

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



JURANDI GONÇALVES DE OLIVEIRA

**EFEITOS FISIOLÓGICOS DA FOTOINIBIÇÃO
DA FOTOSSÍNTESE EM PLANTAS JOVENS DE
CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.).**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
<i>Jurandi Gonçalves de Oliveira</i>
aprovada pela Comissão Julgadora.
<i>22/02/00</i>

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Celso Novaes Magalhães

Co-Orientador: Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves

UNIDADE	B. c
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	0142
V.	Ex.
TOMBO BC/	40859
PROC.	278100
C	☐
D	☒
PREÇO	\$11,00
DATA	09/04/00
N.º CPD	

CM-00139669-0

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Oliveira, Jurandi Gonçalves de

O14e Efeitos fisiológicos da fotoinibição da fotossíntese em plantas jovens de cafeeiro (*Coffea arabica L.*)/Jurandi Gonçalves de Oliveira. -- Campinas, SP: [s.n.], 2000.
180f: illus.

Orientador: Antônio Celso N. Magalhães
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1.

1. Fluorescência. 2. Café. 3. Fotossíntese. I. Magalhães, Antônio Celso N. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 22/02/2000

Banca Examinadora

Titulares:

Prof. Dr. Antônio Celso Novaes Magalhães (Orientador)

Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves (Co-Orientador)

Pedro Luís da Costa Aguiar Alves

Profa. Dra. Cristina Generosa de Senna Queiroz

Cristina Generosa de Senna Queiroz

Prof. Dr. Eduardo Caruso Machado

Eduardo Caruso Machado

Prof. Dr. Ladaslav Sodek

Ladaslav Sodek

Prof. Dr. Paulo Mazzafera

Paulo Mazzafera

Suplentes:

Profa. Dra. Cláudia Regina Baptista Haddad

Dra. Rogéria Pereira de Souza

*"... não ter medo de nenhuma careta
que pretende assustar ..." (Beto Guedes)*

*Aos meus pais,
aos meus irmãos,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela oportunidade de realização deste trabalho.

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

Ao Professor Dr. Antônio Celso Novaes Magalhães, pela orientação dinâmica, confiante e sempre otimista, pela amizade, pela compreensão e pela consideração pessoal.

Ao Professor Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves, pelo apoio, pelas valiosas sugestões, pela atenção dedicada neste trabalho, pela amizade e consideração pessoal.

Aos Professores Dra. Cristina Generosa de Senna Queiroz, Dr. Eduardo Caruso Machado e Dr. Paulo Mazzafera, pela leitura atenciosa e pelos valiosos comentários.

Aos Professores do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, pela colaboração, e aos colegas, pela convivência agradável e enriquecedora.

Aos meus pais José Faustino de Oliveira e Iza Gonçalves de Oliveira, meus eternos professores.

Aos amigos Juverlande e Rosana Lugli e a toda sua família, pela amizade e consideração e pelo infundável apoio.

Aos funcionários do Departamento, pelo apoio e pela colaboração.

A todos os meus colegas e amigos que, na grandeza do anonimato, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Banca Examinadora.....	i
Agradecimentos.....	iii
Índice.....	iv
Abreviaturas.....	viii
Resumo.....	x
Summary.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. A temperatura de resfriamento afetando a cultura do cafeeiro.....	1
1.2. A quantificação do estresse por baixa temperatura <i>in</i> vivo.....	3
1.3. O emprego da fluorescência da clorofila <i>a</i> na avaliação do estresse sobre a atividade fotossintética....	5
1.3.1. Os sinais de fluorescência.....	9
1.4. Baixa temperatura afetando a atividade fotossintética.....	12
1.5. Alta densidade de fluxo de fótons afetando a atividade fotossintética.....	15
1.6. Fotoinibição, fotoproteção e capacidade de recuperação.....	15
1.7. O efeito da fotoinibição sobre o PS _{II}	19
2. Objetivos.....	22
3. Materiais e Métodos.....	23
3.1. Obtenção das plântulas.....	23
3.2. Ajustamento da metodologia.....	24

3.2.1.	Escolha da unidade de amostragem.....	24
3.2.2.	Escolha do fluxo de fótons fotossintéticos..	28
3.3.	Aplicação dos tratamentos.....	30
3.3.1.	Efeitos da temperatura de resfriamento sobre o aparelho fotossintético de plântulas de cafeeiro...	30
3.3.2.	Avaliação da sensibilidade ao resfriamento durante o processo de enverdecimento de folhas cotiledonares de plântulas de cafeeiro.....	32
3.3.3.	Efeitos da temperatura de resfriamento na susceptibilidade de plantas jovens de cafeeiro à fotoinibição.....	33
3.4.	Cinética de fluorescência da clorofila a.....	35
3.4.1.	Medidas de fluorescência para o estudo dos efeitos da temperatura de resfriamento sobre o aparelho fotossintético de plântulas de cafeeiro...	38
3.4.2.	Medidas de fluorescência para a avaliação da sensibilidade ao resfriamento durante o processo de enverdecimento de folhas cotiledonares de plântulas de cafeeiro.....	39
3.4.3.	Medidas de fluorescência para o estudo dos efeitos da temperatura de resfriamento na susceptibilidade de plantas jovens de cafeeiro à fotoinibição.....	40
3.5.	Conteúdo de pigmentos.....	40
3.5.1.	Conteúdo de pigmentos no estudo dos efeitos da temperatura de resfriamento sobre o aparelho	

fotossintético de plântulas de cafeeiro.....	41
3.5.2. Conteúdo de pigmentos na avaliação da sensibilidade ao resfriamento durante o processo de enverdecimento de folhas cotiledonares de plântulas de cafeeiro.....	41
3.6. Peroxidação lipídica.....	42
3.6.1. Peroxidação de lipídios no estudo dos efeitos da temperatura de resfriamento sobre o aparelho fotossintético de plântulas de cafeeiro.....	43
3.6.2. Peroxidação de lipídios na avaliação da sensibilidade ao resfriamento durante o processo de enverdecimento de folhas cotiledonares de plântulas de cafeeiro.....	44
4. Resultados.....	45
4.1. Efeitos da temperatura de resfriamento sobre o aparelho fotossintético de plântulas de cafeeiro.....	45
4.2. Avaliação da sensibilidade ao resfriamento durante o processo de enverdecimento de folhas cotiledonares de plântulas de cafeeiro.....	61
4.3. Efeitos da temperatura de resfriamento na susceptibilidade à fotoinibição.....	85
5. Discussão.....	106
5.1. Efeitos da temperatura de resfriamento sobre o aparelho fotossintético de plântulas de cafeeiro.....	106
5.2. Avaliação da sensibilidade ao resfriamento durante o	

processo de enverdecimento de folhas cotiledonares de
plântulas de cafeeiro.....116

5.3. Efeitos da temperatura de resfriamento na
susceptibilidade de plantas jovens de cafeeiro à
fotoinibição.....128

6. Conclusões.....135

7. Literatura Citada.....136

Apêndice.....158

ABREVIATURAS

Área	Área acima da curva de fluorescência, entre F_0 e F_M
ATP	Adenosina trifosfato
Clo <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
Clo <i>b</i>	Clorofila <i>b</i>
C_{x+c}	Carotenóides
Clo <i>a/b</i>	Relação entre Clo <i>a</i> e Clo <i>b</i>
Clo $a+b/C_{x+c}$	Relação entre as clorofilas (<i>a</i> e <i>b</i>) e os carotenóides
D_1	Proteína D_1
DFFF	Densidade de fluxo de fótons fotossintéticos
dV/dt_0	Fluorescência variável relativa
F_0	Fluorescência inicial
F_M	Fluorescência máxima
F_V	Fluorescência variável
F_V/F_M	Relação entre as fluorescências variável e máxima
F_V/F_0	Relação entre as fluorescências variável e inicial
<i>I</i>	Terceiro transiente da fluorescência
<i>J</i>	Segundo transiente da fluorescência
MDA	Malondialdeído
NADPH ₂	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato no estado reduzido
<i>O</i>	Primeiro transiente da fluorescência

O_2^-	Radical ânion superóxido
1O_2	Oxigênio no estado singleto
P	Transiente correspondente à fluorescência máxima
P_{680}	Clo a especial do centro de reação do PS_{II}
P_{680}^+	Clo a especial do centro de reação do PS_{II} no estado oxidado
$^3P_{680}$	Clo a especial do centro de reação do PS_{II} no estado triplete
Pheo	Feofitina
PMF	Peso da matéria fresca
PQ	Plastoquinona
PQH_2	Plastoquinona reduzida, ou plastoquinol
PS_I	Fotossistema I
PS_{II}	Fotossistema II
PVPP	Polivinil Polipirrolidona
Q_A	Quinona a
Q_A^-	Quinona a, no estado reduzido
Q_B	Quinona b
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
T_{FM}	Tempo para ocorrência de F_M
$t/2$	Tempo necessário para o acúmulo da metade do conteúdo máximo dos pigmentos
Y_z	Resíduo do aminoácido tirosina

RESUMO

A espécie *Coffea arabica* é considerada sensível às baixas temperaturas, podendo ser afetada em todo o seu ciclo. Essa espécie, principalmente na fase jovem, quando exposta à luz, após um período sob baixa temperatura, se torna mais sensível. Considerando a importância econômica da cultura cafeeira como item de exportação e ocupação de mão de obra agrícola no país, e reconhecendo que o cultivo do cafeeiro é afetado pela sazonalidade dos eventos climáticos adversos, dentre eles as temperaturas de resfriamento, a proposta deste trabalho justifica-se não só pelos aspectos de investigação básica, como também pelas aplicações agronômicas que oferece, subsidiárias para os estudos visando o melhoramento genético desta cultura.

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da temperatura de resfriamento na atividade do PS_{II} e na susceptibilidade à fotoinibição, através do estudo da cinética de fluorescência da clorofila *a*, e a participação dos pigmentos cloroplastídicos na tolerância e na capacidade de recuperação dos danos sofridos pelo tecido fotossintetizante de plantas jovens de cafeeiro.

A temperatura de resfriamento inibiu o acúmulo dos pigmentos cloroplastídicos, alterando a capacidade do tecido fotossintetizante de plântulas estioladas de cafeeiro em captar e transferir a energia luminosa até os centros de reação do PS_{II} . Consequentemente, houve uma redução na eficiência de

utilização da energia quântica por parte do PS_{II} . O resultado foi uma atenuação da fluorescência emitida e redução (com exceção para F_0) no tempo de ocorrência dos transientes, provavelmente, em resposta a uma menor concentração de clorofila *a* e às limitações no fluxo de elétrons através do PS_{II} .

Houve uma tendência de aumento no empilhamento dos tilacóides, ou seja, uma maior organização do conteúdo de membranas dos cloroplastos com o aumento no conteúdo dos pigmentos cloroplastídicos. Quando as plantas foram submetidas ao tratamento de resfriamento, o estresse causado pelo frio gerou um desarranjo no aparelho fotossintético, induzindo uma queda no nível de empilhamento (organização) das membranas que constituem os tilacóides e, conseqüentemente, na eficiência quântica do PS_{II} . Com a mudança da temperatura de 10 para 25°C, houve um aumento no nível de organização das membranas dos tilacóides e, apesar da síntese dos pigmentos ter sido inibida em mais de 50% após o tratamento de resfriamento, a eficiência quântica do PS_{II} foi restabelecida.

Os resultados indicaram uma redução generalizada na eficiência quântica do PS_{II} quando as plântulas de cafeeiro foram mantidas no escuro. A redução ocorreu tanto nas plântulas submetidas ao tratamento de resfriamento, quanto no material controle. Isso demonstra que não apenas a temperatura de resfriamento estaria atuando como causa dessas alterações na

atividade do PS_{II} . É provável que tenha ocorrido um esgotamento das reservas do tecido, com a taxa respiratória excedendo à fotossintética, já que essa era nula, uma vez que a energia de excitação esteve comprometida pela permanência das plântulas no escuro.

As plantas de cafeeiro que foram submetidas ao tratamento fotoinibitório ($2500 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$), após o tratamento de resfriamento, sofreram um dano maior no aparelho fotossintético. Nessas plantas, a recuperação da eficiência quântica do PS_{II} foi muito inferior a das plantas mantidas em 25°C .

Conclui-se que a manutenção da integridade das membranas dos tilacóides pela ação protetora dos pigmentos cloroplastídicos é fundamental, mais que a concentração desses, para a conservação de alta eficiência quântica do PS_{II} . O tecido fotossintetizante após tratamento de resfriamento não foi capaz de recuperar plenamente a sua atividade quando as plantas foram expostas à densidade de fluxo de fótons fotossintéticos de $2500 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$.

SUMMARY

The *Coffea arabica* species is considered sensitive to chilling throughout its growth cycle, in view of the many forms of damage caused by this phenomenon. This species, especially at younger stages, when exposed to light, becomes more sensitive after a period under lower temperatures. Considering the economic importance of coffee such as export and employment of agricultural labour, and recognising that the coffee crop is subject to adverse seasonal effects, extreme temperatures included, the present investigation may be justified not only through basic aspects, but also by agronomic applications which offer information for breeding programs.

The aim of this research was to analyse the effects of chilling on the activity of PS_{II} and the susceptibility of photoinhibition through a kinetic study of chlorophyll *a* fluorescence; study the participation of chloroplast pigments in tolerance; and determine the capacity of recovery from the damages suffered by the photosynthetic tissues of young coffee plants.

The result of this investigation showed that chilling inhibited the accumulation of the chloroplast pigments and caused an alteration in the capacity of the photosynthetic tissues of etiolated seedlings of coffee to capture and transfer light energy to the reaction centres of PS_{II} . The result was an attenuation of emitted fluorescence and a

reduction (except for F_0) of the time of transient occurrence. Probably, this is a consequence of a lower chlorophyll *a* concentration and a limitation of electron flow through PS_{II} .

In this investigations, the observed results also show a tendency for increased stacking of thylakoids, that is a grater organisation of chloroplast membrane contents. When the plants were submitted to chilling, the resulting stress created a disorder of the photosynthetic apparatus, inducing a decrease in the level of stacking (organization) of membranes which form the thylakoides and, consequently, affecting the PS_{II} quantum yield. On changing the temperatures from 10 to 25°C, there was a increase in the level of membrane organization and, in spite of pigment synthesis being inhibited more than 50% after chilling, PS_{II} quantum yield was restored.

There was a generalised reduction in the PS_{II} quantum yield when the coffee seedling was kept in the dark. The reduction occurred both in seedlings submitted to chilling as in the controls. This showed that chilling was not the only cause of these PS_{II} activity alterations. It is probably that the tissues ran out of reserves, with a respiratory rate exceeding photosynthesis, since the latter was zero, due to suppressed excitation energy of the seedlings kept in the dark.

The coffee plants submitted to photoinhibition after chilling, suffered greater damage to the photosynthetic

apparatus. The recovery of PS_{II} quantum yield was lower for plants treated at 25°C.

Based on these results it may be concluded that maintenance of thylakoid membrane integrity through the protective action of the chloroplast pigments is more important than their concentration, for the maintenance of high PS_{II} quantum yield. The photosynthetic tissue was unable to fully recover its activity when plants were submitted to treatment with high photon flux density (2500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$), after applying chilling treatments to these plants.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A temperatura de resfriamento afetando a cultura do cafeeiro

A exploração econômica da cultura do cafeeiro, espécie *Coffea arabica* L., está limitada às regiões onde a temperatura média anual varia entre 18 e 22°C (Bauer et al., 1985). Essa espécie é considerada sensível às baixas temperaturas (Levitt, 1980; Bauer et al., 1985), apresentando diminuição ou paralisação do crescimento e desenvolvimento (Smillie et al., 1988), estando sujeita ainda as diversas injúrias provocadas por ela. Com referência ao cafeeiro, os estudos sobre os mecanismos que modulam os processos de tolerância ou susceptibilidade são bastantes escassos (Bauer et al., 1985).

No Brasil, a cultura tem grande importância econômica, tanto como fonte de divisas pela exportação, como pela geração de empregos. Entretanto, sua produção é fortemente afetada pela sazonalidade dos eventos climáticos adversos, dentre eles as temperaturas de resfriamento (abaixo de 12°C), fenômeno comum em muitos locais de elevada altitude nas regiões produtoras do país, como Sul de Minas Gerais e Norte do Paraná, por exemplo.

Outro aspecto cultural da espécie sujeito às intempéries se refere à produção de mudas em viveiro. Estas quando expostas às baixas temperaturas podem não resistir aos danos causados pela disfunção metabólica desencadeada pelo fator estressante.

As mudas de cafeeiro no campo, como em outras espécies lenhosas de origem tropical, são particularmente sensíveis à fotoinibição (Castro et al., 1995). A associação entre baixas temperaturas e alta luminosidade atua sinergisticamente intensificando a susceptibilidade à fotoinibição.

As mudas de cafeeiro produzidas em regiões de elevada altitude adquirem um fator de tolerância às baixas temperaturas - "endurecimento" - porém aquelas que não estiverem adaptadas à essas condições certamente sofrem danos.

Segundo Öquist (1983) as plantas crescidas sob baixa temperatura geralmente possuem uma maior capacidade fotossintética quando submetidas à temperatura de resfriamento, se comparadas com outras crescidas sob temperaturas mais altas. A razão para isso estaria no controle estomático da assimilação do CO₂, além de alterações em alguns processos fotossintéticos no âmbito dos cloroplastos.

Segundo Schöner & Krause (1990) folhas aclimatadas a baixa temperatura apresentam maior atividade de certas enzimas antioxidantes. Haveria também uma alteração na composição dos pigmentos foliares conferindo maior capacidade de tolerar os efeitos provenientes da condição estressante.

Esse fator de tolerância pode significar uma seleção natural dos indivíduos, haja vista que no campo as condições para a ocorrência de uma moderada fotoinibição são comuns (Greer & Laing, 1992; Ögren & Rosenqvist, 1992; Lovelock et al., 1994). Para Fahl et al. (1994) ocorre com frequência o

estresse por fotoinibição no cafeeiro, em particular, quando da transferência de plantas jovens, crescendo em viveiro, para condições de pleno sol.

A capacidade das plantas de tolerar estresse por resfriamento tem sido estudada como um importante fenômeno de adaptação ecofisiológica, sendo objeto de intensas pesquisas no campo da biologia vegetal, com desdobramentos em várias áreas de aplicação agrônômica (Bauer et al., 1985; Smillie et al., 1988; Andrews et al., 1995; Alonso et al., 1997; Queiroz et al., 1998).

1.2. A quantificação do estresse por baixa temperatura *in vivo*

Em termos genéricos, a injúria pelo frio se caracteriza pela inibição do processo fotossintético (Hodgson & Raison, 1989; Andrews et al., 1995), na alteração das funções celulares (Graham & Patterson, 1982) e, em condições extremas, na deterioração dessas funções, podendo resultar na morte da planta. Algumas injúrias provocadas pelo resfriamento apresentam sintomas evidentes, como a clorose das folhas, sugerindo que houve a destruição dos pigmentos fotossintéticos (Muruyama et al., 1990; Brüggemann & Linger, 1994). Segundo Smillie & Hetherington (1983), há um rápido decréscimo da taxa de crescimento abaixo de 20°C, o crescimento cessa entre 8 e 14°C e ainda, abaixando mais a temperatura, pode resultar em desordens fisiológicas permanentes, de acordo com a extensão do

estresse sofrido. Porém, antes dessas evidências, numerosas mudanças no metabolismo celular podem ser detectadas, incluindo alterações nas propriedades físicas das membranas celulares, interrupção da mobilidade protoplasmática, descontrole do movimento de eletrólitos através das membranas e alterações na atividade respiratória (Smillie & Hetherington, 1983).

Trabalhos experimentais mais recentes indicam que o estresse por frio se expressa quando do desencadeamento de processos de peroxidação dos lipídios das membranas celulares, causando alterações na sua fluidez (Merzlyak, 1994; Alonso et al., 1997; Queiroz et al., 1998). Os eventos bioquímicos mais relevantes, ligados às modificações da fluidez das membranas, incluem mudanças na atividade das enzimas e perda da compartimentação celular.

Além desses efeitos, o resfriamento dos tecidos pode acarretar distúrbios metabólicos que resultam em esgotamento nutricional, alterações na respiração e, conseqüentemente, ruptura do balanço de energia das células (Greer et al., 1991).

O balanço hídrico entre as raízes e a parte aérea também é prejudicado com o abaixamento da temperatura nas plantas sensíveis ao resfriamento. Temperaturas abaixo de 15°C reduzem a absorção de água pelas raízes (Bauer et al., 1985). Conseqüentemente, a condutância estomática, agora menor, contribuirá para a queda na assimilação do CO₂.

Por razões de natureza termodinâmica é de se esperar uma queda na atividade fotossintética em condições de baixa temperatura. Em muitas espécies a atividade fotossintética responde sensivelmente a temperatura de resfriamento. Várias enzimas do ciclo de Calvin são reprimidas nessas condições (Sassenrath & Ort, 1990).

Embora haja métodos para definir estresse (Lichtenthaler, 1996), a quantificação do seu efeito nas plantas é mais difícil. Os sintomas visíveis, como mencionado anteriormente, são freqüentemente manifestações tardias da injúria provocada pelo estresse e muitas vezes de difícil medição. Apesar da quantidade de dados de pesquisa nesta área, os fenômenos fisiológicos atuantes sobre a atividade fotossintética não são suficientemente conhecidos, devido, principalmente, às limitações metodológicas, que exigem a utilização de técnicas de avaliação mais rigorosas dos processos sob investigação. Por outro lado, análises bioquímicas podem diagnosticar precocemente, mas serem muito dispendiosas numa grande amostragem, dificultando em muito o seu uso corrente. O ideal é que o método para avaliação do nível de injúria pelo estresse seja rápido, de boa sensibilidade e não destrutivo para o tecido analisado.

1.3. O emprego da fluorescência da clorofila a na avaliação do estresse sobre a atividade fotossintética

As propostas mais recentes para o estudo das respostas das plantas submetidas a condições extremas de temperatura consideram o uso de técnicas menos invasivas, que permitem uma extrapolação dos resultados para as condições naturais. O emprego dos sinais de fluorescência emitidos pela clorofila *a* (*Clo a*), *in vivo*, tem contribuído bastante para desvendar e monitorar os efeitos de estresse ambiental na fotossíntese (Andrews et al., 1995) ou mesmo na seleção de cultivares com menor suscetibilidade à fotoinibição induzida por baixas temperaturas (Björkman & Demmig, 1987).

Usada como "sonda" para a atividade fotossintética a clorofila ligada às membranas cloroplastídicas emite um sinal de comprimento de onda longo, na faixa do vermelho, a fluorescência. Esse sinal emitido pela *Clo a*, após a excitação da molécula, pode ser registrado como uma variação de sua intensidade em função do tempo de emissão. Uma amostra de tecido fotossintético (folha, suspensão de cloroplastos, suspensão de algas ou cianobactérias), após um período de adaptação no escuro, apresenta mudanças características na intensidade da fluorescência da *Clo a* quando iluminada com luz contínua. Essas mudanças, chamadas de indução da fluorescência, transientes da fluorescência ou ainda, efeito Kautsky podem ser divididas em duas etapas; uma rápida (o primeiro segundo de emissão) e outra lenta (a partir de um segundo, até a estabilização da emissão com cerca de dois minutos de duração).

Esses transientes são sinais qualitativos de certas etapas da fase fotoquímica, que iniciam com a captação da energia luminosa pelo complexo antena, se desenvolvem com o transporte de elétrons pelos diversos "trocadores" de elétrons, até culminarem no centro de reação do PS_{II}, com o evento fotoquímico - redução de um receptor e oxidação de um doador - mediado por uma molécula de Cló a especial, P₆₈₀ (Figura 1). Alterações no rendimento da fluorescência de acordo Demmig & Björkman (1987) refletem indiretamente as modificações que estariam ocorrendo no metabolismo fotossintético.

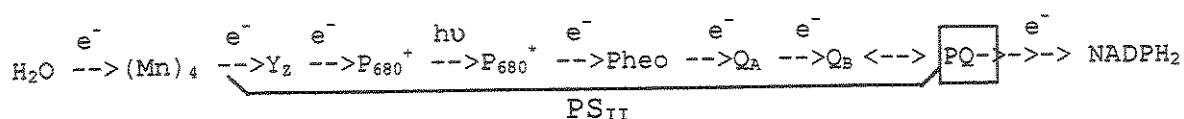


Figura 1 - Representação esquemática da transferência de elétrons através do PS_{II}.

De acordo com a figura 1, Mn representa o complexo de oxidação da H₂O, com o íon manganês em seus quatro estados redox (S₀-S₄) possíveis; Y_Z é um resíduo do aminoácido (Tyr) da proteína D₁ do PS_{II}, responsável pela transferência dos elétrons vindos da oxidação da H₂O para a redução de P₆₈₀⁺ (centro de reação no estado oxidado); P₆₈₀^{*} representa o centro de reação do PS_{II}, no estado excitado após absorção da energia, hν, dos fótons capturados; Pheo, feofitina - uma molécula de Cló a modificada (sem o átomo central de Mg, do anel tetrapirrólico),

recebe os elétrons de P_{680}^+ transferindo-os para a primeira quinona (Q_A) considerada o primeiro aceitador (estável) de elétrons da cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos; Q_B , a segunda quinona envolvida no transporte eletrônico, é repostada pelo estoque de PQ. Em suma, os elétrons originados da oxidação da H_2O , após fluírem através do PS_{II} , serão utilizados, após várias outras etapas de oxi-redução, para a formação de um poder redutor ($NADPH_2$), substrato do ciclo de redução fotossintética do carbono, o Ciclo de Calvin.

O estudo da cinética da fluorescência da Clo *a* é um bom instrumento para se avaliar a atividade fotossintética, com a grande vantagem de ser um procedimento não invasivo (revisões, Krause & Weis 1991; Govindjee 1995). Desde os tempos de Kautsky, os transientes da fluorescência da Clo *a* têm sido usados como uma ferramenta sensível e não destrutiva para monitorar vários processos na fotossíntese (Govindjee & Satoh, 1986).

De acordo com Murata & Fork (1975) as membranas dos tilacóides contêm moléculas de clorofila atuando como sondas intrínsecas de fluorescência, cujo padrão de emissão é um sensível indicador da integridade dessas membranas.

Cerca de 90% da fluorescência origina-se da Clo *a* do PS_{II} , refletindo os processos primários da fotossíntese, como captação de luz, distribuição e transferência da energia de excitação (Krause & Weis, 1984, 1991). Parte dessa fluorescência emitida seria uma resposta às mudanças na

atividade do PS_{II} (Krause et al., 1982, Öquist & Ögren, 1985). Tendo em vista a relação funcional do PS_{II} para com os outros componentes do aparelho fotossintético, a emissão de fluorescência é usada como um indicador indireto do processo fotossintético como um todo. Para Schreiber (1983) e Xu et al. (1989), existe uma correlação entre a emissão de fluorescência da Clo a e as reações fotoquímicas primárias. Essas reações dependem do estado de oxi-redução de Q_A, o receptor primário do PS_{II}, e do gradiente de prótons (H⁺) intermembrana.

1.3.1. Os sinais de fluorescência

A fluorescência inicial (F₀) reflete o estado da Clo a da antena. O complexo coletor de luz - antena - é formado por proteínas integrais associadas às Clo's (a e b) e aos carotenóides; esse complexo é responsável pela captura de fótons e transferência da excitação até os pigmentos associados ao PS_{II} (Bowyer & Leegood, 1997).

De acordo com Bolh r-Nordenkampf & Öquist (1993) F₀ é uma medida para a distribuição inicial da energia, antes da excitação migrar para o centro de reação (P₆₈₀) do PS_{II}.

Os elétrons capturados pelo complexo antena serão transferidos, através do PS_{II}, até o receptor primário de elétrons Q_A.

Quando toda quinona Q_A estiver reduzida à Q_A⁻ pelos elétrons transferidos a partir do P₆₈₀, a fluorescência emitida será máxima (F_M) (Straser et al., 1995).

A diferença entre F_M e F₀ é chamada de fluorescência variável, F_V (F_V = F_M - F₀). Para Georgieva & Yordanov (1993) a F_V

fluorescência é usada como um indicador indireto do processo fotossintético como um todo. Para Schreiber (1983) e Xu et al. (1989), existe uma correlação entre a emissão de fluorescência da Clo *a* e as reações fotoquímicas primárias. Essas reações dependem do estado de oxi-redução de Q_A , o receptor primário do PS_{II} , e do gradiente de prótons (H^+) intermembrana.

1.3.1. Os sinais de fluorescência

A fluorescência inicial (F_0) reflete o estado da Clo *a* da antena. O complexo coletor de luz - antena - é formado por proteínas integrais associadas às Clo's (*a* e *b*) e aos carotenóides; esse complexo é responsável pela captura de fótons e transferência da excitação até os pigmentos associados ao PS_{II} (Bowyer & Leegood, 1997).

De acordo com Bolh r-Nordenkampf &  uist (1993) F_0 é uma medida para a distribuição inicial da energia, antes da excitação migrar para o centro de reação (P_{680}) do PS_{II} .

Os elétrons capturados pelo complexo antena serão transferidos, através do PS_{II} , até o receptor primário de elétrons Q_A .

Quando toda quinona Q_A estiver reduzida à Q_A^- pelos elétrons transferidos a partir do P_{680} , a fluorescência emitida será máxima (F_M) (Straser et al., 1995).

A diferença entre F_M e F_0 é chamada de fluorescência variável, F_v ($F_v = F_M - F_0$). Para Georgieva & Yordanov (1993) a F_v

se origina da população de pigmentos do PS_{II} e se mostra sensível à taxa de transporte de elétrons através dos centros de reação desse e às mudanças na ultraestrutura da membrana do tilacóide.

A razão entre a fluorescência variável e a máxima (F_v/F_m) é amplamente empregada na interpretação dos sinais da emissão de fluorescência (Powles, 1984; Krause & Weis, 1984, 1988 e 1991; Georgieva & Yordanov, 1993; Srivastava et al. 1995) como uma medida da eficácia dos centros de reação na utilização dos fótons capturados em reações fotoquímicas primárias, no PS_{II} . Fatores de estresse afetando o funcionamento do PS_{II} , reduzem o valor de F_v/F_m (Krause & Weis, 1988; Somersalo & Krause, 1988).

De acordo com Schindler & Lichtenthaler (1994), as mudanças na fluorescência variável (acima de F_0) são melhor caracterizadas a partir da razão F_v/F_0 . Segundo os autores essa razão exibe uma amplitude muito maior que a razão F_v/F_m .

Os transientes "OJIP"

A interpretação dos sinais de fluorescência em estudos para avaliação dos efeitos ambientais (como temperatura, luz, disponibilidade de água, etc) sobre o funcionamento do aparelho fotossintético têm evoluído bastante (Krause & Weis, 1984, 1988, 1991; Schreiber, 1983; Powles, 1984; Bolh r-Nordenkamp &  quist, 1993; Schindler, & Lichtenthaler, 1994; Govindjee, 1995; Srivastava et al., 1995; Strasser et al., 1995; Strasser, 1997).

No início da década de 90, os pesquisadores Strasser e Govindjee, utilizando um fluorímetro não modulado, observaram a presença de duas inflexões entre os transientes *O* e *P*, e propuseram a nomenclatura dos transientes *O-J-I-P* (ou F_0JIP) para designar os sinais da emissão de fluorescência (Govindjee 1995). Strasser et al. (1995) verificaram com a logaritmização da escala do eixo das abscissas, o qual representa o tempo de emissão do sinal de fluorescência, uma nova inflexão do sinal entre "*O*" e "*I*". Essa inflexão, chamada de "*J*", foi descrita pelos autores como mais um transiente na cinética de fluorescência da *Clo a*. Sendo conhecida como "*O-J*", representa a etapa fotoquímica da fotossíntese dependente da intensidade luminosa, mais precisamente, a redução de Q_A para Q_A^- , a partir da reoxidação do centro de reação do PS_{II} .

A subida do sinal de fluorescência entre "*O*" e "*J*" reflete uma concentração, momentânea, do receptor primário de elétrons Q_A no estado reduzido (Q_A^-), tendo como causa provável uma limitação por parte da segunda quinona transportadora de elétrons (Q_B) em "aceitar" os elétrons transferidos por Q_A , além, também, da influência causada pelo lado doador do fotossistema II (Hsu, 1993).

Os transientes "*J-I-P*" correspondem à fase não fotoquímica da fotossíntese, mas ainda sob influência da acumulação de Q_A^- . Quando toda Q_A estiver no estado reduzido (Q_A^-), a fluorescência atinge o transiente "*P*".

De acordo com Strasser et al. (1995), a segunda inflexão ("I") na subida da fluorescência se deve a heterogeneidade no lado aceitador do PS_{II}, que pode ser atribuído a: a) uma mistura de diferentes estados redox de Q_B (com maior ou menor aptidão para se oxidar) b) tipos bioquimicamente variados de PS_{II}. Estas características heterogêneas resultariam numa alteração na capacidade de redução do *pool* de plastoquinonas (PQ); em certos casos o *pool* de PQ seria mais rapidamente reduzido que em outros casos.

Todos os transientes, de "O" a "P", passando por "J" e "I", são influenciados pelo fotossistema I (PS_I), o destino dos elétrons que partem do PS_{II}. Os transientes nada mais são do que o reflexo da eficiência em que os elétrons, transferidos a partir da oxidação da água, do lado doador do PS_{II}, serão utilizados do lado aceitador, por Q_A, Q_B e pelo *pool* de PQ.

1.4. Baixa temperatura afetando a atividade fotossintética

Os centros de reação do PS_{II} são, obviamente, bem protegidos contra efeitos adversos do meio (baixa temperatura, luz em excesso, deficiência hídrica, nutricional, etc.), só começando a senti-los quando esta capacidade de proteção for superada. O efeito do estresse sobre a atividade fotossintética manifesta-se de diferentes formas, sempre culminando com a perda na eficiência do aparelho fotossintético em utilizar a

energia dos fótons para produzir trabalho químico (NADPH_2 , ATP e, em última análise, carboidratos).

A temperatura é um dos principais fatores que controla a atividade de formação e funcionamento do aparelho fotossintético. Quanto ao aspecto de formação do aparelho fotossintético, sabe-se que a aclimação de plantas à baixa temperatura requer uma reestruturação bioquímica (Lynch & Steponkus, 1987) e física (Steponkus, 1984) das membranas celulares para aumentar a fluidez dessas. Geralmente se observa um aumento no conteúdo de lipídios, particularmente fosfolipídios, além de um aumento no grau de insaturação das cadeias dos ácidos graxos (Sikorska & Kackperska-Palacz, 1979). Porém, a exposição das plantas a uma condição fotoinibitória (alta radiação), acrescido de uma pré-exposição à baixa temperatura, poderá alterar a estrutura das membranas. Para Hariyadi & Parkin (1993) alterações nas membranas se dão a partir da peroxidação lipídica pela ação das espécies reativas de oxigênio gerados pelo fator estressante, como por exemplo, a baixa temperatura. Uma vez que ânions superóxido (O_2^-) são produzidos no ambiente dos cloroplastos, na presença de luz (Elstner, 1982), as cadeias de ácidos graxos das membranas dos tilacóides (ricas em poli-insaturação) estão altamente vulneráveis à peroxidação. Essas membranas, se mostram como um potencial sítio de ação da fotoinibição dependente de baixas temperaturas (Hodgson & Raison, 1991).

A degradação de ácidos graxos poli-insaturados pela peroxidação produz íons peróxido e malondialdeído (MDA), induzindo um aumento na rigidez das membranas (Steponkus, 1984). Um aumento excessivo da rigidez das membranas pode ocasionar a morte das células.

Portanto, mudanças na concentração de MDA pode ser um bom indicador da integridade estrutural das membranas cloroplastídicas de plantas submetidas à baixa temperatura (Hodgson & Raison, 1991).

Em termos funcionais, temperaturas baixas, acima de zero, afetam sobremaneira a transferência de energia entre os diversos trocadores de elétrons que constituem a cadeia transportadora de elétrons fotossintéticos. Afetam, também, a fosforilação acoplada ao transporte de elétrons fotossintéticos, as enzimas do ciclo de redução do carbono no estroma, além dos mecanismos de transporte dos produtos fotossintéticos a partir dos cloroplastos (Öquist, 1993).

O transporte de elétrons de Q_A até $NADP^+$ através dos domínios da matriz lipídica (no estado gélido) das membranas dos tilacóides, pode ser inibido pela baixa temperatura (Georgieva & Yordanov, 1993). Com o abaixamento da temperatura, muitos padrões de oxi-redução dos trocadores de elétrons são modificados, podendo haver o acúmulo de alguns receptores na forma reduzida, pela queda nas taxas de reoxidação desses "transportadores" de elétrons.

1.5. Alta densidade de fluxo de fótons afetando a atividade fotossintética

Um outro fator determinante em todo o processo fotossintético, que pode conduzir a um ganho ou perda na eficiência das reações fotoquímicas dos centros de reação, é a quantidade de energia radiante que atinge o complexo coletor de luz dos fotossistemas.

A luz desempenha um papel importante na regulação de inúmeras enzimas cloroplastídicas, podendo, quando em excesso, desencadear distúrbios nos processos associados às atividades fotossintéticas.

Alta intensidade de luz pode, em condições aeróbicas, catalisar a geração de espécies reativas de oxigênio (como o radical ânion superóxido, O_2^-), altamente danosas à integridade e funcionalidade celular (Wise & Naylor, 1987a,b).

1.6. Fotoinibição, fotoproteção e capacidade de recuperação

Uma iluminação de alta intensidade (Powles, 1984), associada a baixas temperaturas (Smillie et al., 1988), sobre o tecido fotossintetizante conduz a uma série de reações de estresse, conhecidas como fotoinibição. A capacidade fotossintética é prejudicada, com reflexos no crescimento das plantas e na produtividade (Powles, 1984).

Em geral, a fotoinibição causa diminuição na eficiência de liberação fotossintética do O_2 e induz a alterações nas reações

fotoquímicas associadas à Clo *a* (Krause & Weis, 1991). Nas plantas sensíveis à fotoinibição, ocorrem alterações bioquímicas e fisiológicas, que resultam na perda da integridade das membranas (as lamelas dos tilacóides) cloroplastídicas (Wright & Simon, 1973).

Baker et al. (1994) associaram a fotoinibição a um processo dependente de temperatura e de luz, que resulta no decréscimo na eficiência de utilização da energia dos fótons capturados, em reações fotoquímicas nos fotossistemas (I e II).

Quando submetidas à condições de alta irradiância, muitas plantas superiores, principalmente aquelas de origem tropical, sofrem inibição da fotossíntese devido à incapacidade dos tecidos clorofilados de dissipar o excesso de energia radiante, resultando na fotoinibição (Osmond, 1981; Long, 1983; Baker et al., 1994).

Para Osmond (1994), a fotoinibição se manifesta quando ocorre uma queda prolongada da eficiência quântica do PS_{II}.

A fotoinibição é um processo que está associado a inúmeros fatores endógenos e do ambiente, que invariavelmente causam danos aos sistemas de membranas. No caso dos fenômenos fotossintéticos, as alterações mais importantes ocorrem nos tilacóides, incluindo os domínios lipídicos e protéicos das membranas, resultando no decréscimo da eficiência de utilização da energia dos fótons capturados nas reações fotoquímicas (Baker et al., 1994).

O dano fotossintético pode ser reparado por mecanismos próprios, intrínsecos a cada espécie, de acordo com sua maior ou menor sensibilidade às temperaturas de resfriamento (Hall & Rao, 1995). Dwivedi et al. (1995) demonstraram que a capacidade de recuperação do dano fotoinibitório, mesmo para aquelas espécies menos sensíveis, é tanto maior quanto menor a extensão do dano.

De acordo com Smillie et al. (1988), a fotoinibição induzida por baixas temperaturas é completamente reversível, e pode representar uma estratégia de proteção aos danos provocados pela energia luminosa absorvida e não utilizada.

Quando a fotoinibição é reversível, ela pode ser considerada como um processo regulatório, protetor, estando sob controle fisiológico (Krause, 1988). Esse estado envolveria modificações do PS_{II}, tornando-o menos eficiente na transdução da energia (Demmig & Björkman, 1987). Como resultado, seria inibido o acúmulo de energia de excitação pelos centros do PS_{II} já no estado reduzido (fechado). Caso contrário, permanecendo o acúmulo de energia, ocorreria danos no centro de reação. A reversibilidade da fotoinibição requer a síntese de novo (turnover) da proteína D₁ (Ohad et al., 1984; Hetherington et al., 1989). Para Baker (1991), estaria havendo de fato fotoinibição somente quando ocorressem danos no centro de reação. A queda, simplesmente, na eficiência quântica do PS_{II} pode significar apenas um reajustamento metabólico induzido por

mudanças na densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF), não se caracterizando nem mesmo num processo de estresse (Lichtenthaler, 1996).

O processo fotoinibitório muitas vezes se resume ao fotodano, uma queda na eficiência quântica provocada por danos no aparelho fotossintético causados pela excessiva DFFF (Walters & Horton, 1993; Osmond, 1994).

Dwivedi et al. (1995) se referem ao processo de queda na eficiência quântica do PS_{II}, como uma repressão (*down regulation*) da fotossíntese, um evento independente da fotoinibição. Esse processo apresenta recuperação plena, não dependente de luz, e pouco influenciada por baixa temperatura. Ao passo que, para esses autores, a recuperação da fotoinibição requer impreterivelmente a presença de luz de baixa intensidade (em torno de 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$) para a reinserção de uma nova unidade da proteína D₁. De acordo com Krause (1994), a completa recuperação da fotoinibição é um processo lento, dependente de baixa DFFF e de temperaturas ideais.

A queda na eficiência da utilização da energia luminosa é tida, também, como uma fotoproteção por Demmig-Adams & Adams (1992). Nesse caso, a energia excedente é dissipada na forma térmica, como calor (Castro et al., 1995). Tal mecanismo de proteção evitaria, dessa forma, a formação de espécies reativas de oxigênio - os radicais livres - extremamente danosos às membranas cloroplastídicas.

Quando a planta se mostra incapaz de recuperar esta queda na eficiência quântica, mesmo após ser mantida por três a quatro dias sob luz moderada, a fotoinibição é considerada crônica (Greer & Laing, 1992).

Nem sempre os sintomas apresentados e as respostas da atividade fotossintética, pós-estresse, permitem uma distinção clara entre essas formas de redução da eficiência quântica provocada pela alta DFFF (Ludlow et al., 1988). O termo fotoinibição muitas vezes é empregado de forma genérica fazendo referências a eventos de fotoproteção ou fotodano.

1.7. O efeito da fotoinibição sobre o PS_{II}

O heterodímero D₁/D₂ é considerado a "espinha dorsal" do centro de reação do PS_{II}. A esse heterodímero se ligam a P₆₈₀, Pheo, Q_A e Q_B. Na proteína D₁, encontra-se um resíduo de tirosina (Tyr 161, mais comumente denominada como Y₂ ou apenas z), o sítio responsável pela doação de elétrons (originados da oxidação da H₂O) para a redução de P₆₈₀⁺ (Ross, 1992; Bowyer & Leegood, 1997).

É de consenso geral considerar o centro de reação do PS_{II} como o alvo primário do processo fotoinibitório. Esse processo inclui um dano funcional no transporte de elétrons através do PS_{II} e um dano estrutural da proteína D₁ do centro de reação (Andersson & Styring, 1991; Barber & Andersson, 1992; Prasil et al., 1992; Aro et al., 1993).

Diversos estudos têm demonstrado que iluminação intensa e contínua pode danificar o transporte de elétrons, tanto no lado doador, como no lado receptor do PS_{II} (Prasil et al., 1992; Anderson & Aro, 1994; Strasser et al., 1995).

No lado doador do fotossistema, a fotoinibição deve provavelmente afetar o funcionamento de Y_z ou de P₆₈₀, enquanto, do lado receptor, o dano funcional estaria na dupla redução (não comum) de Q_A (Setlik et al., 1990; Vass et al., 1992). A Q_A duplamente reduzida é um estado anormal, sendo inativa na mediação da transferência de elétrons para Q_B. A captação de fótons por esse centro de reação (modificado) do PS_{II} pode conduzir à recombinação de P₆₈₀⁺Pheo⁻, levando a formação de ³P₆₈₀ (clorofila no estado tripleto) (Van Miegheem et al., 1992; VASS et al., 1992; Vass & Styring, 1993). Sabe-se que a clorofila no estado tripleto reage com O₂, gerando ¹O₂ (oxigênio no estado singlete), uma molécula altamente reativa (Elstner, 1982).

Vários resultados de estudos (Durrant et al., 1990; Vass et al., 1992; Macpherson et al., 1993) sugerem que o ¹O₂ desempenha importante papel no dano da proteína D₁ mas o mecanismo desse processo ainda não foi totalmente caracterizado. A ação de ¹O₂ pode estar na oxidação de alguns resíduos de aminoácidos (como a histidina responsável pela ligação de P₆₈₀ a D₁), no desencadeamento da formação, em cascata, de outras espécies reativas de oxigênio e, ainda, poderia atacar as duplas ligações entre carbono (-C=C-) de

carotenóides e/ou clorofilas (Barber & Andersson, 1992; De Las Rivas *et al.*, 1992), o que provocaria mudanças estruturais no centro de reação.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos: a) avaliar a participação dos pigmentos fotossintéticos na tolerância de plantas jovens de cafeeiro (*C. arabica* L.) à temperaturas de resfriamento; b) avaliar os efeitos da fotoinibição na atividade do PS_{II} em e c) verificar a capacidade de recuperação do dano fotoinibitório.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das plântulas

Utilizou-se neste trabalho plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) do cultivar Catuaí Amarelo, obtidas a partir de sementes doadas pelo Instituto Agronômico de Campinas - IAC.

As sementes foram descascadas manualmente para a retirada do pergaminho, e em seguida, mergulhadas em água destilada a 40°C. O recipiente contendo as sementes foi mantido em banho-maria de modo que a água que envolvia as sementes permanecesse em temperatura constante (40°C) pelo período de 24 horas. Durante esse período a água destilada foi trocada a cada seis horas. O procedimento de embebição das sementes, como descrito por Oliveira (1995), tem a finalidade de acelerar o processo de germinação das sementes de café.

As sementes, após embebição, foram germinadas em bandejas plásticas contendo vermiculita lavada como substrato. As bandejas foram mantidas em ambiente completamente isento de luz, com a umidade relativa do ar próximo a 80% e temperatura em torno de 25°C, durante o dia, e 20°C, durante a noite. A umidade do substrato foi mantida por meio de irrigações diárias.

As plântulas no início do estágio de "orelha-de-onça" (folhas cotiledonares) foram transplantadas para copos plásticos (500 mL), contendo uma mistura de solo de mata e

areia lavada, devidamente esterilizados, na proporção de 4:1 (v/v). Durante todo o procedimento de transplântio, foi utilizada uma luz verde, garantindo-se, assim, que todas as plântulas permanecessem completamente estioladas. Após essa etapa, todas as plântulas permaneceram em câmara de crescimento (de fabricação própria do departamento de Fisiologia Vegetal) em completa ausência de luz.

3.2. Ajustamento da metodologia

Foram realizados dois ensaios com o objetivo de escolher a unidade de amostragem e a densidade de fluxo de fótons fotossintéticos necessária para induzir um processo fotoinibitório no tecido foliar de plantas jovens de cafeeiro.

Foram utilizadas plantas jovens, de aproximadamente três meses de idade, com cerca de seis pares de folhas definitivas. Essas plantas, obtidas conforme item 3.1., foram conduzidas em câmara de crescimento (de fabricação própria do departamento de Fisiologia Vegetal) com iluminação ($\sim 150 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$) e temperatura ($25^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$, dia/noite) controladas e com fotoperíodo de oito horas. Todas as determinações foram realizadas à temperatura de 25°C .

3.2.1. Escolha da unidade de amostragem

A partir de uma unidade de amostragem composta por um par foliar verificou-se que a concentração dos pigmentos foi

crescente com a idade foliar, com exceção para a clorofila *b* (Clo *b*), cuja concentração não se alterou com a posição do par foliar (Figura 2). Os procedimentos utilizados para a determinação dos pigmentos serão descritos com detalhes no item 3.5.).

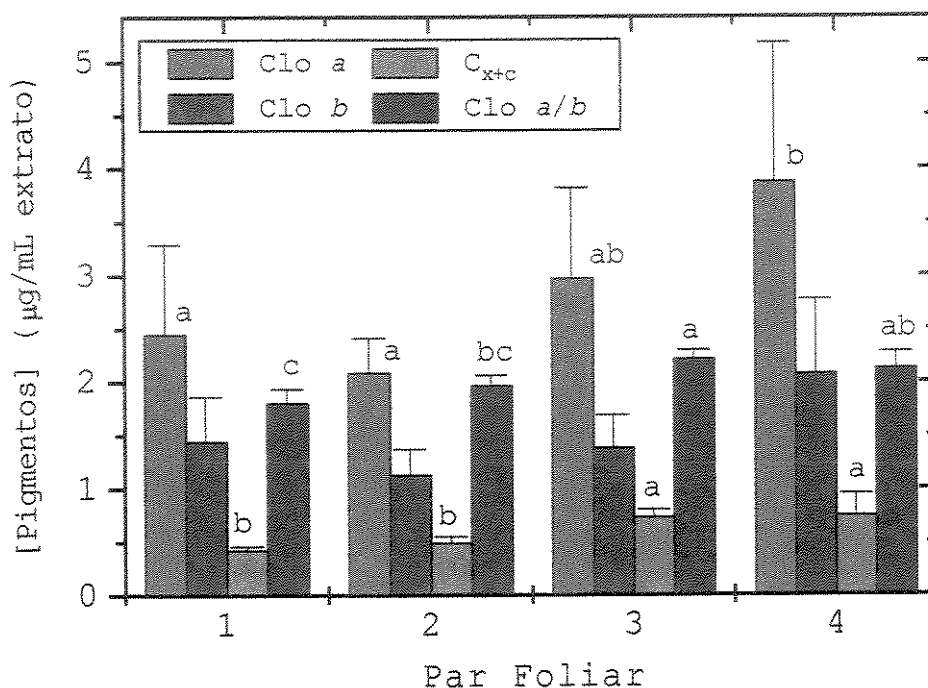


Figura 2 - Concentração de Clo *a*, *b*, e carotenóides, e razão Clo *a/b*, em folhas de plantas de cafeeiro de diferentes idades. O par foliar identificado como 1 se refere ao 1º par de folhas, completamente expandidas, a partir do ápice das plantas. Os valores representam a média de 4 repetições com seus respectivos erros padrões. As barras, para cada variável, identificadas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Nas barras não identificadas com nenhuma letra, a variável em estudo não apresentou significância no teste F

Um fator de organização da atividade dos cloroplastos é o processo de empilhamento das lamelas dos tilacóides com a formação dos grana. Esse processo se correlaciona com a razão Clo *a/b* (Aro et al., 1986; Anderson & Aro, 1994). De acordo com

a figura 2, observou-se uma tendência de aumento nos valores dessa razão a medida que o tecido foliar se apresenta mais maduro no sentido do 1º para o 3º par foliar.

Foi observado que a posição de inserção do par foliar, a partir do ápice (1º ao 3º), influenciou nas determinações de fluorescência. As variáveis avaliadas, fluorescência inicial (F_0), máxima (F_M), variável (F_V) e eficiência quântica do PS_{II} (F_V/F_M) refletiram o processo de acúmulo no conteúdo dos pigmentos. A figura 3 mostra uma diminuição nos valores de F_0 , F_M e F_V e um aumento da eficiência na utilização da energia luminosa pelo PS_{II} - traduzido pela razão F_V/F_M - com o aumento na idade (e organização) do tecido foliar. A razão F_V/F_M , um parâmetro que reflete o comportamento global do aparelho fotossintético, a eficiência quântica do PS_{II} , se correlacionou com o processo de acúmulo dos pigmentos.

A atividade peroxidativa, de forma geral, também aumentou com a maturação do tecido foliar (Figura 4), acarretando o aumento dos níveis de peroxidação lipídica - estimado pela medição da concentração de malondialdeído (MDA - os procedimentos utilizados para sua determinação serão descritos com detalhes no item 3.6.).

Com base nos resultados apresentados até aqui, a unidade amostral foi definida e padronizada como sendo o terceiro par foliar completamente expandido a partir do ápice.

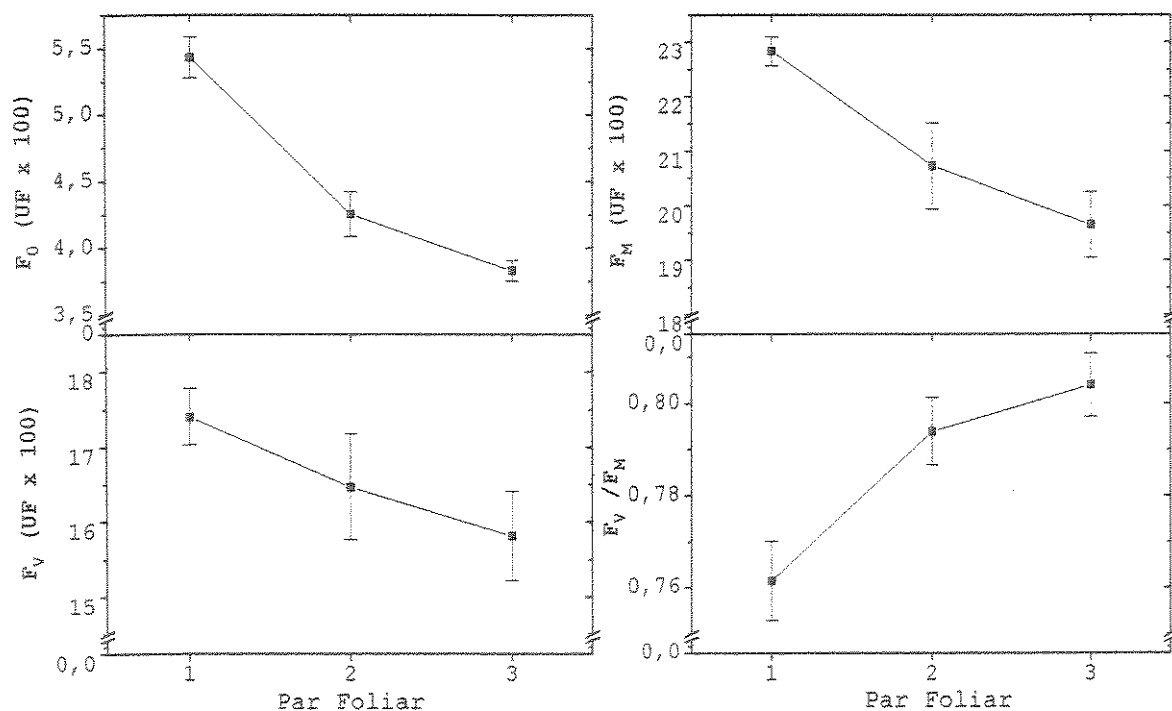


Figura 3 - Alterações em algumas variáveis da cinética de fluorescência da Clo *a* de plantas de cafeeiro em função da idade das folhas. Cada ponto nas curvas representa a média de quatro repetições e as barras indicam o erro padrão.

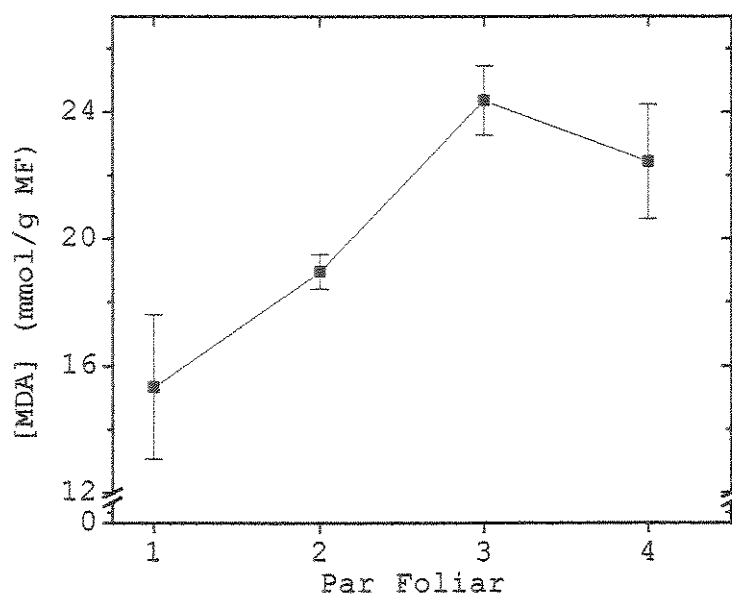


Figura 4 - Efeito da idade foliar na peroxidação lipídica, expressa em termos do conteúdo de MDA acumulado no tecido vegetal. Cada ponto na curva representa a média de quatro repetições e as barras indicam o erro padrão.

3.2.2. Escolha do fluxo de fótons fotossintéticos

Definida a unidade de amostragem, uma folha do terceiro par foliar foi coberta pela metade (no sentido longitudinal), com papel alumínio, mantida portanto no escuro, enquanto a outra era submetida ao tratamento de luz. A metade mantida no escuro foi considerada como o controle. No tratamento de luz, as folhas foram mantidas sob iluminação pelo período de cinco minutos. A figura 5 ilustra a resposta das principais variáveis

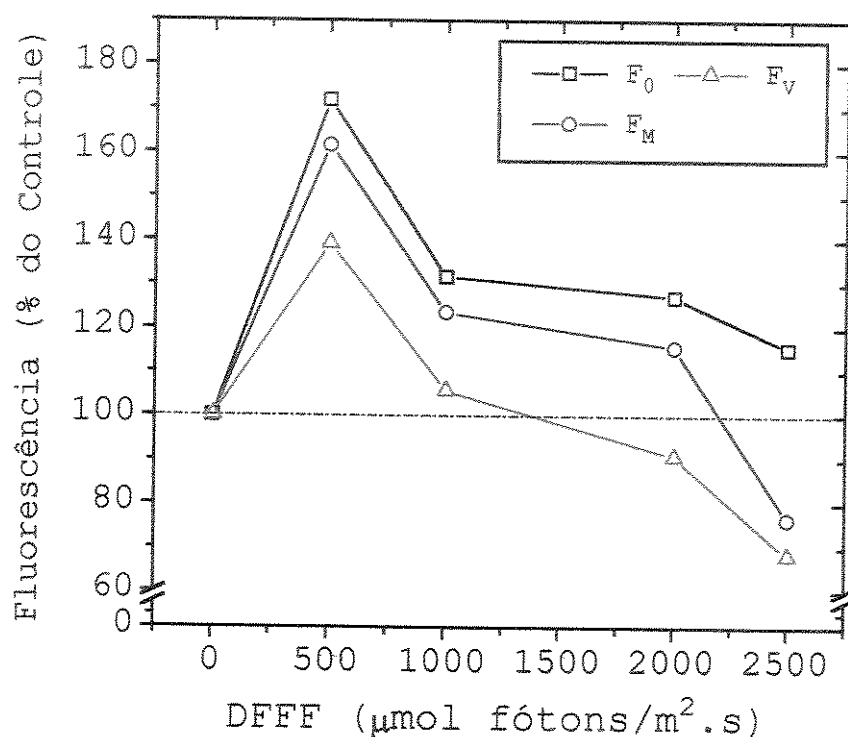


Figura 5 - Fluorescência inicial (F_0), máxima (F_M) e variável (F_V) da Clo *a* em folhas de cafeeiro a 25°C em função da densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF). Os valores estão expressos como porcentagem do controle (100%). Cada ponto representa a média de quatro repetições.

relacionadas à emissão de fluorescência em função da intensidade de radiação aplicada sobre o tecido foliar. Houve um aumento nos valores das variáveis F_0 , F_M e F_V quando se intensificou a

radiação incidente sobre o tecido foliar até o nível de 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$. Esse aumento na emissão de fluorescência teria sido uma consequência direta do aumento dos receptores da energia de excitação, uma vez que foi observado aumento no conteúdo da clorofila total nessa faixa de intensidade luminosa (Figura 6). Com o aumento no fluxo de fótons fotossintéticos, a partir de 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$, observou-se redução no conteúdo de clorofila e na razão F_v/F_m (Figura 6).

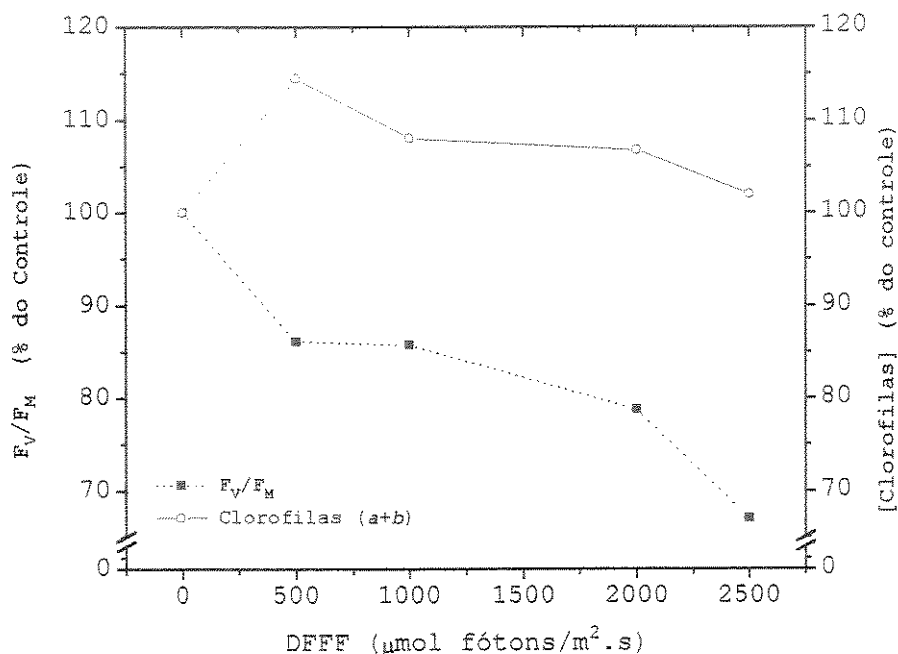


Figura 6 - Eficiência quântica do PS_{II} (F_v/F_m) e teor de clorofila total em folhas de cafeeiro a 25°C em função da DFFF. Os valores estão expressos como porcentagem da controle (100%). Cada ponto representa a média de quatro repetições.

A partir de 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$, a atividade fotossintética começou a ser afetada, com redução generalizada nas variáveis da fluorescência (Figura 5). A redução de F_v/F_m demonstra a

ocorrência de um processo fotoinibitório em desenvolvimento, a medida que se aumentou a densidade de fluxo de fótons fotossintéticos incidente sobre o tecido foliar.

Com base nesse ensaio, para garantir a indução da fotoinibição nas folhas do cafeeiro, padronizou-se 2500 μmol fótons/ $\text{m}^2.\text{s}$ como sendo a DFFF a ser utilizada.

3.3. Aplicação dos tratamentos

3.3.1. Efeitos da temperatura de resfriamento sobre o aparelho fotossintético de plântulas de cafeeiro

Plântulas no estágio de orelha-de-onça foram transferidas para câmaras de crescimento (de fabricação própria do laboratório de Fisiologia Vegetal), sob luz de baixa intensidade ($80 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$), com fotoperíodo de oito horas. A temperatura foi controlada ($25^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$, dia/noite) até a aplicação do tratamento de resfriamento.

Uma semana após a transferência, as plântulas iniciaram a acumulação de pigmentos verdes; após três semanas elas se encontravam totalmente pigmentadas.

Durante esse período, as plântulas foram adubadas, uma vez por semana, com solução nutritiva (Hoagland & Arnold, 1951) e a umidade do substrato mantida com regas diárias. Semanalmente, os copos plásticos foram trocados de posição sobre a mesa da câmara de crescimento. Esse sistema de rodízio teve o intuito

de uniformizar a interceptação de luz por parte das folhas cotiledonares e minimizar qualquer diferença na DFFF da câmara de crescimento sobre as plantas.

O material vegetal, ainda com apenas o par de folhas cotiledonares, porém já pigmentadas, foram transferidas para câmaras de crescimento (FORMA SCIENTIFIC Inc., modelo 24), com temperaturas previamente ajustadas de acordo com o tratamento ($10 \pm 3^{\circ}\text{C}$ - tratamento de resfriamento e $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ - controle). O material vegetal permaneceu no escuro, sob essas temperaturas, por vinte dias, tempo de duração do ensaio.

Nesse período, os copos plásticos foram colocados sobre bandejas contendo água, mantendo-se o nível da água na altura dos dois primeiros centímetros a partir da base do copo. Por capilaridade, a umidade do substrato foi mantida próxima à capacidade de campo. A água das bandejas foi trocada periodicamente para evitar que a temperatura da mesma prejudicasse a absorção de água pelas raízes.

Foram avaliados a cinética de fluorescência da Clo *a*, o conteúdo de pigmentos e a peroxidação lipídica, com amostragens feitas em intervalos de dois e quatro dias para os tratamentos de 10 e 25°C , respectivamente, com quatro repetições representadas por quatro ensaios independentes.

3.3.2. Avaliação da sensibilidade ao resfriamento durante o processo de enverdecimento de folhas cotiledonares de plântulas de cafeeiro

As plântulas no estágio de orelha-de-onça utilizadas nesse ensaio, foram mantidas, nos copos plásticos, na mesma sala da germinação das sementes por cerca de 20 dias após o transplântio. O ambiente foi mantido completamente no escuro. A temperatura foi controlada (25°C/20°C, dia/noite) até a aplicação do tratamento de resfriamento.

As regas e adubações dos substratos durante as três semanas que precederam à aplicação do tratamento seguiram a mesma rotina descrita anteriormente.

Para o tratamento de enverdecimento, as plântulas no estágio de orelha-de-onça, completamente despigmentadas, foram transferidas para câmaras de crescimento (FORMA SCIENTIFIC Inc., modelo 24), com DFFF constante (150 $\mu\text{mol/m}^2.\text{s}$) e temperatura controlada, de acordo com o tratamento.

O material vegetal foi submetido ao processo de enverdecimento sob dois tratamentos de temperatura: 10 e 25°C. Após oito dias a 10°C, a temperatura da câmara foi elevada para 25°C.

Foram avaliados a cinética de fluorescência da Clo *a*, o conteúdo de pigmentos e a peroxidação lipídica com amostragens feitas em intervalos de dois dias até o décimo dia, a partir do qual este intervalo passou para quatro dias. O ensaio foi

conduzido com quatro repetições representadas por quatro ensaios independentes.

3.3.3. Efeitos da temperatura de resfriamento na susceptibilidade de plantas jovens de cafeeiro à fotoinibição.

As plântulas em estágio de orelha-de-onça foram mantidas em câmaras de crescimento com iluminação ($\sim 150 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$) e temperatura ($25^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$, dia/noite) controladas e com fotoperíodo de oito horas.

As regas e adubações dos substratos, bem como o rodízio dos copos, seguiram a mesma rotina descrita anteriormente.

As plantas foram mantidas nessas condições por aproximadamente quatro meses, apresentando cerca de seis pares de folhas definitivas no ramo ortotrópico no momento da aplicação dos tratamentos.

Durante este período de condução das plantas, a infestação de pragas (cochonilhas) foi controlada com aplicações de óleo mineral (solução de 1%, v/v), sempre que necessárias.

As plantas foram transferidas para câmaras de crescimento (FORMA SCIENTIFIC Inc., modelo 24), ajustadas para temperaturas de $10 \pm 3^\circ\text{C}$ ou $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de oito horas, com uma DFFF de $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$, para aplicação dos tratamentos de temperaturas.

As plantas foram envolvidas em sacos plásticos transparentes, presos na base dos copos, para evitar a perda

excessiva de água. A irrigação foi mantida conforme descrito no item 3.3.1.

O tratamento com temperatura controlada foi mantido por dez dias, após os quais as plantas foram submetidas ao tratamento com alta DFFF.

Para o tratamento com alta DFFF, foi utilizado um projetor de eslaides associado a um balão volumétrico de dois litros contendo água (Figura 7).

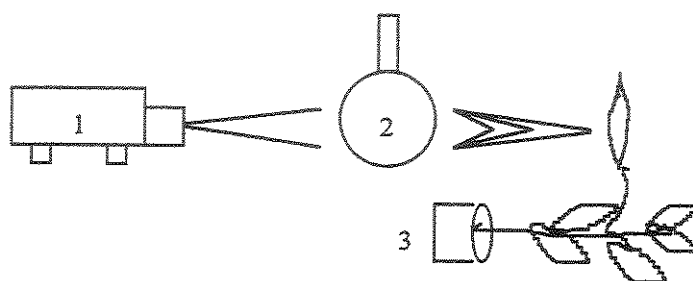


Figura 7 - Esquema da montagem experimental empregada na aplicação do tratamento com alta DFFF, onde: 1) projetor de eslaides; 2) balão volumétrico e 3) posicionamento da amostra.

Este conjunto proporcionou a concentração da DFFF na superfície foliar em $2500 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$, sem a interferência do calor gerado pela fonte de energia luminosa. A unidade de amostragem foi composta do terceiro par de folhas completamente expandidas a partir do ápice. Uma das folhas do par foliar foi envolvida em papel alumínio para evitar a passagem de luz. Esse material foliar que permaneceu no escuro foi considerado como controle do tratamento com alta DFFF. A outra folha do par foi submetida a três tempos de exposição à alta DFFF: 5, 30 e 60

minutos.

A escolha da DFFF de $2500 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$, bem como da posição de inserção do par foliar, foi com base nos ensaios preliminares (ver ajustamento da metodologia).

Neste estudo foi avaliado a cinética de fluorescência da Clo *a*. Após o tratamento com luz, as plantas permaneceram sob baixa intensidade luminosa (cerca de $20 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$) por até 180 minutos, para a recuperação das reações de transferência de elétrons e restabelecimento dos padrões de oxi-redução. As determinações foram realizadas aos 0, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos após a incidência da luz. O ensaio foi conduzido com cinco repetições representadas por cinco ensaios independentes.

3.4. Cinética de fluorescência da clorofila *a*

As determinações relativas à emissão de fluorescência da Clo *a* foram efetuadas à temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) *in vivo* e *in situ* empregando o fluorímetro portátil, PEA (Plant Efficiency Analyser), da HANSATECH INSTRUMENTS Ltda.

Nesse aparelho, a fonte de luz para excitação utiliza um conjunto de seis diodos com emissão de luz de alta intensidade (LEDs). Esse sistema de LEDs permite a rápida emissão de luz de alta intensidade (máxima de $3000 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$) com baixa emissão de calor. Essa característica é de suma importância na acurácia do sinal de fluorescência inicial (F_0). A luz de emissão do

aparelho está na faixa do vermelho, entre 580 e 700 nm, com pico em 650 nm, permitindo, assim, uma absorção direta pelos cloroplastos.

A luz de excitação utilizada nos ensaios foi padronizada em $2400 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ na superfície da folha, correspondente a 80% da intensidade máxima fornecida pelo aparelho.

O material vegetal foi pré-adaptado no escuro por 30 minutos antes das determinações de fluorescência. A adaptação das folhas no escuro, na realidade, corresponde apenas a uma área circular do limbo foliar, de quatro milímetros de diâmetro. Tal adaptação, obtida por meio de pinças com um sistema de janela, permite a sua abertura, quando da medição, ou fechamento para adaptação ao escuro.

O tempo de 30 minutos é suficiente, para essa espécie, para o "relaxamento" de todo o sistema transportador de elétrons fotossintéticos (Oliveira, 1995), garantindo o estado oxidado dos receptores de elétrons.

A partir do emprego de luz saturante ($2400 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$) e da condição de completo "relaxamento" do sistema, o pico de fluorescência emitido pode ser considerado como F_M .

Foram avaliados as seguintes variáveis da emissão de fluorescência da Clo a: F_0 , F_M , F_V , a área acima da curva de fluorescência compreendida entre F_0 e F_M , e as razões F_V/F_M e F_V/F_0 . A figura 8 ilustra essas variáveis na curva de fluorescência.

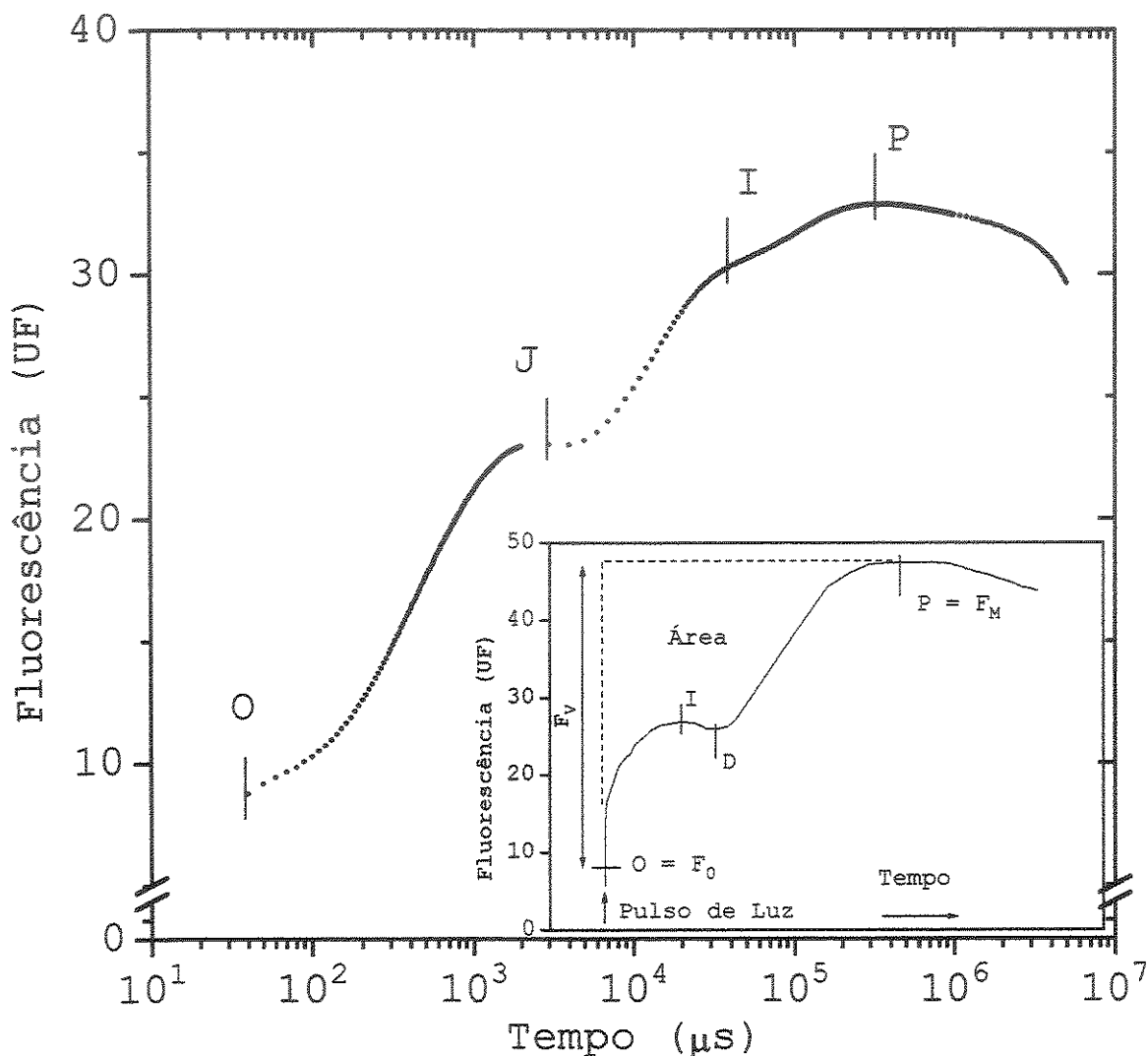


Figura 8 - Cinética da fluorescência da Clo *a* em folhas de cafeeiro (*C. arabica*) seguindo o modelo, proposto por Strasser et al. (1995). No detalhe, a representação da cinética da fluorescência destacando as variáveis, com o eixo X plotado em escala linear. Nesta figura (detalhe) a escala do eixo X foi estendida para melhor apresentação dos transientes.

3.4.1. Medidas de fluorescência para o estudo dos efeitos da temperatura de resfriamento sobre o aparelho fotossintético de plântulas de cafeeiro

As amostragens seguem o descrito no item 3.3.1., as médias e os desvios foram plotados e as curvas obtidas, devidamente ajustadas.

Com o objetivo de expressar, por meio dessas curvas, os efeitos do tratamento de resfriamento proporcionalmente ao controle, foi feita uma relação matemática com as equações das curvas. A equação resultante expressa a resposta, de cada variável, após aplicação do tratamento de resfriamento em porcentagem do controle. Abaixo é dado um exemplo da relação matemática utilizada.

$$\text{Trat. controle} \Rightarrow Y_c = a_c + b_c x + c_c x^2 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\text{Trat. resfriamento} \Rightarrow Y_r = a_r + b_r x + c_r x^2 \quad (\text{Eq. 2})$$

Trat. de resfriamento como porcentagem do controle

$$\Rightarrow Y_s = (Y_r/Y_c) \cdot 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

A equação resultante (3) foi usada para obtenção dos pontos plotados nas figuras que expressam a resposta das variáveis em função do controle (% do controle). A partir desses pontos as curvas foram devidamente ajustadas. As equações com os seus respectivos coeficientes R^2 são apresentadas no apêndice.

3.4.2. Medidas de fluorescência para a avaliação da sensibilidade ao resfriamento durante o processo de enverdecimento de folhas cotiledonares de plântulas de cafeeiro

As amostragens seguem o descrito no item 3.3.2.. Na figura que representa a resposta da razão F_v/F_m , foram destacados com círculos (tratamento controle, 25°C) e quadrados (tratamento de resfriamento, 10°C), oito tempos durante o processo de enverdecimento das plântulas de cafeeiro, para serem interpretados na forma dos transientes "OJIP" da fluorescência. Esses tempos estão representados nos quatro quadros (A, B, C e D) que compõem a figura 34.

Para obtenção dos transientes "OJIP", a escala de tempo de aquisição do sinal de fluorescência foi logaritmizada. Dessa forma, foi possível visualizar os transientes "J" e "I", intermediários entre "O" ou F_0 e "P" ou F_m . De acordo com Strasser et al. (1995), o transiente "O" representa a fluorescência inicial, sendo seu registro padronizado aos 40 μ s da emissão do sinal de fluorescência, eliminando, dessa forma, qualquer interferência eletrônica do aparelho. Os transientes "J" e "I" são definidos por esses autores como sendo o primeiro e o segundo platôs, respectivamente, na subida do sinal entre a fluorescência inicial e a máxima. O transiente "P" representa o ponto máximo de subida do sinal.

A partir da cinética de fluorescência foi calculado o aumento inicial da fluorescência, definido por Strasser et al.

(1995) como $(F_{300\mu s} - F_{50\mu s})/F_0$, onde: $F_{300\mu s}$ e $F_{50\mu s}$ correspondem à fluorescência emitida nos tempos 300 e 50 μs , respectivamente. Ainda, segundo esses autores, essa relação é um bom indicativo da velocidade de redução de Q_A para Q_A^- .

Também foi calculado, a fluorescência variável relativa (dV/dt_0) , definida por Strasser et al. (1995) como: $dV/dt_0 = (F_{300\mu s} - F_{50\mu s}) / (F_M - F_0)$.

3.4.3. Medidas de fluorescência para o estudo dos efeitos da temperatura de resfriamento na susceptibilidade de plantas jovens de cafeeiro à fotoinibição.

As amostragens seguem o descrito no item 3.3.3., as médias e desvios das variáveis F_0 , F_M , F_V , tempo para ocorrência da F_M (T_{Fmax}), área, F_V/F_M e F_V/F_0 , foram plotados e as curvas devidamente ajustadas. As equações com os seus respectivos coeficientes R^2 são apresentados no apêndice.

Nesse ensaio, a cinética de emissão da fluorescência da Clo a foi interpretada, também, segundo a curva polifásica (O, J, I e P) de aumento da fluorescência proposta por Strasser et al. (1995). Para esse estudo, foram considerados os tempos de 0, 5, 30 e 120 minutos.

3.5. Conteúdo de pigmentos

Para as determinações da concentração das Clo's a e b e carotenóides, uma amostra de 50 mg (PMF) do tecido foliar foi

retirada e colocada em tubo de ensaio contendo 5 mL de acetona 80%. Após banho-maria a 70°C por 20 minutos, a amostra foi deixada esfriando no escuro e, em seguida, corrigiu-se o volume dos tubos para os 5 mL iniciais. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro Micronal B390, nos comprimentos de onda 470, 646 e 663 nm, sendo os cálculos realizados segundo procedimento descrito por Lichtenthaler & Wellburn (1983).

3.5.1. Conteúdo de pigmentos no estudo dos efeitos da temperatura de resfriamento sobre o aparelho fotossintético de plântulas de cafeeiro

As amostragens seguem o descrito no item 3.3.1.. A concentração das Clo's *a* e *b* e dos carotenóides (C_{x+c}) foram expressas com relação à concentração desses pigmentos no tecido vegetal no início do ensaio. Para essas determinações foram traçadas as curvas que melhor se ajustaram aos dados. Foram calculadas também, as taxas de acúmulo dos pigmentos.

3.5.2. Conteúdo de pigmentos na avaliação da sensibilidade ao resfriamento durante o processo de enverdecimento de folhas cotiledonares de plântulas de cafeeiro

As determinações foram realizadas em intervalos de dois dias até o décimo dia, a partir do qual este intervalo passou para quatro dias.

As concentrações das clorofilas e dos carotenóides foram

expressas em valores absolutos e relativos ao conteúdo dos pigmentos totais ($C_{lo\ a+b} + C_{x+c}$). A partir das curvas ajustadas foram determinados para cada tratamento: a concentração, o tempo, e o incremento (com relação ao início) no ponto de máximo e de $t/2$ (50% do máximo), de cada pigmento.

Foram determinados, também, a razão $C_{lo\ a}/C_{lo\ b}$ e o espectro de absorção dos pigmentos cloroplastídicos a partir de aliquotas do extrato utilizado para a quantificação dos pigmentos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Bekman DU-70, com varredura entre 400 e 750 nm à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$).

3.6. Peroxidação Lipídica

A estimativa da peroxidação de lipídios das membranas foi determinada pela medida do conteúdo de MDA, um subproduto da peroxidação lipídica, em extratos de tecido foliar.

Foram tomadas amostras de 150 mg (PMF) do tecido foliar. A mesma foi macerada em 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1% na presença de polivinil polipirrolidona (PVPP) na proporção de 1:1,5 (PMF:PVPP). O uso de PVPP se faz necessário para a proteção contra a formação de complexos fenólicos, que poderiam interferir nas leituras de absorbância mascarando os resultados.

O homogenato foi centrifugado a 10.000 RPM por cinco minutos; do sobrenadante retirou-se uma alíquota de 1,0 mL e

misturou-se a 4,0 mL da mistura TCA 20%, contendo TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,5%. Essa mistura foi fervida a 95°C por 30 minutos, seguindo-se de rápido resfriamento em gelo. Após centrifugação a 10.000 RPM, por dez minutos, a amostra foi lida em espectrofotômetro Micronal B390, a 535 e 600 nm. A leitura em 600 nm tem a finalidade de eliminar a interferência dos pigmentos, que podem ter uma pequena absorção também, em 535 nm.

A concentração de MDA foi calculada usando a seguinte equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600}) / (\xi \cdot b)$ onde; ξ (coeficiente de extinção) = $155 \text{ mM}^{-1}/\text{cm}$ e b (comprimento ótico) = 1 cm.

Esse procedimento segue aquele descrito por Dhindsa *et al.* (1981), adaptado de Heath & Packer (1968).

3.6.1. Peroxidação de lipídios no estudo dos efeitos da temperatura de resfriamento sobre o aparelho fotossintético de plântulas de cafeeiro

As amostragens seguem o descrito no item 3.3.1.. A concentração de MDA foi expressa em função do tempo de aclimação aos tratamentos e do conteúdo dos pigmentos totais. Para o tratamento a 10°C, os dados foram ajustados em duas retas, respeitando a dispersão dos mesmos, que se apresentaram em dois grupos distintos: o primeiro, do início ao décimo segundo dia, e o segundo, a partir do 12º dia até o final do ensaio. Para o tratamento a 25°C os dados foram ajustados como

uma reta.

3.6.2. Peroxidação de lipídios na avaliação da sensibilidade ao resfriamento durante o processo de enverdecimento de folhas cotiledonares de plântulas de cafeeiro

Para esse estudo as amostragens seguem o descrito no item 3.3.2..

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos da temperatura de resfriamento sobre o aparelho fotossintético de plântulas de cafeeiro.

A figura 9A mostra, em valores absolutos, o aumento no sinal F_0 em resposta ao período de aclimação. Em termos gerais, observou-se um aumento de F_0 tanto no tratamento de resfriamento, quanto no controle (25°C), apesar do decréscimo inicial (até o 3º ou 7º dia) na curva do tratamento controle e a partir do 16º dia na temperatura de 10°C . Porém, quando os dados

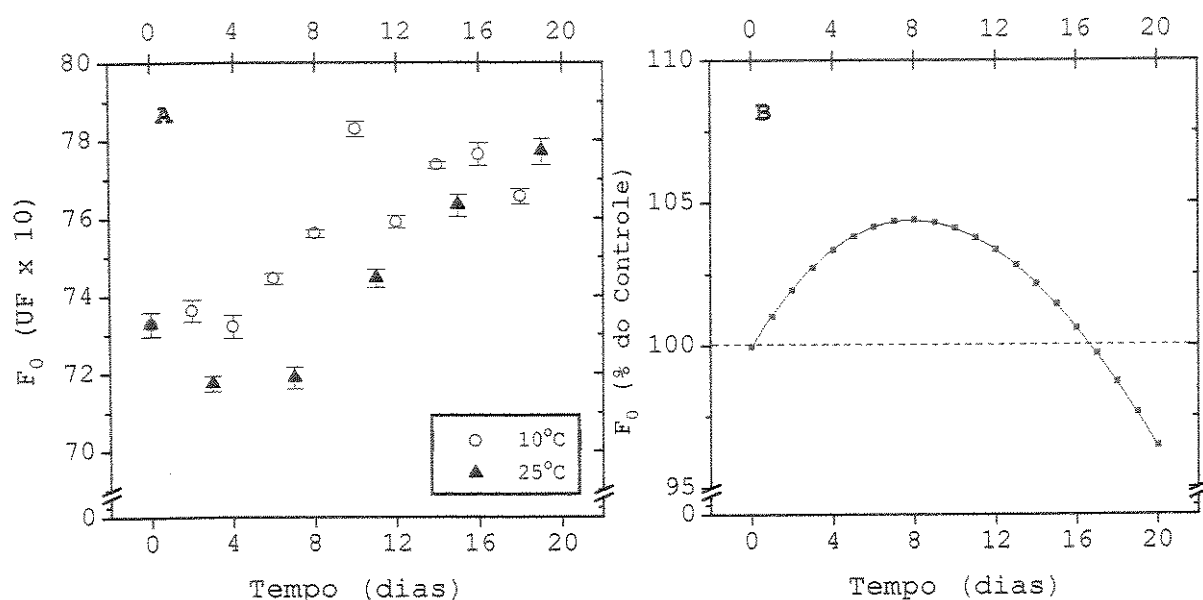


Figura 9 - Fluorescência inicial (F_0) (em unidades de fluorescência - UF) em folhas de cafeeiro, em função do tempo de aclimação às temperaturas de 10 e 25°C (A). A curva da figura B, corresponde ao tratamento de resfriamento com os resultados expressos com base no controle. Cada ponto representa a média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

foram expressos em porcentagem do controle, verificou-se que o aumento em F_0 foi superior nas plântulas tratadas a 10°C ,

durante os primeiros 16 dias do ensaio, atingindo o ponto de máximo em torno do 8º dia (Figura 9B). A partir de então, o aumento de F_0 nas plântulas submetidas ao resfriamento foi cada vez menor (relativamente ao aumento no controle), até ser superado pelos níveis do controle após o 16º dia.

Houve queda nos valores absolutos do sinal de fluorescência máxima para os dois tratamentos em estudo (Figura 10A).

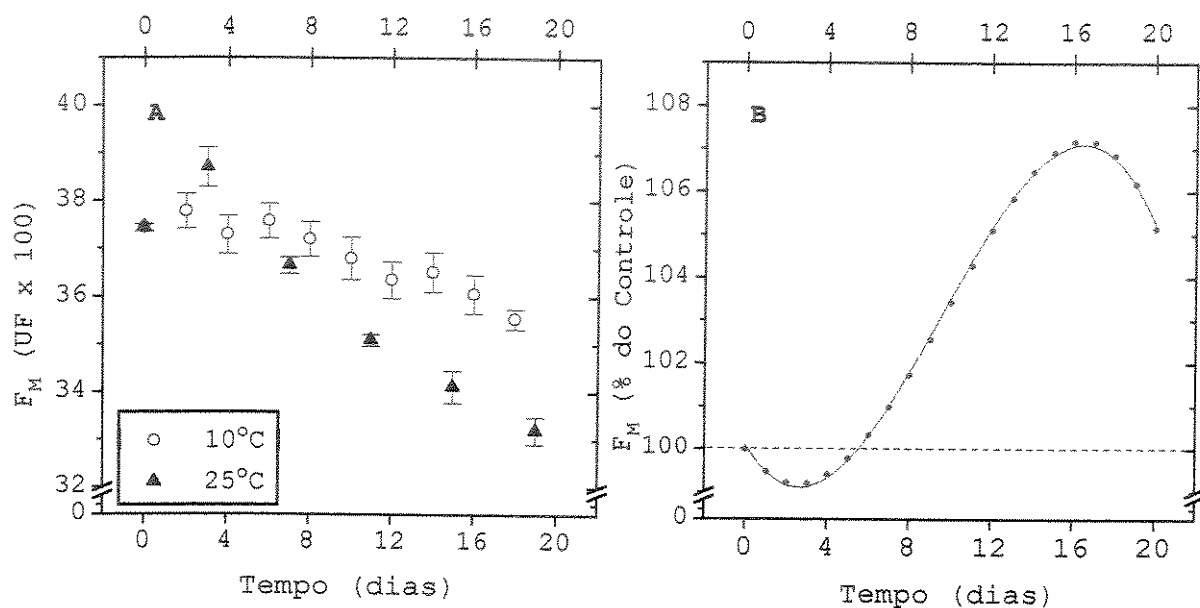


Figura 10 - Fluorescência máxima (F_M) (em unidades de fluorescência - UF) em folhas de café, em função do tempo de aclimação às temperaturas de 10 e 25°C (A). A curva da figura B, corresponde ao tratamento de resfriamento com os resultados expressos com base no controle. Cada ponto nas curvas representa a média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

Os dados do tratamento controle, até o terceiro dia, diferiram do aspecto geral (em queda), sendo esse crescente. Esse padrão de resposta foi semelhante ao observado para a variável F_0 . A F_M em relação ao controle (Figura 10B),

apresentou uma queda até o terceiro dia, a partir do qual ela foi crescente, superando o controle após o sexto dia e atingindo o seu valor máximo por volta do 16º dia, quando iniciou uma queda.

Inesperada foi a queda acentuada no sinal de F_M verificada no tratamento controle após o 3º dia (Figura 10A). Comparado com o valor de F_M no início do tratamento ($F_M=3743$), o sinal no final do tratamento a 25°C caiu pouco mais de 11% (3319), enquanto no tratamento a 10°C essa queda ficou próxima de 5% (3553).

Completando essas observações, a figura 11A demonstra a resposta do *pool* de plastoquinona, representado pela área delimitada entre os sinais F_0 e F_M , em função do tempo de exposição aos tratamentos de temperatura. Nessa, foi constatado a expressiva diferença entre os dados que representam o tratamento de resfriamento com os do controle. O *pool* de plastoquinona à temperatura de 10°C se manteve baixo, variando muito pouco, enquanto no tratamento controle subiu, praticamente dobrando os valores iniciais. Considerando-se os valores relativos (% do controle) do *pool* de plastoquinona (Figura 11B), observou-se queda constante desses valores com o tempo de tratamento a 10°C.

A figura 12A ilustra a queda na razão F_v/F_M com o tempo de aclimação, tanto no tratamento de resfriamento (10°C) quanto

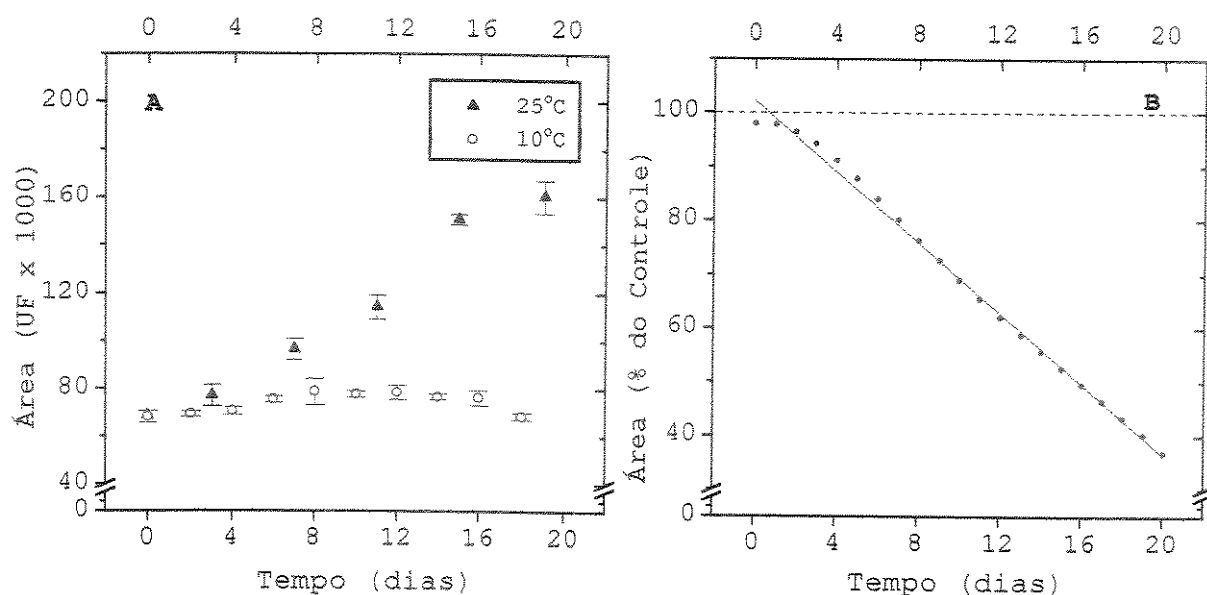


Figura 11 - Alterações na área acima da curva de fluorescência (em unidades de fluorescência - UF) em folhas de cafeeiro, em função do tempo de aclimação às temperaturas de 10 e 25°C (A). A curva da figura B, corresponde ao tratamento de resfriamento com os resultados expressos com base no controle. Cada ponto representa a média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

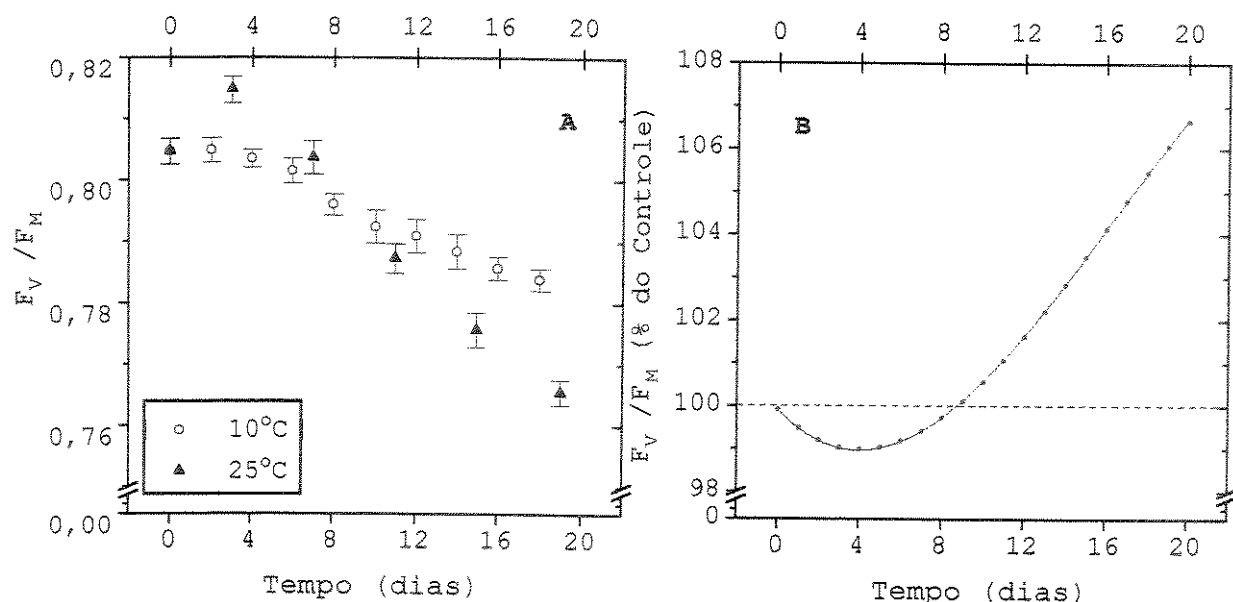


Figura 12 - Eficiência quântica do PS_{II} (F_v/F_m) em folhas de cafeeiro, em função do tempo de aclimação às temperaturas de 10 e 25°C (A). A curva da figura B, corresponde ao tratamento de resfriamento com os resultados expressos com base no controle. Cada ponto representa a média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

no controle (25°C).

As plantas mantidas a 25°C, inicialmente, apresentaram uma eficiência quântica do PS_{II} crescente (até o terceiro dia), quando, então, iniciou-se uma queda. Essa maior eficiência inicial também pode ser comprovada pelo maior fluxo de elétrons, caracterizado pela queda inicial na curva de F_0 (Figura 9A). A partir do terceiro dia, a eficiência quântica no tratamento controle decresceu, aparentemente com taxas constantes, até o final do ensaio.

As plântulas tratadas à temperatura de resfriamento mostraram uma constância na eficiência quântica até próximo ao quarto dia. A partir de então, a razão F_v/F_m começou a decrescer e assim prosseguiu até o fim do experimento. Os valores de F_v/F_m das plantas do tratamento a 10°C estiveram próximos daqueles do controle entre o 6º e o 12º dia, após os quais a redução nas plantas à 25°C foi mais acentuada, se afastando da tendência apresentada pelo material tratado a 10°C (Figura 12A).

A eficiência quântica relativa (% do controle) das plântulas submetidas à temperatura de resfriamento, após uma queda inicial, foi crescente a partir do quarto dia, superando o controle após o nono dia (Figura 12B). Com a queda na eficiência quântica do material controle, a eficiência relativa das plantas tratadas a 10°C aumentou, superando, no final do ensaio, em mais de 6% a eficiência apresentada pelo controle (Figura 12B).

A razão F_v/F_0 apresentou um padrão de resposta semelhante ao da razão F_v/F_m . A curva referente ao tratamento controle (Figura 13A) mostrou um aumento da relação até o terceiro dia, após o qual a mesma sofreu queda constante. Ao final do ensaio (19º dia), a razão F_v/F_0 para o tratamento controle diminuiu pouco mais de 20% do seu valor máximo, uma queda mais acentuada se comparada à da razão F_v/F_m (próximo de 6%).

Com o tratamento à temperatura de resfriamento (Figura 13A), houve redução na razão F_v/F_0 ao longo de todo o período que se desenvolveu o estudo, com redução, assim como aconteceu em F_v/F_m , menor que a do tratamento controle.

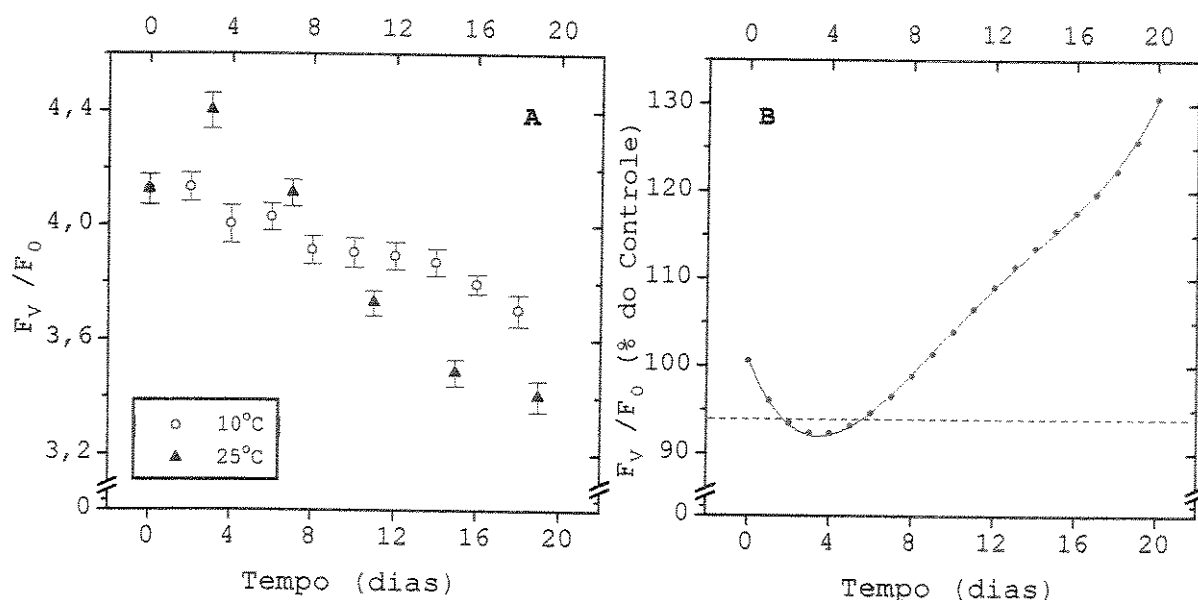


Figura 13 - Alterações na razão F_v/F_0 em folhas de cafeeiro, em função do tempo de aclimação às temperaturas de 10 e 25°C (A). A curva da figura B corresponde ao tratamento a 10°C com os resultados expressos com base no controle. Cada ponto representa a média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

A figura 13B apresenta a variação da razão F_V/F_0 durante o tratamento a 10°C com base no controle (% do controle). O padrão de resposta foi semelhante ao apresentado para a razão F_V/F_M , porém com valores um pouco mais expressivos. Enquanto a queda apresentada por F_V/F_M nos quatro primeiros dias foi de apenas 1% (relativo ao controle) - ainda assim significativo pelo teste de Duncan ($P < 0,05$) - a queda em F_V/F_0 foi cerca de oito vezes maior nesse período. A partir do nono dia, a razão F_V/F_0 apresentou valores acima do controle, chegando a superá-lo em até 30% ao final do experimento. Esse valor foi mais significativo que o apresentado pela razão F_V/F_M . De fato, as duas razões apresentaram uma alta correlação entre si, acima de 99%, independentemente do tratamento aplicado (Figuras 14A e B).

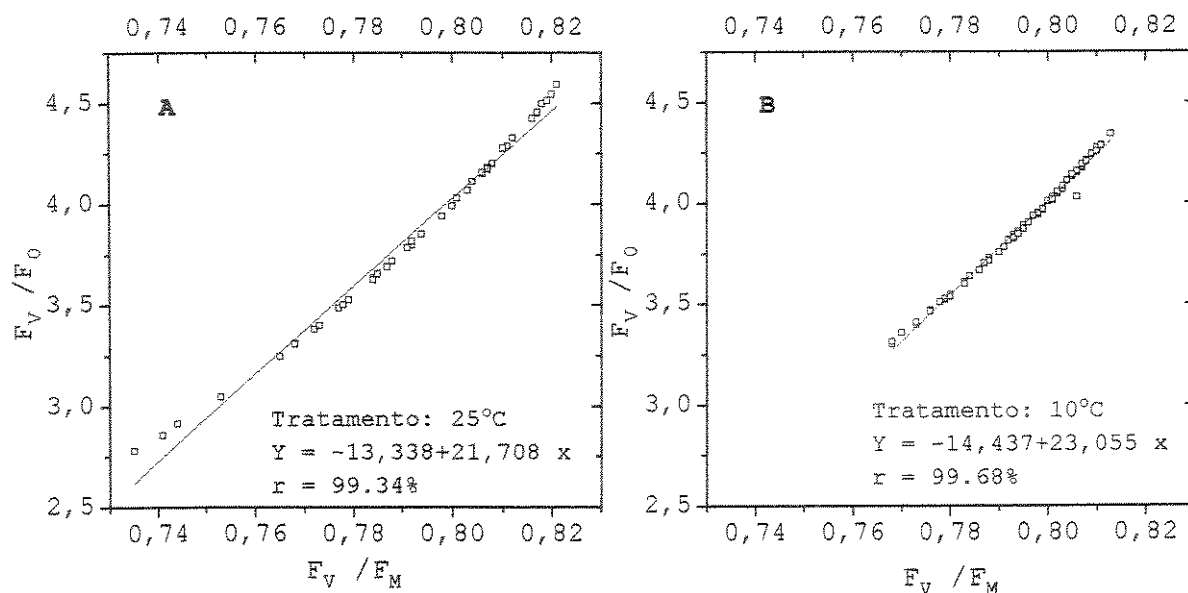


Figura 14 - Correlação entre as razões F_V/F_M e F_V/F_0 medidas em plântulas de cafeeiro, em função do tratameto de temperatura aplicado: (A) controle: 25°C, (B) resfriamento: 10°C.

As figuras 15, 16 e 17 mostram a variação na concentração dos pigmentos fotossintéticos em folhas cotiledonares ("orelha-de-onça") de plântulas de cafeeiro, em resposta ao tratamento de baixa temperatura (10°C) e controle (25°C), ambos no escuro.

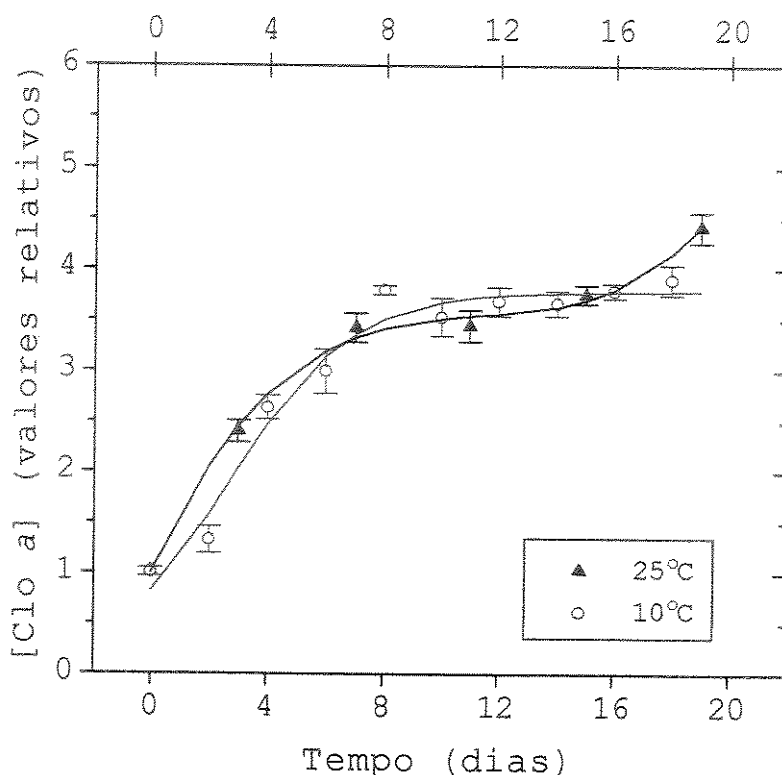


Figura 15 - Alterações na concentração da Clo *a* em plântulas de cafeeiro, em resposta ao tempo de aclimação dos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). Cada ponto corresponde a média de quatro repetições e as barras o erro padrão. A concentração de Clo *a* no tempo 0 é igual a 134,73 µg/g MF.

Para as plântulas mantidas a 25°C, o acúmulo no conteúdo de todos os pigmentos apresentou um padrão semelhante. O ajuste matemático do conteúdo de pigmentos em função do tempo, foi feito através de polinômio do 3º grau, destacando três fases distintas. A partir do início do tratamento, o incremento no conteúdo dos pigmentos deu-se rapidamente até o sétimo dia,

chegando a triplicar (3,42 para Clo a e 3,49 para Clo b) ou mesmo a quase quadruplicar ($\sim 3,72$ para os carotenóides) os seus conteúdos iniciais. Após essa fase inicial, o acúmulo dos pigmentos entrou numa segunda fase, de pequenos incrementos, entre o sétimo e o décimo quinto dia. A terceira fase do processo de enverdecimento ocorreu a partir do 15º dia e se mostrou crescente, até o momento em que se encerrou o ensaio (19º dia) (Figuras 15, 16 e 17).

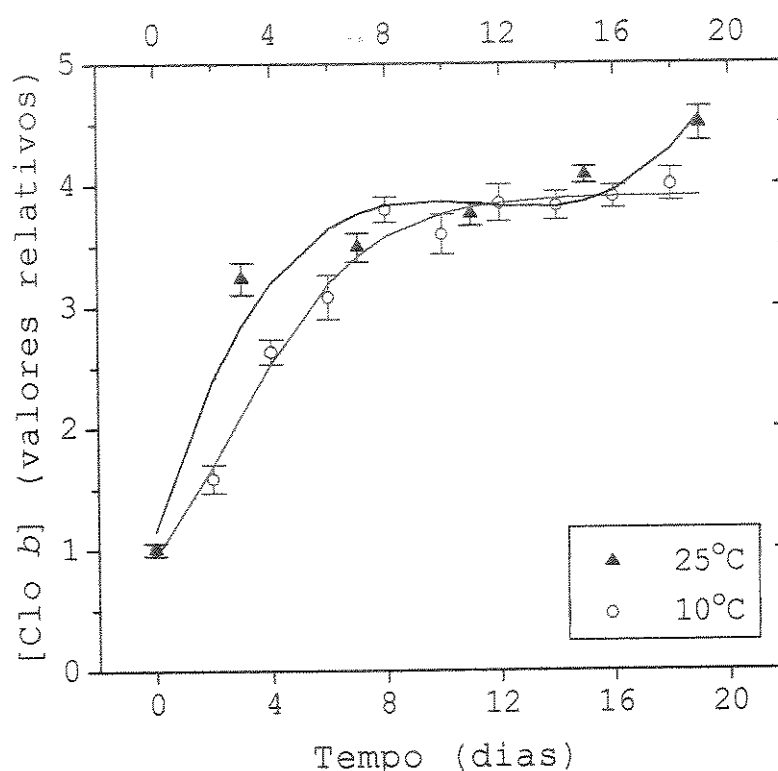


Figura 16 - Alterações na concentração da Clo b em plântulas de café, em resposta ao tempo de aclimação dos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). Cada ponto corresponde a média de quatro repetições e as barras o erro padrão. A concentração de Clo b no tempo 0 é igual a 40,95 µg/g MF.

As taxas de incremento no conteúdo dos pigmentos nessa terceira fase foram superiores às da segunda fase, porém abaixo

daquelas apresentadas na primeira fase (Tabela 1). Nesse período, as plântulas acumularam, tanto para clorofila *a*, *b* e carotenóides cerca de 2/3 do conteúdo total.

A concentração de carotenóides, que inclui carotenos e xantofilas (Figura 17), apresentou o mesmo padrão que o dos pigmentos verdes. Porém, com taxas de acúmulo maiores, principalmente com relação à terceira fase do processo (Tabela 1).

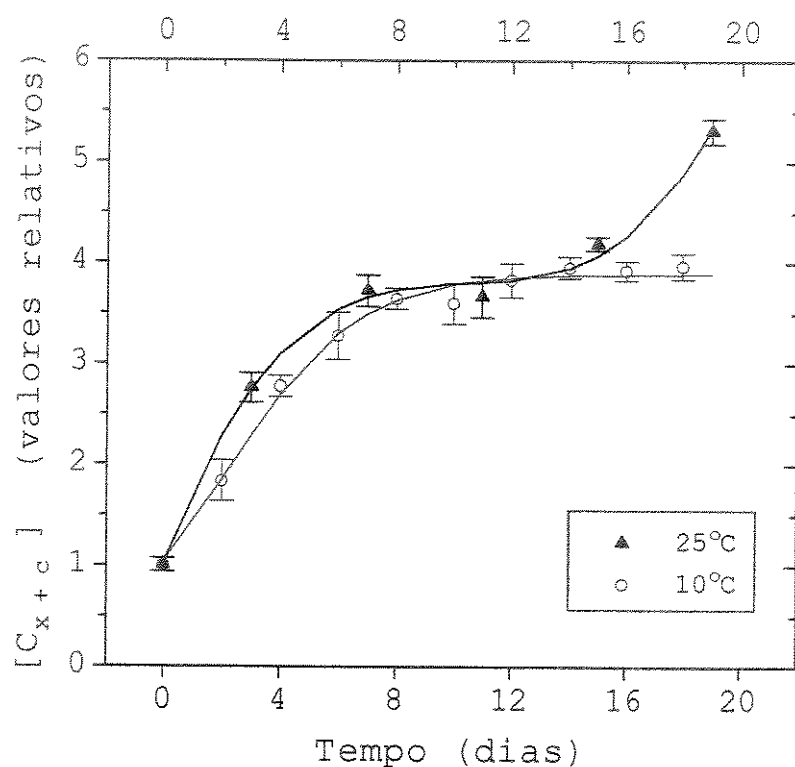


Figura 17 - Alterações na concentração dos carotenóides em plântulas de café, em resposta ao tempo de aclimação dos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). Cada ponto corresponde a média de quatro repetições e as barras o erro padrão. A concentração de C_{x+c} no tempo 0 é igual a 22,64 µg/g MF.

Tabela 1 - Taxa de acúmulo dos pigmentos cloroplastídicos, em folhas cotiledonares de plântulas de cafeeiro, durante o período de aclimação à temperatura de 25°C. Os valores na tabela correspondem à taxa média diária (% do início) de acúmulo dos pigmentos dentro de cada fase.

Pigmento	Intervalo de Tempo de Tratamento (dias)		
	<i>1ª Fase</i> (0 - 7)	<i>2ª Fase</i> (7 - 15)	<i>3ª Fase</i> (15 - 19)
Clo a	34,5	4,0	17,0
Clo b	35,5	7,4	10,5
Carotenóides	39,0	6,0	28,0

Com relação ao tratamento de resfriamento, também foi observada uma semelhança no padrão de acúmulo entre os pigmentos, descrevendo uma curva assintótica, com a estabilização em torno do 8º dia (Figuras 15, 16 e 17). O conteúdo dos pigmentos durante esse tratamento apresentou um intenso ganho nos oito dias iniciais (com taxas médias em torno de 35% ao dia para as clorofilas e 33% para os carotenóides), quando então estabilizou. Ao final dessa fase, o aumento no conteúdo desses pigmentos foi cerca de 3,7 vezes do valor observado no início do tratamento, próximo ao observado para o tratamento controle para esse mesmo período. A segunda fase se iniciou a partir do 8º dia, com o ganho praticamente cessando (taxas de 2% aproximadamente), enquanto nas plântulas controle o acúmulo continuou, principalmente no 19º dia (Figuras 15, 16 e 17).

Com relação ao material vegetal utilizado nesse ensaio, observou-se que inicialmente os valores da razão Clo a/b

corresponderam ao ambiente no qual as plantas se desenvolveram ou seja, na luz; nessas condições, a razão ficou próxima de 3,3 (Figura 18). Com o decorrer do tempo de aplicação dos tratamentos (10 e 25°C), houve uma redução nessa razão, passando de 3,3 para próximo de 2,9 no 12º dia. Porém, a partir

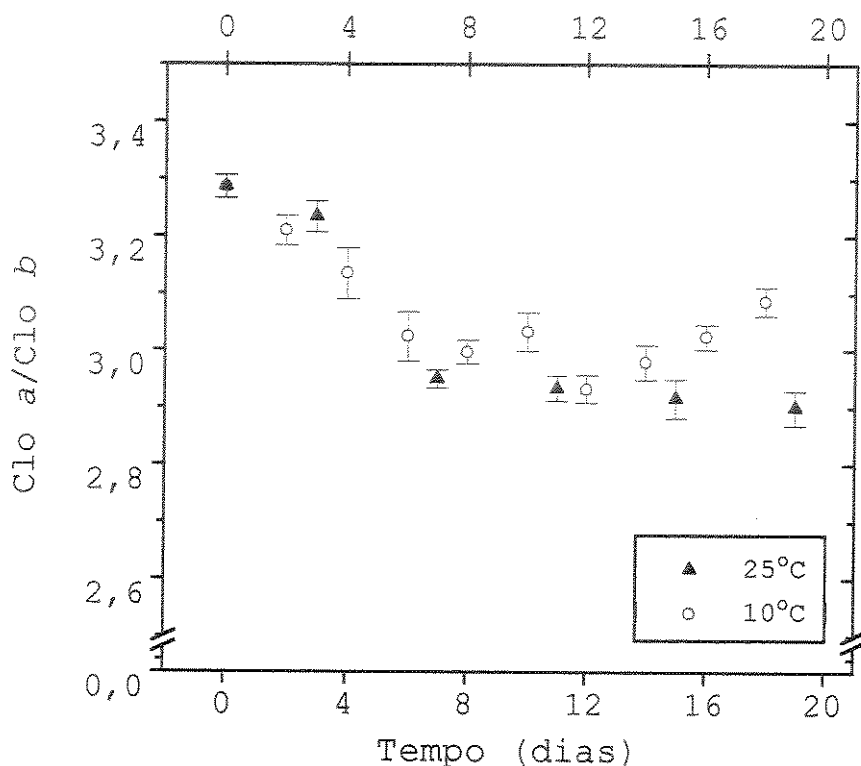


Figura 18 - Alterações na razão $Clo\ a/b$ em plântulas de café, em resposta ao tempo de aclimação dos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). Cada ponto corresponde a média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

do 12º dia, essa razão apresentou uma tendência crescente, chegando ao valor de 3,1, quando foram encerradas as determinações, no 18º dia (Figura 18). No tratamento a 25°C, o valor da razão se manteve até o final do ensaio.

A figura 19 ilustra a resposta da razão entre clorofilas totais e carotenóides ($C_{lo\ a+b} / C_{x+c}$) com o tempo de aclimação aos tratamentos.

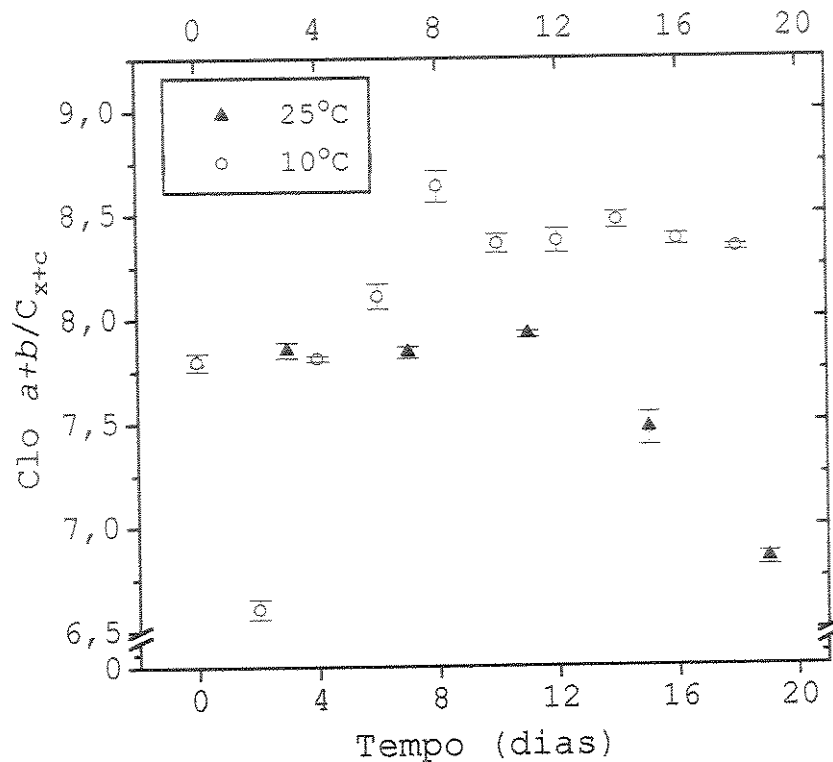


Figura 19 - Alterações na razão clorofilas totais/carotenóides em plântulas de cafeeiro, em resposta ao tempo de aclimação dos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). Cada ponto corresponde à média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

A temperatura de resfriamento influenciou diferentemente no acúmulo de clorofilas e carotenóides. Com o tratamento de resfriamento verificou-se, que a tendência predominante, nos dois primeiros dias, foi de aumento no acúmulo de carotenóides em relação ao de clorofilas, levando a uma queda acentuada na razão clorofilas totais/carotenóides. Entre o segundo e o décimo dia, a taxa de acúmulo das clorofilas superou a dos carotenóides. Predominantemente, a taxa de acúmulo de

carotenóides foi inferior à das clorofilas, estabilizando-se a partir do décimo dia até o final do ensaio. Entre o segundo e o décimo (ou 18º) dia, o aumento na razão clorofilas totais/carotenóides foi de aproximadamente 26%, ou seja, nesse período, o acúmulo das clorofilas superou em pouco mais de um quarto o acúmulo de carotenóides.

Analisando a curva do tratamento controle (Figura 19), pode-se verificar o efeito da temperatura sobre a razão clorofilas a+b/carotenóides. A taxa de acúmulo das clorofilas foi muito semelhante a dos carotenóides até o décimo primeiro dia, quando, então, a taxa de acúmulo desses supera a das clorofilas, de modo crescente.

A figura 20 representa as alterações na concentração de malondialdeído (MDA) durante o período de aclimação aos tratamentos. Com o tratamento controle, observou-se queda na [MDA], com taxas decrescentes praticamente no decorrer de todo o período do ensaio. O tratamento de resfriamento também resultou em queda, porém menos intensa. Apesar da condição de estresse (10°C) em que se encontrava o material vegetal, o nível de peroxidação lipídica se apresentou em queda, com o tempo de tratamento.

As plantas submetidas ao estresse pelo resfriamento apresentaram, basicamente, duas fases no nível de peroxidação lipídica (Figuras 20 e 21). Do início ao 12º dia de tratamento, corresponderia à primeira fase. Nesse período, os níveis de MDA

observados foram ligeiramente decrescentes, sendo que, entre o segundo e o décimo segundo dia, a concentração de MDA praticamente não foi alterada, o que corresponde a uma estabilização nos níveis de degradação das membranas cloroplastídicas. Uma segunda fase iniciou-se a partir do 12º dia, prosseguindo até o final do ensaio. Nessa fase, a concentração de MDA no tecido se apresentou em queda, porém com valores superiores aos das plantas tratadas a 25°C para esse mesmo período (Figura 20).

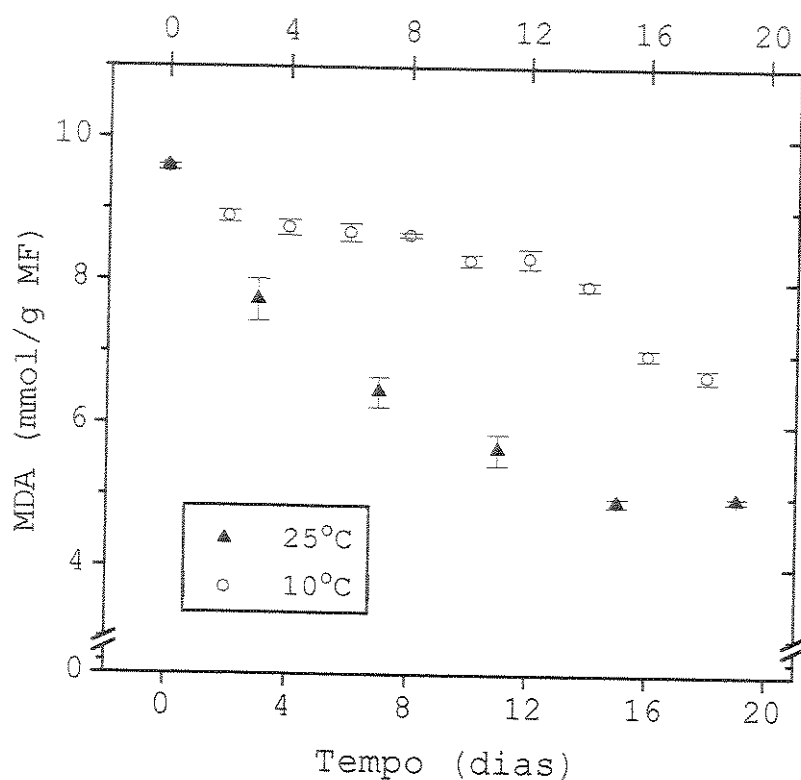


Figura 20 - Alteração na atividade lipoperoxidativa, expressa em termos da concentração de MDA, em folhas cotiledonares de cafeeiro, em função do tempo de aclimação dos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). Cada ponto corresponde a média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

Observou-se que houve uma correlação ($r = 97,1\%$) entre o acúmulo dos pigmentos totais e a concentração de MDA no tratamento controle (Figura 21). Quanto maior a concentração de pigmentos, menor a peroxidação lipídica (menor concentração de MDA). Para o tratamento de resfriamento, observou-se duas fases nessa correlação: uma primeira de menor declividade ($r = 85,8\%$), seguida de uma segunda ($r = 86,3\%$), formada pelos

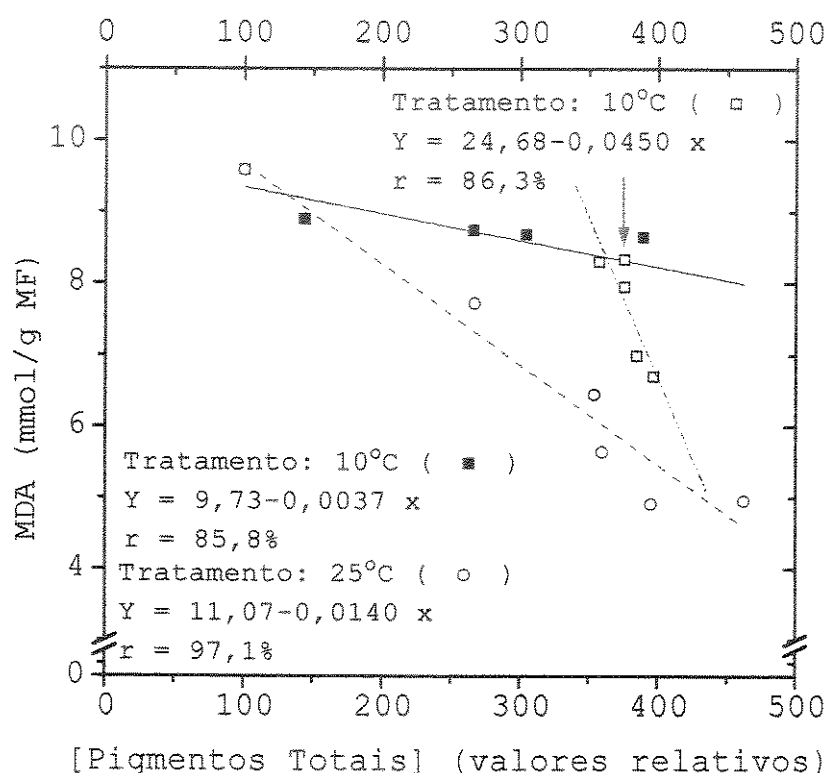


Figura 21 - Alteração na atividade lipoperoxidativa, expressas em termos da concentração de MDA, em folhas cotiledonares de cafeeiro, em função da concentração de pigmentos totais. Cada ponto corresponde a média de quatro repetições. A seta indica o 12º dia, a partir do qual iniciou-se a segunda fase na atividade peroxidativa dos lipídios das membranas cloroplastídicas. A segunda reta (com a equação e o coeficiente r), no tratamento a 10°C, foi ajustadas para os valores obtidos na segunda fase (após a seta).

valores obtidos a partir do 12º dia (segunda fase da atividade peroxidativa), de maior declividade. Ao que tudo indica, a temperatura de resfriamento também influíu (pela redução na atividade metabólica) na redução da atividade peroxidativa, tendo em vista que nesse tratamento (10°C) a correlação entre a atividade peroxidativa e a concentração dos pigmentos foi menor (~86,0%) que a apresentada pelo tratamento controle (~97,0%) (Figura 21).

4.2. Avaliação da sensibilidade ao resfriamento durante o processo de enverdecimento de folhas cotiledonares de plântulas de cafeeiro

O padrão de síntese dos pigmentos foi praticamente o mesmo, tanto para as clorofilas quanto para os carotenóides (Figuras 22, 23 e 24). As plântulas submetidas ao tratamento controle (25°C) rapidamente iniciaram o processo de acúmulo de pigmentos, atingindo um máximo próximo ao 24º dia.

No 24º dia, os conteúdos de Clo *a* e *b* nas folhas cotiledonares ("orelha-de-onça") foram, respectivamente, cerca de 30 (706 µg/g MF) e de 5 vezes (244 µg/g MF) maiores que os conteúdos no primeiro dia do ensaio. Dentre as clorofilas, a taxa de síntese da Clo *a* foi cerca de quatro vezes maior que a da Clo *b*. No décimo dia de ensaio, quando as folhas cotiledonares acumularam cerca de 50% do seu conteúdo máximo, a

taxa de síntese da Clo *a* foi de aproximadamente 33 $\mu\text{g/g.dia}$ contra os cerca de 7,5 $\mu\text{g/g.dia}$ para a Clo *b* (Figuras 22 e 23). Com relação à Clo *a*, essa taxa foi superior à apresentada no ponto de máximo

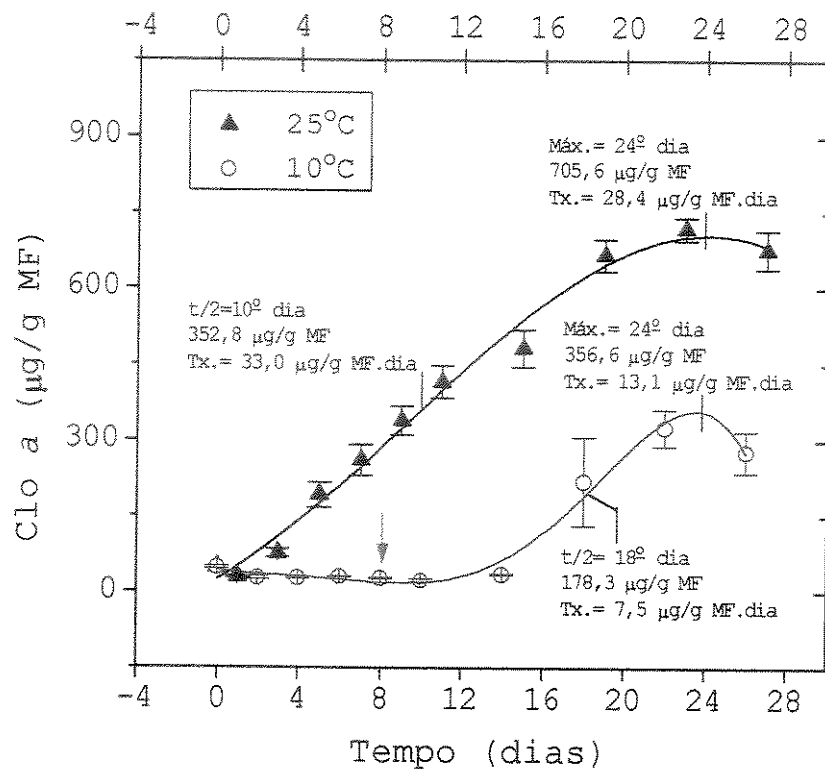


Figura 22 - Concentração da Clo *a* em plântulas de café durante o período de enverdecimento, em resposta aos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). A seta indica a mudança da temperatura do tratamento a 10°C para 25°C. Cada ponto corresponde a média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

máximo (28%), enquanto que para a Clo *b* não diferiu muito (8%).

O acúmulo dos carotenóides no 24º dia (131 $\mu\text{g/g MF}$) superou em mais de 100 vezes o conteúdo do primeiro dia (1,3 $\mu\text{g/g MF}$) (Figura 24). O acúmulo de 50% do conteúdo máximo desses pigmentos deu-se por volta do nono dia, com incremento

de 7 $\mu\text{g/g.dia}$, próximo ao da síntese da Clo *b* e inferior ao da Clo *a*. Esse incremento foi, também, ligeiramente superior ao de síntese no momento de máxima concentração dos carotenóides, no 24º dia, que foi de 5 $\mu\text{g/g.dia}$.

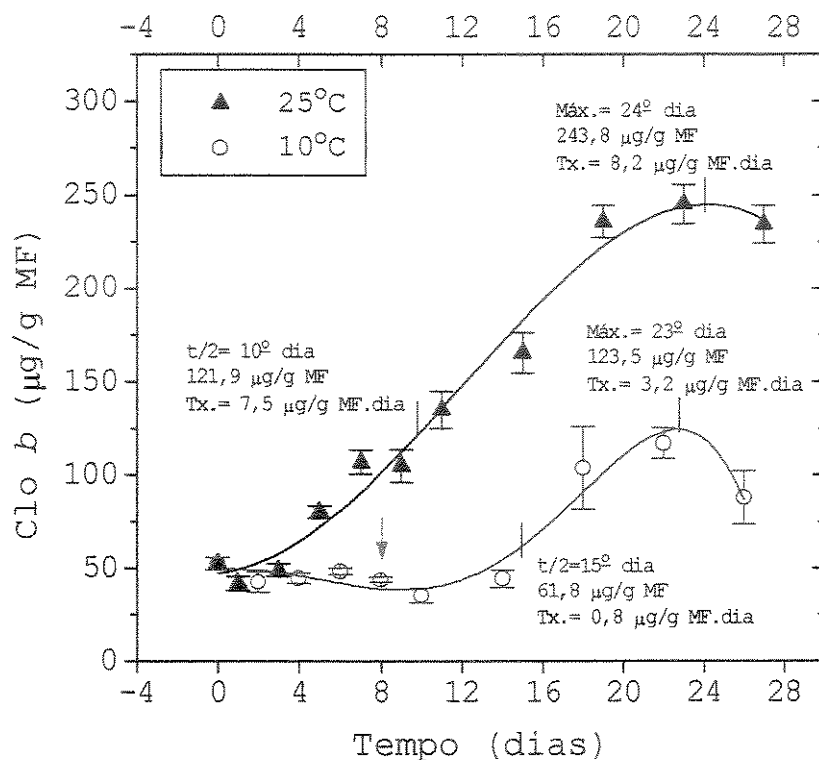


Figura 23 - Concentração da Clo *b* em plântulas de café durante o período de enverdecimento, em resposta aos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). A seta indica a mudança de temperatura do tratamento de 10°C para 25°C. Cada ponto corresponde a média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

Durante a aplicação do tratamento de resfriamento, observou-se a inibição na síntese dos pigmentos cloroplastídicos, pois durante os oito primeiros dias, quando a temperatura foi mantida em 10°C, não se observou nenhum

acréscimo no conteúdo desses pigmentos, mesmo sob condições de DFFF moderada ($150 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$). Somente a partir do 16º ou 18º dia (oito a dez dias após o retorno a 25°C) foi observado pequeno incremento no conteúdo desses pigmentos (Figuras 22, 23 e 24).

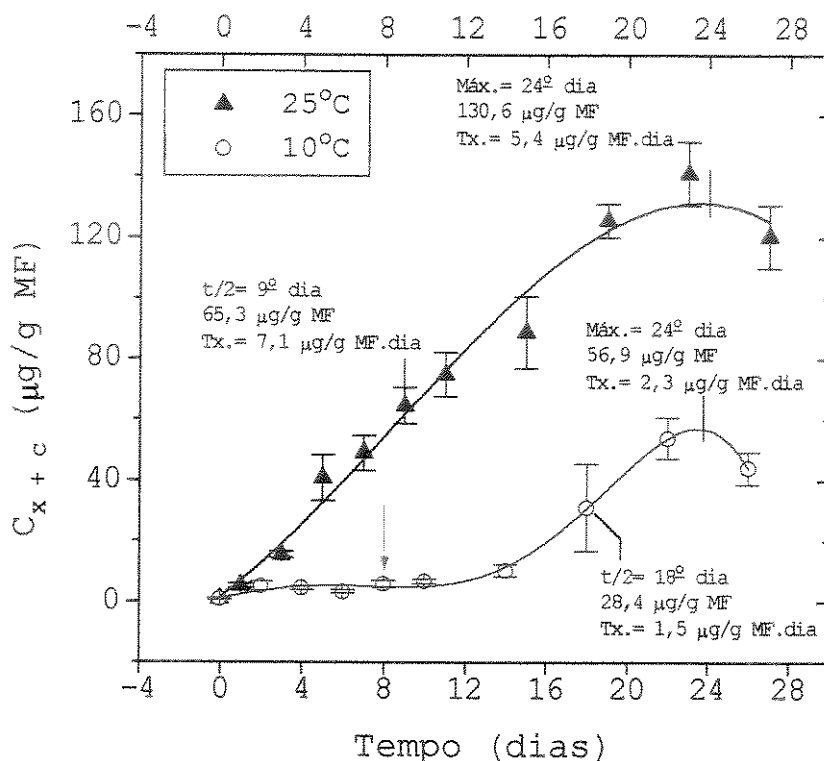


Figura 24 - Concentração dos carotenóides em plântulas de café durante o período de enverdecimento, em resposta aos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). A seta indica a mudança de temperatura do tratamento de 10°C para 25°C. Cada ponto corresponde à média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

Após o 20º dia já estaria havendo um acúmulo significativo desses pigmentos com padrões semelhantes entre eles. Apesar dessa semelhança no padrão de acúmulo dos pigmentos, as taxas de síntese dos mesmos, verificadas após a transferência de 10

para 25°C, diferiram notadamente. A Clo a apresentou os maiores incrementos (7,5 µg/g.dia), seguida pelos carotenóides (1,5 µg/g.dia) e finalmente pela Clo b (0,8 µg/g.dia), registradas no tempo "t/2", ou seja, no tempo correspondente ao acúmulo de 50% do conteúdo máximo. Esses incrementos representam aproximadamente de 1/4 (para a Clo a e carotenóides) a 1/9 (para a Clo b) daquelas apresentadas para o material controle (Figuras 22, 23 e 24). As mesmas foram alcançadas no 18º dia (com exceção para a Clo b, 15º dia), ou seja, 10 dias após a retomada da temperatura.

No tratamento a 10°C, a concentração máxima dos pigmentos foi atingida no 24º dia (Clo a e carotenóides) e 23º dia (Clo b), semelhantemente ao tratamento a 25°C. Nesse momento, o conteúdo acumulado dos pigmentos equivaleu a 50% do apresentado no controle. O mesmo foi observado para os incrementos nos seus conteúdos.

O conteúdo de Clo a inicialmente correspondeu a pouco menos de 40%; a Clo b próximo de 60% e os carotenóides contribuíram com traços (0,6%) no conteúdo total dos pigmentos das folhas cotiledonares de plântulas de cafeeiro (Figuras 25A, B e C).

Submetidas ao processo de enverdecimento, as plântulas tratadas a 25°C rapidamente iniciaram o acúmulo dos pigmentos, sendo que por volta do oitavo dia o balanço entre os pigmentos

já correspondeu àquele do final do ensaio. Por outro lado, o material tratado a 10°C apresentou uma ligeira redução no conteúdo das clorofilas relativo ao conteúdo dos pigmentos totais no início do ensaio. Esta diferença entre os efeitos das temperaturas se mostrou significativa apenas para a Clo *a*. Mas, o acúmulo dos carotenóides, mesmo na temperatura de 10°C, aumentou ($P < 0,05$) com relação ao conteúdo total dos pigmentos, o que pode ser observado, através da tabela 2, pelo teste de médias (Duncan a 5%).

Tabela 2 - Conteúdo relativo dos pigmentos cloroplastídicos (% Pigmentos Totais) em folhas cotiledonares de cafeeiro submetidas ao tratamento de resfriamento (10°C). As plantas permaneceram a 10°C durante os oito primeiros dias, a partir do qual a temperatura foi mantida a 25°C, como no tratamento controle. Os valores da tabela representam a média de quatro repetições. As médias seguidas pela mesma letra, para cada pigmento, não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).

Tempo (dias)	Conteúdo de Pigmentos (% Pig. Totais)		
	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenóides
0	40,07 bc	60,66 a	0,61 e
2	36,23 c	56,35 ab	2,70 de
4	35,76 c	58,31 ab	5,92 cd
6	36,57 c	59,49 ab	4,66 cd
8	34,84 c	57,67 ab	7,49 bc
10	34,84 c	54,32 b	10,84 ab
14	44,03 b	45,68 d	10,29 ab
20	63,22 a	27,89 c	10,04 ab
23	66,38 a	22,86 c	10,76 ab
27	63,25 a	22,73 c	12,85 a

O conteúdo dos carotenóides no 10º dia atingiu os níveis do controle (~12%), enquanto que para as clorofilas foi necessário o dobro do tempo (20º dia) para se atingir os mesmos ($p < 0,05$) níveis (relativos ao total de pigmentos) do controle - Clo a

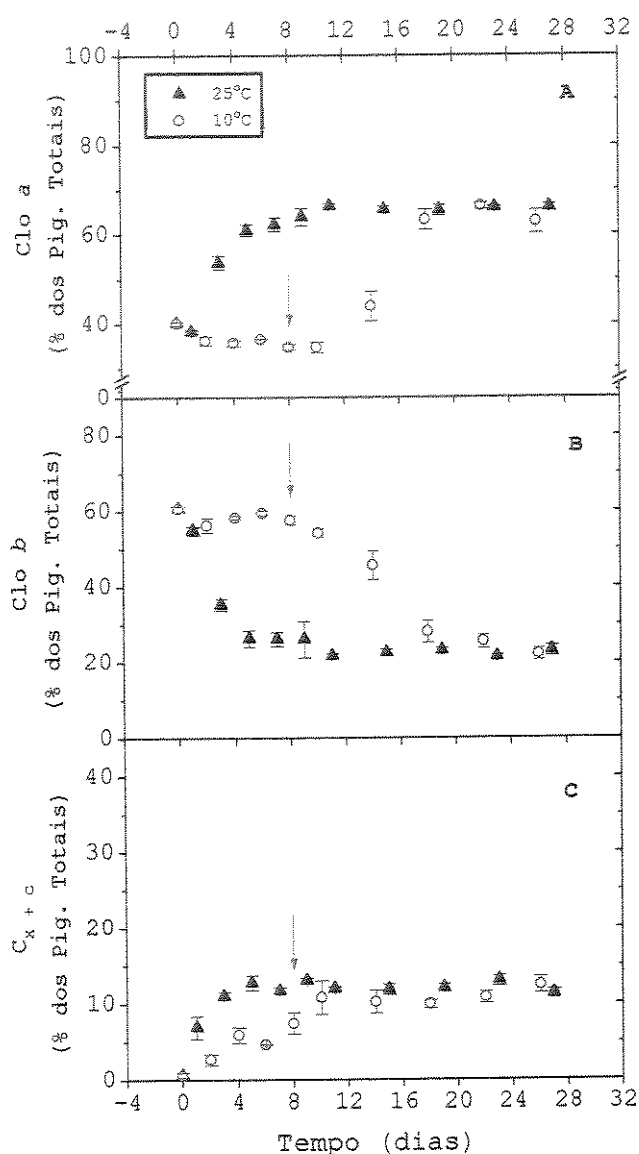


Figura 25 - Alterações no conteúdo relativo (% dos pigmentos totais) dos pigmentos cloroplastídicos em plântulas de cafeeiro durante o período de enverdecimento, em resposta aos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). A seta indica a mudança da temperatura do tratamento a 10°C para 25°C. Cada ponto corresponde a média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

(~65%) e Clo *b* (~23%) (Figuras 25A, B e C).

A figura 26 apresenta o espectro de absorção do extrato foliar, para os dois tratamentos. No tratamento de 10°C houve uma atenuação da absorção nas diversas regiões do espectro em função do menor conteúdo dos pigmentos de modo geral (Figuras 26A e B). O espectro de absorção para o material tratado a 10°C manteve os picos na região do azul (430 nm) e do vermelho (662 nm), assim como no controle. Porém, na região do azul podemos observar o surgimento de um "ombro" ($\lambda = 418$ nm), um pouco mais destacado que aquele apresentado pelo tratamento a 25°C (Figura 26B).

A figura 27 apresenta os valores da razão Clo *a/b* durante o período de enverdecimento. Observou-se que no tratamento controle a razão foi crescente entre o início do processo até o nono dia, quando a mesma atingiu valores próximo de três, permanecendo assim até o final do tratamento. No tratamento a 10°C a razão Clo *a/b* foi afetada pela temperatura, permanecendo baixa (~0,75) enquanto essa foi mantida. Após a mudança da temperatura para 25°C, a partir do 14º dia houve alteração significativa nessa razão, que de forma crescente atingiu o 22º dia com valores semelhantes aos do controle.

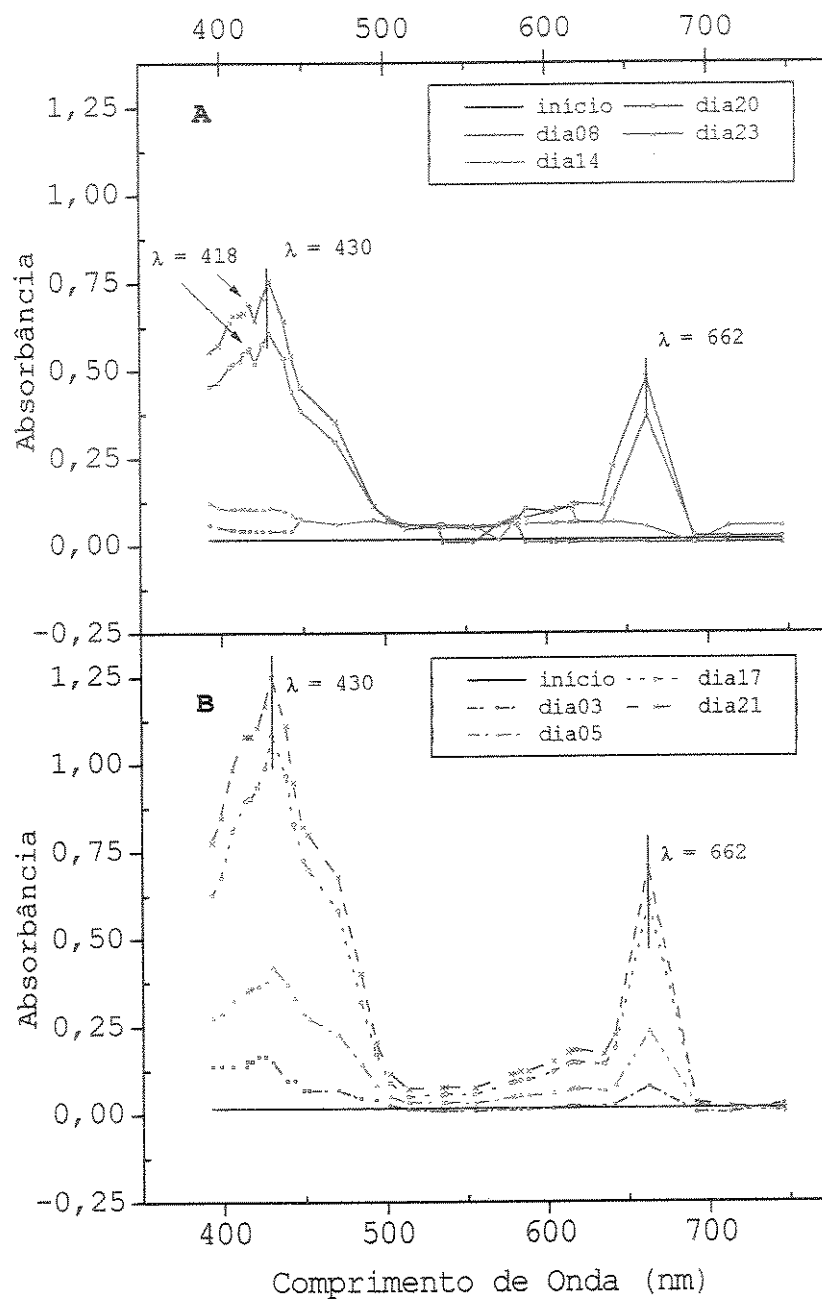


Figura 26 - Espectro de absorção dos pigmentos cloroplastídicos durante o período de enverdecimento de plântulas de cafeeiro. O material vegetal foi submetido aos tratamentos de resfriamento, 10°C, espectro (A) e controle, 25°C, espectro (B).

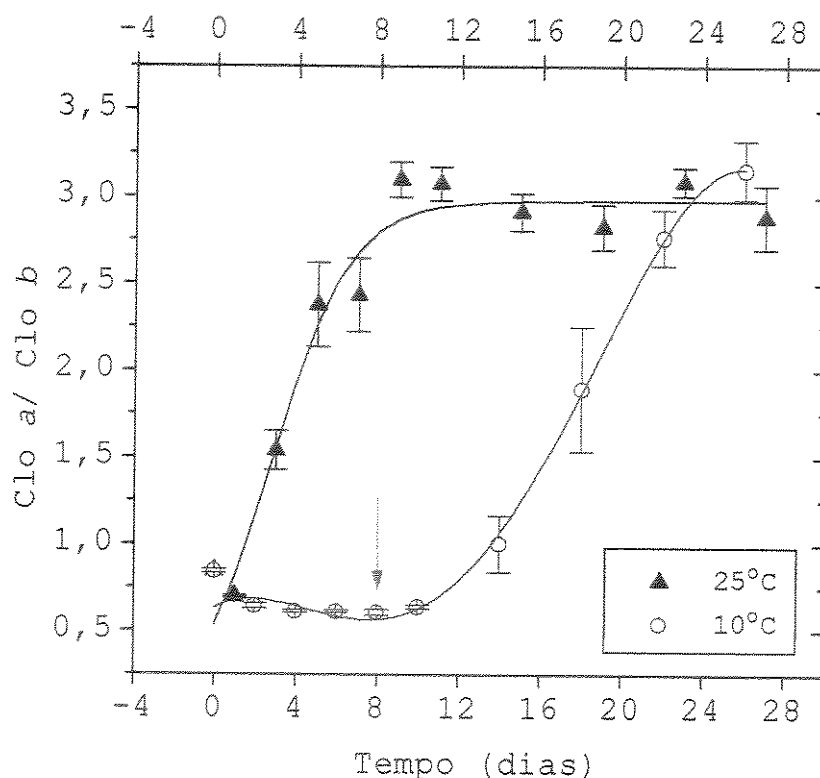


Figura 27 - Alterações na razão Clo *a/b* em plântulas de café durante o período de enverdecimento, em resposta aos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). A seta indica a mudança de temperatura do tratamento a 10°C para 25°C. Cada ponto corresponde a média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

Quanto à cinética da fluorescência da Clo *a* durante o processo de acumulação dos pigmentos (enverdecimento), o sinal de fluorescência inicial, F_0 , aumentou com o tempo de aclimação a 25°C (Figura 28). Ao final do ensaio, o aumento foi de aproximadamente dez vezes se comparado ao emitido pelo tecido foliar (estiolado) no início do processo de enverdecimento.

Em relação ao tratamento de resfriamento, durante os oito primeiros dias em que as plântulas permaneceram sob a

temperatura de 10°C, não houve a emissão de F_0 , nem qualquer outro sinal de fluorescência (Figuras 28, 29, 30 e 31), da mesma forma que não ocorreu acúmulo dos pigmentos (Figuras 22, 23 e 24).

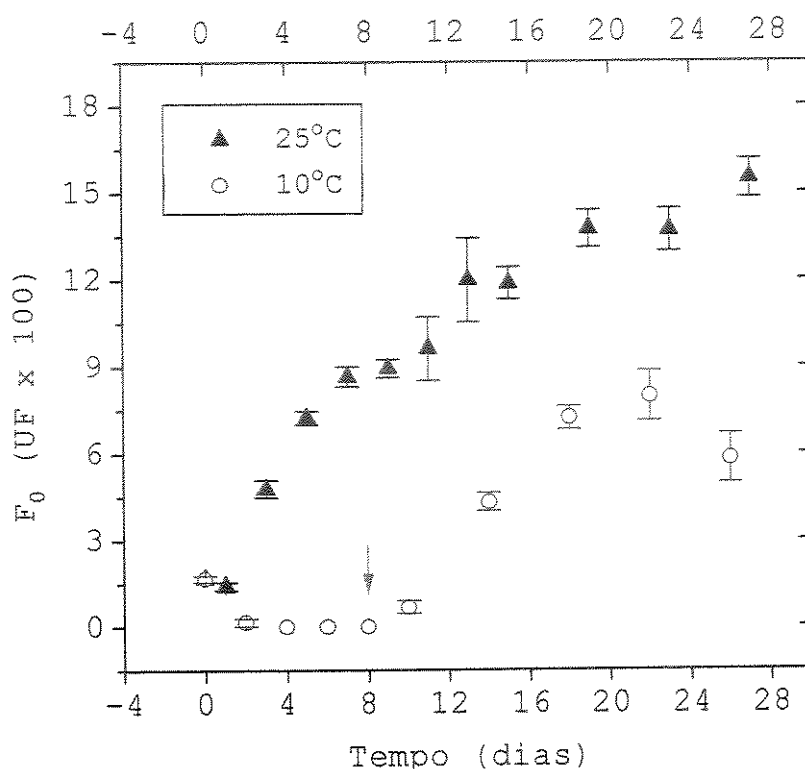


Figura 28 - Fluorescência inicial (F_0) (em unidades de fluorescência - UF) em folhas de cafeeiro durante o período de enverdecimento, em resposta aos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). A seta indica a mudança de temperatura do tratamento a 10°C para 25°C. Cada ponto corresponde a média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

Restabelecida a temperatura para 25°C, o sinal de fluorescência *in vivo* foi retomado. No caso de F_0 (Figura 28), o sinal aumentou ($P < 0,05$) do décimo dia (momento da mudança da temperatura de 10°C para 25°C) ao 22º dia, caindo em seguida até o final do tratamento. Essa resposta de F_0 foi parecida àquela

apresentada para o acúmulo das clorofilas (Figuras 22 e 23) e dos carotenóides (Figura 24), com apenas uma ressalva: no acúmulo dos pigmentos, a retomada do processo não foi imediata ao restabelecimento da temperatura; houve uma defasagem de cerca de seis dias, enquanto para o sinal F_0 , a retomada ocorreu logo após a mudança de temperatura. No 14º dia, enquanto a acumulação dos pigmentos ainda estava nos níveis apresentados durante o tratamento a 10°C (Figuras 22, 23 e 24), o sinal de F_0 já havia subido, diferindo significativamente daquele emitido durante a aplicação da temperatura de resfriamento (Figura 28).

A figura 29 mostra uma subida de F_v (após uma queda inicial), no tratamento controle a partir do primeiro dia, até o 15º dia de tratamento. Após o 15º dia, o sinal F_v começou a descer, chegando ao final do tratamento com aproximadamente 60% do sinal máximo emitido.

Quando aplicado o tratamento de resfriamento, o sinal F_v (além de F_0 , F_M e área) caiu a zero (Figura 29), elevando-se após o restabelecimento da temperatura para 25°C. No 23º dia de tratamento, o valor do sinal de F_v não diferiu estatisticamente entre os dois tratamentos de temperatura; a partir desse momento, o sinal emitido acompanhou a queda da planta controle.

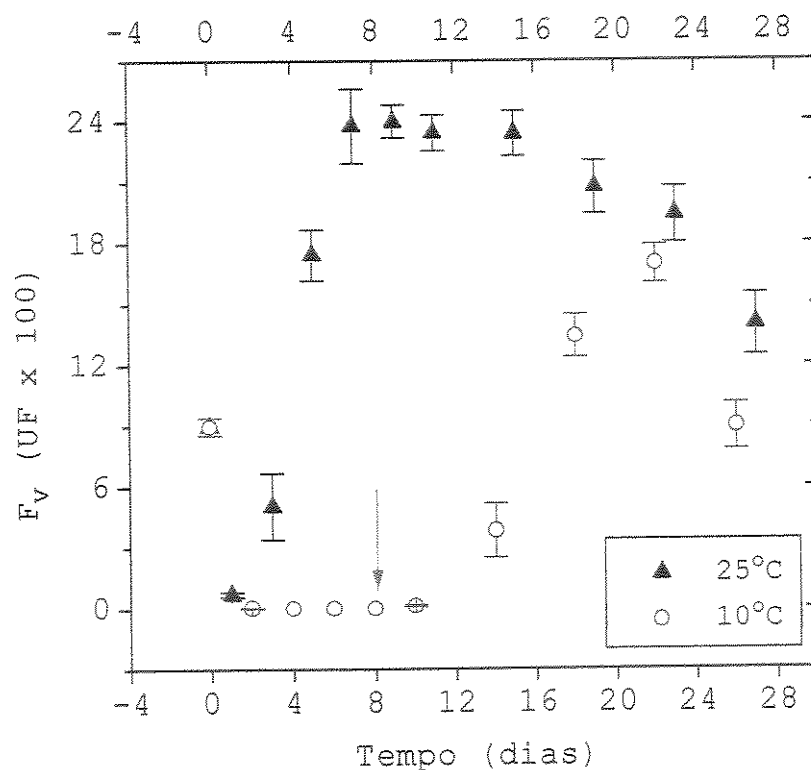


Figura 29 - Fluorescência variável (F_v) (em unidades de fluorescência -UF) em folhas de cafeeiro durante o período de enverdecimento, em resposta aos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). A seta indica a mudança de temperatura do tratamento a 10°C para 25°C . Cada ponto corresponde a média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

A figura 30 ilustra a fluorescência máxima (F_m), emitida pelas plântulas de cafeeiro durante o processo de enverdecimento, após a aplicação dos tratamentos de temperatura.

Nas plântulas submetidas à temperatura de 25°C , o sinal de F_m , após uma pequena descida no primeiro dia, subiu rapidamente nos 11 primeiros dias, variando muito pouco, a partir desse momento, até o final do ensaio.

Com a aplicação do tratamento de resfriamento, a F_M caiu a zero. Esse sinal só foi retomado quando a temperatura do tratamento foi elevada para 25°C. Da mesma forma que o

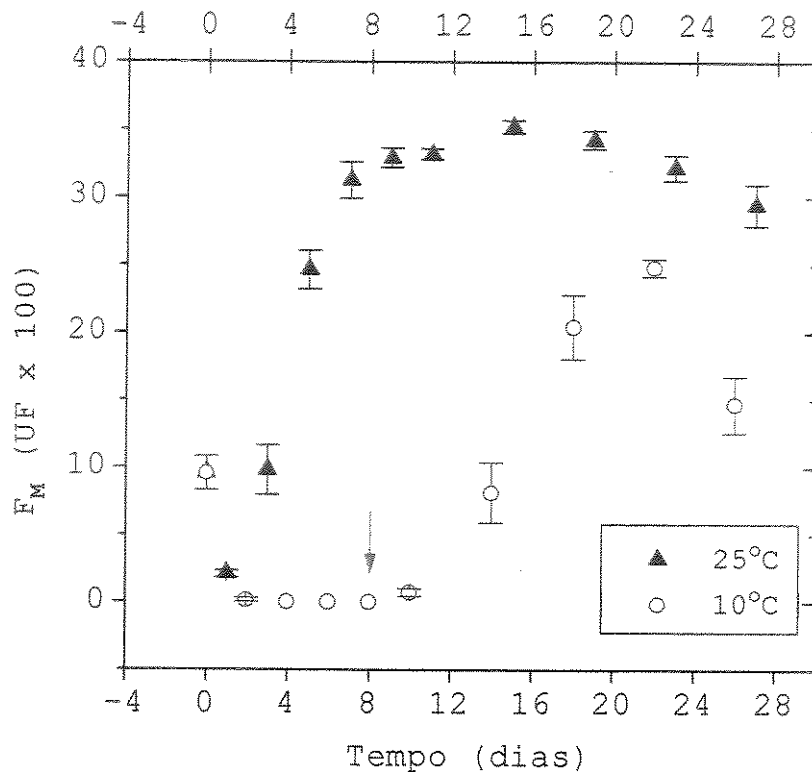


Figura 30 - Fluorescência máxima (F_M) (em unidades de fluorescência - UF) em folhas de cafeeiro durante o período de enverdecimento, em resposta aos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). A seta indica a mudança de temperatura do tratamento a 10°C para 25°C. Cada ponto corresponde a média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

ocorrido com o tratamento controle, o sinal de F_M subiu, porém, com menor intensidade, não atingindo os mesmos níveis do tratamento controle. Após atingir o seu valor máximo, no 22º dia, o sinal caiu (cerca de 40%), se distanciando dos níveis apresentados pelo controle ao final do ensaio (Figura 30).

Durante o período de enverdecimento à temperatura de 25°C,

o pool de PQ (medido pela área acima da curva de indução da fluorescência, figura 31) cresceu rapidamente, até o nono dia de tratamento e permaneceu alto por quase todo o período do ensaio, caindo, ligeiramente (~25%), entre o 23º dia e o final do tratamento.

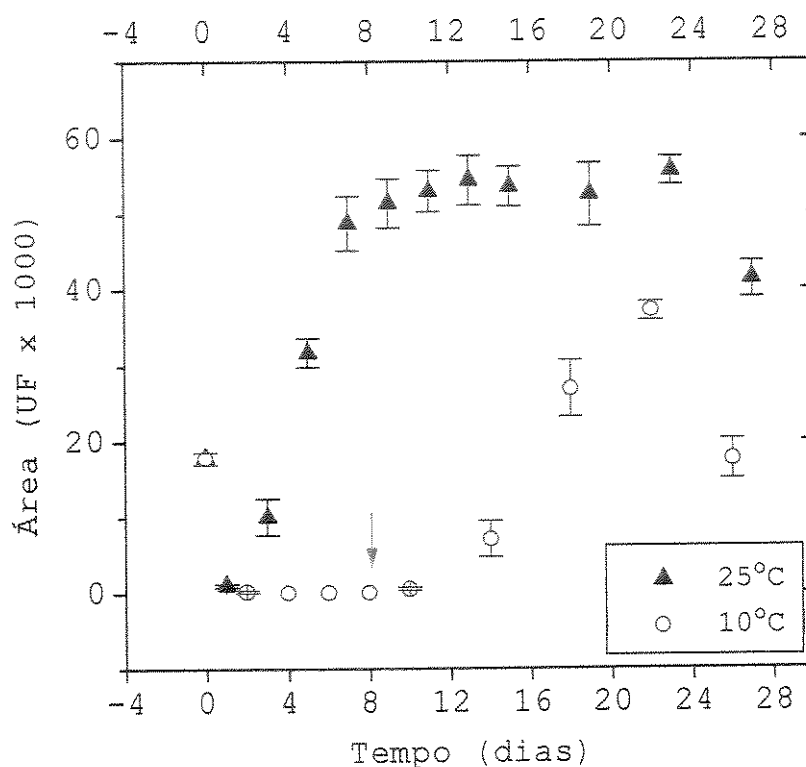


Figura 31 - Alterações na área acima da curva de fluorescência (em unidades de fluorescência - UF) em folhas de café durante o período de enverdecimento, em resposta aos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). A seta indica a mudança de temperatura do tratamento a 10°C para 25°C. Cada ponto corresponde a média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

Nas plantas submetidas à temperatura de resfriamento, houve uma queda no valor da área nos dois primeiros dias, chegando esse a zero. O valor se manteve igual a zero enquanto

o material permaneceu a 10°C ou próximo de zero, mesmo dois dias após a transferência para 25°C (Figura 31). Os valores só apresentaram alterações significativas a partir do 14º dia, aumentado até o 22º dia, porém, ainda distante dos níveis do controle. Após esse pico o valor da área caiu, com maior intensidade que o apresentado pelo controle, em torno de 50% deste valor.

A figura 32 mostra a resposta da razão F_V/F_M ao processo de enverdecimento das plântulas de cafeeiro. Inicialmente (tempo

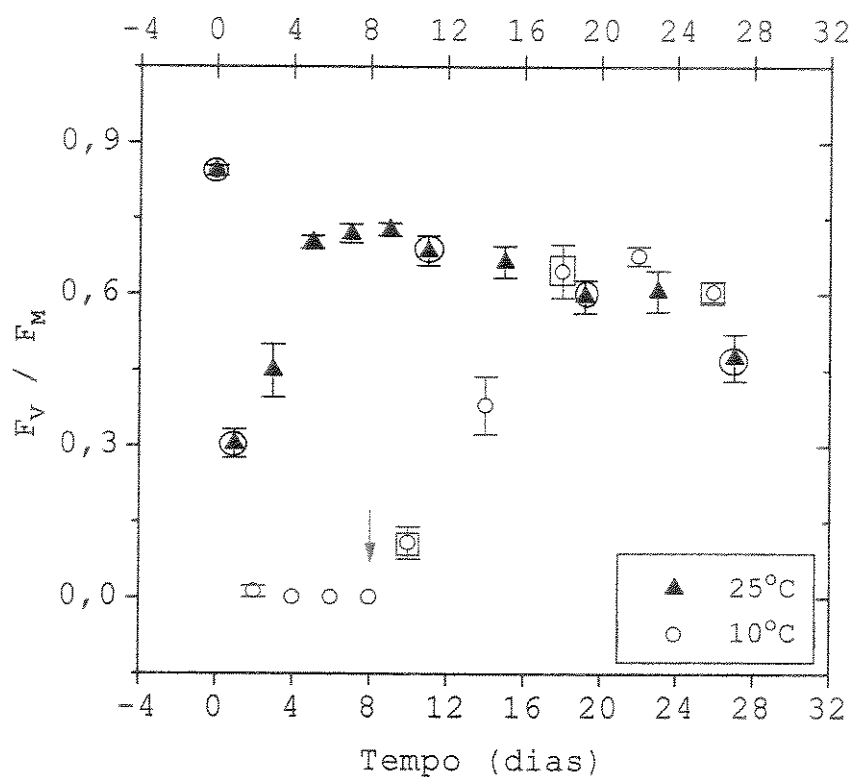


Figura 32 - Eficiência quântica do PS_{II} (F_V/F_M) em folhas de cafeeiro durante o período de enverdecimento, em resposta aos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). A seta indica a mudança de temperatura do tratamento a 10°C para 25°C. Estão destacados com círculos e quadrados, os tempos amostrados nos tratamentos controle e resfriado, respectivamente, para obtenção da figura 34. Cada ponto corresponde a média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

0), a eficiência quântica do PS_{II} foi alta - média de 0,843. Já no momento seguinte (nos três primeiros dias do processo de enverdecimento), a eficiência caiu no tratamento controle. Nesse tratamento, o PS_{II} , após a queda inicial nos primeiros quatro dias, recuperou a eficiência (F_v/F_m) já a partir do quinto dia. A razão F_v/F_m atingiu os valores máximos de 0,720, em média, para esse tratamento. A partir do décimo dia, a razão (F_v/F_m) começou a declinar ligeiramente ($\sim 0,685$), assim permanecendo até o 23º dia, quando a queda foi mais intensa, atingindo no final do período valores médios de 0,470.

Com a aplicação do tratamento de resfriamento, a eficiência quântica do PS_{II} também foi completamente inibida, com a razão F_v/F_m apresentando valores iguais a zero (Figura 32). Uma vez alterada a temperatura para 25°C, os valores de F_v/F_m aumentaram rapidamente, antes mesmo de se detectar a retomada na síntese dos pigmentos (Figuras 22, 23 e 24). No 18º dia de tratamento (10 dias após a mudança da temperatura para 25°C), a razão apresentou os mesmos valores daqueles do controle (0,650), superando esse no 26º dia. Nessa ocasião, a razão F_v/F_m das plântulas que permaneceram a 10°C (nos oito primeiros dias) foi 22% superior ao das plântulas do tratamento controle no 27º dia.

A razão F_v/F_0 no início do processo de enverdecimento caiu de 5,55 para 0,50 (sob temperatura de 25°C), quando as plântulas ainda estavam estioladas. A partir do primeiro dia, a

razão F_v/F_0 começou uma recuperação, partindo de 0,50 e atingindo um máximo de 2,72 no nono dia de tratamento (Figura 33). Após o nono dia, a razão apresentou queda até o encerramento do ensaio. No 27º dia, a média dos valores de F_v/F_0 caíram a 44% dos valores médios registrados no nono dia (máximo alcançado).

Para as plântulas submetidas ao tratamento de resfriamento, a relação F_v/F_0 também caiu inicialmente. Porém, a queda na razão foi um pouco mais intensa, chegando a zero, no segundo dia de tratamento (Figura 33). Logo após a mudança da

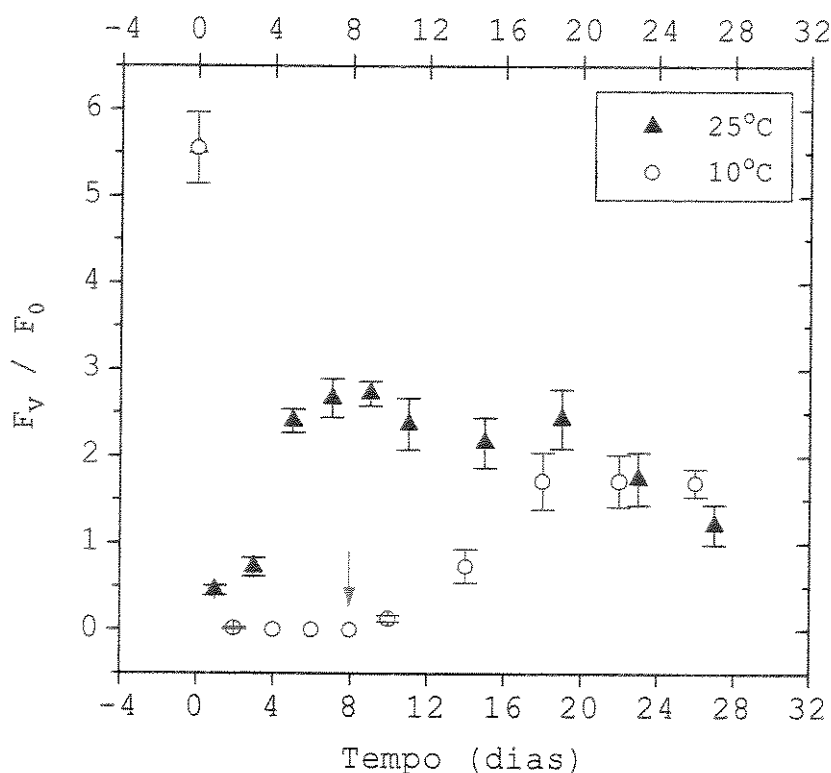


Figura 33 - Alterações na razão F_v/F_0 em folhas de cafeeiro durante o período de enverdecimento, em resposta aos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). A seta indica a mudança de temperatura do tratamento a 10°C para 25°C. Cada ponto corresponde a média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

temperatura para 25°C, a razão F_v/F_0 subiu, se estabilizando em 1,72 até o final do ensaio, chegando, no 22º dia, aos valores apresentados pelas plântulas controle.

A figura 34A apresenta a cinética de emissão de fluorescência da Clo a pelos transientes "OJIP" no início do processo de enverdecimento, caracterizado pelo estado estiolado das plântulas de cafeeiro. Essa cinética se caracterizou pela presença de apenas dois transientes, "O" (ou F_0) e "P", não sendo observado as inflexões "J" e "I". Dessa forma, o PSII pouco heterogêneo, emitiu um sinal de fluorescência onde a inflexão "I" não se distinguiu do transiente "P". No primeiro dia do tratamento de temperatura, o sinal de fluorescência caiu significativamente (Figura 34A). O sinal de F_0 variou pouco com relação ao início do tratamento. Porém, isso foi uma exceção dentro das demais variáveis, que variaram nitidamente. A curva de fluorescência não apresentou qualquer "ponto" de inflexão ("J" ou "I") ou pico ("P") no primeiro dia de acúmulo dos pigmentos a 25°C.

A figura 34B mostra nitidamente a influência da temperatura de resfriamento sobre a cinética da emissão de fluorescência. No décimo primeiro dia, o tratamento controle já apresentou uma mudança na forma da cinética da fluorescência, com clara distinção de todos os transientes, em relação àquela apresentada na primeira amostragem (Figura 34A). Por outro lado, no tratamento a 10°C, com a medida realizada no décimo

dia de tratamento (dois dias após a mudança da temperatura para 25°C), não foi possível caracterizar nenhuma das inflexões ou

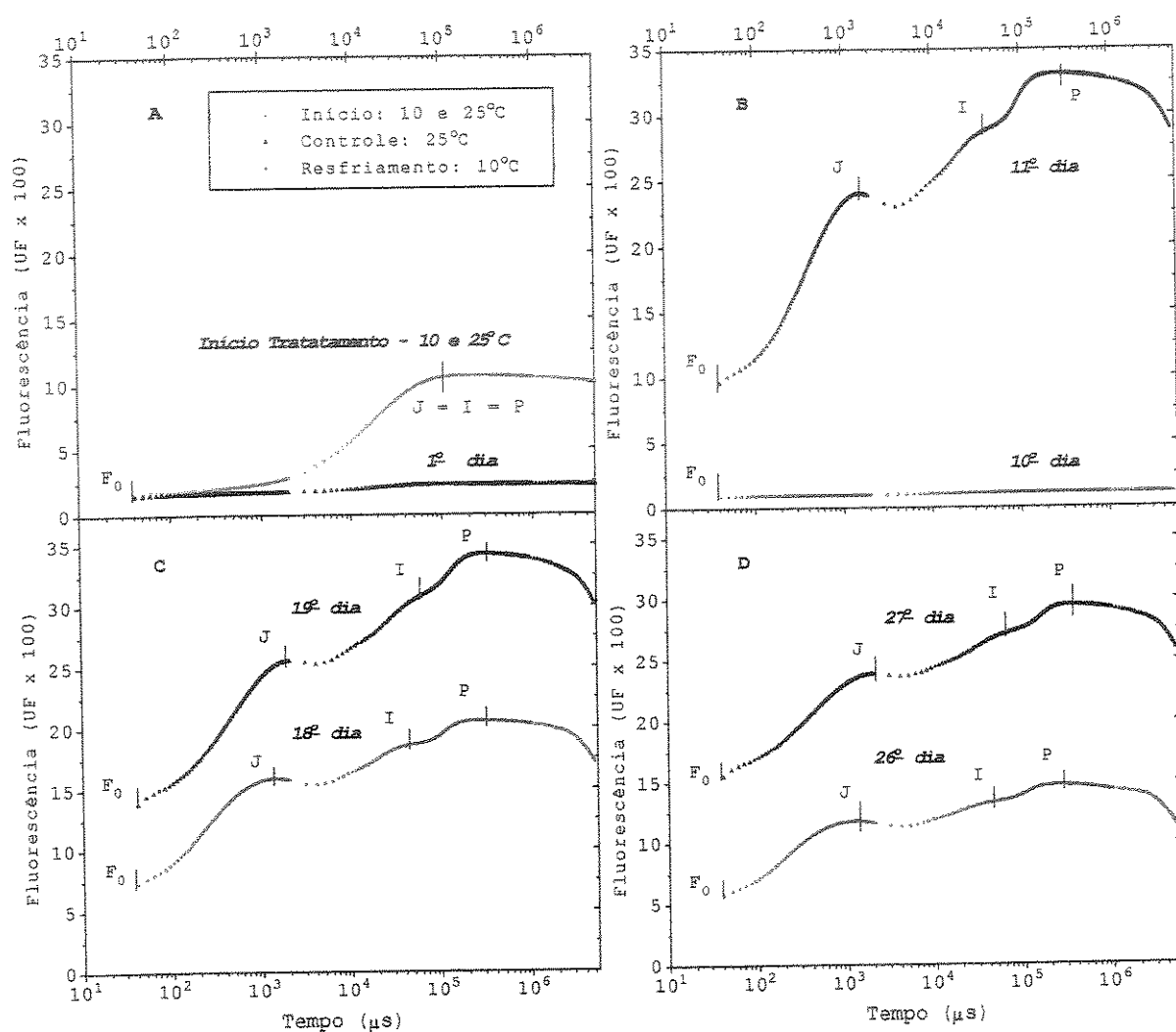


Figura 34 - Cinética de fluorescência da Clo *a* em folhas de cafeeiro durante o período de enverdecimento, em resposta aos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). O tratamento de resfriamento permaneceu a 10°C durante os primeiros oito dias, após os quais a temperatura foi alterada para 25°C e assim permanecendo até o final do ensaio. As curvas estão representadas na forma dos transientes (*OJIP*) da fluorescência. Cada curva representa a média de quatro ensaios independentes.

picos do sinal de fluorescência.

Após 18 dias de tratamento, com as plântulas em processo de enverdecimento, a emissão de fluorescência da Clo a do PSII apresentou uma cinética com todos os transientes típicos ("OJIP"), tanto no tratamento controle, como naquele submetido à temperatura de resfriamento (Figura 34C). O tempo para a ocorrência dessas inflexões no tratamento a 10°C foi menor, ou seja, mais rapidamente o sinal de fluorescência apresentou os transientes "J" e "I" e, também, o pico na fluorescência ("P") foi alcançado mais cedo. Essa resposta também se repetiu no 26º e 27º dias (Figura 34D). Nesses dias foi verificada, também, uma atenuação na emissão de fluorescência com relação ao 18º e 19º dia; a curva em geral (e todos os transientes) foi mais baixa em ambos os tratamentos. Tanto no 18º como no 26º dia, e mais acentuadamente no 10º dia, a emissão de fluorescência das plantas submetidas a temperatura de 10°C foi inferior à do controle, em seus respectivos dias (Figuras 34B, C e D).

No tratamento a 10°C o aumento da fluorescência a partir de F_0 foi claramente afetado (Figura 34B). Observa-se na tabela 3 que, no 10º dia (dois dias após a mudança da temperatura de 10 para 25°C), a taxa de aumento da fluorescência apresentada (0,041) foi muito inferior àquela obtida no 11º dia do tratamento a 25°C (0,828), que, aliás, foi a taxa máxima para esse tratamento. No 18º dia, a taxa de subida para o tratamento

a 10°C foi máxima (0,936) e superior (cerca de 1,9 vezes) àquela apresentada pelo controle (0,498) no 19º dia. No 26º dia, a taxa de subida da fluorescência do tratamento de resfriamento caiu com relação à apresentada no 18º dia, porém, ainda maior (cerca de 3,5 vezes) que a do controle (0,138) no 27º dia (Tabela 3). A taxa para o tratamento a 25°C foi decrescente a partir do 11º até o final do ensaio ($P < 0,05$).

Tabela 3 - Taxa de aumento da fluorescência $[(F_{300\mu s} - F_{50\mu s})/F_0]$ e fluorescência variável relativa (dV/dt_0) em folhas de cafeeiro durante o período de enverdecimento, em resposta aos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). Os valores da tabela representam a média de quatro repetições acompanhada do seu respectivo erro padrão. As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$).

Tempo (dias)	$(F_{300\mu s} - F_{50\mu s})/F_0$		dV/dt_0	
	10°C	25°C	10°C	25°C
0	0,151±0,034 c	0,151±0,034 c	0,029±0,008 c	0,029±0,008 b
1		0,153±0,057 c		0,247±0,051 a
10	0,041±0,009 c		0,192±0,040 b	
11		0,828±0,068 a		0,265±0,016 a
18	0,936±0,074 a		0,593±0,061 a	
19		0,498±0,068 b		0,290±0,038 a
26	0,487±0,070 b		0,257±0,025 b	
27		0,138±0,027 c		0,222±0,052 a

A tabela 3 mostra, também, o efeito da temperatura, durante o processo de acúmulo dos pigmentos, sobre a fluorescência variável relativa (dV/dt_0). Quando comparados os tratamentos de 25 e 10°C com o início do tratamento (plântulas

estioladas - despigmentadas), observou-se que houve um crescimento da fluorescência variável relativa, tendendo para uma saturação do processo no material submetido a 25°C. Nesse tratamento, já a partir do primeiro dia de acumulação dos pigmentos, houve um aumento na dV/dt_0 , se destacando ($P<0,05$) daquela apresentada no início do processo de enverdecimento. A partir de então, a dV/dt_0 se manteve nos mesmos níveis ($P<0,05$) até o final do ensaio (no 27º dia).

Para as plântulas submetidas à temperatura de resfriamento, o aumento na razão dV/dt_0 foi expressivo ($P<0,05$), comparando-se os valores obtidos no início do experimento com os índices do 10º dia. No entanto, este incremento em dV/dt_0 foi inferior (~28%) ao observado no controle no 11º dia. O valor máximo de dV/dt_0 nas plântulas tratadas a 10°C ocorreu no 18º dia do tratamento de enverdecimento, correspondendo a pouco mais do dobro do apresentado pelo controle no 19º dia (Tabela 3). No 26º dia, o valor de dV/dt_0 das plantas a 10°C caiu a menos da metade do 18º dia e superou em 13% o do tratamento a 25°C (no 27º dia).

A figura 35 mostra a concentração de MDA ([MDA]), expressando os níveis de peroxidação lipídica, crescente a partir do início do período de acumulação dos pigmentos cloroplastídicos. Essa concentração foi máxima no tratamento a 25°C no 27º dia. Nesse momento, a [MDA] de 11,15 mmol/g MF foi

cerca de 5 vezes superior a do início do ensaio (2,24 mmol/g MF).

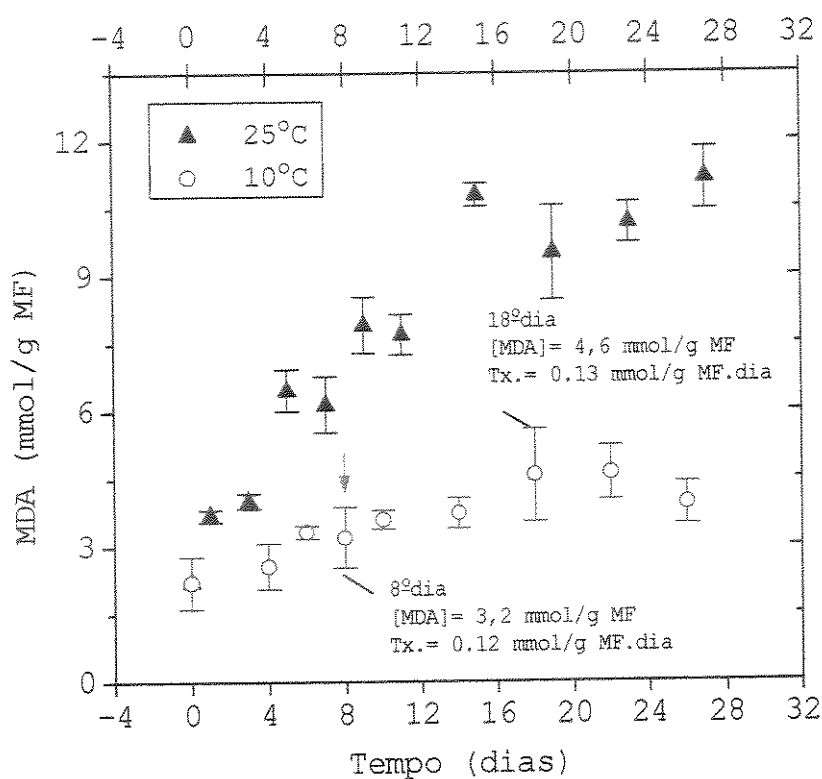


Figura 35 - Alteração na atividade lipoperoxidativa, expressa em termos da concentração de malondialdeído (MDA), em folhas cotiledonares de cafeeiro durante o período de enverdecimento, em resposta aos tratamentos de resfriamento (10°C) e controle (25°C). A seta indica a mudança de temperatura do tratamento a 10°C para 25°C. Cada ponto corresponde a média de quatro repetições e as barras o erro padrão.

Nas plântulas submetidas à temperatura de resfriamento, a [MDA] manteve-se praticamente constante durante a aplicação do tratamento a 10°C. Após a mudança da temperatura para 25°C, a atividade peroxidativa mudou pouco até o 18º dia. Nesse dia, a taxa de aumento na [MDA] foi muito próxima (0,13 mmol/g.dia) a verificada no 8º dia (0,12 mmol/g.dia), quando o material ainda se encontrava a temperatura de 10°C. Entre o 18º dia e o início

do tratamento a [MDA] dobrou, enquanto que até o final do ensaio essa alterou pouco, ficando em média cerca de 14% mais baixa (Figura 35).

4.3. Efeitos da temperatura de resfriamento na susceptibilidade à fotoinibição.

F_0 após o tratamento com alta DFFF ($2500 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$), apresentou uma resposta próxima a do controle (não fotoinibido, permaneceu no escuro) nos primeiros 30 minutos nas plantas que permaneceram a 25°C (Figura 36A). A partir de 60 minutos da recuperação sob baixa luminosidade, os sinais de F_0 dos

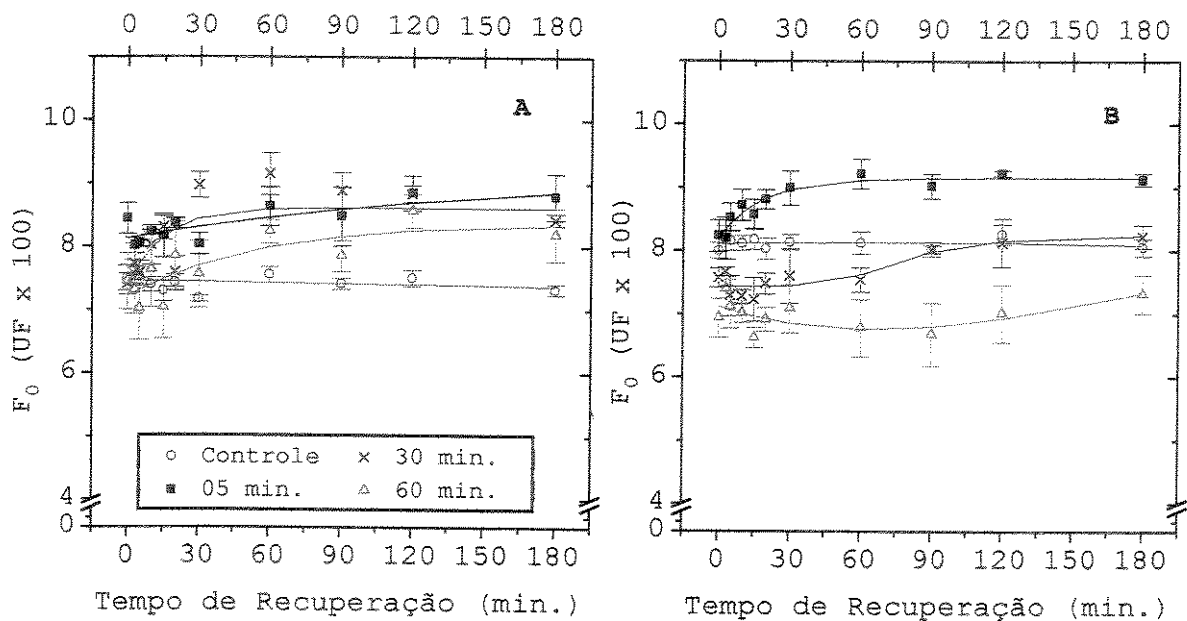


Figura 36 - Fluorescência inicial (F_0) (em unidades de fluorescência - UF) em folhas de cafeeiro durante o período de recuperação após o tratamento de fotoinibição por 5, 30 ou 60 minutos com DFFF de $2500 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$, comparados com o controle (escuro). As plantas foram mantidas a 25°C (A) e a 10°C (B) por dez dias antes do tratamento de fotoinibição. Cada ponto representa a média e as barras o erro padrão de cinco ensaios independentes.

tratamentos de fotoinibição; 5, 30 e 60 minutos de exposição à alta DFFF, foram superiores 14, 16 e 7% ao do controle, respectivamente. No final do ensaio, aos 180 minutos, a diferença nos níveis de F_0 entre os tratamentos de luz foi menor e um pouco maior que o controle. As diferenças com relação ao controle foram de 20, 17 e 13% para os tempos de luz de 5, 30 e 60 minutos, respectivamente.

Para as plantas tratadas a 10°C (Figura 36B), F_0 das plantas que permaneceram no escuro foi ligeiramente superior em relação a do tratamento a 25°C. Após o choque de luz por cinco minutos, F_0 aumentou durante o período de recuperação até os 30 minutos, a partir do qual o sinal se estabilizou permanecendo acima do controle cerca de 12%. Ainda para o tratamento a 10°C, a exposição à DFFF por 30 e 60 minutos, induziu a uma queda em F_0 . Essa variável de fluorescência retornou aos níveis do controle, no tratamento com 30 minutos de luz, após 90 minutos de permanência da planta sob baixa luminosidade. No tratamento com 60 minutos de luz não houve recuperação do sinal de F_0 até o final do ensaio. Após 180 minutos do choque de luz F_0 permaneceu 10% abaixo do controle.

A figura 37A ilustra a resposta de F_v das plantas tratadas a 25°C, durante o período de recuperação após o tratamento de fotoinibição com DFFF de 2500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$. Essa variável de fluorescência foi fortemente afetado pelo choque de luz, apresentando queda entre 75% (para 5 minutos de luz) e 96%

(para 60 minutos de luz) com relação ao controle. F_v apresentou inicialmente uma subida durante o período de recuperação sob baixa intensidade luminosa. Essa recuperação se deu em grande parte durante os primeiros 30 minutos, a partir do qual apresentou uma estabilização do sinal até o final do ensaio. Houve uma nítida diferença na recuperação do sinal de F_v entre os tempos de exposição ao tratamento de fotoinibição, porém, em nenhum momento o sinal se igualou aos níveis do controle. O tratamento de luz por 5 minutos apresentou a maior retomada de F_v chegando ao final do período de recuperação com o sinal 20% abaixo do controle. Para os tratamentos de 30 e 60 minutos de luz, a retomada do sinal atingiu 38 e 51%, respectivamente, dos

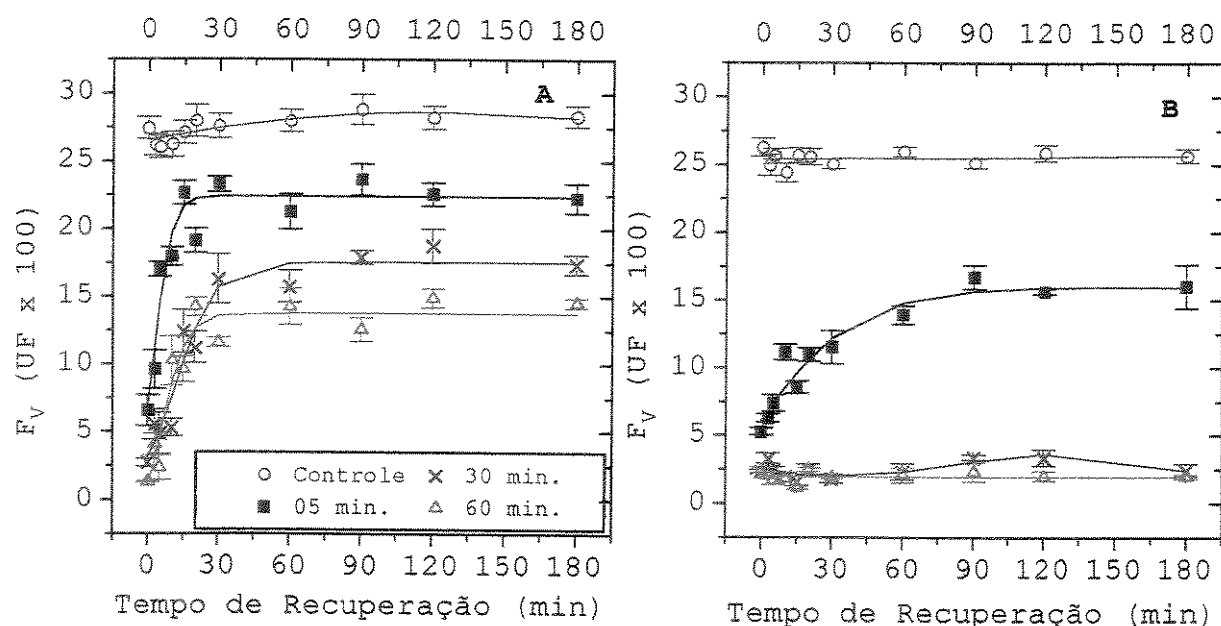


Figura 37 - Fluorescência variável (F_v) (em unidades de fluorescência - UF) em folhas de cafeeiro durante o período de recuperação após o tratamento de fotoinibição por 5, 30 ou 60 minutos com DFFF de $2500 \mu\text{mol/m}^2 \cdot \text{s}$, comparados com o controle (escuro). As plantas foram mantidas a 25°C (A) e a 10°C (B) por dez dias antes do tratamento de fotoinibição. Cada ponto representa a média e as barras o erro padrão de cinco ensaios independentes.

níveis do controle (Figura 37A).

Nas plantas submetidas a temperatura de 10°C (Figura 37B), F_v do controle foi um pouco inferior (5%) ao controle do material tratado a 25°C (Figura 37A). Porém, após os tratamentos de luz, no início do período de recuperação, a queda de F_v ocorreu com intensidade muito próxima (76% para 5, e ~90% para 30 e 60 minutos) do tratamento a 25°C. Notadamente a recuperação de F_v foi afetada pelo tratamento de resfriamento. Com cinco minutos de choque de luz esse sinal apresentou-se 38% abaixo do controle, após 180 minutos de recuperação. Já os tratamentos de 30 e 60 minutos de luz apresentaram, também aos 180 minutos, níveis de F_v em torno de 91% abaixo do controle (Figura 37B).

O tratamento de luz afetou F_m nas plantas tratadas a 25°C (Figura 38A). Essa variável caiu próximo de 50% para o tratamento de luz por cinco minutos, e cerca de 70% quando o material foi iluminado por 30 ou 60 minutos, com alta DFFF. F_m apresentou uma recuperação parcial durante o período que permaneceu sob baixa luminosidade, após o choque de luz. Para o tratamento de luz com duração de cinco minutos F_m estabilizou-se após 30 minutos, enquanto para os tratamentos com 30 e 60 minutos de luz após 60 minutos, sob baixa luminosidade (Figura 38A). A recuperação de F_m não foi suficiente para atingir os níveis do controle. Após 180 minutos sob baixa luminosidade, os

valores de F_M foram 14, 24 e 45% abaixo do controle nos tratamentos de 5, 30 e 60 minutos de luz, respectivamente.

Na figura 38B apresenta-se os resultados de F_M das folhas das plantas submetidas a temperatura de 10°C, após tratamento de luz. Nas plantas que permaneceram no escuro (controle), houve uma pequena queda de ~5% do sinal com relação as plantas tratadas a 25°C. Enquanto que após o tratamento de luz (no tempo 0 de recuperação), a queda em F_M com relação ao controle foi a mesma apresentada pelo tratamento a 25°C. A recuperação do sinal porém, foi menos intensa. F_M ficou 24% abaixo do controle no final do período de recuperação do material que foi

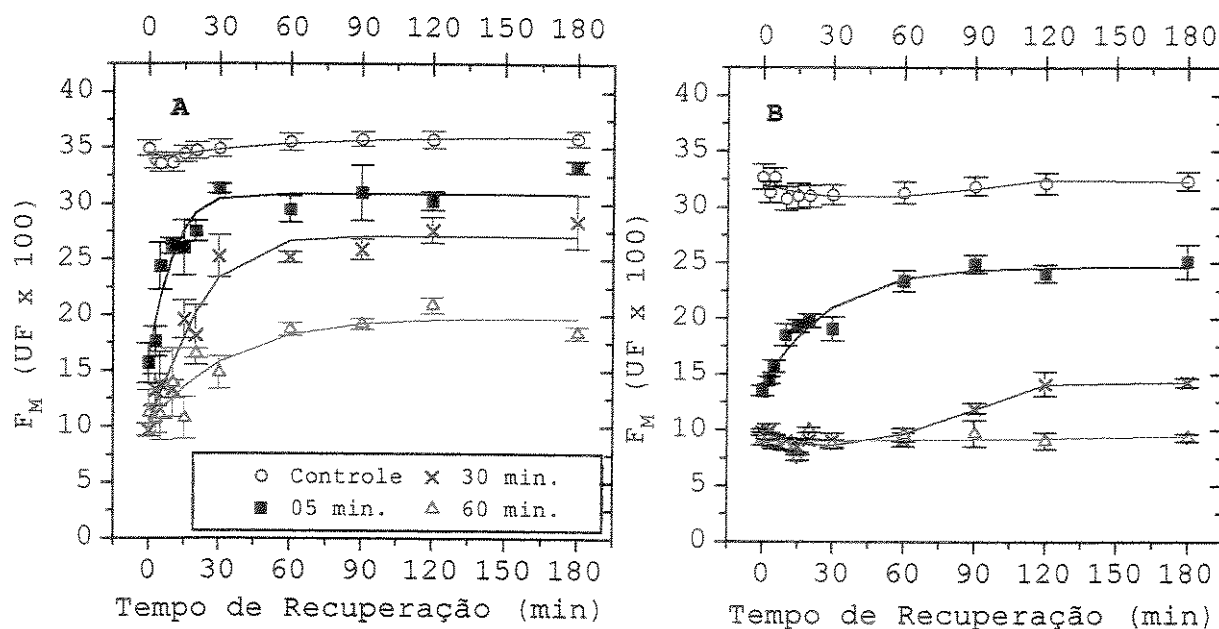


Figura 38 - Fluorescência máxima (F_M) (em unidades de fluorescência - UF) em folhas de cafeeiro durante o período de recuperação após o tratamento de fotoinibição por 5, 30 ou 60 minutos com DFFF de $2500 \mu\text{mol/m}^2 \cdot \text{s}$, comparados com o controle (escuro). As plantas foram mantidas a 25°C (A) e a 10°C (B) por dez dias antes do tratamento de fotoinibição. Cada ponto representa a média e as barras o erro padrão de cinco ensaios independentes.

submetido ao tratamento de luz por cinco minutos. Essa variável ficou 56 e 71% abaixo do controle, após 180 minutos sob baixa luminosidade nas plantas tratadas por 30 e 60 minutos, respectivamente, com alta DFFF. A recuperação de F_M nas plantas tratadas com luz por 30 minutos, só se destacou do tratamento de 60 minutos de luz a partir de 90 minutos sob baixa luminosidade. Não foi verificado qualquer aumento de F_M durante o período de recuperação após o tratamento com alta DFFF por 60 minutos (Figura 38B).

O tempo para ocorrência da F_M (T_{FM}) foi maior após o tratamento de luz. A figura 39A mostra as alterações no T_{FM} das plantas tratadas a 25°C. Com relação ao tratamento de luz por cinco minutos, o T_{FM} caiu (23%) logo após a aplicação do mesmo. Durante o período de recuperação porém, T_{FM} foi crescente nos 60 minutos iniciais sob baixa luminosidade quando ficou 56% superior ao controle. No tratamento de 30 minutos com alta DFFF, o valor do T_{FM} alterou muito pouco durante o período de recuperação das plantas, passando de 53% (logo após o choque de luz) para 70% acima do controle, no final desse período. No tratamento de 60 minutos de luz, o T_{FM} após a alta inicial (233% acima do controle) caiu, se igualando aos outros tratamentos de luz a partir de 60 minutos do período de recuperação.

Para as plantas submetidas ao tratamento de resfriamento (Figura 39B), o T_{FM} se destacou do controle apenas nos tratamentos de 30 e 60 minutos com alta DFFF. A subida de T_{FM} logo após a exposição a alta DFFF foi de 154% acima do controle

para o tratamento de luz com duração de 30 minutos, e de 114% para o de 60 minutos de duração. Em ambos os tratamentos o T_{Fm} caiu durante a recuperação das plantas sob baixa luminosidade, chegando ao final desse período, ainda, acima dos valores apresentados pelo controle; 32% para o tratamento de 30 minutos e 57% para o de 60 minutos de exposição ao choque de luz (Figura 39B).

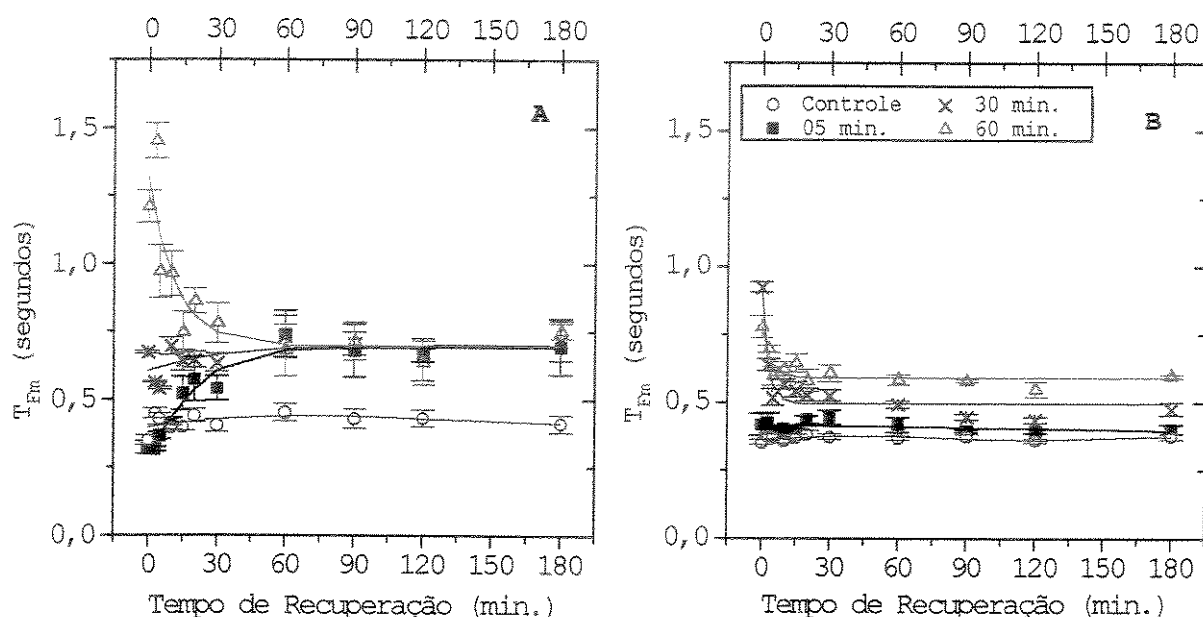


Figura 39 - Tempo para ocorrência da fluorescência máxima (T_{Fm}) em folhas de caféiro durante o período de recuperação após o tratamento de fotoinibição por 5, 30 ou 60 minutos com DFFF de $2500 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, comparados com o controle (escuro). As plantas foram mantidas a 25°C (A) e a 10°C (B) por dez dias antes do tratamento de fotoinibição. Cada ponto representa a média e as barras o erro padrão de cinco ensaios independentes.

A variável referente a área entre F_0 e F_M , das plantas tratadas a 25°C (Figura 40A), diminuiu após incidência de alta DFFF. A queda em relação ao controle foi de 77, 76 e 74% para os tratamentos de luz com 5, 30 e 60 minutos de duração, respectivamente.

Para os tratamentos de 5 e 30 minutos de duração, o valor da área retornou aos níveis do controle após 30 minutos de recuperação das plantas sob baixa luminosidade. Porém, para o tratamento de luz com 60 minutos de duração essa variável de fluorescência não recuperou os níveis do controle. Nesse tratamento, após 180 minutos de permanência sob baixa luminosidade, a área permaneceu 22% inferior ao controle.

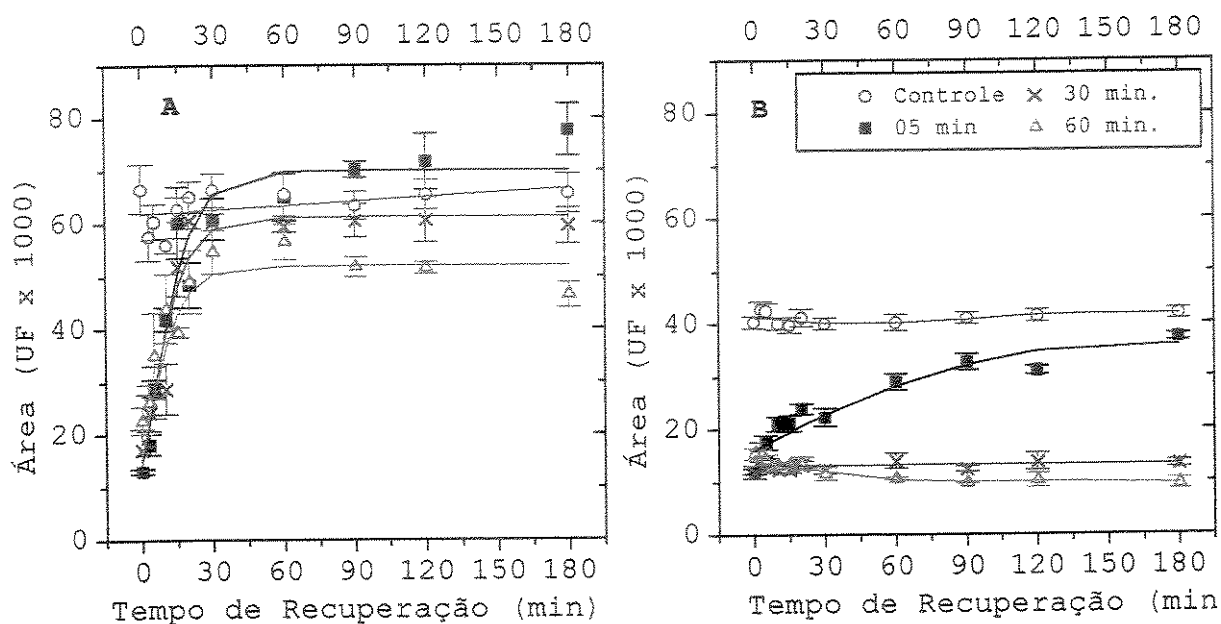


Figura 40 - Área acima da curva de fluorescência (em unidades de fluorescência - UF) em folhas de café durante o período de recuperação após tratamento de fotoinibição por 5, 30 ou 60 minutos com DFFF de $2500 \text{ mmol/m}^2 \cdot \text{s}$, comparados com o controle (escuro). As plantas foram mantidas a 25°C (A) e a 10°C (B) por dez dias antes do tratamento de fotoinibição. Cada ponto representa a média e as barras o erro padrão de cinco ensaios independentes.

A área entre F_0 e F_M foi nitidamente afetada pelo tratamento de resfriamento, caindo em torno de 35% com relação ao tratamento a 25°C (Figura 40B). Com a aplicação do tratamento de luz, o valor da área caiu mais ainda, ficando

cerca de 60% abaixo do controle nos tratamentos de luz com duração de 5 e 60 minutos, e 70% para o tratamento de 30 minutos de exposição ao choque de luz. Nos tratamentos de 30 e 60 minutos de duração do choque com alta DFFF, o valor da área não voltou aos níveis do controle durante o período de recuperação das plantas. No entanto para o tratamento de 5 minutos essa variável de fluorescência recuperou-se parcialmente permanecendo, porém, 14% abaixo do controle, após 180 minutos sob baixa luminosidade.

A razão F_v/F_m foi afetada pelo tratamento de resfriamento, apresentando uma queda de 5% ($P < 0,05$) com relação ao tratamento a 25°C (Figura 41). Com a aplicação do tratamento de fotoinibição, essa eficiência diminuiu a medida em que se aumentou o tempo de exposição das plantas ao tratamento com alta DFFF, independente da temperatura na qual as plantas haviam sido submetidas anteriormente (Figura 41). Após 5 minutos de alta intensidade luminosa a razão F_v/F_m foi de 48% do controle para os dois tratamentos de temperatura. Para o tempo de exposição à DFFF de 30 minutos, a queda foi de 72% para o tratamento a 25°C e 65% para o de resfriamento. Enquanto que para as plantas submetidas ao tratamento de luz por 60 minutos, a queda foi de 74 e 76% nos tratamentos a 10 e 25°C, respectivamente.

Em todos os tratamentos de luz houve recuperação parcial da razão F_v/F_m . Entretanto, a capacidade de recuperação foi

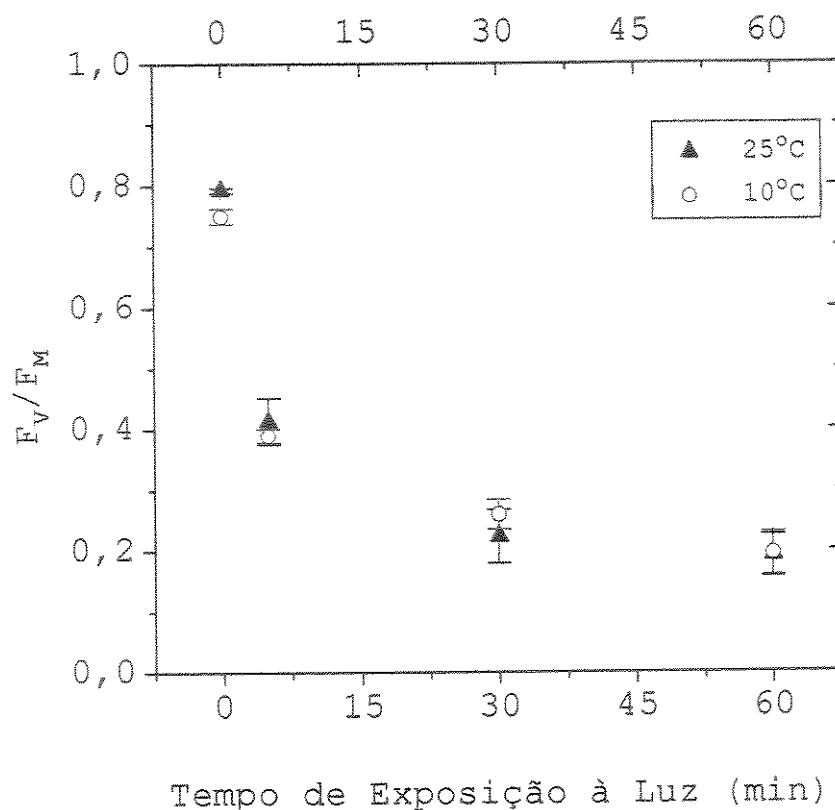


Figura 41 - Eficiência quântica do PS_{II} (F_v/F_m) em folhas de cafeeiro, em função do tempo de exposição das plantas ao tratamento de fotoinibição com DFFF de $2500 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$. Os valores correspondem ao tempo 0 de recuperação. As plantas foram mantidas a 25°C ou a 10°C por dez dias antes do tratamento de fotoinibição. Cada ponto representa a média e as barras o erro padrão de cinco ensaios independentes.

tanto maior, quanto menor o tempo de luz aplicado às plantas (Figuras 42A e 42B).

Nas plantas tratadas com DFFF por 5 minutos, após 30 minutos do período de recuperação, F_v/F_m já havia subido 76% ficando em torno de 9% abaixo dos níveis do controle mantendo-se assim até o final do ensaio. Para os tratamentos de luz com duração de 30 e 60 minutos, a razão F_v/F_m também aumentou durante o período de recuperação das plantas. No final desse

período F_V/F_M estava 17% e 32% abaixo do controle nas plantas submetidas à fotoinibição por 30 e 60 minutos, respectivamente.

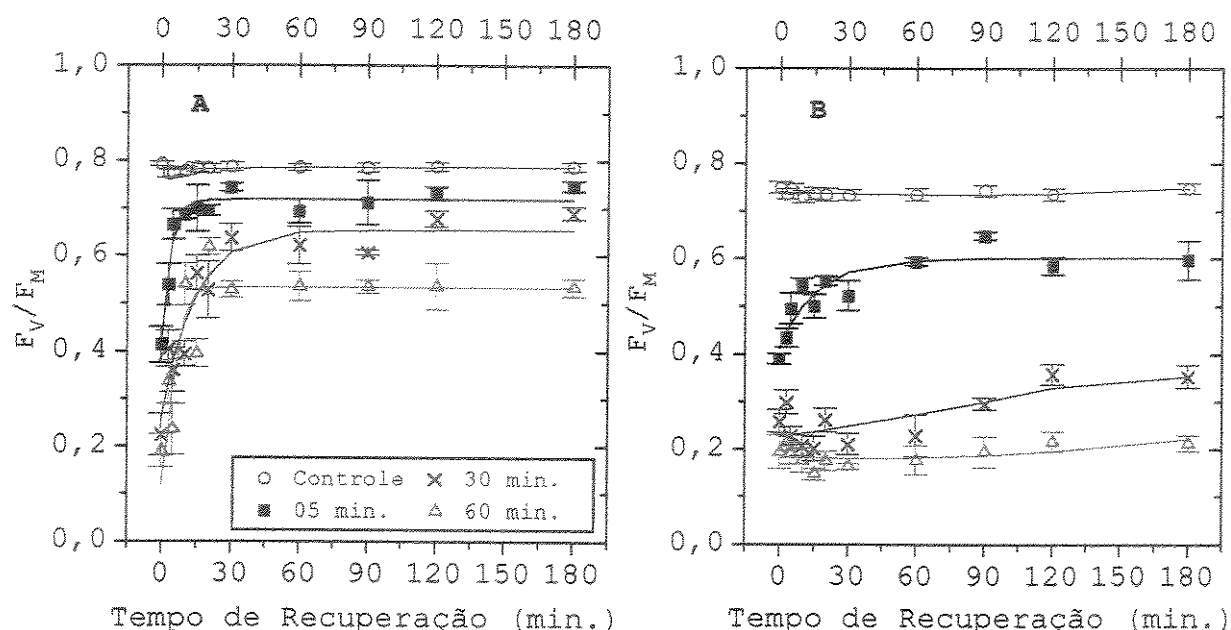


Figura 42 - Eficiência quântica do PSII (F_V/F_M) em folhas de caféiro durante o período de recuperação no escuro, após tratamento de fotoinibição por 5, 30 ou 60 minutos com DFFF de $2500 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, comparados com o controle (escuro). As plantas foram mantidas a 25°C (A) e a 10°C (B) por dez dias antes do tratamento de fotoinibição. Cada ponto representa a média e as barras o erro padrão de cinco ensaios independentes.

Nas plantas que foram submetidas ao resfriamento, a razão F_V/F_M caiu sensivelmente após aplicação do tratamento de luz (Figura 41). Com as plantas sendo mantidas sob baixa luminosidade, houve uma pequena recuperação de F_V/F_M (Figura 42B), com a razão ficando 20%, 53% e 70% abaixo do controle nos tratamentos de luz de 5, 30 e 60 minutos de duração. No tratamento de luz por 60 minutos, a razão F_V/F_M praticamente não mudou durante o período de recuperação das plantas, não sendo observado nenhuma recuperação significativa dessa razão.

Após a aplicação do tratamento de fotoinibição nas plantas do tratamento a 25°C, a razão F_v/F_0 foi de 0,731 no tratamento de luz por 5 minutos, 0,299 para o de 30 minutos e 0,347 para o de 60 minutos de duração do choque de luz (Figura 43A). Quando comparados com o valor de F_v/F_0 do controle (3,581), esses valores representam uma queda de 80%, 92% e 90%, respectivamente. Após o choque de luz, com a permanência das plantas sob baixa luminosidade, F_v/F_0 apresentou um aumento,

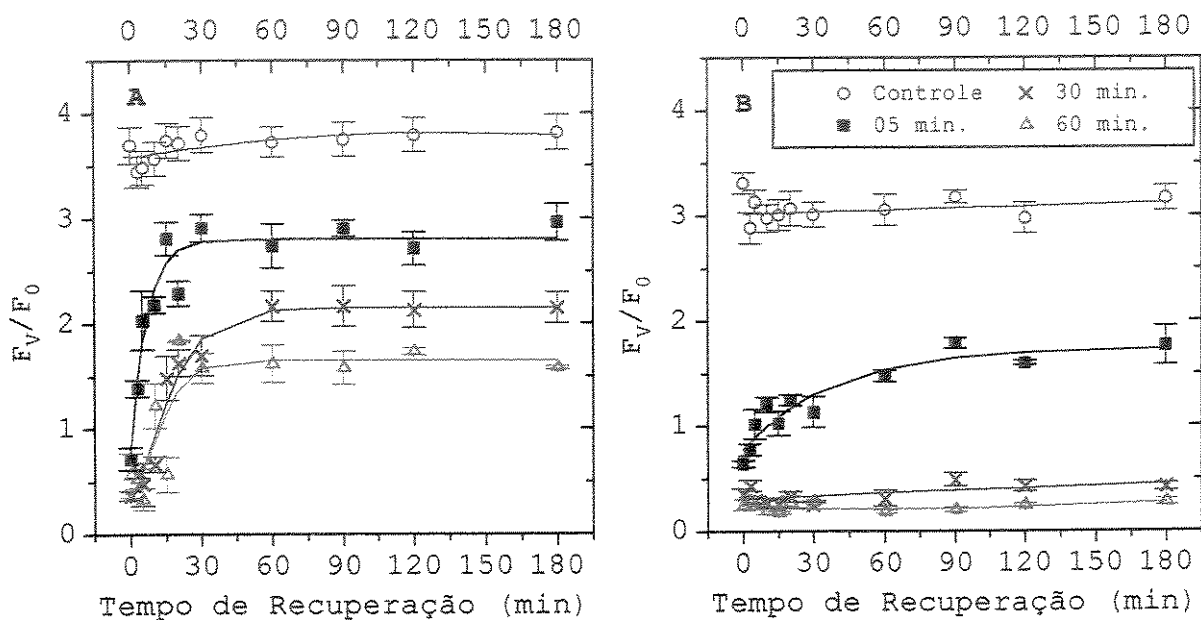


Figura 43 - Altrações na razão F_v/F_0 em folhas de caféiro durante o período de recuperação após o tratamento de fotoinibição por 5, 30 ou 60 minutos com DFFF de 2500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, comparados com o controle (escuro). As plantas foram mantidas a 25°C (A) e a 10°C (B) por dez dias antes do tratameto de fotoinibição. Cada ponto representa a média e as barras o erro padrão de cinco ensaios independentes.

porém, ainda insuficiente para restabelecer os mesmos níveis do controle. Com isso a razão ficou 26%, 43% e 56% abaixo do controle para os tratamentos de 5, 30 e 60 minutos de luz,

respectivamente, após permanência das plantas por 180 minutos sob condições de recuperação.

A razão F_v/F_0 também foi consideravelmente afetada pelo tratamento de resfriamento, essa razão nas plantas controle apresentou queda de 16% ($P < 0,05$) - mais expressiva que os 5% da razão F_v/F_m - em relação ao tratamento a 25°C (Figura 43B). Com a aplicação do choque de luz, a razão caiu 75% nas plantas submetidas ao tratamento de luz por 5 minutos, 90% e 92% naquelas cuja duração do tratamento de luz foi de 30 e 60 minutos, respectivamente. Essas quedas, também, foram mais expressivas que as observadas através da razão F_v/F_m de 56%, 69% e 72%, respectivamente, para as mesmas condições. O período de recuperação alterou muito pouco os valores de F_v/F_0 . No final desse período, essa razão estava 86% e 91% abaixo do controle nos tratamentos com 30 e 60 minutos de luz, respectivamente. No tratamento com 5 minutos de luz, F_v/F_0 ficou 45% abaixo do controle ao final do período de recuperação das plantas.

As figuras de 44 a 47 (A e B) mostram os resultados dos efeitos do tempo de duração dos tratamentos de luz nos transientes da fluorescência da Clo *a*, durante o período de recuperação das plantas. O surgimento dos transientes *J*, *I* e *P*, mostram a capacidade de regeneração do lado aceitador do PS_{II}, após tratamento fotoinibitório (Strasser et al., 1995).

As figuras 44A e B mostram as curvas dos tratamentos a 25 e a 10°C, respectivamente, após o tratamento de fotoinibição.

Para ambas temperaturas, observou-se uma desconfiguração nas curvas de fluorescência após os tratamentos com alta DFFF,

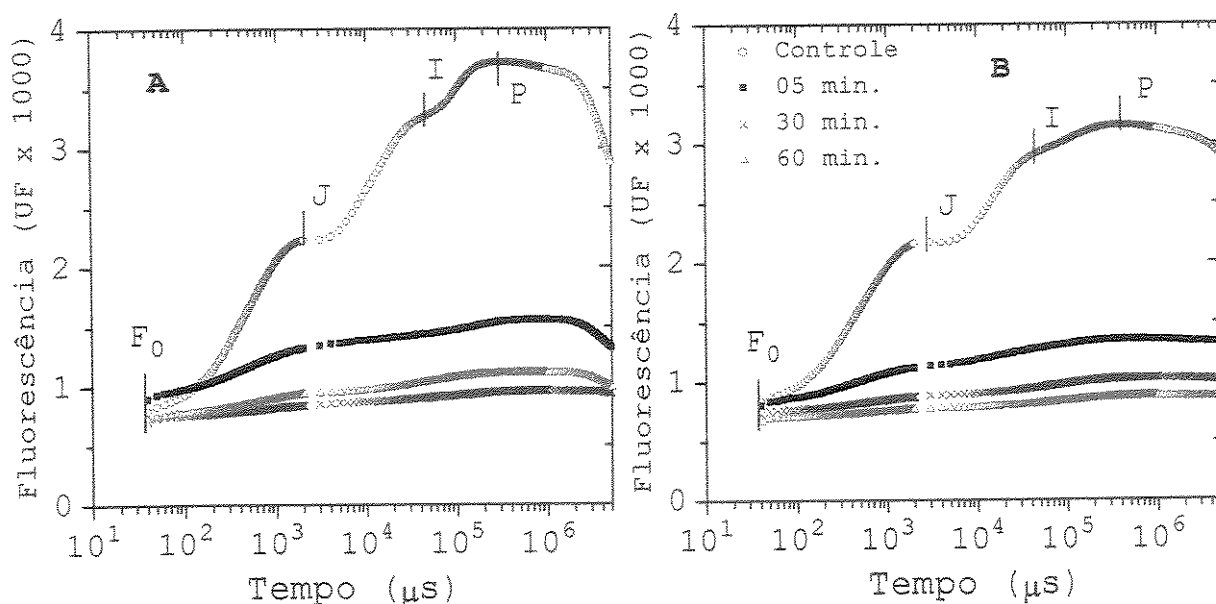


Figura 44 - Cinética de fluorescência da Clo *a* em folhas de cafeeiro após o tratamento de fotonibição por 5, 30 ou 60 minutos com DFFF de 2500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ comparados com o controle (escuro). As plantas foram mantidas a 25°C (A) e a 10°C (B) por dez dias antes do tratamento de luz. Cada figura representa a média de cinco ensaios independentes.

não sendo observados os transientes *J*, *I* e *P*.

Cinco minutos após o tratamento de fotonibição que teve a duração de cinco minutos, já foi possível distinguir *J* em ambos os tratamentos de temperatura (Figuras 45A e B). Com trinta minutos de recuperação, a emissão de fluorescência das plantas tratadas a 25°C com alta DFFF por cinco minutos, apresentou todos os transientes (Figura 46A).

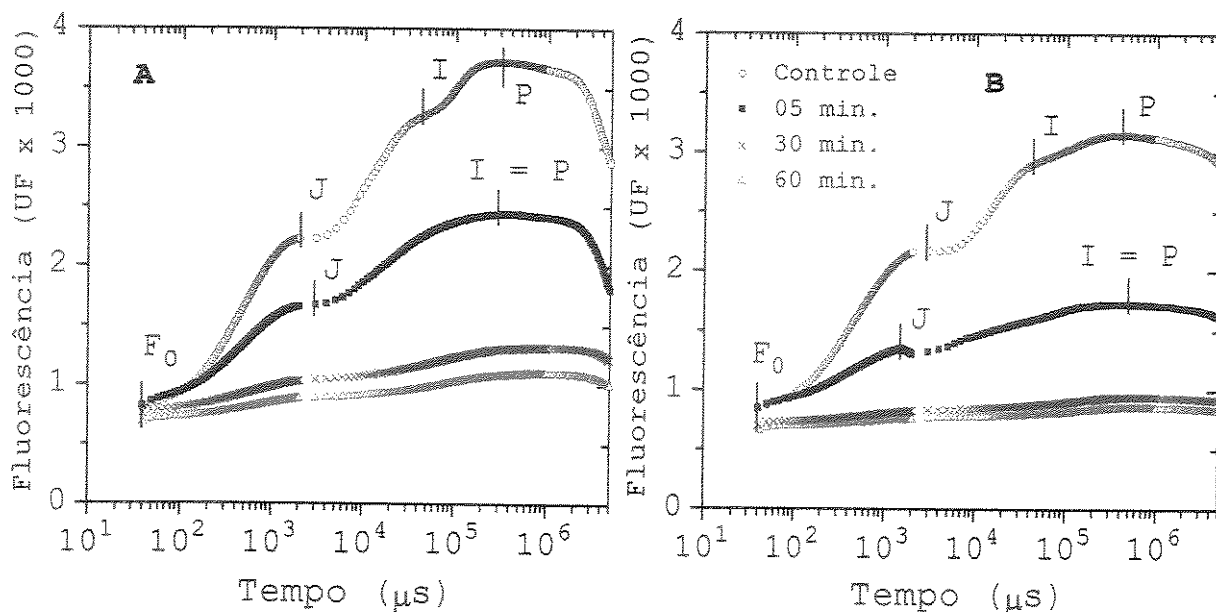


Figura 45 - Cinética de fluorescência da Clo *a* em folhas de cafeeiro, cinco minutos após o tratamento de fotoinibição por 5, 30 ou 60 minutos com DFFF de 2500 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$, comparados com o controle (escuro). As plantas foram mantidas a 25°C (A) e a 10°C (B) por dez dias antes do tratamento de luz. Cada figura representa a média de cinco ensaios independentes.

Na curva do tratamento de luz por 30 minutos, além de F_0 , o transiente *J* foi observado também na emissão de fluorescência. Após 120 minutos da aplicação do tratamento de luz, as curvas de emissão de fluorescência das plantas a 25°C apresentaram o transiente *J* para todos os tempos de duração do tratamento de fotoinibição (Figura 47A). Já o transiente *I* apenas se destacou na curva do material tratado com luz por cinco minutos, não se distinguindo do transiente *P* nas curvas dos demais tratamentos.

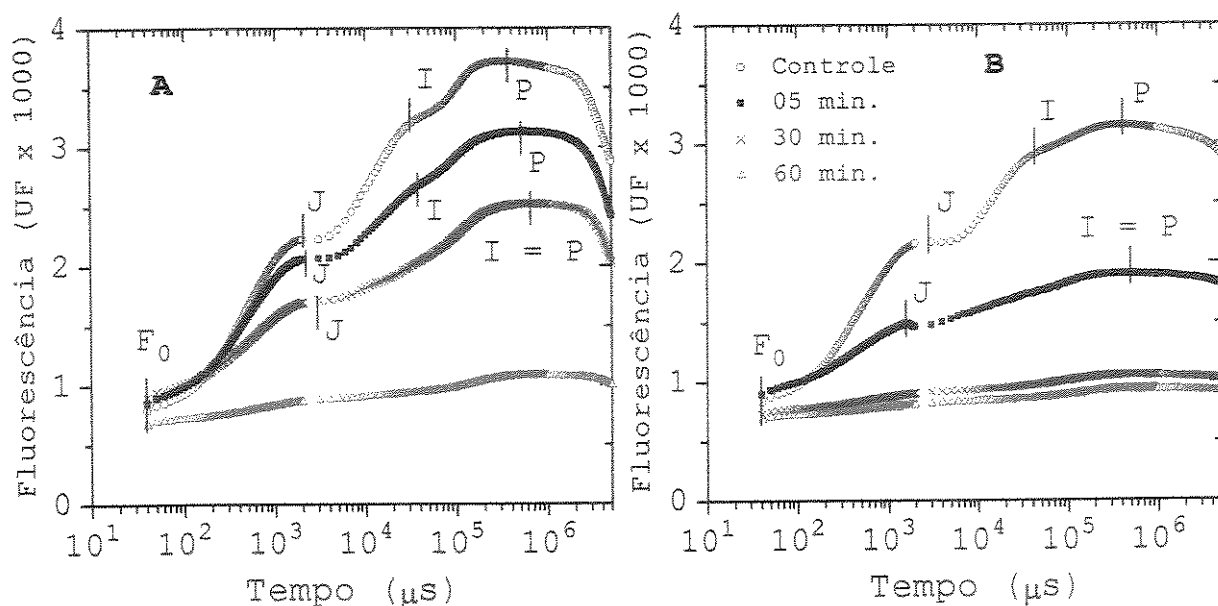


Figura 46 - Cinética de fluorescência da Clo *a* em folhas de caféiro, 30 minutos após o tratamento de fotoinibição por 5, 30 ou 60 minutos com DFFF de 2500 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$, comparados com o controle (escuro). As plantas foram mantidas a 25°C (A) e a 10°C (B) por dez dias antes do tratamento de luz. Cada figura representa a média de cinco ensaios independentes.

Para as plantas submetidas ao tratamento de resfriamento, o transiente *J* foi observado a partir de cinco minutos do tratamento de fotoinibição com duração de cinco minutos (Figura 45B), e 120 minutos após a fotoinibição, na curva referente ao tratamento de luz com duração de 30 minutos (Figura 47B). Para o tratamento de fotoinibição por 60 minutos, nenhum dos transientes (à exceção de F_0) se destacou na curva da emissão de fluorescência das plantas tratadas a 10°C (Figuras 44B, 45B, 46B e 47B).

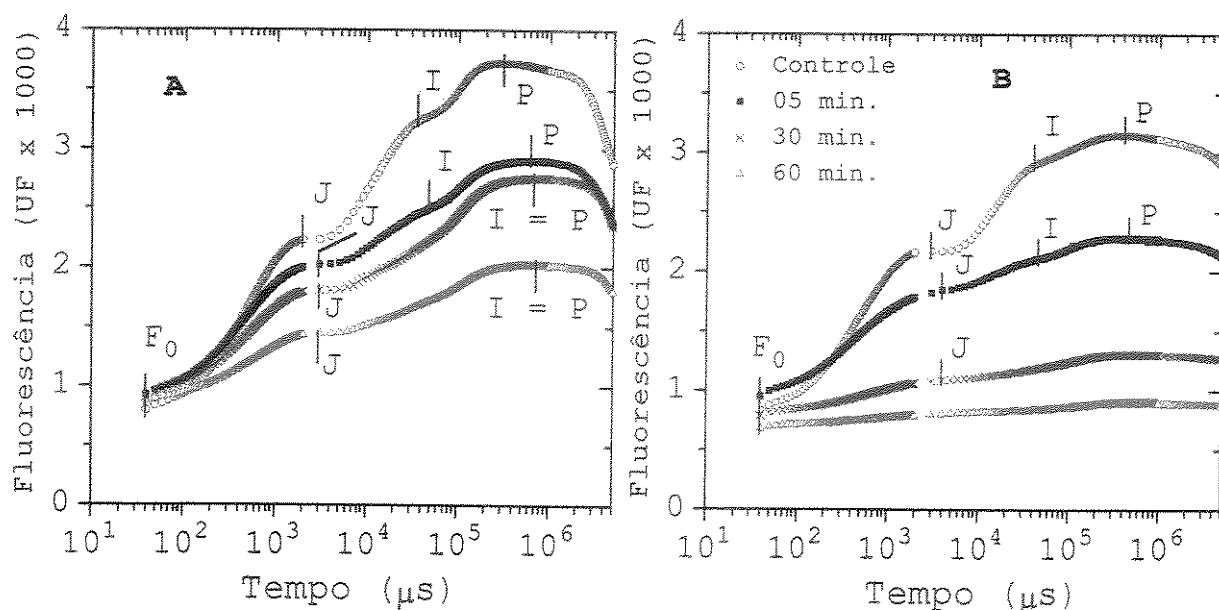


Figura 47 - Cinética de fluorescência da Clo *a* em folhas de cafeeiro, 120 minutos após o tratamento de fotoinibição por 5, 30 ou 60 minutos com DFFF de 2500 μmol/m².s, comparados com o controle (escuro). As plantas foram mantidas a 25°C (A) e a 10°C (B) por dez dias antes do tratamento de luz. Cada figura representa a média de cinco ensaios independentes.

Com relação ao tratamento de temperatura afetando a intensidade da emissão da fluorescência, no tratamento de resfriamento (Figura 44B), observou-se uma atenuação de 15% na emissão da fluorescência máxima (*P* curva do controle) das plantas em comparação com o tratamento a 25°C (Figura 44A). Cinco minutos após o tratamento de fotoinibição, no material submetido ao tratamento de luz por cinco minutos, o tempo para ocorrência de *J* nas plantas tratadas a 10°C (Figura 45B), foi 52% menor que naquelas tratadas a 25°C (Figura 45A), enquanto que a fluorescência foi 19% inferior no tratamento a 10°C. Já a

emissão da fluorescência máxima, após esse mesmo tratamento de luz, ocorreu 63% mais tarde e com intensidade 29% menor, no tratamento a 10°C em comparação ao de 25°C.

Após 30 minutos do tratamento de fotoinibição com cinco minutos de duração, os tempos para ocorrência dos transientes *J* e *P*, foram 21% e 12% menores, respectivamente, nas plantas tratadas a 10°C, em relação ao tratameto a 25°C (Figuras 46A e B). Enquanto a intensidade da fluorescência foi menor 28% em *J* e 39% em *P*.

Decorridos 120 minutos do tratamento de fotoinibição com duração de cinco minutos, a ocorrência do transiente *J* foi 33% mais demorada, enquanto que *I* e *P* foram 10% e 31%, respectivamente, mais rápidos no tratamento a 10°C com relação ao de 25°C. As intensidades de fluorescência emitidas em *J*, *I* e *P*, foram inferiores 9%, 15% e 21%, respectivamente, nas plantas a 10°C em comparação as do tratamento a 25°C.

A figura 48A mostra a variação no aumento inicial da cinética de fluorescência da Clo *a* das plantas tratadas a 25°C, após tratamento fotoinibitório. Foi observado que durante o período de recuperação das plantas, após tratamento com alta DFFF, houve um aumento nos valores dessa subida, com uma tendência à saturação. O tratamento de luz de cinco minutos de duração foi o que apresentou a maior recuperação (76% do controle), após 30 minutos do início do período de recuperação

das plantas. Nos tratamentos de luz de 30 e 60 minutos de duração, a recuperação foi de 53% e 34%, respectivamente, dos valores para a

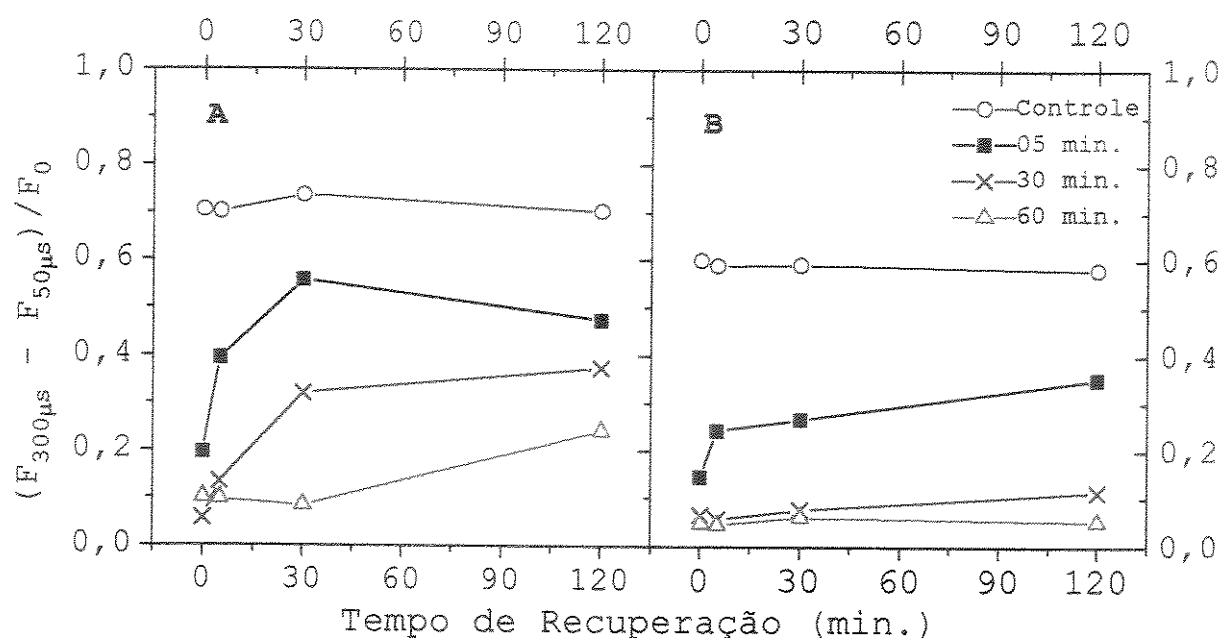


Figura 48 - Alterações no aumento inicial da cinética de fluorescência da Clo *a* em folhas de cafeeiro durante o período de recuperação após o tratamento de fotoinibição por 5, 30 ou 60 minutos com DFFF de 2500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, comparados com o controle (escuro). As plantas foram mantidas a 25°C (A) ea 10°C (B) por dez dias antes do tratamento de luz. Cada ponto corresponde a média de cinco ensaios independentes.

subida da fluorescência apresentados pelo controle, aos 120 minutos após o tratamento fotoinibitório (Figura 48A). No tratamento de resfriamento (Figura 48B), os valores para a subida da fluorescência nas plantas controle foram aproximadamente 20% abaixo dos apresentados pelo tratamento a 25°C. As plantas submetidas ao tratamento de fotoinibição por cinco minutos, apresentaram um pequeno aumento nos valores da

subida inicial da fluorescência, durante o período de recuperação das plantas. Esses valores variaram de 24% do controle, logo após o tratamento de luz, para 60%, aos 120 minutos do período de recuperação das plantas. Nos tratamentos de fotoinibição com duração de 30 e 60 minutos, a temperatura de resfriamento afetou nitidamente a subida inicial da cinética de fluorescência (Figura 48B). Nesses tratamentos, mesmo após o período de recuperação das plantas, sob baixa luminosidade, os valores da subida não recuperaram mais do que 20% (para o

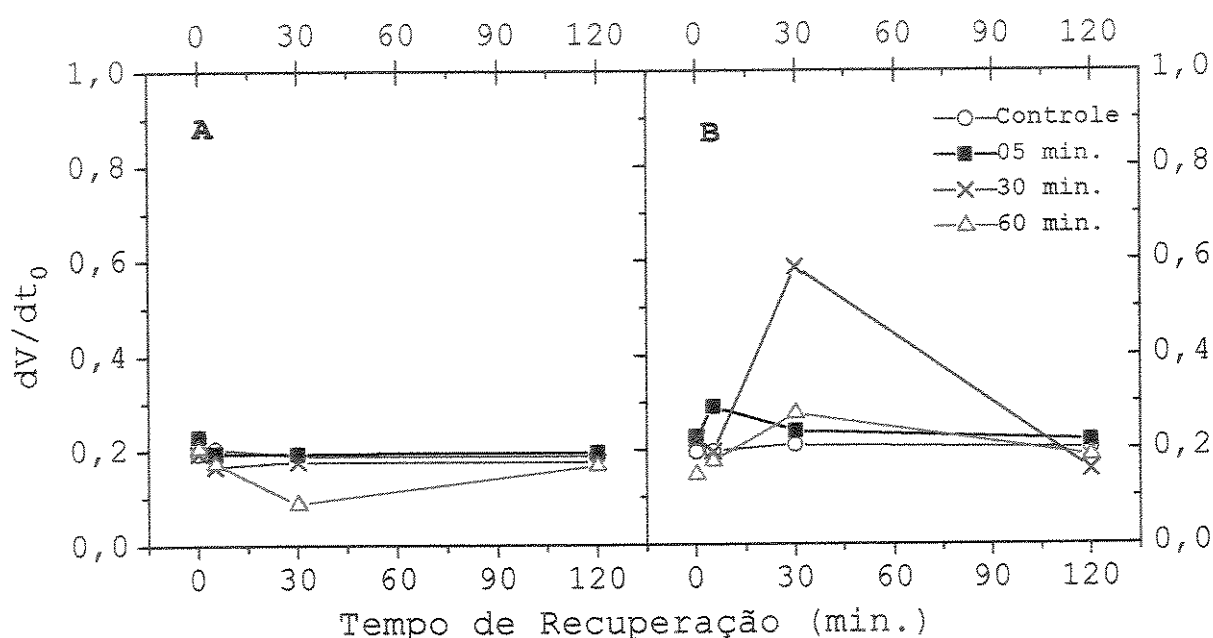


Figura 49 - Fluorescência variável relativa (dV/dt_0) em folhas de café durante o período de recuperação após o tratamento de fotoinibição por 5, 30 ou 60 minutos com DFFF de $2500 \mu\text{mol/m}^2.\text{s}$, comparados com o controle (escuro). As plantas foram mantidas a 25°C (A) e a 10°C (B) por dez dias antes do tratamento de luz. Cada ponto corresponde a média de cinco ensaios independentes.

tratamento de 30 minutos) ou 9% (para o de 60 minutos) dos valores do controle.

A fluorescência variável relativa (dV/dt_0), mostrou-se relativamente estável, no tratamento a 25°C (Figura 49A). Apenas o tratamento de fotoinibição de 60 minutos de duração apresentou uma queda (46% do controle) no valor de dV/dt_0 , ao longo do período de recuperação das plantas. Essa queda se deu aos 30 minutos desse período. Com relação à resposta das plantas que foram submetidas ao tratamento de resfriamento (Figura 49B), observou-se um forte aumento na razão dV/dt_0 no tratamento de luz de 30 minutos. Após 30 minutos sob baixa luminosidade, o aumento verificado em dV/dt_0 foi de 180% do valor do controle. Nos demais tratamentos de fotoinibição não foram observadas mudanças significativas nos valores da fluorescência variável relativa.

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeitos da temperatura de resfriamento sobre o aparelho fotossintético de plântulas de cafeeiro.

Nesse ensaio, o estudo dos efeitos da temperatura de resfriamento na atividade fotossintética de plântulas de cafeeiro foi realizado pela indução da fluorescência da Clo *a*, *in vivo*, que fornece informações sobre o funcionamento do aparelho fotossintético (Krause & Weis, 1984 e 1991; Schreiber, 1993; Krause, 1994; Andrews et al., 1995; Govindjee, 1995). Os resultados desse ensaio mostraram uma redução na eficiência quântica do PS_{II}, sinalizada pela resposta da razão F_v/F_m . A redução ocorreu tanto nas plantas submetidas ao tratamento de resfriamento, quanto no material controle. É provável que essa queda na eficiência quântica tenha sido causada pelo menor fluxo de elétrons através do PS_{II}, verificado pela subida de F_0 , nos dois tratamentos. Para Bilger et al. (1984), Ducruet & Lemoine (1985) e Bukhov et al. (1990) o aumento em F_0 é uma consequência da inibição do fluxo de elétrons de Q_A para Q_B . Já Rosenqvist et al. (1991), atribuem o aumento em F_0 a um dano funcional da P_{680} do centro de reação do PS_{II}. F_0 sinaliza uma rota de dissipação de energia na forma de emissão de fluorescência, através da Clo *a* do complexo antena, após captura da energia de excitação, quando as P_{680} encontram-se no estado oxidado (Strasser et al., 1995). A F_0 reflete o estado das moléculas de clorofila da antena, sendo uma medida para a

distribuição inicial da energia para o PS_{II} , e a eficácia da P_{680} na utilização da energia de excitação capturada (Georgieva & Yordanov, 1993).

Segundo Öquist (1983), temperaturas baixas afetam drasticamente o aparelho fotossintético em plantas sensíveis ao frio. As plântulas de cafeeiro, como são sensíveis ao frio (Levitt, 1980; Bauer et al., 1985), foram afetadas pela temperatura de resfriamento. A baixa temperatura diminuiu, de modo geral, todo o metabolismo e, como não poderia deixar de ser, também as etapas fotoquímicas da fotossíntese que são interdependentes da fase bioquímica, esta mais diretamente influenciada por baixas temperaturas (Wang, 1982; Öquist, 1983). Para Creencia & Bramlage (1971), embora a primeira consequência seja uma redução na razão F_v/F_m , o dano provocado pela baixa temperatura não está confinado ao aparelho fotossintético. Há evidências que a queda na taxa fotossintética induzida por resfriamento tem um importante papel na limitação do crescimento em milho (Ort & Baker, 1988; Stirling et al., 1993). Outros efeitos rapidamente ocorrem, como aumento no vazamento de eletrólitos a partir dos tecidos resfriados, provavelmente devido a um aumento na permeabilidade das membranas desses tecidos (Smillie & Hetherington, 1983). Um aspecto relevante, com relação ao efeito das baixas temperaturas sobre a atividade fotossintética, são as alterações físicas ocorridas nas membranas. Essas, organizadamente distribuídas como uma rede por todo o

cloroplasto, dão sustentação ao transporte de elétrons fotossintéticos (Hall & Rao, 1995). A queda na temperatura induz nas membranas cloroplastídicas um aumento na predominância dos domínios lipídicos no estado de gel, causando uma maior rigidez dessas membranas (Lyons, 1973; Murata & Fork, 1975). Em consequência disso, há uma queda na difusão lateral da PQ, com reflexos no *pool* de PQ e na taxa de redução de Q_A (Bowyer & Leegood, 1997).

Neste estudo com as plântulas de cafeeiro, a quantidade de PQ foi severamente diminuído com a temperatura de resfriamento. Se havia menos plastoquinona (menor *pool*) para ser reposta após sua redução, via re-oxidação de P_{680} , e ainda, uma redução no fluxo de elétrons através do PS_{II} , é provável que, como consequência, haja menos Q_A^- (quinona no estado reduzido). A queda na taxa de redução de Q_A nas plântulas de cafeeiro, pode ser constatada pela redução sistemática no sinal de F_M (Figura 10A).

Segundo Schreiber (1983) e Xu et al. (1989), o estado redox do aceitador primário de elétrons Q_A e o gradiente de H^+ intermembranas são os principais fatores que controlam as reações fotoquímicas no PS_{II} . A eficiência na captura, transferência e utilização da energia luminosa em reações fotoquímicas no PS_{II} , requer uma sequência de eventos fotoquímicos, bioquímicos e biofísicos (Nobel, 1991). Esses, em última análise, dependem de energia, quer seja para síntese de compostos constitutivos (proteínas), metabólicos (enzimas) ou

estruturais, como as membranas dos tilacóides. A manutenção dessa estrutura do aparelho fotossintético num arranjo típico e funcional também dispense energia, sendo indiretamente afetada pela queda no metabolismo, causada pela temperatura de resfriamento (Lyons, 1973; Wang, 1982). Alguns efeitos de danos causados pela baixa temperatura só se manifestam quando as plantas retornam a temperaturas acima da temperatura de resfriamento. Szalai et al. (1996) verificaram que em plantas de milho submetidas a baixas temperaturas, o retorno a 25°C causou uma queda na razão F_v/F_m , apesar dessa variável ter alterado pouco durante o tratamento de frio em completo escuro. Para esses autores, isso sugere que plantas sensíveis ao frio, quando expostas à luz após tratamento de frio, se tornam mais sensíveis.

Tanto a queda na taxa de redução de Q_A , como no fluxo de elétrons, bem como a redução na eficiência quântica do PS_{II} , foram constatados nas plântulas de cafeeiro de ambos os tratamentos de temperatura. Isso demonstra que não apenas a temperatura de resfriamento estaria atuando como causa dessas alterações no transporte de elétrons. É provável que tenha ocorrido uma queda em todas as etapas de transferência de energia, uma vez que a energia de excitação esteve comprometida pela permanência das plântulas na ausência de luz. Com isso, provavelmente, houve um esgotamento das reservas do tecido, com a taxa respiratória excedendo à fotossintética, já que essa era

nula. Como nas plântulas submetidas à temperatura de resfriamento o metabolismo estava reprimido, a taxa de respiração foi mais baixa que no material controle, levando a um esgotamento mais lento das reservas nessas plântulas. Isso justificaria a queda mais acentuada na eficiência quântica do PS_{II} nas plântulas tratadas a 25°C, em relação as do tratamento a 10°C, verificada após o décimo dia de tratamento.

A variação na razão F_v/F_0 , no decorrer do período de aclimação das plântulas desse ensaio, mostrou-se semelhante à da razão F_v/F_m , que reflete a eficiência quântica do PS_{II} , mas com maior amplitude nos valores apresentados. O emprego dessa razão em detrimento de F_v/F_m , permite discriminar melhor pequenas diferenças na eficiência quântica do PS_{II} , o que pode ser utilizado em trabalhos que visem a seleção de ecotipos mais adaptados à baixa temperatura. Para Schindler & Lichtenthaler (1994), a razão F_v/F_0 também apresentou valores com maior amplitude que os de F_v/F_m em estudos de fotoinibição.

Nesse ensaio, o acompanhamento das alterações no conteúdo dos pigmentos fotossintéticos envolveu tanto aqueles diretamente relacionados com o centro de reação do PS_{II} (C10 a), quanto aqueles chamados acessórios (C10 b e carotenóides). Os resultados mostraram que houve uma tendência de aumento mais acentuado na concentração dos pigmentos acessórios se comparados ao da C10 a, provavelmente por ser uma tentativa de aumentar ao máximo a captação dos fótons, essenciais à

sobrevivência da plântula, que se encontrava em fase de estabelecimento. Os pigmentos acessórios são os responsáveis pela captura e transferência dos fótons até o centro de reação (Lichtenthaler & Calvin, 1964; Nobel, 1991; Hall & Rao, 1995).

Apesar do estresse por baixa temperatura, não se constatou um aumento significativo no conteúdo dos carotenóides nas plântulas desse ensaio. Esses pigmentos, como se sabe, estão envolvidos em estratégias de proteção contra a fotoinibição (Hall & Rao, 1995). Uma vez que as plantas estavam no escuro, não havia condições para a ocorrência do processo fotoinibitório e todas as suas consequências danosas ao aparelho fotossintético. Não havendo esse risco de ocorrência da fotoinibição, provavelmente não houve a necessidade de um acúmulo maior de carotenóides nas plântulas de cafeeiro tratadas a 10°C. Os pigmentos do grupo denominado carotenóides estão presentes no complexo antena dos PS_I e PS_{II}. No PS_{II}, eles podem ser encontrados mais abundantemente nas formas de luteína, β -caroteno, neoxantina, violaxantina, anteroxantina e zeaxantina (Bowyer & Leegood, 1997). O grupo das xantofilas tem uma participação estratégica importante no mecanismo de proteção das plantas. Através do ciclo das xantofilas, esses pigmentos permitem a dissipação não fotoquímica do excesso de energia, protegendo o PS_{II} contra os danos provocados pelo processo fotoinibitório em plantas sensíveis a certas condições de estresse ambiental, como baixa temperatura (Sarry et al.,

1994; Thiele & Krause, 1994). Nessas condições, há uma potencialização na redução da capacidade fotossintética do tecido vegetal (Ludlow & Björkman, 1984; Öquist & Ögren, 1985; Rosenqvist et al., 1991).

Neste trabalho, os resultados observados mostraram uma tendência de aumento no empilhamento dos tilacóides, ou seja, uma maior organização do conteúdo de membranas dos cloroplastos com o tempo de tratamento (Figura 18). Essa tendência foi verificada a partir da relação $Clo\ a/b$, que se mostra inversamente correlacionada com a extensão do empilhamento das lamelas dos cloroplastos (Aro et al., 1986; Anderson & Aro, 1994). Segundo Anderson et al. (1988), plantas crescidas à plena luz apresentam uma relação $Clo\ a/b$ entre 2,6 e 3,6 enquanto para aquelas desenvolvidas na sombra, a razão está entre 2,0 e 2,2, de acordo com o grau de organização das membranas dos cloroplastos. Neste trabalho, como o material vegetal foi representado por plântulas (tecido jovem) de cafeeiro, e mais, de folhas cotiledonares, era de se esperar essa resposta de tendência à organização. O processo de estruturação lamelar nos cloroplastos ocorre a partir de plastídios onde não há qualquer organização de membranas. De acordo com Whatley & Whatley (1982), os plastídios inicialmente são sacos incolores esféricos ou ovais, englobados por uma membrana dupla e contendo estroma e algumas vezes pequenas porções fragmentadas de material lamelar. No material submetido

à temperatura de resfriamento, era de se esperar um nível organizacional inferior, uma vez que a atividade metabólica, de modo geral, provavelmente era inferior à do controle. De acordo com a resposta da razão $Clo\ a/b$ para esse tratamento, verificou-se que, apesar da tendência de maior organização apresentada até o 12º dia, o estresse causado pelo frio gerou, a partir desse dia, um desarranjo no aparelho fotossintético, induzindo uma queda no nível de empilhamento (organização) das membranas que constituem os tilacóides. Já o nível organizacional das membranas tilacoidais do material controle apresentou uma tendência crescente até o sétimo dia, a partir do qual se manteve constante. Segundo Chow et al. (1991), o aumento no nível de empilhamento dos tilacóides se deve a maior força de atração (forças de van der Waals) causada pela abundância dos complexos proteína-clorofila a/b . Esses complexos são as antenas coletoras de energia, associadas aos núcleos dos fotossistemas.

Neste trabalho observou-se que houve um súbito aumento no conteúdo dos carotenóides quando comparado ao das clorofilas no segundo dia do tratamento de resfriamento (Figura 19). Provavelmente, esta seria uma primeira tentativa no sentido de melhorar a eficiência na captação de luz, com um maior acúmulo dos pigmentos acessórios, primordialmente os carotenóides. Como já mencionado anteriormente, uma vez afastado o risco da ocorrência da fotoinibição, menor seria a importância de acúmulo dos carotenóides, uma vez que sua função, além de

coletor de luz, também é de fotoprotetor, essencial contra os danos causados pela fotoinibição (Siefermann-Harms, 1985, 1987; Koyama, 1991; Schindler & Linchtenthaler, 1994).

A temperatura de resfriamento aplicada sobre as plântulas de cafeeiro, juntamente com a condição de escuro, afetou a relação entre clorofilas e carotenóides, privilegiando, de modo geral, o acúmulo das clorofilas. Nesse tratamento, o conteúdo das clorofilas foi cerca de oito vezes superior ao dos carotenóides. Normalmente, em tecidos foliares não submetidos a estresse, essa razão está próxima de cinco (Babani et al., 1996).

A degradação de ácidos graxos poliinsaturados por meio de peroxidações produz, além de íons peróxido, o MDA. Baseado nisso, mudanças na concentração de MDA têm sido usadas como um bom indicador da peroxidação lipídica e, por consequência, da integridade das membranas cloroplastídicas (ricas em ácidos graxos poliinsaturados) em plantas submetidas a condições estressantes (Dhindsa et al., 1981; Hodgson & Raison, 1991; Jouve et al., 1993; Qiu & Liang, 1995).

Da mesma forma que a degradação protéica, a peroxidação lipídica também tem como agente desencadeador a ação de radicais livres. Esses, através de reações em cascata, conduzem à formação de espécies reativas de oxigênio (radical ânion superóxido, radical hidroxila, etc.) altamente danosas à integridade dos tilacóides (Barber & Andersson, 1992; De Las Rivas et al., 1992). Entretanto, para a geração de radicais

livres, necessita-se da energia luminosa (Barényi & Krause, 1985; Richter et al., 1990). Como esse experimento foi conduzido na ausência de luz, a formação dessas espécies reativas foi desestimulada, fato esse acentuado com a permanência do material vegetal no escuro.

Durante o tratamento de resfriamento, os níveis de degradação das membranas cloroplastídicas esteve, numa primeira fase, estável. Porém, a segunda fase demonstrou uma redução mais acentuada na atividade peroxidativa, possivelmente devido a queda na geração de espécies reativas de oxigênio em resposta à ausência de luz, além da maior concentração de pigmentos cloroplastídicos.

Os resultados demonstraram que o acúmulo dos pigmentos durante o tratamento de resfriamento seria um dos responsáveis pela queda na atividade peroxidativa dos lipídios. Como no tratamento a 10°C a correlação entre essa atividade (peroxidativa) e a concentração dos pigmentos foi mais baixa (~86%) que a apresentada pelo tratamento controle (~97%), isso indica que a temperatura de resfriamento também influíu (pela queda na atividade metabólica) na queda da atividade peroxidativa. A síntese dos pigmentos (principalmente as xantofilas, do grupo dos carotenóides) estaria atuando como uma proteção (Schindler & Lichtenthaler, 1994; Thiele & Krause, 1994), possivelmente contra a formação dos radicais livres (Young, 1991), inibindo a peroxidação dos lipídios

constitutivos das membranas dos tilacóides (Sarry et al., 1994). Essa proteção contra o "ataque" à integridade das membranas dos cloroplastos é de extrema importância para a manutenção da atividade fotossintética na sua totalidade (Öquist, 1983; Dwivedi et al., 1995). Isso foi verificado neste ensaio nos primeiros seis dias, quando a eficiência quântica do PSII (F_v/F_m) do tratamento a 10°C foi mantida acima de 0,800 - uma alta eficiência.

5.2. Avaliação da sensibilidade ao resfriamento durante o processo de enverdecimento de folhas cotiledonares de plântulas de cafeeiro

A temperatura de resfriamento aplicada às plântulas de cafeeiro afetou igualmente a emissão do sinal F_m , a área acima da curva de fluorescência, bem como os parâmetros F_0 e F_v . Enquanto a temperatura foi mantida a 10°C, nenhum sinal de fluorescência foi emitido. Todo o processo de captação da energia luminosa e, conseqüentemente, a utilização dessa energia não foi possível, uma vez que a temperatura havia inibido (C_{x+c}) ou impedido (Clo a e b) a acumulação dos pigmentos envolvidos na atividade fotossintética (Tabela 2). Com a mudança da temperatura de 10 para 25°C, a síntese dos pigmentos foi retomada a partir do 14º dia, ao passo que F_0 , F_m e o valor da área sinalizaram essa mudança antes, por volta do 10º dia (dois dias após mudança da temperatura). Essa resposta

rápida do sinal de fluorescência à mudança de temperatura, antes mesmo da correspondente detecção de alteração no conteúdo dos pigmentos, demonstra a eficiência dessa técnica no monitoramento do aparelho fotossintético, quando submetido às condições de estresse (Schreiber, 1983; Bolh r-Nordenkampf &  quist, 1993). Após a alteração da temperatura, apesar da retomada das variáveis de emissão da fluorescência, os mesmos não recuperaram os níveis apresentados pelas plântulas tratadas a temperatura controle, mesmo porque o acúmulo dos pigmentos atingiu menos de 50% do acumulado pelas plântulas do tratamento controle. O tratamento a 10 C, porém, não interferiu no balanço (conteúdo relativo) entre os pigmentos, ao contrário da capacidade de acumulação (conteúdo absoluto), que foi prejudicada. Em síntese, a temperatura de resfriamento, ao inibir o acúmulo dos pigmentos cloroplastídicos, alterou a capacidade do tecido fotossintetizante de plântulas estioladas de cafeeiro em captar e transferir a energia luminosa até os centros de reação do PS_{II}. Csapó et al. (1991) também verificaram alterações no conteúdo dos pigmentos cloroplastídicos em plantas jovens de milho crescendo abaixo de 13 C, que tal qual a cultura do cafeeiro,   originária de clima quente. Segundo Lichtenthaler (1996) e Szalai et al. (1996), alguns sintomas de danos não podem ser detectados   baixa temperatura, mas apenas quando as plantas retornam a temperaturas acima da temperatura de resfriamento, após o

tratamento de frio. Para Smillie et al. (1987) e Hetherington & Öquist (1988), dentre os sintomas verificados após tratamento de resfriamento estão a redução da taxa de crescimento e a queda na taxa máxima de subida da indução da fluorescência da Clo a.

Neste trabalho, todos os parâmetros da cinética de fluorescência da Clo a refletiram, de alguma forma, os efeitos dos tratamentos de temperatura sobre o processo de enverdecimento e, por consequência, a atividade fotossintética. Essas variáveis são sinais qualitativos de certas etapas da fase fotoquímica (Briantais et al., 1986; Georgieva & Yordanov, 1993; Strasser et al., 1995; Babani et al., 1996). Essas iniciam com a captação da energia luminosa pelo complexo antena, se desenvolvem com a transferência dessa através dos vários transportadores de elétrons, até culminarem no centro de reação do PS_{II} com o evento fotoquímico - redução de um receptor e oxidação de um doador, através de P₆₈₀ (Nobel, 1991; Govindjee, 1995; Bowyer & Leegood, 1997).

A relação F_v/F_m é a mais confiável e mais usada variável da cinética de emissão da fluorescência da Clo a para avaliar a eficiência do PS_{II} na utilização da energia capturada (Krause & Weis, 1984; Krause, 1988, 1991; Cao & Govindjee, 1990; Govindjee, 1995). Dessa forma, mesmo que certas etapas do processo estejam sob efeito adverso de algum fator externo, muitas vezes a eficiência do PS_{II} é menos ou muito pouco afetada

(Knopka et al., 1996). Enquanto os outros parâmetros de fluorescência representam certas etapas, a razão F_v/F_m representa o processo global da atividade do PS_{II} (Krause & Weis, 1984, 1988, 1991; Krause 1994).

No início da aplicação dos tratamentos de temperatura (tempo 0), a eficiência quântica do PS_{II} foi alta - média de 0,843. Esse valor corresponde aos apresentados por folhas maduras de diversas espécies vegetais sadias em plena atividade fotossintética (Björkman & Demmig, 1987). Mesmo com o conteúdo dos pigmentos baixo e outros parâmetros de fluorescência (F_m , por exemplo) indicando uma queda na atividade do PS_{II} , a eficiência na utilização da energia capturada pelos centros de reação foi alta. Como neste ensaio o aparelho fotossintético estava em formação, a capacidade de interceptação e absorção de energia luminosa pelo complexo antena era baixa, não sobrecarregando o centro de reação (P_{680}). Isso refletiu em uma alta eficiência do PS_{II} , no início dos tratamentos.

Porém, já no momento seguinte (primeiro dia a 25°C), a eficiência quântica do PS_{II} caiu drasticamente ($\sim 0,300$). A explicação para essa queda repentina pode estar na capacidade de reoxidação do centro de reação do PS_{II} . O rápido aumento no conteúdo de $Clo\ a$ (pigmento do centro de reação, P_{680}) em relação ao conteúdo total dos pigmentos, não foi acompanhado, ao que tudo indica, por um correspondente aumento na capacidade de reoxidação de P_{680} . A reoxidação do centro de reação pela

redução de Q_A envolve o estoque de PQ, capaz de realimentar com Q_B o processo de oxi-redução, que inicia a partir da redução de Q_A com a oxidação de P_{680} (Bowyer & Leegood, 1997). Esse estoque de PQ muito provavelmente ainda estava baixo, nesse tempo de tratamento, contribuindo para a queda na eficiência do PS_{II} (F_v/F_m), pela diminuição na capacidade de reoxidação de P_{680} . O baixo valor de F_0 nas plântulas nesse período indica boa atividade do fluxo de elétrons, descartando a possibilidade desse ser a causa da baixa reoxidação de P_{680} , causando a queda apresentada na eficiência do PS_{II} .

As plântulas deste trabalho aumentaram a eficiência quântica do PS_{II} rapidamente já a partir do quinto dia após a transferência para 25°C. Porém, mesmo o máximo atingido de 0,720 está abaixo dos valores médios relatados para espécies de dicotiledôneas de porte arbustivo e não decíduas, em torno de 0,830 (Björkman & Demmig, 1987). Convém lembrar que como unidade amostral foram adotadas plântulas de cafeeiro, sendo as determinações realizadas nas folhas cotiledonares ("orelha-de-onça"), não definitivas. É razoável considerar essas folhas cotiledonares como órgãos ainda heterotróficos; por conseguinte, essa eficiência quântica não seria tão baixa quanto parece. Essas plântulas, na forma estiolada e completamente desprovidas de pigmentos, atingiram durante o processo de enverdecimento (sob temperatura de 25°C) uma eficiência quântica próxima de 70%. Heupel & Kutschera (1996)

concluíram que folhas cotiledonares (verdes) de plântulas de girassol em processo de enverdecimento atuaram como órgãos heterotróficos. Em plântulas de soja, Harris et al. (1986) verificaram que a contribuição fotossintética das primeiras folhas definitivas era cerca de cinco vezes a das folhas cotiledonares (pigmentadas).

O efeito da temperatura de resfriamento afetando a eficiência do PS_{II} parece não ter sido permanente neste ensaio. Apesar da síntese de pigmentos ter sido inibida em mais de 50% após o tratamento de resfriamento, a eficiência quântica do PS_{II} foi restabelecida. Isso demonstrou que o acúmulo dos pigmentos durante o processo de enverdecimento está além das suas necessidades metabólicas para manutenção da atividade fotossintética, mais especificamente do PS_{II}. As plântulas de cafeeiro atingiram a eficiência quântica igual à do controle com aproximadamente a metade do conteúdo das Clo's *a* e *b* e cerca de 40% do conteúdo dos carotenóides, resultados esses observados após a alteração da temperatura do tratamento de 10 para 25°C. Godde & Dannehl (1994) observaram que plantas de espinafre (sob estresse nutricional) com cerca de 50% do conteúdo de clorofila apresentaram uma queda de apenas 10% na razão F_v/F_m .

Os transientes da Clo *a* são umas das mais freqüentes técnicas usadas na pesquisa em fotossíntese para investigar as reações do PS_{II} (Dau, 1994; Govindjee, 1995). No início do

processo de enverdecimento das plântulas de cafeeiro, a cinética da fluorescência se caracterizou pela apresentação de apenas dois transientes, "O" (ou F_0) e "P". Nessa amostragem não foram observadas as inflexões "J" e "I", ou "I" estaria se sobrepondo ao "P" ($I=P$), como já verificado antes por Strasser et al. (1995). Como o aparelho fotossintético dessas plântulas estava em processo de formação, juntamente com a acumulação dos pigmentos, o PS_{II} e o pool de PQ, ainda pouco expressivos quantitativamente, também apresentavam pequena variação qualitativa. Dessa forma, a pequena heterogeneidade do PS_{II} foi refletida pela emissão de um sinal de fluorescência, onde a inflexão "I" não se distinguiu do transiente "P".

No primeiro dia do tratamento a 25°C, o sinal de F_0 variou muito pouco com relação ao início do tratamento. Porém, isso foi uma exceção dentro dos demais parâmetros, que variaram nitidamente. Na análise em separado das demais variáveis de fluorescência, também foi observado tal resultado. Provavelmente, isso foi uma consequência do processo de organização do aparelho fotossintético a partir do início da acumulação dos pigmentos cloroplastídicos, refletido na emissão da fluorescência da Clo a. Com a progressão no acúmulo dos pigmentos, o sinal de fluorescência emitido pelo PS_{II} também intensificou-se, com maior amplitude durante o tratamento controle (25°C).

Neste trabalho, as plântulas sob o tratamento de

enverdecimento à temperatura de 10°C não emitiram qualquer sinal de fluorescência, enquanto permaneceram sob a temperatura de resfriamento. A baixa temperatura inibiu o acúmulo dos pigmentos e toda a organização do aparelho fotossintético, cuja consequência foi a queda na eficiência de utilização da energia quântica por parte do PS_{II}. Porém, o tecido fotossintético demonstrou uma capacidade em recuperar a atividade do PS_{II} dez dias após o retorno das plântulas à temperatura de 25°C. No 18º dia, a fluorescência emitida apresentou uma cinética típica, com todos os transientes. Tanto as inflexões "J" e "I", bem como F₀ e o pico "P", refletiram as alterações ocorridas no aparelho fotossintético. O resultado foi uma atenuação da fluorescência emitida e redução (com exceção para F₀) no tempo de ocorrência dos transientes. Esse resultado pode ter sido uma consequência da menor concentração de Cl_o a e das limitações no fluxo de elétrons através do PS_{II} (Ögren, 1991; Strasser et al., 1995).

A partir das determinações da velocidade de emissão da fluorescência (Strasser et al., 1995), verificou-se que, provavelmente, a queda na eficiência da redução de Q_A nas plântulas tenha como causa o menor fluxo de elétrons através do PS_{II}. No período entre o 19º e o 27º dia do tratamento a 25°C, o fluxo de elétrons estava baixo, como foi verificado pela F_v (Georgieva & Yordanov, 1993). Como o fluxo de elétrons entre os "trocadores" de elétrons fotossintéticos estava possivelmente

prejudicado, houve uma diminuição na ocorrência das reações de oxi-redução, dentre elas a redução de Q_A . No 11º dia do tratamento a 25°C, como o fluxo de elétrons já se apresentava em níveis satisfatórios, a velocidade de redução de Q_A foi alta. Essa mesma resposta foi observada no 18º dia do tratamento de resfriamento. Janssen & van Hasselt (1988) propuseram que o aumento de F_v como resultado da baixa temperatura foi devido a um aumento na porcentagem de Q_A^- , causado pela menor taxa de reoxidação do mesmo.

A fluorescência variável relativa (dV/dt_0) é uma medida da fração de Q_A que se encontra no estado reduzido (Q_A^-), num determinado tempo, com relação ao estado inicial (em F_0 toda Q_A está oxidada) (Strasser et al., 1995). Neste trabalho, os resultados mostraram que a atividade fotoquímica do tecido fotossintético das plântulas de cafeeiro foi estimulada com a mudança das plântulas para a temperatura de 25°C, após dez dias sob temperatura de resfriamento. Esse estímulo também foi observado com os resultados relativos aos transientes "OJIP".

Os resultados de dV/dt_0 e os da eficiência quântica do PS_{II} deste ensaio se somam para consolidar a evidência de que a saturação na atividade fotossintética das plântulas de cafeeiro ocorreu bem antes da saturação no acúmulo dos pigmentos cloroplastídicos.

Quando se menciona a eficiência quântica ou a taxa relativa fotoquímica do PS_{II} , refere-se a apenas a uma fração do

conteúdo total dos pigmentos (Clo's *a* e *b* e carotenóides) que estão diretamente envolvidos no processo fotossintético. Existem outros PS_{II} inativos, também associados a pigmentos, que não estariam contribuindo nas variáveis de fluorescência analisados, mas cujos pigmentos a eles associados somam-se do conteúdo total dos pigmentos (Cao & Govindjee, 1990; Krause & Weis, 1991; Krause, 1994; Bowyer & Leegood, 1997). Esses PS_{II} inativos podem ser modificados, retornando à atividade fotoquímica (Aro et al., 1993; Krause, 1994; Anderson et al., 1995). É sabido, também, que alguns pigmentos cloroplastídicos, especialmente os carotenóides, participam ativamente das estratégias fotoprotetoras (Lichtenthaler, 1987; Young, 1991; Schindler & Lichtenthaler, 1994; Hall & Rao, 1995), minimizando a ação foto-oxidativa do O₂ na presença de luz sobre o aparelho fotossintético. Além disso, também é importante considerar que as determinações de fluorescência foram realizadas após excitação do tecido fotossintético sob condições ótimas de luz (tanto na intensidade como na qualidade). Essas condições dificilmente são reproduzidas por um tempo prolongado no ambiente natural, onde a disponibilidade de luz é altamente variável com a hora do dia, com a posição de inserção da folha no caule, com o sombreamento provocado pelas folhas superiores do dossel, dentre outros fatores (Bolhar-Nordenkamp, 1985). Dessa forma, as plantas não realizaram uma "aquisição de luxo" ao acumular o dobro do conteúdo de pigmentos necessários para atingir a saturação da atividade fotossintética, mas sim,

fizeram um "investimento" que lhes permita sobreviver nas condições diversas do seu hábitat.

O nível de peroxidação lipídica no material controle deste ensaio foi crescente até o 14º dia, sendo no final do ensaio 5 vezes superior ao do início do processo de enverdecimento. Alguns autores atribuem ao $^1\text{O}_2$ (oxigênio singlete) o desencadeamento da peroxidação lipídica (Hodgson & Raison, 1991; Olsson, 1995; Qiu & Liang, 1995). Como é de consenso, também, que os carotenóides são fisiologicamente importantes na proteção contra $^1\text{O}_2$ (Anderson & Krinsky, 1973; Mathews-Roth et al., 1974; Young, 1991; Schindler & Lichtenthaler, 1994). Nesse trabalho, porém, o aumento no nível de peroxidação lipídica foi acompanhado pelo aumento na concentração dos carotenóides. Isso mostra que a atividade protetora desses pigmentos (Young, 1991) não foi capaz (pelo menos até o 14º dia) de inibir a ação peroxidativa do $^1\text{O}_2$. Essa espécie reativa de oxigênio pode ser gerada no cloroplasto, na presença de luz em condições de estresse, como a baixa temperatura (Vass et al., 1992; Aro et al., 1993; MacPherson et al., 1993).

É provável que com a inibição do fluxo de elétrons, tenha ocorrido a geração de espécies reativas de oxigênio quando a concentração dos carotenóides ainda era baixa, insuficiente para extinguir o potencial foto-oxidativo formado. Em consequência, ocorreu o aumento no nível de peroxidação lipídica nas plântulas do tratamento a 25°C e uma tendência de

aumento nas plântulas do tratamento de resfriamento (Figura 35). Segundo Takahama & Nishimura (1975), a formação de MDA é estimulada quando a transferência de elétrons através do PS_{II} é inibida ou inativada pelo estresse luminoso. A partir do momento em que a concentração dos carotenóides nas plântulas de cafeeiro deste trabalho esteve alta (no 18^o dia para o tratamento controle), os níveis de peroxidação lipídica se estabilizaram, configurando, dessa forma, a função protetora desses pigmentos cloroplastídicos. No tratamento a 10°C, como todo o metabolismo foi comprometido, a geração de ¹O₂ provavelmente também o foi, resultando em menor atividade peroxidativa sobre as membranas dos cloroplastos. A presença de certos pigmentos da classe dos carotenóides pode, também, ter contribuído para essa menor atividade peroxidativa. Nesse tratamento, dez dias após mudança da temperatura para 25°C, foi verificado a partir do espectro de absorção dos pigmentos cloroplastíticos, a presença de pequenos picos ("ombros") na faixa do azul. É possível que essa resposta seja resultante da maior presença de certas xantofilas no grupo dos carotenóides. Violaxantina e neoxantina apresentam picos de absorção na faixa de 420 e 416 nm, respectivamente (Lichtenthaler, 1987). Todos esses pigmentos estão envolvidos em mecanismos protetores contra os danos causados sobre o aparelho fotossintético provenientes de condições estressantes (Young, 1991; Schindler & Lichtenthaler, 1994).

5.3. Efeitos da temperatura de resfriamento na susceptibilidade de plantas jovens de cafeeiro à fotoinibição.

A temperatura de resfriamento aplicada às plantas de cafeeiro afetou a atividade fotossintética das mesmas de forma irreversível, pelo menos dentro do período de recuperação avaliado. A eficiência quântica do PS_{II} caiu após o tratamento a 10°C e o tecido fotossintetizante não foi capaz de recuperar plenamente a sua atividade. Essa resposta, provavelmente, está relacionada à origem da espécie *C. arabica*, de regiões de clima tropical. Bauer et al. (1985) também verificaram uma queda na atividade fotossintética de plantas de cafeeiro submetidas à temperatura de resfriamento. Para Wang (1982), a queda na fotossíntese é apenas uma das várias alterações bioquímicas e fisiológicas ocorridas nas plantas, em resposta ao estresse por baixa temperatura.

É provável que a queda na eficiência quântica do PS_{II} seja uma consequência do menor fluxo de elétrons causado pelo abaixamento da temperatura. A mobilidade das proteínas e dos diversos componentes da cadeia transportadora de elétrons fotossintéticos é fortemente influenciada pela mobilidade dos lipídios, onde esses carreadores estão inseridos nas membranas. A temperatura de resfriamento, diminuindo a mobilidade desses lipídios (Murata & Fork, 1975; Alonso et al., 1997; Queiroz et al., 1998), causará uma consequente perda na mobilidade dos

carreadores e da sua função. Essa queda no fluxo de elétrons foi verificada através das variáveis de fluorescência F_0 e F_v (Figuras 36 e 37), bem como pelo decréscimo na redução de Q_A , constatada através da resposta apresentada pela F_M (Figura 38). A capacidade de reposição de Q_B também foi muito afetada, com uma grande queda no *pool* de PQ. Para Bauer et al. (1987), a maior contribuição na redução da atividade fotossintética pela temperatura de resfriamento se deve a impedimentos no funcionamento dos cloroplastos. Segundo Krause (1994), a fotoinibição induzida por baixa temperatura se caracteriza pela inativação dos centros de reação do PS_{II} . Esses centros porém, ainda seriam capazes de aprisionar a energia de excitação e convertê-la em calor. Dessa forma, a inativação do PS_{II} atuaria protegendo o aparelho fotossintético contra a foto-oxidação de pigmentos durante a excitação excessiva (van Wijk et al., 1992).

Quando as plantas de cafeeiro foram submetidas ao tratamento com alta intensidade de luz, a queda na eficiência quântica do PS_{II} foi maior. Porém, para aquelas que já vinham de uma condição estressante por baixa temperatura, a queda imediata em F_v/F_M , não foi intensificada (Figura 41). Essa resposta difere daquela apresentada por Greer & Laing (1989), que verificaram em plantas de kiwi uma queda no rendimento quântico do PS_{II} duas vezes maior quando as mesmas, após tratamento de resfriamento, foram submetidas ao tratamento de luz com alta intensidade. Certamente, a associação do estresse

por baixa temperatura com o de luz de alta intensidade atua como um potente fotoinibidor (Greer et al., 1991; Krause, 1994; Osmond, 1994; Andrews et al., 1995). Entretanto, a manifestação do dano, e sua amplitude, sobre a atividade do PS_{II}, isto é, na capacidade de transportar elétrons, pode não ter ocorrido imediatamente após o processo fotoinibitório. Os processos que resultam na inativação do PS_{II} poderiam ocorrer em mais de um etapa, como uma forma de aumentar a eficiência quando da recuperação do dano. Isto estaria mascarando o verdadeiro dano causado pelo estresse luminoso, e intensificado pela condição de resfriamento por que foram submetidas as plantas de cafeeiro.

Segundo Powles (1984), o principal dano causado pela fotoinibição sobre o aparelho fotossintético ocorre no âmbito do PS_{II}. O processo fotoinibitório induz, além de um dano funcional no transporte de elétrons através do PS_{II}, um dano estrutural. Alterações na rotatividade da proteína D₁ do centro de reação do PS_{II} são consideradas o principal fator de desestabilização estrutural do PS_{II} (Aro et al., 1993; Krause, 1994).

A proteína D₁ é caracterizada por sua rápida rotatividade (síntese-degradação), dependente de luz (Mattoo et al., 1994). Mesmo sob condições ótimas para a fotossíntese, a proteína D₁ é rapidamente degradada e substituída através de nova síntese. Quando a degradação de D₁ excede a sua síntese, como em condições de estresse luminoso, centros de reação do PS_{II}

inativos serão acumulados, caracterizando o fenômeno da fotoinibição (Aro et al., 1993, 1994). A proteólise da proteína D_1 é descrita como um processo de duas etapas: primeiro a proteína seria "marcada para degradação" por um processo fotofísico. Posteriormente, numa segunda etapa, essa proteína (marcada) sofreria a ação proteolítica de enzimas pré-existentes (Aro et al., 1990; Richter et al., 1990). Segundo Aro et al. (1990), a proteólise de D_1 é fortemente inibida em temperatura abaixo de 7°C, mas ocorre independentemente da luz, quando a temperatura do tratamento fotoinibitório é elevada para 20°C.

O tempo de exposição ao tratamento fotoinibitório afetou a queda ocorrida na razão F_v/F_m das plantas de cafeeiro. Com o aumento no tempo do tratamento de luz, foi maior a queda na eficiência quântica do PS_{II} . Porém, essa queda, quantificada através da eficiência quântica do PS_{II} , atingiu uma saturação. Os valores de F_v/F_m obtidos imediatamente após o tratamento de luz estabilizaram-se; a partir dessa fase, mesmo duplicando o tempo de exposição ao tratamento de luz, não houve uma perda correspondente na atividade fotossintética.

A extensão do dano sobre a eficiência quântica do PS_{II} pode ser avaliada pela capacidade de restabelecimento da eficiência do aparelho fotossintético do tecido (Greer et al., 1991). Nas plantas de cafeeiro que foram submetidas ao tratamento de resfriamento antes do processo fotoinibitório, a

recuperação da eficiência do PS_{II} foi prejudicada. Nessas plantas, a recuperação da eficiência quântica do PS_{II} foi muito inferior à das plantas tratadas a 25°C. A capacidade de recuperação das plantas tratadas a 25°C, após o tratamento de luz mais drástico (60 minutos de duração), se igualou a das plantas tratadas a 10°C após o tratamento fotoinibitório de menor duração (cinco minutos). Já para aqueles tratamentos de luz mais prolongados, nas plantas submetidas ao tratamento de resfriamento, houve uma recuperação muito pequena (após 30 minutos de choque de luz) ou praticamente nula (com 60 minutos de luz). Isso mostra que o dano causado pelo tratamento de luz sobre o aparelho fotossintético foi intensificado pela temperatura baixa. Para Greer et al. (1991), a temperatura baixa também intensificou o dano causado pelo tratamento fotoinibitório, manifestado através da capacidade de recuperação da atividade fotossintética.

O restabelecimento da eficiência quântica do PS_{II} das plantas de cafeeiro submetidas ao tratamento fotoinibitório ocorreu, de modo geral, em duas etapas. A primeira, mais pronunciada, deu-se na primeira hora do período de recuperação. A partir dessa primeira hora, seguiu-se uma segunda etapa, muito mais lenta, com pequenos ganhos em F_V/F_M . A plena recuperação da eficiência do aparelho fotossintético das plantas de cafeeiro não foi possível, pelo menos dentro do período de tempo avaliado (três horas) (Figura 42). O processo

de recuperação da eficiência quântica do PS_{II} , quando acompanhado pela razão F_v/F_m , apresenta, geralmente, duas fases distintas (Somersalo & Krause, 1989; Krause & Weis, 1991; Hurry & Huner, 1992). Segundo Krause (1994), a primeira etapa pode ocorrer mesmo sob baixas temperaturas e não há, nessa fase, o ciclo de reparo da proteína D_1 . Essa fase é caracterizada por mudanças conformacionais no PS_{II} , tornando-o ativo novamente. Na segunda etapa, é necessário a síntese e reinserção de novas unidades da proteína D_1 no centro de reação do PS_{II} . Nessa fase, ocorre a montagem do complexo protéico (PS_{II}) e sua migração no tilacóide, entre as lamelas do estroma (local da montagem) e as do grana (local de atuação) (Aro et al., 1990; Carlberg et al., 1992). Como visto, essa fase é influenciada pela temperatura, não ocorrendo sob baixas temperaturas.

O conceito de dano fotoinibitório tem sido questionado. Ainda é matéria de discussão se a fotoinibição é considerada um processo vantajoso, estando sob controle fisiológico, ou um processo danoso, pela geração de espécies reativas de oxigênio (Krause, 1994; Osmond, 1994). Segundo Demming & Bjorkman (1987), o decréscimo inicial na eficiência fotoquímica após estresse luminoso está sob controle fisiológico. Isso evitaria o acúmulo de centros de reações do PS_{II} no estado reduzido (fechado, porém aptos para aprisionar a energia). Ainda segundo os mesmos autores, caso essa situação (a condição de estresse) se perpetue, levaria a um segundo estágio hipotético da fotoinibição, onde haveria a formação de centros de reação do

PS_{II} fotodanificados, permanentes. No primeiro caso, estaria configurado o que Weis & Berry (1987) e Dwivedi et al. (1995) classificam como *down regulation* da eficiência quântica do PS_{II}. Para Krause (1988) esse mecanismo permite uma "desaceleração" da fotoquímica do PS_{II} evitando-se uma fotoinibição mais severa. Esse processo é rapidamente reversível quando se elimina as condições estressantes para a atividade fotossintética. No caso da ocorrência de danos mais severos no PS_{II}, que exijam a troca de algum componente (a proteína D₁, por exemplo) permanentemente danificada do fotossistema, o processo é tido como uma fotoinibição (Powles, 1984; Krause, 1988, 1994; Aro et al., 1994; Osmond, 1994; Castro et al., 1995). A fotoinibição pode ser reparada (Samuelsson et al., 1987; Ögren, 1988; Baker, 1991) sendo o processo de reparo sensível a baixas temperaturas (Greer et al., 1986). Esse processo está sob controle fisiológico e não deve ser visto meramente como um dano causado pela incidência de alta densidade de fluxo de fótons.

6. CONCLUSÕES

A manutenção da integridade das membranas dos tilacóides em plantas jovens de cafeeiro é fundamental para a conservação de alta eficiência quântica do PS_{II}, sendo que essa eficiência se mostrou mais dependente da ação protetora dos pigmentos cloroplastídicos do que propriamente da concentração desses. Quando as plantas de cafeeiro foram expostas a densidade de fluxo de fótons de 2500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$, após tratamento a 10°C, não houve uma maior perda na eficiência quântica do PS_{II} em relação ao tratamento controle (25°C). Porém, a capacidade de recuperar plenamente a atividade fotossintética, foi significativamente menor, caracterizando a ocorrência da fotoinibição da fotossíntese.

7. LITERATURA CITADA

- Allen, J.F., 1992. Protein phosphorylation in the regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1098:275-335.
- Alonso, A., Queiroz, C.S. & Magalhães, A.C., 1997. Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. *Biochim. Biophys. Acta* 1323:75-84.
- Anderson, J.M. & Aro, E-M., 1994. Grana stacking and protection of photosystem II in thylakoid membranes of higher plant leaves under sustained high irradiance: an hypothesis. *Photosynth. Res.* 41:315-326.
- Anderson, J.M., Chow, W.S. & Goodchild, D.S., 1988. Thylakoid membrane organization in sun/shade acclimation. *Aust. J. Plant Physiol.* 15:11-26.
- Anderson, J.M., Chow, W.S. & Park, Y-I., 1995. The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynth. Res.* 46:129-139.
- Anderson, S.M. & Krinsky, N.I., 1973. Protective action of carotenoid pigments against photodynamic damage to liposomes. *Photochem. Photobiol.* 18:403-408.
- Andersson, N.B. & Styring, S., 1991. Photosystem II - organization function. IN: *Current Topics in Bioenergetics* (C.P. Lee, ed.), Vol. 16, Academic Press, San Diego, pp.1-81.

- Andersson, N.B.; Salter, H.A., Virgin, I., Vass, I. & Styring, S., 1992. Photodamage to photosystem II: primary and secondary events. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 15:15-31.
- Andrews, J.R., Fryer, M.J. & Baker, N.R., 1995. Characterization of chilling effects on photosynthetic performance of maize crops during early season growth using chlorophyll fluorescence. *J. Exp. Bot.* 46:1195-1203.
- Aro, E-M., Rintamäki, E., Korhonen, P. & Mäenpää, P., 1986. Relationship between chloroplast structure and O_2 evolution rate of leaf discs in plants from different biotypes in south finland. *Plant Cell Env.* 9:87-94.
- Aro, E-M., Hundal, T., Carlberg, I. & Andersson, B., 1990. *In vitro* studies on light-induced inhibition of photosystem II and D₁-protein degradation at low temperatures. *Biochim. Biophys. Acta* 1019:269-275.
- Aro, E-M., Virgin, I. & Andersson, B., 1993. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1143: 113-134.
- Aro, E-M., McCaffery, S. & Anderson, J.M., 1994. Recovery from photoinhibition in peas (*Pisum sativum* L.) acclimated to varying growth irradiances. *Plant Physiol.* 104:1033-1041.
- Babani, F., Lichtenthaler, H.K. & Richter, P., 1996. Changes of chlorophyll fluorescence signatures during greening of etiolated barley seedlings as measured with the ccd-oma fluorometer. *J. Plant Physiol.* 148:471-477.

- Baker, N.R., 1991. A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiol. Plant.* 81:563-570.
- Baker, N.R., Farage, P.K., Stirling, C.M. & Long, S.P., 1994. Photoinhibition of crop photosynthesis in the field at low temperatures. IN: *Photoinhibition Of Photosynthesis - from Molecular Mechanisms to the Field* (N.R. Baker & J.R. Bowyer eds.), Bios Scientific Publishers, Oxford, pp.349-63.
- Barber, J. & Andersson, B., 1992. Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *TIBS* 17:61-66.
- Barényi, B. & Krause, G.H., 1985. Inhibition of photosynthetic reactions by light. A study with isolated spinach chloroplasts. *Planta* 163:218-226.
- Bauer, H., Wierer, R., Hatheway, W.H. & Larcher, W., 1985. Photosynthesis of *Coffea arabica* after chilling. *Physiol. Plant.* 64:449-454.
- Bilger, H.W., Schreiber, U. & Lange, O.L., 1984. Determination of leaf heat resistance: comparative investigation of chlorophyll fluorescence changes and tissue necrosis methods. *Oecologia* 63:256-262.
- Björkman, O. & Demmig, B., 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77k among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170:489-504.
- Bolhar-Nordenkamp, H.R., 1985. Shoot morphology and leaf anatomy in relation to photosynthesis. IN: *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis* (J. Coombs,; D.O. Hall,;

- S.P. Long, & J.M.O. Scurlock, eds.), 2nd Edition, Pergamon Press, Oxford, pp.107-117.
- Bolh  r-Nordenkamp, H.R. &   quist, G., 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. IN: Photosynthesis and Production in a Changing Environment: A Field and Laboratory Manual (D.O. Hall,; J.M.O. Scurlock,; H.R. Bolh  r-Nordenkamp,; R.C. Leegood, & S.P. Long, eds.), Chapman & Hall, London, pp.193-206.
- Bowyer, J.B. & Leegood, R.C., 1997. Photosynthesis. IN: Plant Biochemistry (P.M. Dey, & J.B. Harborne, eds.), Academic Press, San Diego, pp.49-110.
- Briantais, J., Vernotte, G., Krause, G. & Weis, E., 1986. Chlorophyll a fluorescence of higher plants: chloroplasts and leaves. IN: Light Emission by Plant and Bacteria (Govindjee; J. Ames, & D.J. Fork, eds.), Academic Press, New York, pp.539-583.
- Brown, C.S. & Huber, S.C., 1987. Photosynthesis, reserve mobilization and enzymes of sucrose metabolism in soybean (*Glycine max*) cotyledons. *Physiol. Plant.* 70:537-543.
- Brüggemann, W. & Linger, P., 1994. Long-Term Chilling of young tomato plants under low light. IV. Differential responses of chlorophyll fluorescence quenching coefficients in *Lycopersicum* species of different chilling sensitivity. *Plant Cell Physiol.* 35:585-591.

- Bukhov, N.G., Sabat, S.C. & Mohanty, P. 1990. Analysis of chlorophyll a fluorescence changes in weak light in heat-treated *Amaranthus* chloroplasts. *Photosynth. Res.* 23:81-87.
- Cao, J. & Govindjee, 1990. Chlorophyll a fluorescence transient as an indicator of active and inactive photosystem II in thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1015:180-188.
- Carlberg, I., Bingsmark, S., Vennigerholz, F., Larsson, U.K. & Andersson, B., 1992. Low temperature effects on thylakoid protein phosphorylation and membrane dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* 1099:111-117.
- Castro, Y., Fetcher, N. & Fernández, D.S., 1995. Chronic photoinhibition in seedlings of tropical trees. *Physiol. Plant.* 94:560-565.
- Chow, W.S., Miller, C & Anderson, J.M., 1991. Surface charges, the heterogeneous lateral distribution of the two photosystems, and thylakoid stacking. *Biochim. Biophys. Acta* 1057:69-77.
- Creencia, R.P. & Bramlage, W.J., 1971. Reversibility of chilling injury to corn seedlings. *Plant Physiol.* 47:389-392.
- Csapó, B.J., Kovács, J., Páldi, E. & Szigeti, Z. Fluorescence induction characteristics of maize inbred lines after long-term chilling treatment during the early phase of development. *Photosynthetica* 25:575-582.

- Dau, H., 1994. Molecular mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence. *Photochem. Photobiol.* 60:1-23.
- Davies, K.J.A., Lin, Sh.W. & Pacifici, R.E., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J. Biol. Chem.* 262:9914-9920.
- De Las Rivas, J., Andersson, B. & Barber, J., 1992. Two sites of primary degradation of the D₁ - protein induced by acceptor or donor side photoinhibition in photosystem II core complexes. *FEBS Lett.* 301:246-252.
- 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, B. & Björkman, O., 1987. Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77k) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher plants. *Planta* 171:171-184.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P. & Thorpe, T.A., 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* 32:93-101.
- Ducruet, J.M. & Lemoine, Y., 1985. Increased heat sensitivity of the photosynthetic apparatus in triazine-resistant biotypes from different plant species. *Plant Cell Physiol.* 26:419-429.

- Durrant, J.R., Giorgi, L.B., Barber, J., Klug, D.R. & Porter, G., 1990. Characterization of triplet states in isolated photosystem II reaction centers: oxygen quenching as a mechanism of photodamage. *Biochim. Biophys. Acta* 1017:167-175.
- Dwivedi, U., Sharma, M. & Bhardwaj, R., 1995. Down regulation of photosynthesis in *Artabotrys hexapetatus* by high light. *Photosynth. Res.* 46:393-397.
- Elstner, E.F., 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33:73-96.
- 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.
- Georgieva, K. & Yordanov, I., 1993. Temperature dependence of chlorophyll fluorescence in pea thylakoid membranes. *J. Plant Physiol.* 142: 151-155.
- Godde, D. & Dannehl, H., 1994. Stress induced chlorosis and increase in D₁ protein turnover precedes photoinhibition in spinach suffering under combined magnesium and sulphur deficiency. *Planta* 195:291-300.
- Govindjee, 1995. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. *Aust. J. Plant Physiol.* 22:131-160.
- Govindjee & Sotoh, K., 1986. fluorescence properties of chlorophyll b - and chlorophyll c - containing algae. IN:

- Light Emission by Plants and Bacteria (Govindjee; J. Ames, & D.C. Fork, eds.), Academic Press, New York, pp.497-537.
- Graham, D. & Patterson, B.D., 1982. Responses of plants to low, nonfreezing temperatures: proteins, metabolism, and acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33:347-372.
- Greer, D.H., Berry, J.A. & Björkman, O., 1986. Photoinhibition of photosynthesis in intact bean leaves; role of light and temperature, and requirement of chloroplast-protein synthesis during recovery. *Planta* 168:253-260.
- Greer, D.H. & Laing, W.A., 1989. Photoinhibition of photosynthesis in intact kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) leaves: effect of temperature on photoinhibition and recovery. *Planta* 180:32-39.
- Greer, D.H. & Laing, W.A., 1992. Photoinhibition of photosynthesis in intact kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*) leaves: changes in susceptibility to photoinhibition and recovery during the growth season. *Planta* 186:418-425.
- Greer, D. H., Ottander, C. & Oquist, G., 1991. Photoinhibition and recovery of photosynthesis in intact barley leaves at 5 and 20°C . *Physiol. Plant.* 81:203-210.
- Hall, D.O. & Rao, K.K., 1995. Research in photosynthesis. IN: *Photosynthesis* (D.O. Hall, & K.K. Rao, eds.), 5th Edition, Cambridge University Press, Cambridge, pp.145-94.

- Hariyadi, P. & Parkin, K.L., 1993. Chilling-induced oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. calypso) seedlings. *J. Plant Physiol.* 141:733-738.
- Harris, M., Mackender, R.O. & Smith, D.L., 1986. Photosynthesis of cotyledons of soybean seedlings. *New Phytol.* 104:319-329.
- Heath, R.L. & Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125:189-198.
- Hetherington, S.E. & Öquist, G., 1988. Monitoring chilling injury: a comparison of chlorophyll fluorescence measurements, post-chilling growth and visible symptoms of injury in *Zea mays*. *Physiol. Plant.* 72:241-247.
- Hetherington, S.E., He, J. & Smillie, R.M., 1989. Photoinhibition at low temperature in chilling-sensitive and resistant plants. *Plant Physiol.* 90:1609-1615.
- Heupel, T. & Kutschera, U., 1996. Pigment accumulation, dark respiration and photosynthesis during the greening of sunflower cotyledons. *J. Plant Physiol.* 147:567-572.
- Hoagland, D.R. & Arnold, D.I., 1951. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experimental Station Bulletin* 347:32.
- Hodgson, R.A.J. & Raison, J.K., 1989. Inhibition of photosynthesis by chilling in moderate light: a comparison of plants sensitive and insensitive to chilling. *Planta* 178:545-552.

- Hodgson, R.A.J. & Raison, J.K., 1991. Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in relation to photoinhibition induced by chilling in moderate light. *Planta* 183:215-219.
- Hurry, V.M., Krol, M., Öquist, G. & Huner, N.P.A., 1992. Effect of long-term photoinhibition on growth and photosynthesis of cold-hardened spring and winter wheat. *Planta* 188:369-375.
- Hsu, B.D., 1993. Evidence for the contribution of the s-state transition of oxygen evolution to the initial phase of fluorescence induction. *Photosynth. Res.* 36:81-88.
- Janssen, L.H.J. & Van Hasselt, P.K., 1988. Temperature induced alteration of *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence induction in cucumber as affected by DCMU. *Photosynth. Res.* 15:153-162.
- Jouve, L., Engelmann, F., Noirot, M. & Charrier, A., 1993. Evaluation of biochemical markers (sugar, proline, malonedialdehyde and ethylene) for cold sensitivity in microcuttings of two Coffee species. *Plant Sci.* 91:109-116.
- Knopka, C., Hollinderbäumer, R., Ebbert, V., Wietoska, H. & Godde, D., 1996. Imbalances of D₁ protein turnover during stress induced chlorosis of a declining spruce tree. *J. Plant Physiol.* 148:324- 331.
- Krause, G.H., 1988. Photoinhibition of photosynthesis. an evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol. Plant.* 74:566-574.

- Krause, G.H., 1994. Photoinhibition Induced by Low Temperatures. IN: Photoinhibition of Photosynthesis - from Molecular Mechanisms to the Field (N.R. Baker, & J.R. Bowyer, eds.), Bios Scientific Publishers, Oxford, pp.331-363.
- Krause, G.H., Vernotte, C. & Briantais, J-M., 1982. Photoinduced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae. resolution into two components. Biochim. Biophys. Acta 679:116-124.
- Krause, G.H. & Weis, E., 1984. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. ii interpretation of fluorescence signals. Photosynth. Res. 5:139-157.
- Krause, G.H. & Weis, E., 1988. The photosynthetic apparatus and chlorophyll fluorescence. An introduction. IN: Application of Chlorophyll Fluorescence (H.K. Lichtenthaler, ed.), Kluwer, Dordrecht, pp.3-11.
- Krause, G.H. & Weis, E., 1988a. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. Physiol. Plant. 74:566-574.
- Krause, G.H. & Weis, E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:313-349.
- Levitt, J., 1980. Responses of plants to environmental stress. I. Chilling, freezing, and high temperature stresses, 2nd Edition, Academic Press, New York, pp.23-64.

- Lichtenthaler, H.K., 1969. Light-stimulated synthesis of plastid quinones and pigments in etiolated barley seedlings. *Biochim. Biophys. Acta* 184:164-172.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148:350-382.
- Lichtenthaler, H.K., 1996. Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol.* 148:4-14.
- Lichtenthaler, H.K. & Buschmann, C., 1987. Chlorophyll fluorescence spectra of green leaves. *J. Plant Physiol.* 129:137-147.
- Lichtenthaler, H.K. & Calvin, M., 1964. Quinone and pigment composition of chloroplast and quantasome aggregates from *Spinacia oleracea*. *Biochim. Biophys. Acta* 79:30-40.
- Lichtenthaler, H.K. & Wellburn, A.R., 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Transactions* 11:591-592.
- Long, S.P., 1983. C₄ photosynthesis at low temperatures. *Plant Cell Environ.* 6:345-363.
- Lovelock, C.E., Jebb, M. & Osmond, C.B., 1994. Photoinhibition and recovery in tropical plant species: response to disturbance. *Oecologia* 97:297-307.
- Ludlow, M.M. & Björkman, O., 1984. Paraheliotropic leaf movement in siratro as a protective mechanism against

- drought-induced damage to primary photosynthetic reactions:
damage by excessive light and heat. *Planta*. 161:505-518.
- Lyons, J.M., 1973. Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 24:445-466.
- Lynch, D.V. & Steponkus, P.L., 1987. Plasma membrane lipid alteration associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. Cv. Puma). *Plant Physiol.* 83:761-767.
- Macpherson, A.N., Telfer, A., Barber, J. & Truscott, T.G., 1993. Direct detection of singlet oxygen from isolated photosystem two reaction centers. *Biochim. Biophys. Acta* 1143:301-309.
- Mathews-Roth, M.M., Wilson, T., Fujimori, E. & Krinsky, N.I., 1974. Carotenoid chromophore length and protection against photosensitization. *Photochem. Photobiol.* 19:217-222.
- Mattoo, A.K., Hoffmann-Falk, H., Marder, J.B. & Edelman, M., 1984. Regulation of protein metabolism: coupling of photosynthetic electron transport to *in vivo* degradation of the rapidly metabolised 32-kilodalton protein of the chloroplast membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 81:1380-1384.
- Merzlyak, M.N., 1994. Free radical oxidative reactions on lipids of plant membranes. *Free Rad. Biol. Med.* 16:9-10.
- Murata, N. & Fork, D.C., 1975. Temperature dependence of chlorophyll a fluorescence in relation to the physical

- phase of membrane lipids in algae and higher plants. *Plant Physiol.* 56:791-796.
- Muruyama, S., Yatom, M. & Nakamura, Y., 1990. Response of rice leaves to low temperatures. I. Changes in basic biochemical parameters. *Plant Cell Physiol.* 31:303-309.
- Nobel, P.S., 1991. Chapter 4: Light; Chapter 5: Photochemistry of photosynthesis. IN: *Physicochemical and Environmental Plant Physiology* (P.S. Nobel, ed.), Academic Press, San Diego, pp.191-298.
- Ögren, E., 1988. Photoinhibition of photosynthesis in willow leaves under field conditions. *Planta* 175:229-236.
- Ögren, E., 1991. Prediction of photoinhibition of photosynthesis from measurements of fluorescence quenching components. *Planta* 184:538-544.
- Ögren, E. & Rosenqvist, E., 1992. On the significance of photoinhibition of photosynthesis in the field and its generality among species. *Photosynth. Res.* 33:63-71.
- Ohad, I., Kyle, D.J. & Arntzen, C.J., 1984. Membrane protein damage and repair: removal and replacement of inactivated 32 kilodalton polypeptides in chloroplast membranes. *J. Cell Biol.* 99:481-485.
- Oliveira, J.G., 1995. Acompanhamento da fotossíntese líquida e da cinética de emissão de fluorescência da clorofila a de plantas de café (*Coffea arabica* L.) submetidas a um ciclo de suspensão e restabelecimento da irrigação. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, tese de Mestrado.

- Olsson, M., 1995. Alterations in lipid composition, lipid peroxidation and anti-oxidative protection during senescence in drought stressed plants and nondrought stressed plants of *Pisum sativum*. Plant Physiol. Biochem. 33:547-553.
- Öquist, G., 1983. Effects of low temperature on photosynthesis. Plant Cell Environ. 6:281-300.
- Öquist, G. & Ögren, E., 1985. Effects of winter stress on photosynthetic electron transport and energy distribution between the two photosystems of pine as assayed by chlorophyll fluorescence kinetics. Photosynth. Res. 7:19-30.
- Ort, D.R. & Baker, N.R., 1988. Consideration of photosynthetic efficiency at low light as a major determinant of crop photosynthetic performance. Plant Physiol. Biochem. 26:555-565.
- Osmond, C.B., 1981. Photorespiration and photoinhibition: some implications for the energetics of photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 639:77-98.
- Osmond, C.B., 1994. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. IN: Photoinhibition of Photosynthesis - from Molecular Mechanisms to the Field (N.R. Baker, & J.R. Bowyer, eds.), Bios Scientific Publishers, Oxford, pp.1-24.
- Ottander, C., Hundal, T., Andersson, B., Huner, N.P.A. & Öquist, G., 1993. Photosystem II reaction centres stay

- intact low temperature photoinhibition. *Photosynth. Res.* 35:191-200.
- Powles, S.B., 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:15-44.
- Prasil, O., Adir, N. & Ohad, I., 1992. Dynamics of photosystem II: mechanism of photoinhibition and recovery processes. IN: *Topics in Photosynthesis, the Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology* (J. Barber, ed.), Vol. 11, Elsevier, Amsterdam, pp.220-250.
- Qiu, Q-S. & Liang, H-G., 1995. Lipid peroxidation caused by redox system of plasma membranes from wheat roots. *J. Plant Physiol.* 145:261-265.
- Queiroz, C.G.S., Alonso, A., Mares-Guia, M. & Magalhães, A.C., 1998. Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica* L. roots. *Biol. Plant.* 41:403-413.
- Richter, M., Rühle, W. & Wild, A., 1990. Studies on the mechanism of photosystem II photoinhibition. II. The involvement of toxic oxygen species. *Photosynth. Res.* 24:237-243.
- Rosenqvist, E., Wingsle, G. & Ögren, E., 1991. Photoinhibition of photosynthesis in intact willow leaves in response to moderate changes in light and temperature. *Physiol. Plant.* 83:390-396.

- Ross, C.W., 1992. Photosynthesis: chloroplasts and light. IN: Plant Physiology (F.R. Salisbury, & C.W. Ross, eds.), 4th Edition, Belmont, California, pp.207-224.
- Samuelsson, G., Lönneborg, A., Gustafsson, P. & Öquist, G., 1987. The susceptibility of photosynthesis to photoinhibition and the capacity of recovery in high and low light grown cyanobacteria, *Anacystis nidulans*. Plant Physiol. 83:438-441.
- Sarry, J-E., Montillet, J-L., Sauvaire, Y. & Havaux, M., 1994. The protective function of the xanthophyll cycle in photosynthesis. FEBS Lett. 353:147-150.
- Sassenrath, G.H. & Ort, D.R., 1990. The relationship between inhibition of photosynthesis at low temperature and the inhibition of photosynthesis after rewarming in chill-sensitive tomato. Plant Physiol. Biochem. 28:457-465.
- Schindler, C. & Lichtenthaler. H.K., 1994. Is there a correlation between light-induced zeaxanthin accumulation and quenching of variable chlorophyll a fluorescence? Plant Physiol. Biochem. 32:813-823.
- Schreiber, U., 1983. Chlorophyll fluorescence yield changes as a tool in plant physiology. I. The measuring system. Photosynth. Res. 4:361-373.
- Schöner, S. & Krause, G.H., 1990. Protective systems against active oxygen species in spinach. response to cold acclimation in excess light. Planta 180:383-389.

- Setlik, I., Allakhverdiev, S.I., Nedbal, L., Setlikova, E. & Klimov, V.V., 1990. Three types of photosystem II photoinactivation. 1. Damaging processes on the acceptor side. *Photosynth. Res.* 23:39-48.
- Siefermann-Harms, D., 1985. Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochim. Biophys. Acta* 811:325-355.
- Siefermann-Harms, D., 1987. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol. Plant.* 69:561-568.
- Sikorska, E. & Kackperska-Palacz, A., 1979. Phospholipid involvement in frost tolerance. *Physiol. Plant.* 47:144-150.
- Smillie, R.M. & Hetherington, S.E., 1983. Stress tolerance and stress-induced injury in crop plants measured by chlorophyll fluorescence *in vivo* chilling, freezing, ice cover, heat, and high light. *Plant Physiol.* 72:1043-1050.
- Smillie, R.M., Hetherington, S.E., He, J. & Nott, R., 1988. Photoinhibition at chilling temperatures. *Aust. J. Plant Physiol.* 15:207-222.
- Smillie, R.M., Nott, R., Hetherington, S.E. & Öquist, G., 1987. Chilling injury and recovery in detached and attached leaves measured by chlorophyll fluorescence. *Physiol. Plant.* 69:419-428.
- Somersalo, S. & Krause, G.H., 1988. Changes in chlorophyll fluorescence related to photoinhibition of photosynthesis and cold acclimation of green plants. IN: Application of

Chlorophyll Fluorescence (H.K. Lichtenthaler, ed.), Kluwer, Dordrecht, pp.157-164.

Somersalo, S. & Krause, G.H., 1989. Photoinhibition at chilling temperature. Fluorescence characteristics of unhardened and cold-acclimated spinach leaves. *Planta* 177:409-416.

Srivastava, A., Strasser, R.J. & Govindjee, 1995. Polyphasic rise of chlorophyll *a* fluorescence in herbicide-resistant *d₁* mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.* 43:131-141.

Steponkus, P.L., 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:543-584.

Stirling, C.M., Rodrigo, V.H. & Emberru, J., 1993. Chilling and photosynthetic productivity of field grown maize (*Zea mays*); changes in the parameters of the light-response curve, canopy leaf CO₂ assimilation rate and crop radiation-use efficiency. *Photosynth. Res.* 38:125-133.

Stober, F. & Lichtenthaler, H.K., 1992. Changes of the laser-induced blue, green and red fluorescence signatures during greening of etiolated leaves of wheat. *J. Plant Physiol.* 140:673-680.

Strasser, B.J., 1997. Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients. *Photosynth. Res.* 52:147-155.

- Strasser, R.J., Srivastava, A. & Govindjee, 1995. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.* 61:32-42.
- Szalai, G., Janda, T., Páldi, E. & Szigeti, Z., 1996. Role of light in the development of post-chilling symptoms in maize. *J. Plant Physiol.* 148:378-383.
- Takahama, U. & Nishimura, M., 1975. Formation of singlet molecular oxygen in illuminated chloroplasts. Effects on photoinactivation and lipid peroxidation. *Plant Cell Physiol.* 16:737-748.
- Thiele, A. & Krause, G.H., 1994. xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in photosystem II: relationship between zeaxanthin formation, energy-dependent fluorescence quenching and photoinhibition. *J. Plant Physiol.* 144:324-332.
- Van Miegheem, F.J.E., Searle, G.F.W., Rutherford, A.W. & Schaafma, T.J., 1992. The influence of the double reduction of Q_A on the fluorescence decay kinetics of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1100: 198-206.
- Van Wijk, K.J., Andersson, B. & Styring, S., 1992. Spectroscopic characterization of photoinhibited photosystem II and kinetic resolution of the triggering of the D_1 -reaction center protein for degradation. *Biochim. Biophys. Acta* 1100:207-215.

- Vass, I. & Styring, S., 1993. Characterization of chlorophyll triplet promoting states in photosystem II sequentially induced during photoinhibition. *Biochemistry* 32:3334-3341.
- Vass, I., Styring, S., Hundall, T., Koivuniemi, A., Aro, E-M. & Andersson, B., 1992. Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II. Stable reduced Q_a species promote chlorophyll triplet formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 89:1408-1412.
- Walters, R.G. & Horton, P., 1993. Theoretical assessment of alternative mechanisms for no-photochemical quenching of PS_{II} fluorescence in barley leaves. *Photosynth. Res.* 36:119-140.
- Wang, C. Y., 1982. Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress. *Hortscience* 17:173-186.
- Weis, E. & Berry, J., 1987. Quantum efficiency of photosystem II in relation to energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 894:198-208.
- Whatley, J.M. & Whatley, F.R. 1982. Germinação e estabelecimento das plântulas. IN: A luz e a vida das plantas. (J.M. Whatley & F.R. Whatley eds.; G.M. Felipe trad.), Vol. 30, EPU/EDUSP, São Paulo, pp. 29-48.
- Wise, R.R. & Naylor, A.W., 1987. Chilling-enhanced photooxidation. The peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure. *Plant Physiol.* 83:272-277.

- Wise, R.R. & Naylor, A.W., 1987a. Chilling-enhanced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiol.* 83:278-282.
- Wolff, S.P., Garner, S. & Dean, R.T., 1986. Free radicals, lipids and protein degradation. *TIBS* 11:27-31.
- Wright, M. & Simon, E.W., 1973. Chilling injury in cucumber leaves. *J. Exp. Bot.* 24:400-411.
- Xu, C., Rogers, S.M., Goldsteing, G., Widholm, J.M. & Govindjee, 1989. Fluorescence characteristics of photoautotrophic soybean cells. *Photosynth. Res.* 21:93-106.
- Young, A.J., 1991. The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiol. Plant.* 83:702-708.

APÊNDICE

APÊNDICE I

Relação de equações de figuras do estudo dos efeitos da temperatura de resfriamento sobre o aparelho fotossintético de plântulas de café.

Figura 9B - (F_0)

$$\bullet Y = 99,921 + 1,186x - 0,086x^2 + 0,00089x^3 \quad R^2 = 99,99\%$$

Figura 10B - (F_M)

$$\bullet Y = 100,099 - 0,793x + 0,174x^2 - 0,00607x^3 \quad R^2 = 99,95\%$$

Figura 11B - (Área)

$$\bullet Y = 102,233 - 3,281x \quad R^2 = 99,77\%$$

Figura 12B - (F_V/F_M)

$$\bullet Y = 99,910 - 0,490x + 0,070x^2 - 0,00141x^3 \quad R^2 = 99,99\%$$

Figura 13B - (F_V/F_0)

$$\bullet Y = 100,687 - 5,721x + 1,144x^2 - 0,068x^3 + 0,00150x^4$$
$$R^2 = 99,96\%$$

Figura 15 - (Clô a)

$$\bullet 25^\circ\text{C} \rightarrow Y = 98,605 + 63,468x - 5,419x^2 + 0,15947x^3 \quad R^2 = 99,83\%$$

$$\bullet 10^\circ\text{C} \rightarrow Y = \frac{378,5227}{1 + 3,6368 e^{(-0,4783 x)}} \quad R^2 = 98,61\%$$

Figura 16 - (Clo b)

- 25°C → $Y = 115,137 + 75,160x - 6,803x^2 + 0,19974x^3$ $R^2 = 97,97\%$
- 10°C → $Y = \frac{391,1767}{1+3,1765 e^{(-0,4405 x)}}$ $R^2 = 99,37\%$

Figura 17 - (Cx + c)

- 25°C → $Y = 101,596 + 77,040x - 7,229x^2 + 0,23010x^3$ $R^2 = 99,81\%$
- 10°C → $Y = \frac{389,7730}{1+2,7583 e^{(-0,4535 x)}}$ $R^2 = 99,67\%$

Relação de equações de figuras do estudo dos efeitos da temperatura de resfriamento na susceptibilidade de plantas jovens de café à fotoinibição

Figura 36A - (F₀)

- 25°C: 5 min. → $Y = \frac{920,2260}{1+0,1318 e^{(-0,0068 x)}}$ $R^2 = 82,47\%$
- 25°C:30 min. → $Y = \frac{861,1951}{1+0,1648 e^{(-0,0702 x)}}$ $R^2 = 74,15\%$
- 25°C:60 min. → $Y = \frac{836,8289}{1+0,1607 e^{(-0,0203 x)}}$ $R^2 = 82,96\%$
- 25°C:Controle → $Y = 745,2036 - 0,0421x$ $R^2 = 18,12\%$

Figura 36B - (F₀)

- 10°C: 5 min. → $Y = \frac{914,9157}{1+0,1151 e^{(-0,0566 x)}}$ $R^2 = 96,11\%$

- 10°C:30 min. $\rightarrow Y = \frac{(743,8154 * 7,7430461 \text{ E} + 08) + (825,9771 x^{4,7077})}{7,7430461 \text{ E} + 08 + x^{4,7077}}$

$$R^2 = 91,62\%$$

- 10°C:60 min. $\rightarrow Y = 712,2164 - 1,2177x + 0,0118x^2 - 2,44\text{E}-05x^3$

$$R^2 = 66,76\%$$

- 10°C:Controle $\rightarrow Y = 811,4647 + 0,0630x - 0,00041x^2 \quad R^2 = 14,04\%$

Figura 37A - (Fv)

- 25°C: 5 min. $\rightarrow Y = \frac{2236,1019}{1 + 2,3413 e^{(-0,2851 x)}} \quad R^2 = 95,00\%$

- 25°C:30 min. $\rightarrow Y = \frac{1751,4177}{1 + 4,6554 e^{(-0,1226 x)}} \quad R^2 = 97,39\%$

- 25°C:60 min. $\rightarrow Y = 1375,3265 e^{-e^{(0,9593 - 0,1684 x)}} \quad R^2 = 95,68\%$

- 25°C:Controle $\rightarrow Y = 2649,3606 + 3,4381x - 0,01390x^2 \quad R^2 = 82,95\%$

Figura 37B - (Fv)

- 10°C: 5 min. $\rightarrow Y = 1599,4202 e^{-e^{(-0,0408 - 0,0418 x)}} \quad R^2 = 96,29\%$

- 10°C:30 min. $\rightarrow Y = 261,2943 - 4,2629x + 0,0827x^2 - 0,00033x^3$
 $R^2 = 77,52\%$

- 10°C:60 min. $\rightarrow Y = \frac{193,2637}{1 - 0,1986 e^{(-0,8417 x)}} \quad R^2 = 38,06\%$

- 10°C:Controle $\rightarrow Y = 2538,5447 + 0,0738x + 0,00059x^2 \quad R^2 = 19,21\%$

Figura 38A - (F_M)

- 25°C: 5 min. $\rightarrow Y = \frac{3083,4153}{1+0,8869 e^{(-0,1359 x)}} \quad R^2 = 95,26\%$
- 25°C:30 min. $\rightarrow Y = \frac{2706,3734}{1+1,6028 e^{(-0,0767 x)}} \quad R^2 = 97,42\%$
- 25°C:60 min. $\rightarrow Y = 1973,5738 e^{-e^{(-0,4405 - 0,0348 x)}} \quad R^2 = 93,01\%$
- 25°C:Controle $\rightarrow Y = \frac{3599,4701}{1+0,0621 e^{(-0,0190 x)}} \quad R^2 = 86,60\%$

Figura 38B - (F_M)

- 10°C: 5 min. $\rightarrow Y = 2465,0535 e^{-e^{(-0,5882 - 0,0415 x)}} \quad R^2 = 97,42\%$
- 10°C:30 min. $\rightarrow Y = 983,3534 - 9,0355x + 0,1862x^2 - 0,00068x^3$
 $R^2 = 98,83\%$
- 10°C:60 min. $\rightarrow Y = 895,0204 + 0,27162x \quad R^2 = 23,34\%$
- 10°C:Controle $\rightarrow Y = 3206,3919 - 6,2799x + 0,0937x^2 - 0,00032x^3$
 $R^2 = 71,21\%$

Figura 39A - (T_{fm})

- 25°C: 5 min. $\rightarrow Y = \frac{0,6904}{1+1,2787 e^{(-0,0744 x)}} \quad R^2 = 97,36\%$
- 25°C:30 min. $\rightarrow Y = \frac{0,6998}{1+0,1594 e^{(-0,0347 x)}} \quad R^2 = 60,08\%$
- 25°C:60 min. $\rightarrow Y = -0,6211 * [1,1202 - e^{(-0,0866 x)}] \quad R^2 = 88,83\%$
- 25°C:Controle $\rightarrow Y = 0,3958 + 0,0013x - 1,2300E-05x^2 + 3,0580E-08x^3$
 $R^2 = 47,96\%$

Figura 39B - (T_{Em})

• 10°C: 5 min. $\rightarrow Y = 0,4130 - 2,0252E-05x - 4,3411E-07x^2$ $R^2 = 27,80\%$

• 10°C:30 min. $\rightarrow Y = \frac{0,4955}{1 - 0,4636 e^{(-0,2572 x)}}$ $R^2 = 95,54\%$

• 10°C:60 min. $\rightarrow Y = \frac{0,5903}{1 - 0,2413 e^{(-0,2160 x)}}$ $R^2 = 90,37\%$

• 10°C:Controle $\rightarrow Y = 0,3643 + 0,0007x - 1,0439E-05x^2 + 3,9243E-08x^3$
 $R^2 = 54,30\%$

Figura 40A - (Área)

• 25°C: 5 min. $\rightarrow Y = \frac{69963,628}{\{1 + e^{[-2,7329 - (0,1074 x)]}\}^{1/0,0394}}$ $R^2 = 96,83\%$

• 25°C:30 min. $\rightarrow Y = 61238,213 e^{[-e^{(0,3535 - 0,1183 x)}]}$ $R^2 = 96,80\%$

• 25°C:60 min. $\rightarrow Y = 51968,094 e^{[-e^{(-0,1651 - 0,1218 x)}]}$ $R^2 = 94,97\%$

• 25°C:Controle $\rightarrow Y = 61799,805 + 26,8596x$ $R^2 = 42,73\%$

Figura 40B - (Área)

• 10°C: 5 min. $\rightarrow Y = 15995,936 + 247,0632x - 0,75508x^2$

$R^2 = 95,26\%$

• 10°C:30 min. $\rightarrow Y = 13098,019 + 1,09154x$ $R^2 = 5,77\%$

• 10°C:60 min. $\rightarrow Y = 15266,815 - 147,0210x + 1,3155x^2 - 0,00376x^3$
 $R^2 = 98,05\%$

• 10°C:Controle $\rightarrow Y = 41679,782 - 74,7843x + 1,0248x^2 - 0,00336x^3$
 $R^2 = 56,35\%$

Figura 41A - (F_v/F_m)

- 25°C: 5 min. $\rightarrow Y = \frac{0,7165}{1+0,7600 e^{(-0,3436 x)}} \quad R^2 = 97,43\%$
- 25°C:30 min. $\rightarrow Y = 0,3994 * [1,6359 - e^{(-0,0710 x)}] \quad R^2 = 95,67\%$
- 25°C:60 min. $\rightarrow Y = \frac{0,5330}{1+3,4998 e^{(-0,3329 x)}} \quad R^2 = 91,31\%$
- 25°C:Controle $\rightarrow Y = 0,7796 + 9,6918E-05x - 2,90095E-075x^2$
 $R^2 = 46,69\%$

Figura 41B - (F_v/F_m)

- 10°C: 5 min. $\rightarrow Y = 0,1890 * [3,1798 - e^{(-0,0612 x)}] \quad R^2 = 91,55\%$
- 10°C:30 min. $\rightarrow Y = \frac{0,3530}{\{1+e^{[101,6911-(0,7134 x)]}\}^{1/228,9150}} \quad R^2 = 95,54\%$
- 10°C:60 min. $\rightarrow Y = 0,1829-0,00012x+1,84178E-06x^2 \quad R^2 = 55,36\%$
- 10°C:Controle $\rightarrow Y = 0,7403-0,00016x+1,15185E-06x^2 \quad R^2 = 55,48\%$

Figura 42A - (F_v/F_0)

- 25°C: 5 min. $\rightarrow Y = 2,0746 * [1,3522 - e^{(-0,1473 x)}] \quad R^2 = 96,45\%$
- 25°C:30 min. $\rightarrow Y = 2,1483 e^{[-e^{(0,6794 - 0,0862 x)}]} \quad R^2 = 98,13\%$
- 25°C:60 min. $\rightarrow Y = \frac{1,6519}{[1+3,7625 e^{(-0,1442 x)}]} \quad R^2 = 86,72\%$
- 25°C:Controle $\rightarrow Y = 3,5814+0,0035x-1,27843x^2 \quad R^2 = 68,99\%$

Figura 42B - (F_v/F_0)

- 10°C: 5 min. $\rightarrow Y = 0,9648 * [1,7984 - e^{(-0,0262 x)}]$ $R^2 = 94,47\%$

- 10°C:30 min. $\rightarrow Y = \frac{0,5381}{1 + [0,7577 e]^{(-0,0073 x)}}$ $R^2 = 56,70\%$

- 10°C:60 min. $\rightarrow Y = 0,2489 - 0,0013x + 1,2132E-05x^2 - 2,3098E-08x^3$
 $R^2 = 45,91\%$

- 10°C:Controle $\rightarrow Y = 3,0191e^{(0,00019 x)}$ $R^2 = 37,58\%$