

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

Aginaldo R.M. Chaves¹, Fábio M. DaMatta¹ Email: fdamatta@ufv.br, Aristides Ribeiro², Hugo A. Pinheiro¹, Gustavo K. Moraes¹, Karine D. Batista¹, Paulo C. Dias¹, Wagner L. Araújo¹, Ângela T. Caten¹, Cláudio Ronchi¹, Roberto L. Cunha¹, Marcelo Loureiro¹

¹ Dep. Biologia Vegetal; ² Dep. Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG

Resumo:

Procurou-se identificar potenciais mecanismos de proteção contra a escaldadura em cafeeiros cultivadas no campo, sob 50 e 100% da luz natural incidente. Foram analisadas folhas das faces do renque completamente expostas à luz, em três épocas: agosto e dezembro de 2003 e outubro de 2004. A fotossíntese líquida foi muito baixa e similar nas plantas de ambos regimes de luz em todas as épocas, especialmente à tarde. Tendência semelhante foi observada para a atividade da rubisco. Observou-se fotoinibição crônica em agosto e uma discreta fotoinibição dinâmica em dezembro e outubro nas plantas de ambos tratamentos. O ângulo foliar foi sempre maior nas plantas a pleno sol em relação às sob sombra. Na maioria das amostragens, a taxa de transporte de elétrons foi semelhante em plantas de ambos tratamentos. Verificou-se tendência de maiores níveis de ascorbato nas plantas a pleno sol que naquelas sob sombra. Não se observaram diferenças substanciais nas atividades das principais enzimas antioxidantes, bem como na extensão de danos celulares, entre plantas ao sol ou à sombra. Em suma, os resultados indicam que o sombreamento não resultaria em proteção adicional contra a escaldadura nas folhas mais expostas, tampouco contribuiria decisivamente para maximizar as trocas gasosas dessas folhas, mas poderia limitar grandemente a fotossíntese da folhagem mais interna, em função da menor disponibilidade de luz. Isso parece explicar, em boa extensão, o porquê de o sombreamento resultar em reduções na produtividade de cafezais, pelo menos em regiões com características climáticas próximas às ótimas para a cafeicultura.

Palavras-chave: café, fotossíntese, sistema antioxidante, sombreamento.

PHOTOSYNTHESIS AND MECHANISMS OF PROTECTION AGAINST PHOTOOXIDATIVE DAMAGES IN *Coffea arabica* GROWN IN THE FIELD UNDER TWO IRRADIANCE LEVELS

Abstract:

We aimed to identify potential mechanisms of protection against photooxidation in coffee shrubs grown in the field under 50 or 100% incident natural light. Leaves from sun-faced hedgerows were analyzed in three periods: August and December 2003, and October 2004. Net photosynthetic rates were too small and similar between plants from both light treatments, regardless of the sampling date, particularly at noon. A similar trend was found for Rubisco activity. A chronic photoinhibition in August, and a discrete dynamic photoinhibition in December and October, were observed in both treatments. Leaf angle was always steeper in sunlit than in shaded leaves. On most occasions, electron transport rates, activities of key antioxidant enzymes, as well as cellular damages, were similar between sunlit and shaded leaves. Summing up, results indicate that shading would not result in further protection against photooxidative damages to the outer leaves, neither would contribute decisively to maximize their gas exchanges; on the other hand, shading could largely constrain photosynthesis in the inner leaves due to lower light availability. This appears greatly to explain why shading may be detrimental for coffee production, at least in regions with optimal or near-optimal climatic characteristics to the coffee tree.

Key words: antioxidant system, coffee, photosynthesis, shading

Introdução

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

Apesar de a grande maioria dos trabalhos sugerir que o cafeeiro exibe folhas com características típicas de sombra, a sua taxa de fotossíntese líquida (A) pode ser maior a pleno sol que à sombra, desde que a abertura estomática não seja limitante (DaMatta 2004). Em todo o caso, o café é caracterizado como uma espécie que apresenta valores de A relativamente baixos (Silva *et al.* 2004). Em função disso, é comum a ocorrência de irradiâncias superiores às necessárias para saturar a fotossíntese, fato que pode resultar em perda de eficiência fotoquímica do fotossistema II (FSII), fenômeno conhecido como fotoinibição. Se a fotossíntese e a fotorrespiração não utilizarem a maior fração do poder redutor gerada na

fase fotoquímica, pode ocorrer uma sobre-redução da cadeia de transporte de elétrons do cloroplasto e, nessa condição, elétrons podem daí escapar e serem usados para reduzir o oxigênio molecular, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) capazes de resultar em danos fotoinibitórios e fotooxidativos, popularmente conhecidos como escaldadura.

Proteção contra danos oxidativos pode ocorrer às expensas de aumento na dissipação térmica da energia de excitação, por meio de carotenóides, ou via metabolismo das ERO's, em função da maior atividade do sistema antioxidativo (Asada 1999). Tal sistema compreende as chamadas "enzimas antioxidantes" (e.g., dismutase do superóxido, SOD; catalase, CAT; peroxidase do ascorbato, APX e redutase da glutatona, GR), além da participação de moléculas antioxidantes hidrofílicas (e.g., ascorbato e glutatona) e lipofílicas (e.g., α -tocoferol, β -caroteno) (Asada 1999, Ort e Baker 2002). Maior proteção contra excesso de irradiância pode também ocorrer via alteração do ângulo de orientação foliar, uma vez que, quanto mais verticalizada estiver a folha, menor será a interceptação da radiação incidente (DaMatta 2003).

Até o presente, nenhum estudo mais detalhado, em café, parece ter sido feito acerca da associação entre sombreamento, oscilações nos padrões de fotossíntese e mecanismos de fotoproteção. O objetivo deste trabalho foi, pois, identificar potenciais mecanismos de fotoproteção, bem como avaliar como tais mecanismos se ajustam diurna e sazonalmente, em café. Para tal, plantas adultas foram cultivadas sob sombra e plena exposição solar, procedendo-se às avaliações em folhas mais externas, ao longo do dia. Foram avaliadas as trocas gasosas, pigmentos fotossintéticos, variações na interceptação da irradiância, utilização e dissipação da energia absorvida, o metabolismo antioxidante e danos celulares.

Material e métodos

O experimento foi conduzido em Viçosa (altitude 690 m; 20°45'S, 42°15'W), em Viçosa, Minas Gerais. Foram utilizadas plantas de *Coffea arabica* L. cv. Catuai Vermelho, cultivadas sob espaçamento de 3,0 x 1,0 m, plantadas em novembro de 1989, com uma planta por cova, em Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, com o plantio orientado no sentido leste-oeste. Em agosto de 1998, as plantas foram recepadas. Foram avaliadas plantas a pleno sol e sob 50% de luz solar direta, sendo para este tratamento utilizado, a partir de outubro de 2001, sombrite com a referida capacidade de retenção de luminosidade. O experimento foi disposto em blocos casualizados, com seis repetições, e analisado em esquema fatorial (2x3, dois níveis de irradiância e três épocas).

As medições e amostragens foram feitas em dias sem nuvens, com insolação superior a 9 h: 20 de agosto e 12 de dezembro de 2003, e 30 de outubro de 2004. Nessas datas, as temperaturas do ar mínima e máxima foram, respectivamente, 8.6 e 26.5°C, 18.2 e 34.0°C, e 15.5 e 29.4°C. De 20 de maio a 20 de agosto de 2003, houve apenas 31 mm de precipitação, dos quais 22.5 mm ocorreram em 16 de agosto. Houve precipitação abundante nos dias precedentes às outras épocas de medições. Em agosto, época fria e seca, o café apresenta taxas negligenciáveis de crescimento vegetativo e fotossíntese; em dezembro, época quente e chuvosa, as taxas de crescimento e fotossíntese são frequentemente limitadas pelas altas temperaturas; e em outubro, época chuvosa e de temperatura mais amena, as taxas de crescimento vegetativo e de fotossíntese são mais elevadas (Silva *et al.* 2004). Nas épocas selecionadas, folhas da face norte, em agosto, e da face sul, em outubro e dezembro, foram expostas à radiação solar incidente ao longo de todo o dia. Todas as medições e amostragens foram feitas em folhas expandidas do terço superior das plantas, utilizando-se apenas folhas das faces do renque do cafezal completamente expostas à radiação solar. Amostras foliares foram coletadas ao meio-dia e, posteriormente, armazenadas a -80°C até a análise.

As taxas de assimilação líquida do carbono (A) e a condutância estomática (g_s) foram medidas sob luz e concentração de CO₂ ambientes, com um analisador de gases a infravermelho (LCA4, ADC, Reino Unido).

A eficiência máxima do FSII foi estimada pela razão entre as fluorescências variável e máxima, $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$. O rendimento quântico do transporte de elétrons através do FSII (Φ_{FSII}) foi estimado, aplicando-se um pulso de luz saturante (6000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 1 s (Pinheiro *et al.* 2004). A taxa de transporte de elétrons (TTE) foi estimada como: [RFA interceptada pela folha] x [absorptância foliar] x Φ_{FSII} x 0.5.

Foram determinadas a concentração de ascorbato, as atividades de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, APX e GR) e danos celulares, que indicam a ocorrência de estresse oxidativo, por meio da peroxidação de lipídios, via acúmulo de aldeído malônico, e pelo extravasamento de eletrólitos, conforme Pinheiro *et al.* (2004). A atividade da rubisco foi medida, rastreando-se a oxidação do NADH a 340 nm (Sharkey *et al.* 1991). Clorofilas foram quantificadas conforme Lichtenthaler (1987).

Resultados e discussão

O cafeeiro tem sido caracterizado por apresentar baixas taxas de assimilação líquida do carbono (A), mesmo sob condições ótimas de cultivo (Silva *et al.* 2004), e os resultados aqui apresentados corroboram esse registro. Em agosto, época relativamente seca e fria, apesar de a temperatura foliar (não mostrado) situar-se numa faixa presumivelmente mais adequada para o funcionamento normal do aparelho fotossintético, os valores de A foram extremamente baixos ao longo do dia (Fig. 1), mesmo não se observando déficits hídricos internos severos. Mesmo em dezembro ou outubro, quando se esperariam taxas maiores de crescimento e de fotossíntese, os valores de A foram de modo geral baixos (Fig. 1) e bem inferiores aos valores máximos já relatados para café cultivado em condições de campo ($\sim 12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), conforme mostrado por Silva *et al.* (2004). Estas informações pressupõem a ocorrência de limitações à fotossíntese, que podem ser de natureza estomática e/ou não-estomática. Apesar de a condutância estomática ter sido muito baixa (valores máximos de 55

mmol m⁻² s⁻¹; não mostrado), as atividades inicial e total da rubisco (esta, ensaiada sob condições ótimas) foram também muito reduzidas (valores máximos de 6 μmol m⁻² s⁻¹; não mostrado), evidenciando limitações da capacidade carboxilativa. Contudo, limitações *in vivo* à capacidade de carboxilação não devem estar associadas a reduções em TTE, visto que *A* foi reduzida em maior extensão que aquele parâmetro (Fig. 1), donde pode-se inferir que potenciais fotodanos ou fotoinibição ao FSII não explicariam as limitações observadas na fotossíntese líquida. Adicionalmente, em agosto, a ocorrência de temperaturas noturnas relativamente baixas associadas a taxas de crescimento negligenciáveis devem ter contribuído para ocorrência de limitações bioquímicas e biofísicas à fotossíntese, conforme proposto por Silva *et al.* (2004).

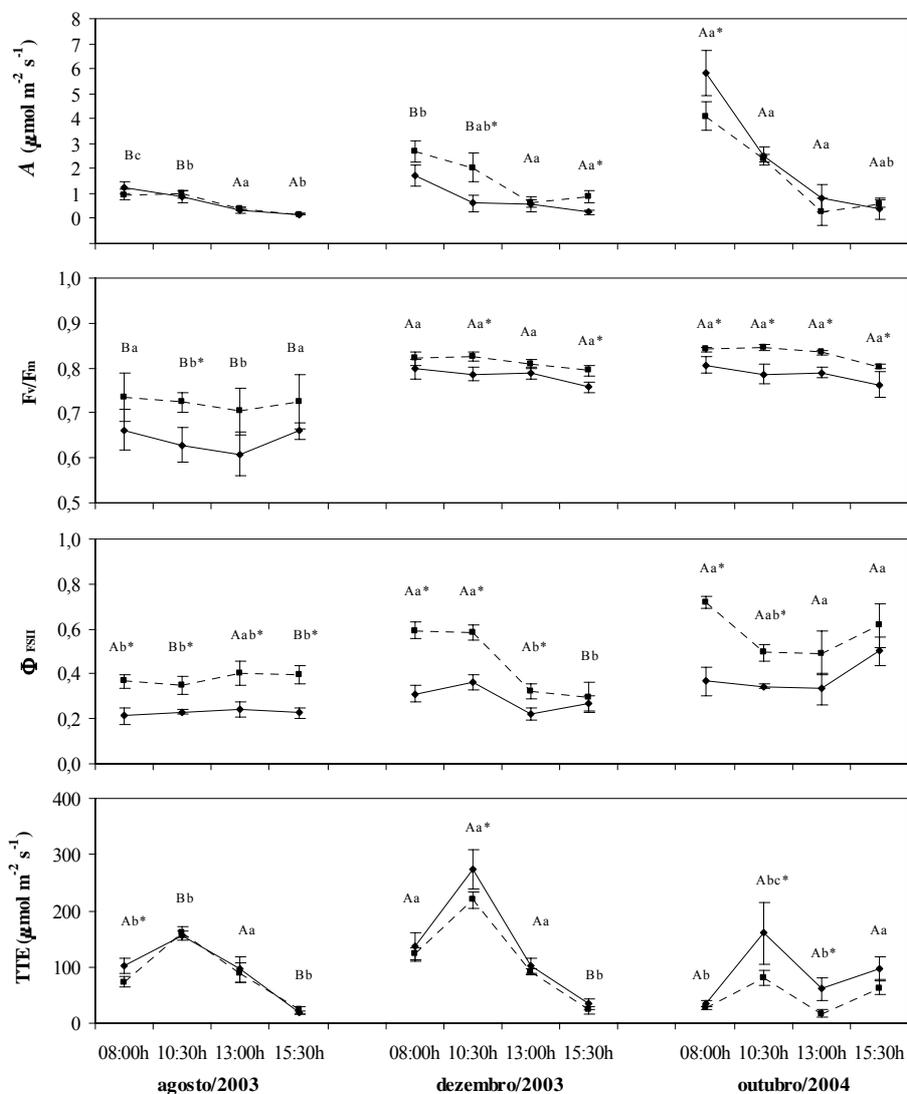


Fig.1 Curso diário da taxa de assimilação líquida de carbono (*A*), da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m), do rendimento quântico de transporte de elétrons (Φ_{FSII}) e da taxa de transporte de elétrons (TTE) em plantas de café a pleno sol (linha cheia) e sob sombra (linha tracejada), em três épocas de avaliação. Diferenças estatísticas entre médias obtidas nas três épocas, dentro de um mesmo horário, são indicadas por letras maiúsculas para plantas a pleno sol, e por letras minúsculas, para plantas sob sombra (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$). Asterisco (*) denota diferença significativa (teste *t*, $P \leq 0,05$) entre as médias dos regimes de luz, dentro de um mesmo horário e época de avaliação. $n = 6 \pm EP$

Em dezembro e em outubro, os valores de F_v/F_m na antemanhã (não mostrado) estiveram dentro de uma faixa ótima (0,80-0,83) relatada por Björkman e Demmig (1987). Ao longo do dia, nessas épocas, não foram observados valores de F_v/F_m inferiores a 0,75, mesmo nas plantas a pleno sol (Fig. 1). Por conseguinte, potenciais decréscimos na razão F_v/F_m devem ser atribuídos a mecanismos de fotoproteção, i.e., fotoinibição dinâmica (Asada 1999). Por outro lado, em agosto, foram observados, sistematicamente, menores valores de F_v/F_m associados com maiores valores de F_0 , mesmo na antemanhã, independentemente dos tratamentos aplicados. Estes resultados indicam ocorrência de uma discreta fotoinibição crônica, na medida em que não se observou recuperação da eficiência fotoquímica do FSII após o período noturno. Reduções persistentes na eficiência do FSII têm sido atribuídas à retenção de componentes desepoxidados do ciclo das xantofilas (zeaxantina e anteraxantina), os quais poderiam participar ativamente na dissipação de energia de excitação e, desse modo, proteger o FSII de sobre-excitação e fotodanos (Gilmore 1997). Alternativamente, reduções sustentadas de F_v/F_m podem também resultar de acúmulo de centros de reação não-funcionais do FSII e de fotoativação parcial do FSII (Niyogi 1999). Esses últimos processos também conduzem à dissipação do excesso de fótons como calor, mas, em última análise, resultariam em fotodanos após exposição prolongada dos tecidos foliares a irradiâncias excessivas. Nas condições de agosto, *A* extremamente baixa, quer em plantas ao sol ou à sombra, favorece a hipótese de que a fotoinibição esteve mais associada com fotodano do que com fotoproteção ao aparelho fotossintético. Registre-se, contudo, que apesar de se observarem danos celulares, caracterizados por aumentos discretos no extravasamento de eletrólitos e peroxidação de lipídeos, eles foram de pequena magnitude, quando comparados com os dados obtidos em dezembro (Fig. 2).

A redução da absorção da energia radiante, via decréscimos na concentração de clorofilas, aumentos do ângulo de inclinação foliar e maior reflectância da folha, podem ser meios para as plantas se defenderem contra irradiâncias potencialmente fotoinibitórias (DaMatta 2003). Neste trabalho, pôde-se observar maiores ângulos de inclinação das folhas de plantas ao sol que à sombra (não mostrado). Isso deve acarretar, proporcionalmente, menor interceptação do fluxo de energia radiante por unidade de área foliar incidente nas plantas a pleno sol (DaMatta 2003). De qualquer modo, além da menor interceptação da irradiância, a menor concentração de clorofilas (Fig. 2) deve ter concorrido para reduzir a absorptância foliar e, pois, reduzir a quantidade total de energia efetivamente absorvida pelos fotossistemas, particularmente nas plantas sob plena exposição solar.

Os decréscimos em Φ_{FSII} , provavelmente associados a aumento da dissipação não-fotoquímica da energia absorvida (Niyogi 1999), acarretaram fortes reduções em TTE das plantas expostas a pleno sol, de maneira tal que, geralmente, houve diferenças relativamente pequenas na capacidade de transporte de elétrons entre tais plantas e aquelas à sombra (Fig. 1). Conseqüentemente, a magnitude da geração de poder redutor e ATP não deve ter sido muito diferente entre as plantas dos dois regimes de luz. Desde que as taxas de assimilação do carbono, processo considerado como o principal dreno de energia nos cloroplastos, pouco diferiu entre folhas de plantas a pleno sol e plantas sob sombra, espera-se, por conseguinte, que o nível de energia de excitação nos fotossistemas deva também ter sido semelhante entre essas plantas, na maioria das amostragens.

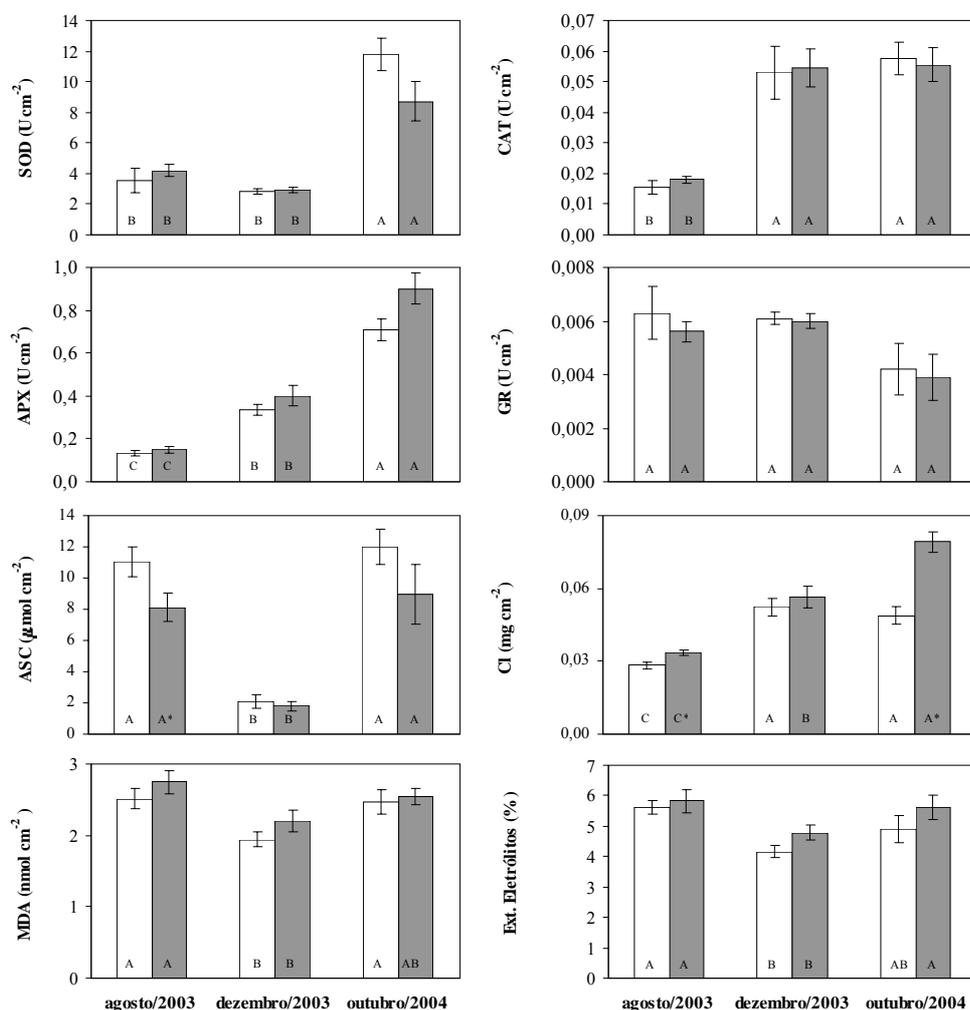


Fig. 2. Atividade da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e redutase da glutationa (GR), concentrações de ascorbato (ASC), clorofilas totais (Cl) e aldeído malônico (MDA), e extravasamento de eletrólitos em plantas de café a pleno sol (colunas vazias) e sob sombra (colunas cheias), em três épocas de avaliação. Médias obtidas ao longo das épocas de avaliação acompanhadas de diferentes letras são estatisticamente distintas entre si, dentro de um mesmo regime de luz (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$). Asterisco (*) indica diferenças entre regimes de luz, dentro de mesma época (teste t , $P \leq 0,05$). $n = 6 \pm EP$

Em virtude do desequilíbrio entre absorção e utilização da energia radiante (A foi reduzida em extensão maior que TTE; Fig. 1), presume-se que tenha ocorrido um excesso de poder redutor. A fim de evitar-se a formação de ERO's, que levaria à ocorrência de dano ao aparelho fotossintético, aquele excesso deve ser dissipado, e.g., via reação de Mehler e fotorrespiração (Asada 1999, Ort e Baker 2002). Não obstante, em agosto, observou-se, de modo geral, menor atividade das enzimas antioxidantes (Fig. 2), apesar da ocorrência de fotoinibição crônica associada a muitas horas de insolação naquela época. Possivelmente, a redução aparente da atividade do FSII e fotoativação seja aumentada sob temperaturas noturnas mais baixas, na medida em que a síntese protéica é reduzida. Por outro lado, nas outras épocas avaliadas, a alta atividade da CAT pode estar relacionada à maior produção de H_2O_2 nos peroxissomos, devido a um provável aumento na taxa de fotorrespiração (Ort e Baker 2002). Não está claro, todavia, porque as atividades da SOD e da APX, assim como os níveis de ascorbato, foram substancialmente menores em dezembro em relação a outubro. Uma possível explicação poderia

envolver um maior número de horas de insolação em outubro que em dezembro e, portanto, maior pressão de excitação naquela época.

A tendência de maiores níveis de ascorbato reduzido (Fig. 2), conforme observado nas plantas a pleno sol em agosto e outubro, pode, portanto, ter contribuído para aumentar a capacidade antioxidante dessas plantas em relação à das plantas sob sombra. De acordo com Wise e Naylor (1987), a manutenção do estoque de ascorbato auxiliaria grandemente as plantas a protegerem-se contra estresse oxidativo, e pode ser considerada como um indicador fisiológico de um sistema de defesa eficiente contra danos oxidativos. Os níveis de outros antioxidantes importantes, como o α -tocoferol (não mensurado neste trabalho), são usualmente maiores em plantas a pleno sol que sob sombra. Conjuntamente, esses compostos poderiam auxiliar um possível aumento da capacidade de dissipação de excessos potenciais de energia de excitação nas plantas sob completa exposição solar. Tal condição explicaria, em parte, porque essas plantas puderam evitar, em comparação com plantas à sombra, a ocorrência de danos oxidativos, particularmente nas situações em que sua capacidade de transporte de elétrons foi mantida em níveis superiores aos das plantas sob sombra.

Conclusões

Além de poder alterar a absorção da energia radiante, o cafeeiro pode também dissipar satisfatoriamente o excesso da energia absorvida, ainda que A seja consideravelmente baixa. As diferenças relativamente pequenas na magnitude das trocas gasosas, da concentração de clorofilas, da fotoinibição e da capacidade antioxidante, aliadas à ocorrência de danos celulares discretos e em extensão muito similar entre folhas de plantas a pleno sol e sob sombra, sugere que o cafeeiro pode responder plasticamente às variações da irradiância. Estes resultados corroboram a asserção de DaMatta (2004) de que o cafeeiro é uma planta facultativa de sombra, ou, alternativamente, uma espécie com plasticidade relativamente elevada de seu aparelho fotossintético às variações da irradiância. Por fim, os resultados aqui apresentados indicam que o sombreamento resultaria em pouca fotoproteção adicional às folhas mais expostas, tampouco contribuiria decisivamente para maximizar as trocas gasosas dessas folhas, mas poderia limitar grandemente a fotossíntese da folhagem mais interna, em função da menor disponibilidade de luz. Isso parece explicar, em boa extensão, o porquê de o sombreamento resultar em reduções na produtividade de cafezais, pelo menos em regiões com características climáticas próximas às ótimas para a cafeicultura (DaMatta 2004), como parecem ser as da região de Viçosa.

Referências bibliográficas

- Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 50, 601-639.
- Björkman O., Deming B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, 170, 489-504.
- DaMatta F.M. 2003. Drought as a multidimensional stress affecting photosynthesis in tropical tree crops. In: Hemantaranjan E. (Ed.), **Adv. Plant Physiol.**, v.5. Jodhpur: Scientific Publishers, 227-265.
- DaMatta F.M. 2004. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. **Field Crops Res.**, 86, 99-114.
- Lichtenthaler H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Meth. Enzimol.**, 148, 350-382.
- Niyogi K.K. 1999. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 50, 333-359.
- Ort D.R., Baker N.R. 2002. A photoprotective role for O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis? **Curr. Opin. Plant Biol.**, 5, 193-198.
- Pinheiro H.A., DaMatta F.M., Chaves A.R.M., Fontes E.P.B., Loureiro M.E. 2004. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Sci.**, 167, 1307-1314.
- Sharkey T.D., Savitch L.V., Butz N.D. 1991. Photometric method for routine determination of k_{cat} and carbamylation of rubisco. **Photosynth. Res.**, 28, 41-48.
- Silva E.A., DaMatta F.M., Ducatti C., Regazzi A.J., Barros R.S. 2004. Seasonal changes in vegetative growth and photosynthesis in Arabica coffee trees. **Field Crops Res.**, 89, 349-357.
- Wise R.R., Naylor A.W. 1987. Chilling-enhanced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. **Plant Physiol.**, 83, 251-259.