

FÁBIO MURILO DA MATTA

DESEMPENHO FOTOSSINTÉTICO DO CAFEIEIRO EM RESPOSTA
A TENSÕES ABIÓTICAS

Tese Apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como Parte das
Exigências do Curso de Fisiologia
Vegetal, para Obtenção do Título de
Doctor Scientiae



VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
DEZEMBRO - 1995

A Márcia von Schreiggäch
In memoriam

AGRADECIMENTOS

*“Sê todo a cada coisa.
Põe o que és no mínimo que fazes.”*
Fernando Pessoa

Ao Professor Moacyr Maestri,
Um agradecimento especial, pela orientação,
pelo exemplo, pelo carinho e pela amizade.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos.

À Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária e à Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais, pela cessão do material vegetal.

Aos Professores Paulo R. Mosquim e Raimundo S. Barros, pelos ensinamentos, pela amizade, pelas críticas e sugestões.

Ao Professor Marco Aurélio P. e Silva, pela agradável convivência, pelas críticas e sugestões.

À Professora Hermínia P. Martinez, pelas críticas e sugestões.

Aos Professores Eldo M. da Silva e Luiz Carlos Salomão, pela colaboração.

Aos Técnicos Oswaldo Santos Filho e Carlos Raimundo, pela atenção e colaboração.

Aos meus **amigos** Cláudio G. do Nascimento, Érico G. Cardoso, Glauco A. Corrêa, Josemar Schmidt, Marcelo A. G. Carnelossi e Marcelo V. Rolim, pela amizade fraterna, pelo constante apoio e pela feliz convivência.

BIOGRAFIA

FÁBIO MURILO DA MATTA, nasceu em Vitória, Espírito Santo, em 14 de outubro de 1966.

Em janeiro de 1987, graduou-se em Agronomia, pela Universidade Federal do Espírito Santo.

Em 1991, concluiu o Mestrado em Fisiologia Vegetal e, no mesmo ano, iniciou o Curso de Doutorado *em* Fisiologia Vegetal, ambos na Universidade Federal de Viçosa. A partir de novembro de 1994, foi efetivado como Professor Assistente I, no Departamento de Biologia Geral daquela Universidade.

CONTEÚDO

	Página
EXTRATO.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1	
FOTOINIBIÇÃO DA FOTOSSÍNTESE - EFEITOS DO CLORANFENICOL E DITIOTREITOL	
1-INTRODUÇÃO	3
2- MATERIAL E METODOS.....	6
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	8
CAPÍTULO 2	
PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS RELACIONADOS COM A TEMPERATURA	
1-INTRODUÇÃO.....	18
2- MATERIAL E METODOS.....	20
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO.	22

CAPÍTULO 3**EFEITOS DO DÉFICE HÍDRICO SOBRE O
DESEMPENHO FOTOSSINTÉTICO**

1- INTRODUÇÃO.....	37
2- MATERIAL E METODOS.....	40
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
RESUMO E CONCLUSÕES.....	53
BIBLIOGRAFIA.....	56

EXTRATO

MATTA, Fábio Murilo Da, D.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 1995. *Desempenho Fotossintético do Cafeeiro em Resposta a Tensões Abióticas*. Professor Orientador: Moacyr Maestri. Professores Conselheiros: Paulo Roberto Mosquim e Raimundo Santos Barros.

Foram investigadas respostas fisiológicas decorrentes de tensões luminosa, térmica e hídrica, sobre o aparelho fotossintético de *Coffea arabica* cv Catuaí Vermelho e *C. canephora* cv Conillon. Sob alta irradiância, a fotoinibição foi manifestada por decréscimos lineares da eficiência fotoquímica do fotossistema II (FSII). Cloranfenicol (CAP) intensificou a extensão da fotoinibição e bloqueou completamente o seu restabelecimento sob baixa irradiância, sem quaisquer efeitos aparentes de ditiotreitol (DTT). Não foi observada separação de fases na reversão da fotoinibição. A evolução de oxigênio fotossintético, sob condições fotoinibitórias, foi reduzida por CAP e DTT, sendo decrescida apenas marginalmente nas plantas-controles de Catuaí, porém com pronta recuperação após 90min de exposição a baixa irradiância. Com relação à temperatura, o desempenho fotossintético de Conilon e Catuaí foi reduzido em folhas que se

desenvolveram no inverno, com decréscimos mais drásticos no primeiro cultivar, principalmente em virtude de fatores não-estomáticos. O teor de amido foliar foi significativamente maior no inverno, Catuaí mostrando teores 70% superiores àqueles observados em Conilon. Foi verificada, naquele cultivar, uma estreita correlação entre a evolução de oxigênio fotossintético e a concentração foliar de amido. Quando os níveis desse carboidrato foram reduzidos à metade, a evolução do oxigênio fotossintético e a eficiência fotoquímica do FSI foram restabelecidas a taxas semelhantes àquelas medidas em folhas desenvolvidas no verão. Conilon acumulou prolina e ascorbato em maior extensão do que Catuaí, no inverno, ocorrendo o oposto com relação a malondialdeído. A constante da taxa de recuperação da fotoinibição, no inverno, foi quatro vezes menor em Catuaí, sendo incrementada no verão, mas a valores inferiores aos mostrados por Conilon. Nesse cultivar, a redução da fotossíntese nas fases iniciais da seca foi governada, principalmente, por fatores não-estomáticos, enquanto em Catuaí, tanto fatores estomáticos quanto não-estomáticos estiveram associados com a redução do seu desempenho fotossintético. Sob déficit hídrico severo, limitações não-estomáticas foram as mais importantes, no controle das taxas fotossintéticas, com menores decréscimos em Conilon, que maximizou o ganho de carbono às expensas de conservação de água. Deficiência hídrica moderada, *per se*, não afetou consistentemente a evolução do oxigênio fotossintético na recuperação da fotoinibição em ambos os cultivares, porém, sob seca severa, a capacidade fotossintética de Catuaí foi drasticamente reduzida. De modo geral, o aparelho fotossintético do Conilon foi menos sensível do que o do Catuaí a altas irradiâncias, à temperatura e ao déficit hídrico.

INTRODUÇÃO GERAL

Dentre mais de 70 espécies pertencentes ao gênero *Coffea*, apenas duas delas, *Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre, assumem importância econômica, respondendo por quase a totalidade da produção mundial de café (RENA et al., 1994).

A distribuição geográfica de plantios comerciais de cafeeiros é controlada, basicamente, por temperatura, de modo que *C. arabica*, geralmente exibindo menor sensibilidade a frio de que *C. canephora* (JOUVE et al., 1993; RENA et al., 1994), é preferencialmente cultivado em regiões altas e amenas e, de modo oposto, regiões baixas e quentes são mais adequadas ao cultivo de *C. canephora*.

Apesar de serem plantas com folhas de características típicas de sombra, cafeeiros são cultivados, via de regra, a pleno sol, com produções satisfatórias e, geralmente, maiores que os plantios sob sombra, desde que a disponibilidade hídrica do solo não seja um fator limitante à sua produtividade. No entanto, altas intensidades luminosas mais do que saturam o aparelho fotossintético do cafeeiro, acarretando-lhe severa fotoinibição (NUNES et al., 1993), a qual pode ser

potencializada por déficit hídrico e extremos de temperatura (BARBER e ANDERSSON, 1992; KRAUSE, 1988; OSMOND, 1994). Interação entre as respostas de tais fatores abióticos, portanto, modulam complexamente as respostas fotossintéticas do cafeeiro ao ambiente, limitando sua assimilação de carbono e seu crescimento, especialmente em campo, onde sinergismo/antagonismo entre tais fatores é fortemente acentuado.

Nos últimos anos, vários estudos exploraram efeitos de variáveis ambientes, como luz, temperatura, umidade relativa, disponibilidade hídrica, sobre o desempenho fotossintético do cafeeiro, mas, pouco se conhece sobre diferenças de estratégias da maquinaria fotossintética de *C. arabica* e de *C. canephora*, visando aclimatação a condições adversas do ambiente. Neste trabalho, foram investigadas respostas fisiológicas decorrentes de tensões luminosa, térmica e hídrica, sobre a capacidade fotossintética daquelas espécies.

CAPÍTULO 1

FOTOINIBIÇÃO DA FOTOSÍNTESE EFEITOS DO CLORANFENICOL E DITIOTREITOL

1- INTRODUÇÃO

Irradiâncias superiores àqueles necessários para saturar a fotossíntese freqüentemente acarretam um decréscimo líquido na taxa de transporte de elétrons através do fotossistema II (FSII), e um forte incremento na taxa de giro de **D1**, principal proteína dos centros de reação do FSII, na medida em que ela se liga a todos os cofatores necessários à transferência de elétrons, desde o complexo de clivagem da água até o estoque de plastoquinonas (ANDERSSON et al., 1994; TELFER e BARBER, 1994). Como regra, fotoinibição sempre resulta em redução de eficiência fotoquímica do FSII (KRAUSE, 1988), freqüentemente avaliada pela razão de fluorescências variável (Fv) e máxima (Fm).

O mecanismo de fotoinibição não está completamente elucidado (CRITCHLEY e RUSSEL, 1994; LONG et al., 1994), mas parece resultar (a) de

processos fotoprotetores acoplados à dissipação de energia térmica, especialmente aqueles associados com a interconversão violaxantina-zeaxantina (DEMMIG-ADAMS e ADAMS, 1992), caracterizados por decréscimos de fluorescência inicial (F_0) e de F_m , e, (b) inativação/destruição e reparo de centros de reação do FSII (ARO et al., 1994; FRANKLIN et al., 1992; GREER et al., 1993), normalmente associados com incrementos de F_0 , resultantes de fotodanos no FSII (KRAUSE, 1988; OSMOND, 1994). Reversão da fotoinibição, nesse contexto, exige ressíntese e substituição da proteína D1 nos centros de reação do FSII (GREER et al., 1993; LEITCSH et al., 1994; OHAD et al., 1994).

Quando a reversão da fotoinibição é avaliada à temperatura ambiente, duas fases distintas de restabelecimento podem ser observadas (FRANKLIN et al., 1992; HURRY e HUNER, 1992; KRAUSE, 1994; LEITSCHE et al., 1994; RINTAMÄKI et al., 1994; SCHNETTGER et al., 1992; van WIJK e van HASSELT, 1993). A primeira é rápida, usualmente completada dentro de 1h e independente do giro proteico, e uma segunda fase, lenta, atribuída à ressíntese e substituição de D1 e, via de regra, completamente bloqueada por inibidores da síntese de proteínas cloroplastídicas (ARO et al., 1994; LEITSCHE et al., 1994; SCHNETTGER et al., 1992). O restabelecimento na primeira dessas fases tem sido atribuído, em grande parte, à formação de zeaxantina (DEMMIG et al., 1987; DEMMIG-ADAMS, 1990; FRANKLIN et al., 1992). DEMMIG-ADAMS e ADAMS (1992) sugeriram que dissipação de energia térmica envolvendo formação de zeaxantina é o principal processo fotoprotetor de extinção do excesso de energia, ocorrendo em folhas sob várias condições usualmente encontradas por plantas.

Neste trabalho, foi avaliada, qualitativamente, a importância relativa dos processos acima discutidos na fotoinibição do cafeeiro. A importância da capacidade do ciclo de reparo do FSII, atuando como proteção contra fotoinibição, foi estimada utilizando-se cloranfenicol (CAP) para bloquear a

síntese de proteínas codificadas no genoma do cloroplasto, e a inibição da extinção do excesso de energia térmica, mediada por formação de zeaxantina, foi avaliada a partir da inibição de sua síntese por ditioneitol (DTT).

2- MATERIAL E MÉTODOS

Dois cultivares de cafeeiros, *Coffea arabica* L. cv Catuai Vermelho e *C. canephora* Pierre cv Conilon, de aproximadamente seis anos, cultivados em campo, a pleno sol, foram utilizados nos experimentos de fotoinibição.

Folhas do terceiro par, a partir do ápice, de ramos plageotrópicos, orientadas na direção leste-oeste, foram destacadas e acondicionadas em dessecador provido de placa perfurada, com pecíolos imersos em água, cloranfenicol (CAP) ou ditiotreitól (DTT), estes obtidos de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA. Foram testadas várias concentrações e tempos para absorção desses inibidores. Alternativamente, discos foliares e folhas inteiras foram infiltradas a vácuo, a fim de se avaliar a eficácia do método empregado para a absorção de CAP e DTT. Os resultados obtidos referem-se à absorção de CAP (1mol m^{-3}) por 3h e DTT (3mol m^{-3}) por 6h, ambos absorvidos via corrente transpiratória.

A fotoinibição foi estudada em discos foliares de 1000mm^2 , flutuando em água ou em solução de CAP ou DTT, sob $1,6\text{mmol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por até

160min, a 22°C, utilizando-se duas lâmpadas de halogênio de 1000W. O excesso de radiação térmica foi filtrado por uma lâmina de 0,1m de água. A recuperação da fotoinibição foi acompanhada durante 210min, a 22°C, sob 40 μ mol de fótons $m^{-2} s^{-1}$, com discos foliares mantidos na mesma solução utilizada nos tratamentos fotoinibitórios.

A fotoinibição e o subsequente restabelecimento foram estudados, medindo-se a cinética de emissão de fluorescência rápida e a evolução de oxigênio fotossintético. No primeiro caso, foi utilizado um fluorímetro, o Analisador de Eficiência de Plantas (PEA, Hansatech, Norfolk, Reino Unido), medindo-se, à temperatura ambiente, F_o e F_m . A razão de fluorescência variável e fluorescência máxima (F_v/F_m) foi determinada em folhas previamente adaptadas a 20min de obscuridade. A indução de F_m foi acompanhada por um pulso de luz saturante de 3mmol de fótons $m^{-2} s^{-1}$, com pico de comprimento de onda em 650nm, por 5s. A fluorescência inicial foi derivada pela extrapolação ao tempo zero da linha de melhor ajuste dos sinais de fluorescência registrados a cada 10 μ s, após o início da iluminação. Todas essas operações foram feitas automaticamente pelo analisador, sendo os dados recuperados num microcomputador via programa próprio.

A fotossíntese líquida máxima, expressa pela evolução de oxigênio ($A_{m\acute{a}x}$), foi medida sob luz e CO_2 saturantes, a 35°C, utilizando-se um eletrodo de oxigênio de fase gasosa (LD2, Hansatech, Norfolk, Reino Unido), calibrado pela introdução de um volume conhecido de O_2 . Luz foi fornecida por uma fonte LS2 - Hansatech, provida de lâmpada de halogênio de 100W (tipo Xenophot, Osram, Berlim, Alemanha), fornecendo cerca de 1,2mmol de fótons $m^{-2} s^{-1}$ ao nível de disco foliar. A concentração de CO_2 ($\pm 30mmol mol^{-1}$) na câmara foi gerada por 0,2mL de tampão carbonato/bicarbonato ($1kmol m^{-3}$), conforme WALKER (1987).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra redução de eficiência fotoquímica máxima do FSI, avaliada pela razão F_v/F_m , quando discos foliares de cafeeiros C o d o n e Catuai foram expostos a $1,6\text{mmol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por até 160min. Claramente, o declínio de F_v/F_m ao longo do tempo foi fortemente linear, aproximando-se de uma cinética de primeira ordem, tanto nos discos-controles como nos discos tratados com DTT e CAP. Os resultados obtidos com os discos-controles são similares àqueles observados por DEMMIG e BJÖRKMAN (1987) e GREER et al. (1986), mas contrastam com os dados de FRANKLIN et al. (1992), em que se pode observar a ocorrência de dois processos de primeira ordem, caracterizados por declínio inicial rápido e posteriormente lento de F_v . Em qualquer caso, a redução de F_v/F_m , em função do tempo de fotoinibição, pode representar, em proporção aproximada, declínio do número de centros de reação do FSI envolvidos no transporte linear de elétrons, com concomitante aumento do número de centros inativos, que dissipariam fortemente o excesso de energia em calor (CRITCHLEY e RUSSEL, 1994; KRAUSE e WEIS 1991; LEITSCH et al., 1994; ÖQUIST et al., 1992; SCHNETTGER et al., 1994).

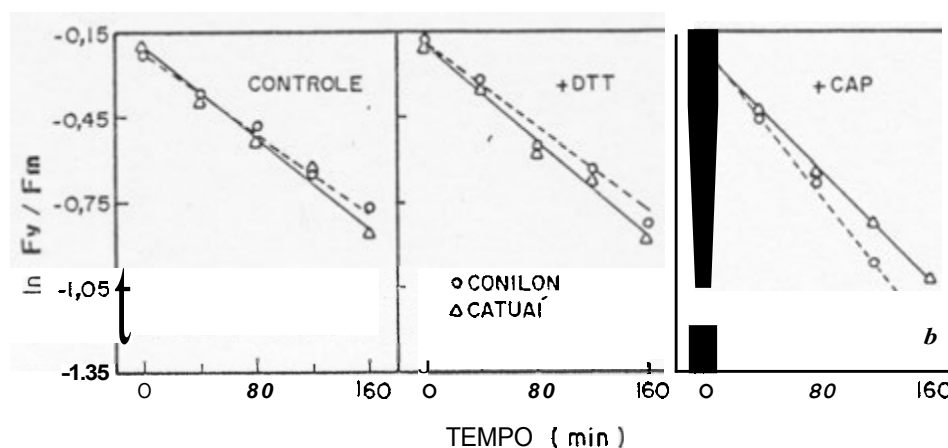


FIGURA 1- Fotoinibição do FSI, Avaliada pelo Decréscimo de \ln (Eficiência Fotoquímica do FSI) de Discos Foliares de Dois Cultivares de Cafeeiros, Flutuando em Água ou em Solução de Cloranfenicol (CAP) ou Ditiotreitól (DTT). A Fotoinibição Foi Conduzida a 22°C, sob 1,6mmol de Fótons $m^{-2} s^{-1}$. Cada Símbolo É Média de Seis Repetições. Erro Padrão Não Excedeu a 5% do Valor da Média.

Ditiotreitól não alterou a extensão da fotoinibição, mas, em presença de CAP, a fotoinibição foi inequivocamente incrementada, tanto em Conilon como em Catuaí, com maior sensibilidade de Conilon (Fig. 1). Nesse cultivar, a constante de taxa de declínio de F_v/F_m de discos foliares tratados com CAP, dada pela declividade da curva $\ln F_v/F_m$ x tempo de fotoinibição, foi 92% superior à dos discos-controle, contra 47% observados em Catuaí. Essa disparidade pode ser resultante da melhor conexão entre centros de reação do FSI fotoinibidos e centros funcionais adjacentes em Catuaí (ÖQUIST et al., 1992), como consequência do maior empilhamento dos grana de seus cloroplastos (ADAMSON et al., 1991). Nesse contexto, maior concentração de clorofila b reflete maior conexão entre centros de reação do FSI (LEVERENZ et al., 1992) e, de fato, a concentração de clorofila b, em Catuaí, foi 59% superior à de Conilon (dados não mostrados). Alternativamente, a intensificação da fotoinibição

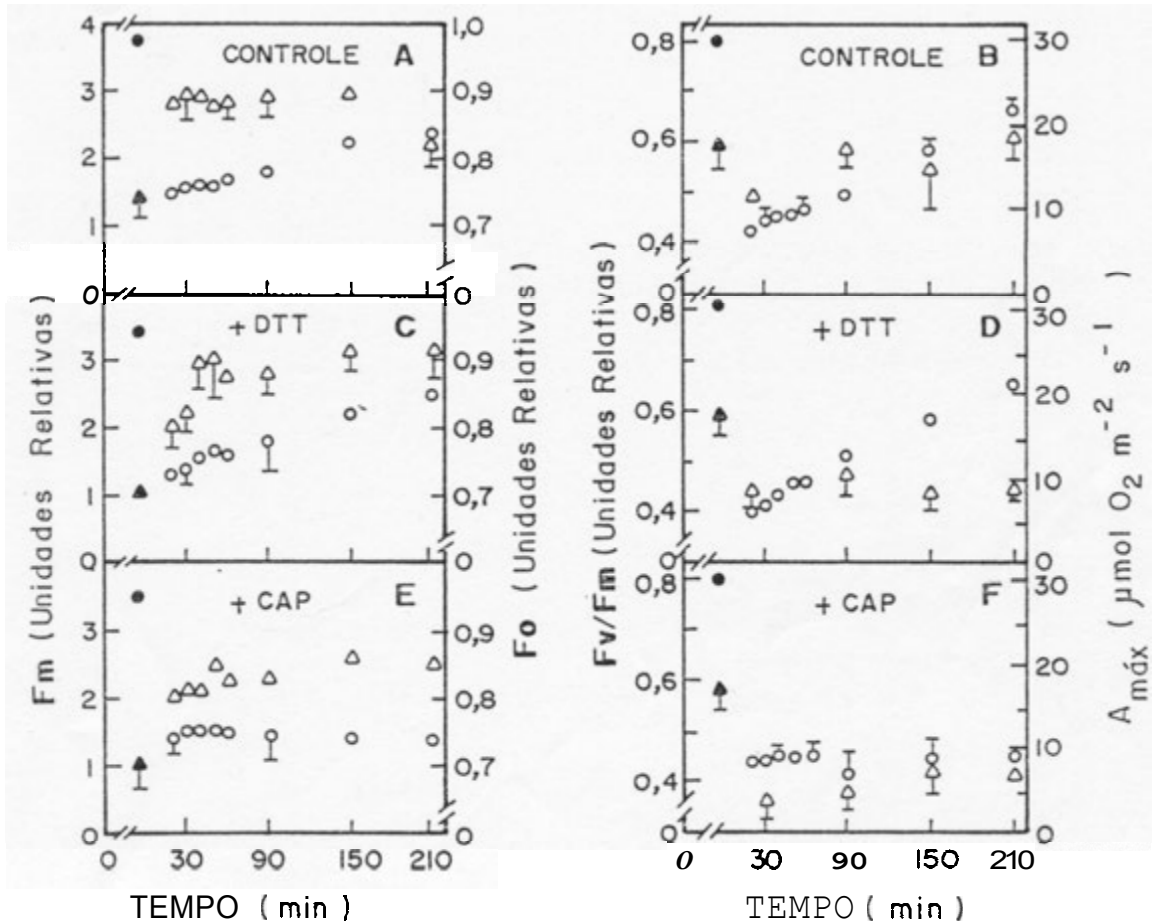


FIGURA 2- *Esquerda*, Variações de Fluorescências Inicial, F_o (A) e Máxima, F_m (o); *Direita*, Razão de Fluorescência Variável/Máxima, F_v/F_m (o) e Evolução de Oxigênio Fotossintético, $A_{m\acute{a}x}$ (A) Medidas em Discos Foliares do Cafeeiro Catuaí (A e B, Discos-Controles; C e D, Discos Tratados com Ditioneitol; E e F, Discos Tratados com Cloranfenicol), Durante Recuperação da Fotoinibição, sob $40\mu\text{mol}$ de Fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a 22°C . Cada Símbolo É Média de Seis Repetições, e Barras Indicam Erro Padrão; Quando Não Mostrado, Erro Padrão Foi Menor que Tamanho dos Símbolos. Símbolos Cheios à Esquerda de Cada Figura Indicam Valores dos Parâmetros Avaliados Anteriores à Fotoinibição.

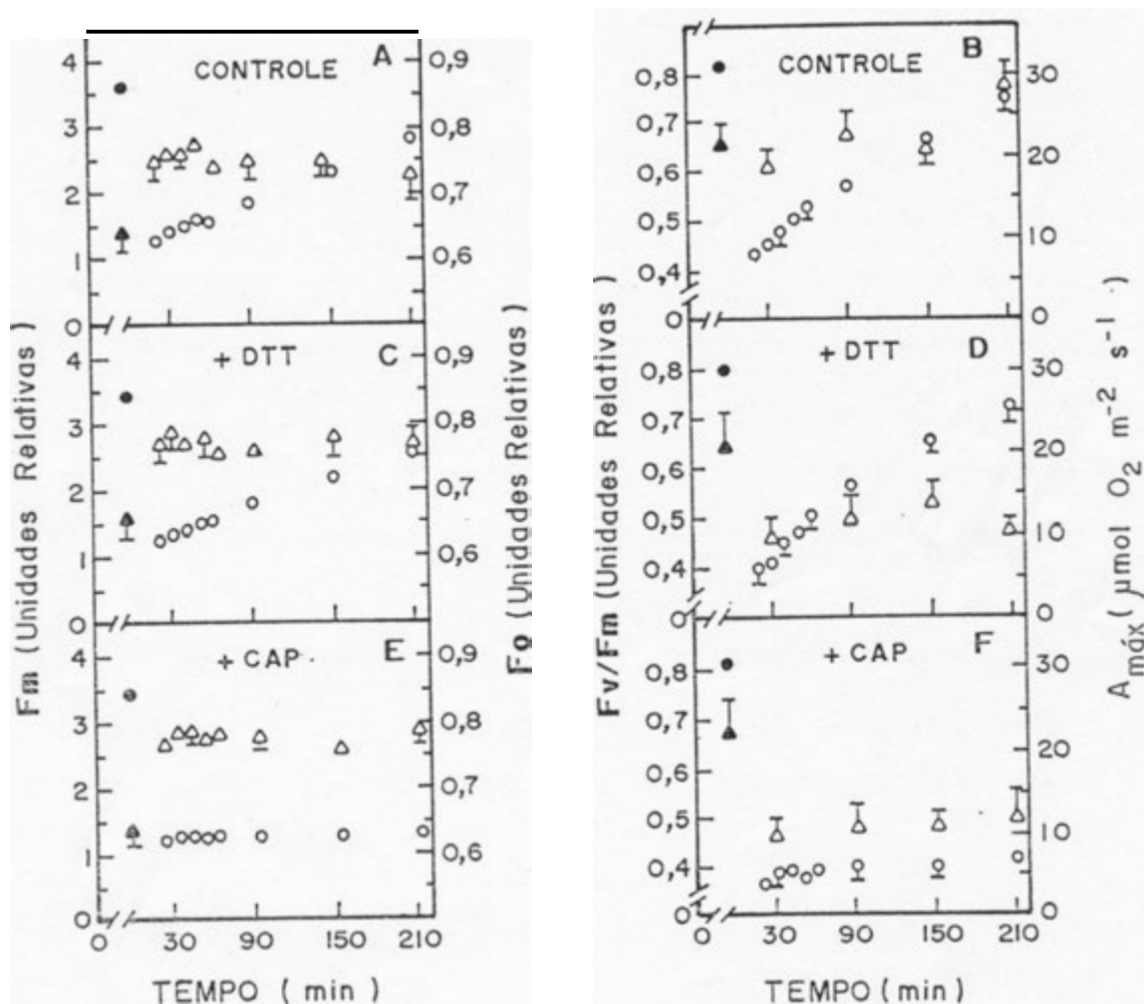


FIGURA 3- *Esquerda*, Variações de Fluorescências Inicial, F_o (A) e Máxima, F_m (o); *Direita*, Razão de Fluorescência Variável/Máxima, F_v/F_m (o) e Evolução de Oxigênio Fotossintético, $A_{máx}$ (A), Medidas em Discos Foliare do Cafeeiro Codon, Durante a Recuperação da Fotoinibição. Ver Legenda da Fig. 2 para Demais Detalhes.

por CAP pode indicar um balanço entre inativação e concomitante reativação do FSII, através do giro da proteína D1 (LEITSCH et al., 1994; SCHNETTGER et al., 1994; TYYSTJÄRVI et al., 1992).

As Figuras 2A e 3A indicam incrementos de F_o da ordem de 19% e 16%, em discos foliares de Catuaí e Conilon, respectivamente, após 2h de fotoinibição. Os incrementos de F_o foram pequenos mas significativos, mantendo-se ao longo da fase de recuperação, e podem ser tomados como indicativo de dano fotoinibitório (KRAUSE, 1988), caracterizado por destruição e, ou, inativação de centros de reação do FSII, ou por redução de transferência de energia de excitação das antenas aos centros de reação (SOMERSALO e KRAUSE, 1990), provavelmente como consequência de a taxa de destruição de D1 exceder à sua taxa de substituição em centros de reação do FSII fotodanificados (GREER et al., 1986; KRAUSE, 1988). Por outro lado, tanto Conilon, como Catuaí mostraram reduções da ordem de 63% de F_m (Figs. 2A e 3A). As variações de F_o e de F_m concorreram, portanto, para reduzir a eficiência fotoquímica do FSII, em tomo de 50% nos dois cultivares. Após 210min de recuperação, sob $40\mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, F_v/F_m alcançou valores próximos a 82% e 93% em relação aos discos-controles de Catuaí e Conilon, respectivamente (Figs. 2B e 3B). Nesse período, o restabelecimento de F_v/F_m foi devido exclusivamente a ganhos de F_m , visto que F_o se manteve constante.

O restabelecimento de F_v/F_m após fotoinibição parece ser bifásico (BOESE e HUNER, 1992; HURRY e HUNER, 1992; KRAUSE e WEIS, 1991; LEITCSH et al., 1994; SCHNETTGER et al., 1992), com fase inicial rápida (20-60min) e uma segunda, lenta, requerendo várias horas para completa reativação do FSII (HURRY e HUNER, 1992; LEITSCH et al., 1994). No entanto, nenhuma separação de fases foi observada na recuperação de F_v/F_m em cafeeiros, como mostra a Fig. 4, em que pode-se observar uma tendência de cinética de primeira

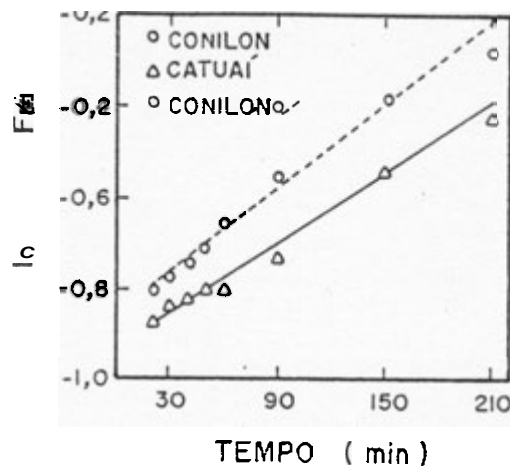


FIGURA 4- Recuperação da Fotoinibição do FSI, Avaliada por ln (Eficiência Fotoquímica do FSI, F_v/F_m) de Discos Foliares de Cafeeiros Catuai e Conilon. A Recuperação da Fotoinibição Foi Conduzida a 22°C, sob $40\mu\text{mol}$ de Fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Cada Símbolo É Média de Seis Repetições. Erro Padrão Não Excedeu a 4% do Valor da Média.

ordem, ao invés de dois processos distintos que seriam caracterizados por duas fases exponenciais separadas, cada qual seguindo uma cinética de primeira ordem. Para avaliar essa hipótese, foi utilizado DTT para inibir a extinção não-fotoquímica associada à desepoxidação da violaxantina (BILGER et al., 1989), que caracteriza, em grande parte, a fase inicial rápida (ADAMS e DEMMIG-ADAMS, 1993, DEMMIG-ADAMS e ADAMS, 1992), e CAP, como inibidor da síntese da proteína D1, necessária para o funcionamento do ciclo de reparo do FSI e associada à fase lenta de restabelecimento de F_v/F_m (ARO et al., 1994; CRITCHLEY e RUSSEL, 1994; SCHNETTGER et al., 1992).

Ditiotreitol não promoveu, essencialmente, quaisquer alterações de F_o , F_m e F_v/F_m durante a fotoinibição nem tampouco no seu restabelecimento (Figs. 2C,D e 3C,D). ÖQUIST et al. (1992) também não observaram efeitos de DTT sobre o declínio de F_v/F_m em *Tradescantia* submetida a $1,7\text{mmol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por 4h, mas isso pode ter sido consequência de sua baixa irradiância de crescimento (OSMOND et al., 1993). Não obstante, é possível que a recuperação

de F_v/F_m mediada por formação de zeaxantina, em cafeeiros, pode ter sido demasiadamente rápida, em tempo inferior aos 20min requeridos para o relaxamento dos sinais de fluorescência e, ou, alternativamente, cafeeiros podem carecer de um estoque significativo de xantofilas para mediar a extinção não-fotoquímica na fase rápida de restabelecimento da atividade do FSII, na medida em que, zeaxantina, *per se*, apresenta eficiência de extinção relativamente baixa, menor que 10% (OWENS, 1994). Por outro lado, extinção não-fotoquímica mediada por formação de zeaxantina ainda é pouco compreendida (DEMMIG-ADAMS e ADAMS, 1992; HORTON et al., 1994; OSMOND, 1994), e muitas conclusões nesse sentido foram extraídas via inibição de sua síntese por DTT, pressupondo inexistência de efeitos laterais desse inibidor sobre outros processos da fotossíntese, conforme demonstrado por BILGER e BJÖRKMAN (1990). Isso, claramente, não ocorreu neste experimento, na medida em que DTT inibiu a evolução de oxigênio fotossintético, mas não F_v/F_m , durante o restabelecimento da fotoinibição (Figs. 2D e 3D). Ademais, DEMMIG-ADAMS e ADAMS (1992) relataram que folhas que se desenvolvem em campo, a pleno sol (como as deste ensaio), somente tornam-se sensíveis a CAP quando pré-tratadas com DTT, indicando que os centros de reação do FSII estão normalmente protegidos do excesso de energia, por meio de incrementos de dissipação de energia térmica, associados com decréscimo do estado de epoxidação de intermediários do ciclo da xantofila. Isso não foi observado e mesmo quando discos foliares de cafeeiros absorveram CAP e DTT concomitantemente, o comportamento de F_v/F_m foi similar ao apresentado por discos tratados apenas com CAP (resultados não mostrados), a exemplo de GREER et al. (1993) trabalhando com *kiwi*.

Cloranfenicol inibiu completamente, por 210min no mínimo, a recuperação de F_v/F_m de discos foliares de cafeeiros previamente fotoinibidos, com perda de 50% de eficiência do FSII, conforme mostram as Figs. 2F e 3F. Estes resultados são consistentes com aqueles observados em ervilha com outros inibidores (ARO

et al., 1994) e na microalga *Ulva rotundata* (FRANKLIN et al., 1992), mas diferem profundamente dos dados obtidos em espinafre (LEITSCH et al., 1994), feijão (GREER et al., 1986), *kiwi* (GREER et al., 1993) e trigo (HURRY e HUNER, 1992). Nesses, foi observada recuperação substancial de F_v/F_m , mas em extensão inferior à das plantas-controles, provavelmente em consequência de inativação, degradação ou mesmo transporte para fora das folhas do inibidor utilizado (GREER et al., 1993).

O completo bloqueio da recuperação de F_v/F_m mediado por *CAP* e a ineficácia de DTT em inibir o início do restabelecimento da eficiência fotoquímica do FSII após fotoinibição, tal como observado sob as condições deste experimento, reforçam os dados apresentados na Fig. 4, ou seja, a reversão da fotoinibição, em cafeeiros, não é um processo bifásico. Resultados discordantes foram observados por HURRY e HUNER (1992) em folhas de trigo tratadas com *CAP*. Eles observaram um componente rápido e reversível no restabelecimento da fotoinibição, caracterizado por forte relaxamento da extinção de F_v e presumivelmente insensível à síntese de proteínas do cloroplasto. Uma vez que a recuperação de F_v/F_m (após 30min de adaptação à obscuridade) ocorreu a 3, 5 e 20°C, eles sugeriram que esse componente não está, provavelmente, associado à interconversão violaxantina-ateraxantina, que ocorre a taxas muito pequenas sob baixas temperaturas. HURRY e HUNER (1992), seguindo um modelo proposto por OHAD et al. (1990), sugeriram que a fase de rápida recuperação da fotoinibição envolve mudanças conformacionais reversíveis de DI mediadas por luz, permitindo aos centros de reação do FSII sofrerem reações fotoquímicas primárias, mas desestabilizando o acceptor $Q^{\cdot b}$ e inibindo o transporte de elétrons até a plastoquinona. Resta demonstrar a significância e a extensão desse mecanismo, na medida em que, no cafeeiro, nenhuma fase rápida de recuperação pôde ser observada e, complementarmente, recuperação como um todo foi claramente bloqueada por *CAP*.

Cloranfenicol reduziu drasticamente a evolução de oxigênio fotossintético e inibiu sua total recuperação no período de restabelecimento da fotoinibição (Figs. 2F e 3F), especialmente em Catuaí, mesmo quando discos foram submetidos a $40\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, por 0,5h, sem, contudo, danos aparentes sobre F_v/F_m daquele cultivar. GREER et al. (1993) e SCHNETTGER et al. (1994) também observaram resultados semelhantes em *kiwi* e em espinafre, respectivamente. Esses efeitos são consistentes com o forte poder oxidante desse inibidor, atuando possivelmente como aceptor de elétrons do FSI e, portanto, influenciando o nível de fotoinibição do FSII (OKADA et al., 1991). Ditiotreitól também inibiu fortemente a evolução de oxigênio fotossintético (Figs. 2D e 3D), mas desconhecem-se as causas dessa inibição.

Claramente, redução da eficiência fotoquímica do FSII após fotoinibição e durante seu restabelecimento, não limitou a capacidade fotossintética **máxima** de Conilon, reduzindo-a ligeiramente em Catuaí, porém com pronta recuperação após 90min do fim de sua exposição a alta irradiância (Figs. 2B e 3B). Estes resultados são consistentes com as observações de ANDERSON et al. (1993). Segundo eles, pouco mais de 40% de centros funcionais do FSII em folhas fotoinibidas pode prover a mesma capacidade fotossintética máxima de 100% de centros funcionais em plantas não inibidas. Analisados concomitantemente, esses dados sugerem que a fotoinibição não é, necessariamente, um fenômeno destrutivo, mas pode representar uma estratégia de aclimatação do FSII, traduzindo-se em proteção contra níveis de luz potencialmente injuriosos.

Em resumo, tanto fotoinibição assim como sua reversão, nos cultivares de cafeeiros aqui investigados, tendem a seguir uma cinética de primeira ordem, sendo profundamente afetadas por *CAP* e, à primeira vista, insensíveis a DTT. Na medida em que Conilon mostrou maiores taxas de restabelecimento da eficiência fotoquímica do FSII, após 2h de fotoinibição, sugere-se que ele tenha um ciclo de reparo do FSII mais ativo do que Catuaí. Visto que a redução da

atividade do FSII não limitou a evolução de oxigênio fotossintético, os presentes resultados indicam que fotoinibição, *per se*, não deve resultar em reduções substanciais na produtividade de cafeeiros cultivados em campo. Isso pode explicar o sucesso do cultivo de variedades comerciais a pleno sol, a despeito das características de sombra observadas em *Coffea*.

CAPÍTULO 2

PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS RELACIONADOS COM A TEMPERATURA

1- INTRODUÇÃO

Há fortes evidências demonstrando maior sensibilidade de *Coffea canephora* a frio e, ao contrário, de *C. arabica* a altas temperaturas (JOUVE et al., 1993; RENA et al., 1994), de sorte que, no sudeste do Brasil, o primeiro é cultivado em regiões com temperaturas médias entre 22-27°C, enquanto *C. arabica* suporta temperaturas mais baixas, com médias entre 17-23°C (INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ, 1985).

Extremos de temperatura afetam largamente a fotossíntese em cafeeiros (BAUER et al., 1985; RENA et al., 1994). Em *C. arabica*, baixas temperaturas induzem fortes decréscimos nas taxas fotossintéticas, principalmente em virtude da redução da eficiência de carboxilação (BAUER et al., 1985), enquanto temperaturas elevadas, acima de 24°C, promovem reduções não somente na fotossíntese, mas também na condutância foliar, em consequência,

principalmente, do possível aumento da resistência mesofílica (KUMAR e TIESZEN, 1980). Apesar dessas considerações em *C. arabica*, muito poucas informações associam o desempenho da fotossíntese de *C. canephora* à temperatura.

Extremos de temperatura podem, ainda, acarretar danos fotoinibitórios à maquinaria fotossintética, que podem ser incrementados quando o nível de irradiância excede àquele necessário para saturar a fotossíntese (BARBER e ANDERSSON, 1992). Nesse contexto, fotoinibição se manifesta por redução da eficiência fotoquímica do fotossistema II (FSII) e, frequentemente, por decréscimos das taxas de fotossíntese (KRAUSE, 1988; KRAUSE e WEIS, 1991).

Virtualmente, muito poucos trabalhos exploraram, comparativamente, respostas fotossintéticas de *C. canephora* e de *C. arabica* à temperatura, sob mesmas condições. Pretendeu-se, então, avaliar o desempenho fotossintético e o acúmulo de alguns marcadores bioquímicos de sensibilidade a frio/calor naquelas espécies, em períodos de baixas e altas temperaturas (inverno e verão, respectivamente).

2- MATERIAL E MÉTODOS

Coffea arabica L. cv Catuaí Vermelho (linhagem LCH 2077-2-5-44) e *C. canephora* Pierre cv Conillon (clone Emcapa 13), plantados no verão de 1994, foram cultivados em vasos com 0,006 m³ de solo, sob cobertura plástica (irradiância máxima de 0,7mmol de fótons m⁻² s⁻¹), em Viçosa, MG (altitude 650m, latitude 20,45°S).

Os parâmetros fisiológicos e bioquímicos foram estimados de folhas do 3º par, a partir do ápice, no inverno de 1994 e no verão de 1995, épocas em que as temperaturas médias diária/noturna foram, respectivamente, 19,4/13,9°C e 23,5/19,9°C.

A condutância estomática ao vapor d'água (g_s), a taxa de transpiração (E), a concentração de CO₂ da superfície foliar evaporante (C_{se}) e a fotossíntese líquida (A) foram medidas em sistema aberto, sob luz saturante, por volta de 09:00h, com um analisador de gases a infravermelho portátil (Analytical Development Company, Kings Lynn, Reino Unido). Previamente, as plantas foram submetidas à irradiância de 0,30-0,35mmol de fótons m⁻² s⁻¹, por 1h e, em seguida, a 0,85-0,90 mmol de fótons m⁻² s⁻¹ durante as medições dos parâmetros

supracitados. A umidade relativa do ar foi, aproximadamente, 80%, e a temperatura foliar variou de 22-24°C. A fotossíntese líquida máxima ($A_{\text{máx}}$) e a cinética de indução de fluorescência rápida foram medidas conforme descrito no Capítulo 1 (Material e Métodos).

Paralelamente, folhas intactas foram encobertas com papel-alumínio de dupla face, por 96h, com o objetivo de reduzir a concentração do amido armazenado, sendo que, nas últimas 12h, essas folhas foram destacadas das plantas e acondicionadas numa câmara úmida, com pecíolos imersos em água, e incubadas a 4, 8, 20 e 32°C, à noite, medindo-se, então, a emissão de fluorescência, $A_{\text{máx}}$ e a concentração de amido. Procedimento idêntico foi aplicado a folhas não encapadas com papel-alumínio.

As análises bioquímicas envolveram determinações das concentrações foliares de clorofilas totais, extraídas em acetona 80% e quantificadas de acordo com os comprimentos de onda e coeficientes de extinção propostos por LICHTENTHALER (1987). Adicionalmente, foram quantificados amido (McCREADY et al., 1950, modificado por AMARAL, 1991), prolina livre (BATES et al., 1973) e ascorbato (SCHÖNER e KRAUSE, 1990). A peroxidação de lipídios foi estimada pela produção de malondialdeído (MDA), conforme HENDRY et al. (1993).

A fotoinibição foi estudada em discos de 1000mm², flutuando em água, sob 1,6mmol de fótons m⁻² s⁻¹, por 2h, a 22°C. A recuperação dos discos foliares fotoinibidos foi acompanhada por 3,5h, a 22°C, sob irradiância de 40μmol de fótons m⁻² s⁻¹, avaliando-se a emissão de fluorescência e $A_{\text{máx}}$ (para maiores detalhes, ver Capítulo 1, Material e Métodos).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Quadro 1 mostra o desempenho fotossintético de Codon e de Catuaí, avaliado em folhas completamente expandidas, no inverno e no verão. Inequivocamente, a aclimação a baixas temperaturas no inverno reduziu fortemente a capacidade fotossintética dos dois cultivares, com declínio muito mais pronunciado em Catuaí. Paralelamente, foram observados decréscimos em g_s e incrementos em C_{se} nesse cultivar, mas não em Codon, em razão de essas variáveis não mostrarem, significativamente, quaisquer variações sazonais.

Tomando-se os parâmetros medidos no verão (Quadro 1) como um controle, pode-se observar que a redução drástica de A , em Catuaí, foi acompanhada por incrementos de **34%** em C_{se} e, em adição, $A_{máx}$ (medida sob concentração de CO_2 saturante e, portanto, sem efeitos de limitações estomáticas), foi reduzida em **53%**. Estes resultados sugerem fortemente que os decréscimos das taxas fotossintéticas em Catuaí, no inverno, devem ser essencialmente governados por fatores não-estomáticos. Quanto a Codon, conclusões nesse sentido são mais inequívocas, uma vez que reduções de **43** e **40%** em A e em $A_{máx}$, respectivamente, não estiveram estatisticamente

associadas a quaisquer variações de g_s e de C_{se} . Resultados ligeiramente diferentes foram observados por BAUER et al. (1985) em *C. arabica*. Eles deduziram, a partir da resposta de A à concentração intracelular de CO_2 , que fechamento estomático foi responsável por 25% da redução de A , atribuindo a fatores não-estomáticos a contribuição dos 75% restantes.

Aclimação a baixas temperaturas resultou em decréscimos da eficiência fotoquímica do FSII (avaliada por F_v/F_m , conforme KRAUSE, 1988) e da razão entre energia interceptada e fluxo de elétrons pós-plastoquinona (avaliada por F_m/F_o , conforme HORTON e BOWYER, 1990), especialmente em Catuaí (Quadro 2). Esses parâmetros foram reduzidos, respectivamente, em 21 e 45% nesse cultivar, e em 6 e 20% em Conilon, sugerindo inibição da atividade da reação de Hill (HETHERINGTON et al., 1989) e, portanto, redução do transporte linear de elétrons através do FSII (KRAUSE e WEIS, 1991), provavelmente como uma consequência, e não uma causa, do declínio das taxas fotossintéticas, conforme se evidenciará mais à frente. Em adição, extinção de F_m , sem variações substanciais de F_o , indica que parte de unidades do FSII se torna fotoquimicamente inativa e convertida a extintores, dissipando energia de excitação em calor, suportando a hipótese de que, no estado fotoinibido, duas populações de centros de reação do FSII estão presentes, centros ativos e centros completamente inativos (van WIJK e KRAUSE, 1991).

Em virtude da maior sensibilidade da fotossíntese de Catuaí a baixas temperaturas, em relação a Conilon, foram investigados alguns parâmetros bioquímicos que poderiam influenciar a susceptibilidade diferencial do aparelho fotossintético desses cultivares no inverno. Nesse contexto, acúmulo de poder redutor, decorrente da capacidade fotossintética reduzida, pode ser utilizado parcialmente para reduzir oxigênio molecular, levando à formação de compostos altamente reativos (BADIANI et al., 1993), os quais podem fotooxidar pigmentos

QUADRO 1- Condutância Estomática ao Vapor d'Água (g_s), Concentração de CO_2 da Superfície Foliar Evaporante (C_{se}), Assimilação Líquida de CO_2 (A) e Evolução de O_2 Fotossintético, Medida sob Luz e CO_2 Saturante ($A_{máx}$), de Dois Cultivares de Cafeeiros, Medidas no Inverno de 1994 e no Verão de 1995, em Viçosa (MG). Valores São Médias de Seis Repetições. Números entre Parênteses Indicam Erro Padrão da Média

	INVERNO		VERÃO	
	CATUAI	CONILON	CATUAÍ	CONILON
$g_s, \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	0,01 (0,00)	0,05 (0,01)	0,04 (0,01)	0,07 (0,02)
$C_{se}, \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$	354 (16)	261 (10)	264 (15)	244 (15)
$A, \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$	0,02 (0,25)	2,8 (0,8)	2,8 (0,6)	49 (0,6)
$A_{máx}, \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$	11,0 (1,9)	17,6 (2,2)	23,6 (3,8)	29,5 (4,9)

QUADRO 2- Fluorescências Inicial (F_o) e Máxima (F_m) e Razões de Fluorescência Variável/Máxima (F_v/F_m) e Máxima/Mínima (F_m/F_o), de Dois Cultivares de Cafeeiros, Medidas no Inverno de 1994 e no Verão de 1995, em Viçosa (MG). Valores São Médias de Seis Repetições. Números entre Parênteses Indicam Erro Padrão da Média.

	INVERNO		VERÃO	
	CATUAÍ	CONILON	CATUAÍ	CONILON
F_o	776 (23)	686 (26)	707 (13)	640 (41)
F_m	2255 (264)	3086 (209)	3715 (176)	3634 (81)
F_v/F_m	0,65 (0,05)	0,79 (0,01)	0,82 (0,00)	0,83 (0,01)
F_m/F_o	2,90 (0,14)	4,53 (0,06)	5,25 (0,09)	5,69 (0,08)

QUADRO 3- Concentrações Foliaves de Prolina, Ascorbato, Malondialdeído (MDA), Amido e Clorofilas (a+b), de Dois Cultivares de Cafeeiros, Medidas no Inverno de 1994 e no Verão de 1995, em Viçosa (MG). Valores São Médias de Seis Repetições. Números entre Parênteses Indicam Erro Padrão da Média.

	INVERNO		VERÃO	
	CATUAÍ	CONILON	CATUAÍ	CONILON
Prolina, $\mu\text{mol g(MS)}^{-1}$	5,65 (0,9)	8,24 (1,3)	2,15 (0,28)	2,27 (0,21)
Ascorbato, $\mu\text{mol g(MS)}^{-1}$	14,11 (2,78)	26,94 (5,10)	9,43 (2,23)	8,65 (1,04)
MDA, nmol g(MS)^{-1}	95,9 (12,6)	36,9 (4,9)	31,3 (4,7)	28,4 (4,2)
Amido, mg g(MS)^{-1}	97,6 (10,4)	57,4 (7,0)	24,7 (2,2)	26,2 (3,1)
Clorofilas, g m^{-2}	0,55 (0,08)	0,57 (0,05)	0,53 (0,05)	0,53 (0,06)

e lipídios de membranas (ANDERSSON et al., 1992; JAHNKE et al., 1991). No entanto, como mostra o Quadro 3, a concentração de clorofilas foi semelhante nas duas épocas de análise, tanto em Catuaí como em Conilon e, portanto, não explicaria as diferenças observadas nas taxas fotossintéticas e na emissão de fluorescência desses cultivares. Por outro lado, em Catuaí, foram observados altos níveis de MDA no inverno, refletindo peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados, alterando, pois, a estrutura de membranas celulares via aumentos de sua rigidez e, portanto, incrementando sua susceptibilidade a baixas temperaturas (HEATH e PACKER, 1968). Em Conilon, porém, não foram verificados incrementos na peroxidação de lipídeos no inverno, em relação ao verão, talvez pelo fato de esse cultivar possuir um sistema anti-oxidante mais eficiente do que Catuaí. Nesse respeito, incrementos observados de concentração de ascorbato, em Conilon, podem ter exercido papel de destaque, na medida em que ele toma parte em vários mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos de varredura de radicais livres, removendo peróxidos, extinguindo oxigênio singlete

e protegendo grupos tiol da oxidação (FOYER et al., 1990; SCHÖNER e KRAUSE, 1990). Em Catuaí, não houve alterações de concentração desse soluto, medidas no inverno e no verão. SCHÖNER e KRAUSE (1990) postularam, embora não conclusivamente, que desenvolvimento de tolerância a baixas temperaturas está diretamente associado a incrementos da concentração total de ascorbato do tecido foliar. Em adição, oxidação e perda do estoque de ascorbato, de acordo com WISE e NAYLOR (1987), podem ser consideradas como indicador fisiológico de severo estresse, resultante de um precário sistema de defesa contra danos oxidativos.

Quanto a prolina, foram observados incrementos de sua concentração da ordem de 161 e 236% em Catuaí e em Conilon, respectivamente, como resposta à aclimação ao frio (Quadro 3). *Alguns* fenômenos são normalmente associados a esse acúmulo, como estabilização de proteínas, manutenção da atividade enzimática (ITAI e PALEG, 1982) e estabilização de membranas (HEBER et al., 1973). Portanto, acúmulos de prolina e de ascorbato podem ter uma função central na menor sensibilidade de Conilon a baixas temperaturas, com reflexos diretos em melhor desempenho de sua fotossíntese no inverno. Não obstante, os resultados acima são claramente opostos àqueles apresentados por JOUVE et al. (1993). Eles observaram incrementos sustentados dos níveis de prolina em *C. arabica*, mas não em *C. canephora*, em microestacas incubadas a 12°C e, adicionalmente, verificaram aumento de concentração de MDA, não ocorrendo o mesmo em *C. arabica*. Essas discrepâncias devem ser analisadas com cautela, em razão de virtuais variabilidades genéticas e de claras diferenças experimentais entre os dois estudos.

O Quadro 3 mostra, ainda, que a concentração de amido em Catuaí foi 70% superior à de Conilon, no inverno, Quando foram relacionadas concentração de amido e $A_{m\acute{a}x}$, foi obtido alto coeficiente de determinação ($R^2=-0,88$) em

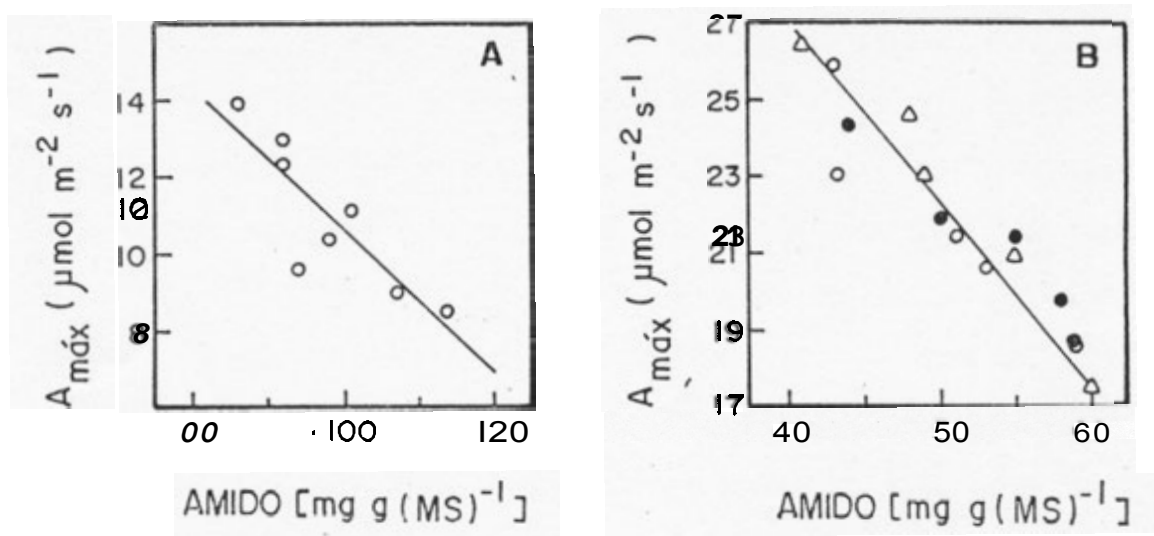


FIGURA 5- Relação entre Evolução de Oxigênio Fotossintético ($A_{m\acute{a}x}$) e Concentração de Amido Foliar, Determinada no Inverno de 1994, em Cafeeiro Catuaí, **A**, Folhas Intactas Não Encobertas com Papel Alumínio; **B**, Folhas Encobertas com Papel Alumínio de Dupla Face, por 96h e Incubadas nas Últimas 12h a 4(●), 8(o) e 20°C(Δ).

Catuaí (Fig. 5A), mas não em Conilon, provavelmente em virtude de seu menor teor de amido foliar. AMARAL (1991) já observara em Catuaí, no campo, em Viçosa (MG), que, no outono, as taxas de crescimento começam a declinar, sendo acompanhadas, *a posteriori*, por redução das taxas fotossintéticas e incrementos de níveis de amido, ocorrendo o oposto no início da primavera. Com o intuito de investigar a dependência da capacidade fotossintética com relação ao amido acumulado e à temperatura, folhas de Conilon e de Catuaí foram encobertas com papel-alumínio de dupla face, por 96h, com incubação, nas últimas 12h, a 4, 8, 20 e 32°C, medindo-se, então, concentração de amido, $A_{m\acute{a}x}$ e emissão de fluorescência, adotando-se igual procedimento em folhas não encapadas com papel-alumínio.

O Quadro 4 mostra efeitos de 12h de incubação de folhas destacadas de Catuaí e de Conilon, a quatro diferentes temperaturas, no inverno e no verão,

sobre a cinética de emissão de fluorescência e de $A_{m\acute{a}x}$. No inverno, a 4°C, esses parâmetros foram semelhantes àqueles de folhas nas plantas, medidos após uma noite de baixas temperaturas (temperatura mínima de 3,9°C, Quadros 1 e 2), ou seja, decréscimos de F_v/F_m (em razão de extinção de F_m) e de $A_{m\acute{a}x}$, com quedas significativamente maiores em Catuaí. Por outro lado, em folhas incubadas a 8, 20 e 32°C, foi observada recuperação de F_m sem variação de F_o e, em conseqüência, restabelecimento de F_v/F_m nos dois cultivares. Esses dados sugerem que a eficiência fotoquímica do FSII é grandemente afetada por baixas temperaturas, uma vez que, sob temperaturas favoráveis, há pronta recuperação de F_m e de F_v/F_m , ainda que fossem observados drásticos declínios de $A_{m\acute{a}x}$, especialmente em Catuaí. Provavelmente, baixas temperaturas positivas inibem a remoção, difusão e reparo de complexos-protéicos de centros de reação do FSII, entre lamelas do estroma e tilacóides dos grana (ARO et al., 1990; CALRBERG et al., 1992; OHAD et al., 1994). Por outro lado, nos dois cultivares, no verão, F_m e F_v/F_m foram virtualmente constantes, não respondendo às temperaturas de incubação, mesmo a 4°C, talvez pelo fato de o tempo de exposição ter sido insuficiente para induzir alterações detectáveis nos sinais de fluorescência. Com relação a $A_{m\acute{a}x}$, seus baixos valores em Catuaí, no inverno, não acompanharam o restabelecimento de F_v/F_m sob temperaturas mais elevadas, enquanto em Conilon, $A_{m\acute{a}x}$ foi decrescida somente quando folhas foram expostas a 32°C. Em ambos os cultivares não foram observados, no verão, efeitos da temperatura de incubação sobre $A_{m\acute{a}x}$.

Folhas encobertas com papel-alumínio exibiram, no inverno, concentração de amido reduzida em, aproximadamente, 50%. Sob condições idênticas às do Quadro 4, pode-se observar, no Quadro 5, que essas folhas mostraram valores de F_v/F_m em torno de 0,80, independentes das temperaturas de incubação e cultivares. Nessa situação, quando F_v/F_m foi desmembrada em seus componentes

QUADRO 4- Fluorescências Inicial (Fo) e Máxima (Fm), Razão de Fluorescência Variável/Máxima (Fv/Fm) e Evolução de O₂ Fotossintético, Medida sob Luz e CO₂ Saturantes ($A_{m\acute{a}x}$, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), de Folhas Destacadas de Dois Cultivares de Cafeeiros, Incubadas por 12h, à Noite, a 4, 8, 20 e 32°C, Medidas no Inverno de 1994 e no Verão de 1995, em Viçosa (MG). Valores São Médias de Seis Repetições. Números entre Parênteses Indicam Erro Padrão da Média.

		INVERNO		VERÃO	
		CATUAÍ	CONILON	CATUAÍ	CONILON
4°C	Fo	801 (32)	650 (58)	748 (43)	657 (36)
	Fm	2310 (127)	3112 (210)	3627 (308)	3323 (139)
	Fv/Fm	0,65 (0,04)	0,79 (0,01)	0,79 (0,01)	0,80 (0,01)
	$A_{m\acute{a}x}$	9,6 (1)	18,0 (2,3)	18,1 (2,2)	24,9 (1,1)
8°C	Fo	774 (17)	675 (26)	720 (50)	628 (42)
	Fm	3253 (210)	3322 (237)	3495 (81)	3476 (146)
	Fv/Fm	0,76 (0,02)	0,80 (0,01)	0,79 (0,01)	0,81 (0,01)
	$A_{m\acute{a}x}$	10,8 (1,3)	20,7 (3,7)	20,5 (2,4)	26,5 (3,1)
20°C	Fo	831 (85)	632 (45)	703 (32)	645 (12)
	Fm	3609 (242)	3257 (204)	3687 (165)	3623 (291)
	Fv/Fm	0,77 (0,03)	0,81 (0,02)	0,81 (0,01)	0,82 (0,01)
	$A_{m\acute{a}x}$	12,5 (3,6)	20,4 (3,4)	21,0 (1,3)	25,5 (2,3)
32°C	Fo	754 (10)	625 (39)	737 (45)	675 (55)
	Fm	3592 (256)	3554 (214)	3622 (123)	3243 (135)
	Fv/Fm	0,79 (0,01)	0,81 (0,00)	0,80 (0,01)	0,80 (0,01)
	$A_{m\acute{a}x}$	13,4 (2,8)	12,9 (1,2)	23,8 (3,2)	24,1 (3,7)

QUADRO 5- Fluorescências Inicial (Fo) e Máxima (Fm), Razão de Fluorescência Variável/Máxima (Fv/Fm) e Evolução de O₂ Fotossintético, Medida sob Luz e CO₂ Saturantes ($A_{m\acute{a}x}$, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), de Folhas de Dois Cultivares de Cafeeiros Encobertas com Papel Alumínio de Dupla Face, por 96h, Sendo que, nas Últimas 12h, as Folhas Foram Destacadas e Incubadas por 12h, à Noite, a 4, 8, 20 e 32°C, Medidas no Inverno de 1994 e no Verão de 1995, em Viçosa (MG). Valores São Médias de Seis Repetições. Números entre Parênteses Indicam Erro Padrão da Média.

		INVERNO		VERÃO	
		CATUAÍ	CONILON	CATUAÍ	CONILON
4°C	Fo	511 (18)	428 (18)	746 (38)	690 (4)
	Fm	2384 (138)	2310 (89)	3393 (237)	3240 (308)
	Fv/Fm	0.79 (0,01)	0.81 (0,01)	0,78 (0,02)	0.79 (0,01)
	$A_{m\acute{a}x}$	21,2 (2.1)	25.4 (0.5)	19.5 (1,9)	23.4 (3,0)
8°C	Fo	501 (54)	402 (8)	727 (69)	628 (29)
	Fm	2442 (181)	2368 (200)	3478 (112)	3316 (121)
	Fv/Fm	0.80 (0.02)	0.83 (0,02)	0,79 (0,00)	0,81 (0,02)
	$A_{m\acute{a}x}$	21.9 (2,7)	24.2 (3,0)	19,6 (3.2)	24,6 (2,2)
20°C	Fo	489 (31)	386 (14)	720 (39)	655 (31)
	Fm	2319 (123)	2387 (91)	3606 (65)	3382 (131)
	Fv/Fm	0,79 (0,01)	0.83 (0,02)	0,80 (0.01)	0.81 (0,01)
	$A_{m\acute{a}x}$	22,4 (3,5)	26.9 (0,6)	20,3 (3,9)	27,8 (3,7)
32°C	Fo	484 (28)	413 (9)	736 (45)	643 (35)
	Fm	2258 (116)	2195 (45)	3622 (122)	3268 (252)
	Fv/Fm	0.79 (0,01)	0.81 (0,00)	0.80 (0.00)	0.80 (0,01)
	$A_{m\acute{a}x}$	9,4 (1,4)	12,9 (1.2)	22,2 (1,60)	21.1 (3.9)

primários, foi observada forte extinção de F_o e de F_m , mas não no verão, quando foram inteiramente similares às folhas-controles não encapadas com papel-alumínio. Uma vez que as reduções de F_o e de F_m , no inverno, não foram acompanhadas por perda de clorofilas (não mostrado), é possível que tenha ocorrido transferência de energia de excitação entre unidades funcionais do FSII e unidades fotoinibidas que formam a população de FSII α (GREER et al., 1991; KRAUSE, 1994; KRAUSE et al., 1990). Paralelamente, a redução de concentração de amido pode ter permitido o restabelecimento da evolução de oxigênio fotossintético, com incrementos de cerca de 100% de $A_{m\acute{a}x}$ em Catuaí e, como em Conilon, a taxas semelhantes às obtidas no verão. Todavia, nos dois cultivares, $A_{m\acute{a}x}$ caiu à metade quando folhas foram incubadas a 32°C, no inverno, provavelmente como conseqüência de decréscimos no estado de ativação de algumas enzimas do ciclo de Calvin (KOBZA e EDWARDS, 1987), ao invés de efeitos sobre a fase fotoquímica da fotossíntese, que se manifestariam por alteração de F_v/F_m . Por outro lado, insensibilidade de $A_{m\acute{a}x}$, no verão, à exposição de folhas a 32°C, mostra aclimatação do aparelho fotossintético de cafeeiros a temperaturas relativamente elevadas, talvez como parte de incrementos na estabilidade térmica de vários componentes do cloroplasto (BERRY e BJÖRKMAN, 1980).

Analisados conjuntamente, os resultados dos Quadros 4 e 5 indicam efeitos sinérgicos entre baixas temperaturas e redução na assimilação do carbono, no controle da eficiência fotoquímica do FSII, cuja diminuição, no inverno, parece uma conseqüência, e não uma causa, da inibição da evolução do oxigênio fotossintético. Em adição, na medida em que a redução substancial da concentração de amido se refletiu em franca recuperação de $A_{m\acute{a}x}$, principalmente em Catuaí ($R^2 = -0,97$, Fig 5B), sugere-se que a inibição da fotossíntese por baixas temperaturas seja altamente controlada pela partição de produtos fotossintéticos em nível de cloroplastos. Nesse contexto, acúmulo de carboidratos pode ser, portanto, a causa primária da forte redução da assimilação

de carbono em Catuaí, com reflexos menores em Conilon, em razão de se ter observado, nesse cultivar, menores teores de amido no inverno. HUANG et al. (1989) também chegaram a conclusões semelhantes, observando alta correlação entre inibição da fotossíntese e diferenças induzidas por frio no conteúdo de carboidratos foliar, em vários cultivares de arroz.

As diferenças exibidas por Conilon e Catuaí, no que diz respeito à aclimação a frio, foram refletidas na sensibilidade à fotoinibição (Fig. 6). Após exposição de discos foliares a $1,6 \text{ mmol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, por 2h, a 23 °C, foi observada, em Catuaí, redução de 48% de F_v/F_m , como consequ\u00eancia do forte decl\u00ednio de F_m (65%) e, em menor propor\u00e7\u00e3o, de F_o (22%), indicando extin\u00e7\u00e3o n\u00e3o-fotoqu\u00edmica nas antenas e, paralelamente, em centros de rea\u00e7\u00e3o inativos do FSII (HAVAUX, 1994; HURRY e HUNER, 1992; KRAUSE e WEIS, 1991). Provavelmente, redu\u00e7\u00e3o de taxas fotossint\u00e9ticas em resposta a baixas temperaturas acarreta incrementos do estoque de quinonas reduzidas (GODDE e HEFER, 1994; KRAUSE, 1994; \u00d6QUIST et al., 1993), as quais, n\u00e3o sendo convenientemente reoxidadas, induzem decr\u00e9scimos na raz\u00e3o plastoqu\u00edno-na/plastoquinol que, por sua vez, reduz, *in vivo*, degrada\u00e7\u00e3o de D1 e o subsequente restabelecimento da atividade do FSII (OHAD et al., 1994). Como consequ\u00eancia, grande propor\u00e7\u00e3o de centros inativos se forma, dissipando energia de excita\u00e7\u00e3o como calor e, portanto, reduzindo danos potenciais provenientes do excesso de luz. A restri\u00e7\u00e3o da atividade do ciclo de reparo do FSII refletiu-se, portanto, em invariabilidade de F_o e em ligeiros incrementos de F_m na fase de restabelecimento da fotoinibi\u00e7\u00e3o, culminando, em \u00faltima inst\u00e2ncia, em lenta recupera\u00e7\u00e3o de F_v/F_m , com constante de taxa de $0,023 \text{ h}^{-1}$. Em Conilon, a fotoinibi\u00e7\u00e3o foi manifestada por decr\u00e9scimos de 45% de F_v/F_m , resultantes de decl\u00ednio de 63% de F_m , sem quaisquer varia\u00e7\u00f5es de F_o . Estabilidade de F_o , nesse caso, sugere dist\u00fabios seletivos nos centros de rea\u00e7\u00e3o do FSII, posto que efeitos sobre as antenas modificariam, simultaneamente, a amplitude de F_m e de F_o

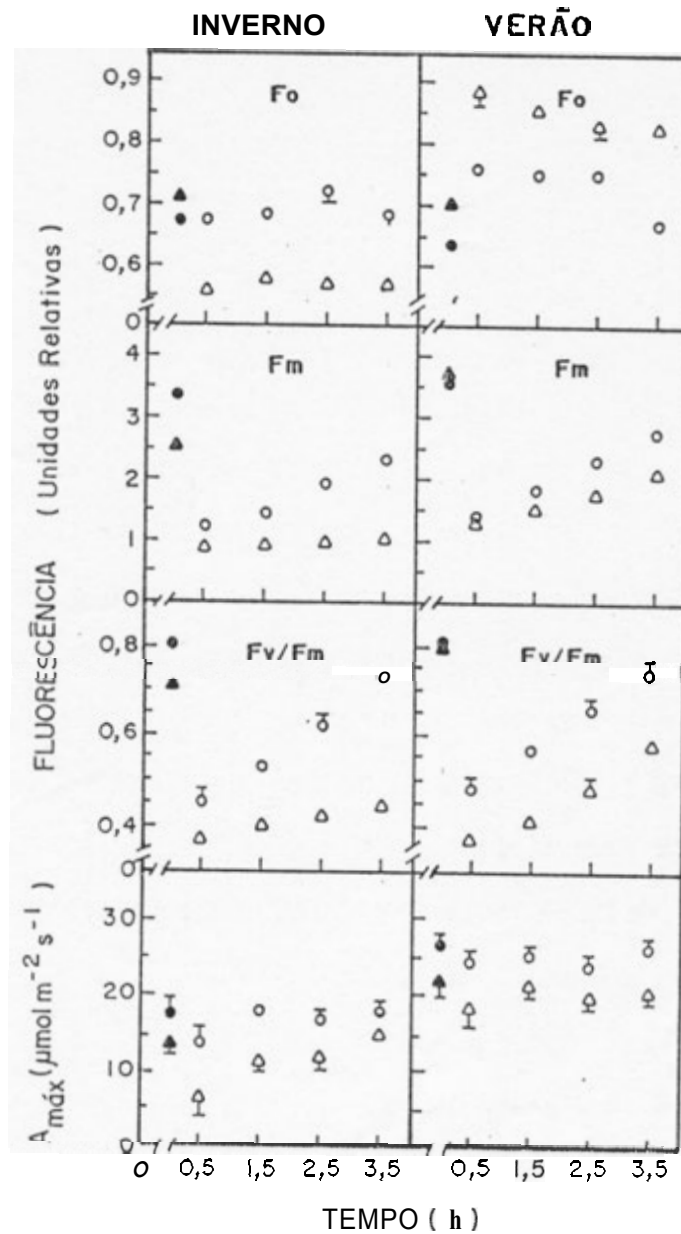


FIGURA 6- Recuperação da Fotoinibição, Avaliada por Variações de Fluorescências Inicial (F_o) e Máxima (F_m), Razão de Fluorescência Variável/Máxima (F_v/F_m) e Evolução de Oxigênio Fotossintético ($A_{m\acute{a}x}$), Medidas em Folhas de Cafeeiros Catuaí (A) e Conilon (o) Desenvolvidas no Inverno e no Verão. Fotoinibição Foi Conduzida a $1,6 \text{ mmol de F\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a 22°C . Subseqüente Restabelecimento Ocorreu sob $40 \mu\text{mol de F\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a 22°C . Cada Símbolo É Média de Cinco Repetições, e Barras Indicam Erro Padrão; Quando Não Mostrado, Erro Padrão Foi Menor que Tamanho dos Símbolos. Símbolos Cheios, à Esquerda de Cada Figura Indicam Valores dos Parâmetros Anteriores à Fotoinibição.

(HAVAUX, 1994; HURRY e HUNER, 1992). Em outras palavras, forte decréscimo de F_m sem alteração de F_o deve ser atribuída a incrementos na dissipação de energia térmica por centros de reação inativos do FSII (SOMERSALO e KRAUSE, 1990; van WIJK e KRAUSE, 1991). Na reversão da fotoinibição, F_v/F_m foi rapidamente restabelecida, em Conilon, à taxa de $0,096h^{-1}$, exclusivamente às expensas de **ganhos** de F_m , indicando um ciclo de reparo do FSII eficiente, além de invariabilidade das constantes de taxas de desexcitação das antenas.

Quando folhas que se desenvolveram a partir do fim da primavera foram fotonibidas no verão, o comportamento de F_o e de F_m foi similar em Conilon e em Catuaí, sendo observados, respectivamente, incrementos de F_o da ordem de 19% e 27%, enquanto F_m foi reduzida em cerca de 61% nos dois cultivares, após 2h de fotoinibição. Variações de F_o e de F_m contribuíram, pois, para reduzir a eficiência fotoquímica do FSII em 44% em Conilon, e em 55% em Catuaí. Maior redução de F_v/F_m nesse cultivar foi decorrência de maiores incrementos de F_o , indicando danos em maior extensão nos centros de reação do FSII, provavelmente porque a taxa de substituição de D1 fotodegradada em Catuaí foi menor do que em Conilon. Por outro lado, comportamento diferencial de F_o no inverno e no verão indica, no primeiro caso, que a degradação de D1 inativa é restringida em resposta à aclimatação a temperaturas relativamente baixas (ANDERSON et al., 1994; TELFER e BARBER, 1994), ocorrendo o oposto no verão. Na fase de recuperação da fotoinibição, o restabelecimento da atividade do FSII foi conseqüência de incrementos sustentados de F_m , enquanto F_o somente foi reduzida a valores estatisticamente similares aos controles após 3,5h do fim do tratamento fotoinibitório, tanto em Conilon quanto em Catuaí. Novamente, Conilon pareceu apresentar maior giro de D1, na medida em que sua constante de taxa de restabelecimento de F_v/F_m foi 34% superior à apresentada por Catuaí.

A Figura 6 mostra, em Catuaí, o restabelecimento diferencial da fotoinibição no inverno e no verão, com constantes de taxas de recuperação de F_v/F_m três vezes maior no verão ($0,067 \text{ h}^{-1}$ contra $0,023 \text{ h}^{-1}$ no inverno). Em Conilon, não houve diferenças desse parâmetro em resposta à aclimação a diferentes temperaturas. Por outro lado, quando folhas desses cultivares foram incubadas por 16h a 4°C , foram observadas, subseqüentemente, diferenças na extensão da fotoinibição de discos foliares submetidos a $1,6 \text{ mmol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, por 2h, a 23°C ou a 1°C , tanto no verão como no inverno (resultados não mostrados). Considerando-se o envolvimento de etapas enzimáticas na fotoinibição e no seu restabelecimento (HANELT e NULTSCH, 1995), os resultados acima sugerem que a alteração na atividade de enzimas pode ser desenvolvida em função da temperatura na qual as folhas crescem e se desenvolvem, mas também é consequência de breve exposição de folhas a baixas temperaturas. Resultados semelhantes foram verificados em espinafre (BOESE e HUNER, 1992), mas diferem das observações feitas em trigo (HURRY e HUNER, 1991), em que a sensibilidade à fotoinibição seria governada apenas pelo regime de temperatura durante o desenvolvimento da folhagem. Em qualquer caso, decréscimos da atividade do FSII podem ser tomados como uma estratégia de proteção contra altas irradiâncias, na medida em que não foram observados efeitos consistentes da redução de F_v/F_m sobre $A_{\text{máx}}$ (Fig. 6), conforme discutido no Capítulo 1.

Os resultados aqui apresentados contradizem, à primeira vista, o conceito estabelecido acerca da menor sensibilidade de Catuaí ao frio, em relação a Conilon, na medida em que este mostrou, *in vivo*, melhor desempenho e maior plasticidade de seu aparelho fotossintético, com respeito à aclimação às temperaturas do inverno e do verão. No entanto, observações de campo indicam que Conilon, quando cultivado em regiões com temperaturas mais amenas, mostra

crescimento vegetativo vigoroso, mas com maturação tardia de frutos e, freqüentemente, produção menor do que os tipos Arábicos, sugerindo diferenças potenciais na partição de fotoassimilados entre fontes e drenos. Nesse contexto, controles internos diferenciais, mediados por hormônios, podem ser mais importantes do que o desempenho fotossintético *per se*, como resposta adaptativa à temperatura.

CAPÍTULO 3

EFEITOS DO DÉFICE HÍDRICO SOBRE O DESEMPENHO FOTOSSINTÉTICO

1- INTRODUÇÃO

A associação entre déficit hídrico e fechamento estomático restringe fortemente a assimilação de carbono. Nesse contexto, o controle estomático tem sido apontado como a fiação principal da limitação total da fotossíntese (CHAVES, 1991; PEREIRA e CHAVES, 1993). Todavia, ajustes internos não-estomáticos, em diferentes níveis, têm sido observados, incluindo redução da atividade de algumas enzimas do ciclo de Calvin (DUA et al., 1994; KICHEVA et al., 1994), inibição do transporte de elétrons fotossintético (GENTY et al., 1987; MASOJÍDEK et al., 1991) e alterações do estoque de carboidratos nas células (QUICK et al., 1992; ZRENNER e STITT, 1991).

Evidências de limitações não-estomáticas da fotossíntese induzidas por déficit hídrico normalmente provêm de análises da relação entre assimilação líquida de CO₂ (**A**) e concentração interna de CO₂ (C_i). Alta C_i, na medida que **A** decresce, com redução da disponibilidade de água, ou quando, nessa condição, **A**

não é restabelecida sob concentração externa elevada de CO_2 têm sido tomadas como evidências diretas de limitações não-estomáticas da fotossíntese (WISE et al., 1992). No entanto, concentrações de até $150 \text{ mmol de } \text{CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, sob condições de seca, podem ser necessárias para superar a barreira difusiva ao CO_2 imposta pelos estômatos e, portanto, algumas medidas da capacidade fotossintética relatadas na literatura podem ter sido obtidas sob concentração não-saturante de CO_2 , traduzindo-se em sobrestimativas de inibições não-estomáticas da fotossíntese, sob disponibilidade hídrica limitada (CHAVES, 1991). De modo semelhante, valores de C_i , derivados de análises de trocas de gases, podem ser sobrestimados, devidos à subestimativa da condutância foliar, em consequência de fechamento não-uniforme dos estômatos, em plantas desidratadas (CHAVES, 1991; DOWNTOWN et al., 1988; MANSFIELD et al., 1990; TERASHIMA et al., 1988), especialmente em folhas heterobáricas, em que a difusão lateral de gases é substancialmente reduzida (CHAVES, 1991; PARKHURST, 1994).

Redução da capacidade fotossintética induzida por seca não é acompanhada, geralmente, por alterações de eficiência fotoquímica do fotossistema II (FSII) (GENTY et al., 1987; HAVAUX, 1992; JEFFERIES, 1994). Não obstante, quando déficit hídrico é combinado com temperaturas elevadas e altas irradiâncias, como freqüentemente ocorre sob condições naturais, as plantas tomam-se mais sensíveis à fotoinibição, posto que, com estômatos fechados, a capacidade para dissipar a energia solar absorvida como calor latente é reduzida (PEREIRA e CHAVES, 1993), podendo resultar, conseqüentemente, em fotodanos e em perda líquida da proteína D1 dos centros de reação do FSII (BAKER, 1994).

Fotoinibição da fotossíntese induzida por déficit hídrico é complexa, não existindo, no presente, uma compreensão clara acoplando essas variáveis. A resposta não é geral entre espécies, de modo que, em várias delas, a fotoinibição é

incrementada quando o suprimento de água é limitante (ARAUS e HOGAN, 1994; BEN et al., 1987; LUDLOW e BJÖRKMAN, 1984; MASOJÍDEK et al., 1991; SHARPE e BOYER, 1986), enquanto noutras, nenhum efeito aditivo é observado (DI MARCO et al., 1988; GENTY et al., 1987; JEFFERIES, 1994). Com efeito, HAVAUX (1992) propôs que deficiência hídrica até poderia aumentar a resistência à fotoinibição, mesmo sob altas temperaturas.

Em cafeeiros, o fechamento estomático tem sido freqüentemente considerado como o indicador primário do déficit hídrico, não sendo acompanhado, efetivamente, por decréscimos nas taxas de transpiração (NUNES, 1976; NUNES e DUARTE, 1969). Nesse contexto, KUMAR e TIESZEN (1980) atribuíram a limitações estomáticas a redução das taxas fotossintéticas observadas, sob condições de seca, concordando com os resultados de MEINZER et al. (1990), que verificaram estreita associação entre A e condutância estomática (g_s), em vários genótipos de cafeeiros sob diferentes conteúdos de água do solo. Não obstante, outros fatores, como redução da condutância mesofílica e eficiência de carboxilação, podem estar mais diretamente associados no controle de A , sob disponibilidade hídrica reduzida (ALMEIDA, 1993; RENA et al., 1994). Todavia, essas relações se mostram fragmentárias e incompletas, podendo ser meramente circunstanciais, pelo menos em parte em virtude de artefatos metodológicos ou imprecisões nos protocolos utilizados.

Neste trabalho, foram avaliadas relações entre *status* hídrico foliar e vários parâmetros fotossintéticos, em um cultivar de *C. arabica* e outro de *C. canephora*, com diferenças potenciais de sensibilidade à seca (DA MATTA et al., 1993, MAESTRI et al., 1995). Contribuições relativas de limitações estomáticas e não-estomáticas da fotossíntese foram abordadas qualitativamente. Paralelamente, foi investigada a sobreposição de déficit hídrico com diferentes temperaturas e irradiância, com relação à extensão da fotoinibição e de seu restabelecimento.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos com mudas de cafeeiros com 14 meses de idade, cultivadas em vasos de 0,006 m³, sob irradiância máxima de 0,7mmol de fótons m⁻² s⁻¹, utilizando-se os cultivares Catuaí Vermelho e Conilon.

Deficiência hídrica foi induzida por suspensão da irrigação, cobrindo-se previamente os vasos com plástico transparente, a fim de reduzir a velocidade de perda de água do solo por evaporação, permitindo, conseqüentemente, um estabelecimento gradual do déficit hídrico. As características fotossintéticas, sempre estimadas de folhas do terceiro par a partir do ápice, foram, então, avaliadas sob déficit hídrico de média e severa intensidade (potencial hídrico de antemanhã, $\Psi_{am} = -1,5 \pm 0,17$ e $-2,7 \pm 0,34$ MPa, respectivamente), sendo necessários, para tanto, 4 e 6d, e 6 e 9d sem irrigação, respectivamente para Conilon e Catuaí. As plantas-controles foram continuamente irrigadas ($\Psi_{am} = -0,23 \pm 0,06$ MPa).

Condutância estomática ao vapor d'água (g_s), taxa de transpiração (E), concentração de CO₂ da superfície foliar evaporante (C_{se}) e assimilação líquida

de CO_2 (A) foram medidas com um analisador de gases a infravermelho, enquanto a cinética de fluorescência rápida foi avaliada com o analisador de eficiência de plantas, sob condições idênticas às mencionadas no Capítulo 2.

Com o objetivo de se determinar uma concentração de CO_2 adequada para superar completamente a limitação difusiva imposta pelos estômatos, em plantas desidratadas, foram testados quatro níveis de CO_2 : 32 mmol mol^{-1} , gerado por $0,2 \text{ mL}$ de tampão carbonato/bicarbonato 1 kmol m^{-3} (quantificado por cromatografia gasosa), e 50, 100 e $150 \text{ mmol mol}^{-1}$, estes derivados de misturas de gases contendo, ainda, 210 mmol de $\text{O}_2 \text{ mol}^{-1}$ e N_2 para balanço (White Martins, SP, Brasil). Máxima evolução de O_2 fotossintético ($A_{\text{máx}}$) foi obtida com 100 mmol de $\text{CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, embora sem diferença significativa ($P < 0,10$) quando medida com 50 mmol de $\text{CO}_2 \text{ mol}^{-1}$. A evolução de oxigênio fotossintético foi reduzida em cerca de 30%, quando determinada sob concentração de CO_2 de 32 e $150 \text{ mmol mol}^{-1}$, no primeiro caso em razão da não saturação da maquinaria fotossintética e, no segundo, provavelmente por acidificação de células foliares (CHAVES, 1991; ÖGREN e EVANS, 1993).

A evolução de O_2 fotossintético foi, portanto, medida à concentração de 100 mmol de $\text{CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, com demais condições idênticas às mencionadas no Capítulo 1. Nesse contexto, o rendimento quântico da fotossíntese (Φ), foi avaliado variando-se a densidade de fluxo de fótons de $14\text{-}1070 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, ao nível de disco foliar, por diferentes combinações de filtros de densidade neutra. Usualmente, sete pontos foram selecionados para estabelecer a declividade inicial da curva de resposta de $A_{\text{máx}}$ x irradiância. O procedimento exato e as equações utilizadas para determinação de Φ foram aqueles citados por DELEU e WALKER (1981).

A fotoinibição foi estudada em discos foliares de 1000 mm^2 , provenientes de plantas irrigadas e sob deficiência hídrica, flutuando em água, sob $1,5 \text{ mmol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a 22 ou a 35°C . A recuperação dos discos fotoinibidos foi

acompanhada durante 3,5h, sob $50\mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a 20 ou a 35°C, medindo-se a emissão de fluorescência e $A_{\text{máx}}$. Não houve diferenças na extensão da fotoinibição e no seu restabelecimento, entre discos flutuando em água ou em solução de polietileno glicol 6000 (42% m/v, potencial osmótico = -2,5MPa).

As concentrações de clorofilas *a* e *b*, extraídas em acetona 80%, foram quantificadas conforme os comprimentos de onda e coeficientes de extinção citados por LICHTENTHALER (1987). Amido e açúcares totais foram determinados segundo McCREADY et al. (1950), modificado por AMARAL (1991).

A densidade estomática (DE) foi medida em impressões da epiderme abaxial, em microscópio, selecionando-se casualmente oito campos na porção mediana da folha, sendo utilizadas cinco folhas para cada cultivar.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desempenho fotossintético de Conilon foi claramente superior ao de Catuaí, quer em plantas irrigadas, quer em plantas sob déficit hídrico, conforme mostra o Quadro 6. Conilon apresentou maior densidade estomática (DE), com prováveis reflexos sobre g_s e A , cerca de 100% superiores em relação a Catuaí, sob hidratação adequada. Apesar de não diferirem quanto a $A_{m\acute{a}x}$, Φ foi 21% maior em Conilon, evidenciando maior potencial produtivo de cultivares de *canephora*, conforme normalmente observado em campo.

Sob deficiência hídrica moderada ($Y_{am} = -1,5\text{MPa}$), g_s foi reduzida em 45% em Conilon e em 75% em Catuaí, sendo acompanhada, nessa ordem, por decréscimos de 51 e 70% em A . Em Conilon, Φ foi reduzido em 24%, paralelamente a uma redução não significativa de 15% em $A_{m\acute{a}x}$. Tomados juntamente, esses dados sugerem que, nesse cultivar, a capacidade de regeneração da ribulose 1,5-bisfosfato, determinada primariamente pela taxa de transporte de elétrons e por processos de fosforilação associados (DI MARCO et al., 1988), é pouco afetada nas fases iniciais da seca. Portanto, a redução observada em A deve

QUADRO 6- Densidade Estomática (DE), Taxa de Transpiração (E), Condutância Estomática ao Vapor d'Água (g_s), Concentração de CO₂ da Superfície Foliar Evaporante (C_{se}), Assimilação Líquida de CO₂ (A), Evolução de O₂ Fotossintético, Medida sob Luz e CO₂ Saturantes ($A_{máx}$) e Rendimento Quântico Aparente da Evolução de O₂ (Φ), de 2 Dois Cultivares de Cafeeiros, Irrigadas e sob Défice Hídrico Moderado e Severo (Respectivamente, $\Psi_{am} = -0,2, -1,5$ e $-2,7$ MPa). Valores São Médias de Seis Repetições. Números entre Parênteses Indicam o Erro Padrão da Média.

CULTIVAR	Ψ_{am} -MPa	DE mm ⁻²	E mol m ⁻² s ⁻¹	g_s mol m ⁻² s ⁻¹	C_{se} μmol mol ⁻¹	A μmol m ⁻² s ⁻¹	$A_{máx}$ μmol m ⁻² s ⁻¹	Φ mol O ₂ mol (fótons) ⁻¹
CATUAÍ	0,2	21 (3)	1,2 (0,3)	0,04 (0,01)	265 (15)	3,0 (0,6)	27,8 (5,6)	0,077 (0,005)
	1,5		0,5 (0,1)	0,01 (0,00)	329 (11)	0,9 (0,2)	12,4 (1,8)	0,037 (0,005)
	2,7		0,4 (0,1)	0,01 (0,00)	349 (16)	-0,3 (0,2)	5,1 (1,3)	0,023 (0,003)
CONILON	0,2	37 (4)	1,8 (0,2)	0,09 (0,01)	264 (15)	5,7 (0,7)	29,8 (3,5)	0,093 (0,007)
	1,5		1,4 (0,3)	0,05 (0,02)	276 (18)	2,8 (0,8)	25,5 (2,9)	0,071 (0,006)
	2,7		1,0 (0,1)	0,04 (0,01)	303 (11)	1,5 (0,4)	17,8 (2,2)	0,054 (0,006)

ser, principalmente, conseqüência de limitações estomáticas, conforme também observado em outras espécies (EASTMAN e CAMM, 1995; FARQUHAR e SHARKEY, 1982; KICHEVA et al., 1994; ÖGREN e ÖQUIST, 1985; RAGGI, 1992). Por outro lado, em Catuaí, decréscimos da ordem de 55% em $A_{\text{máx}}$ e Φ , medidos sob CO₂ saturante e, portanto, sem efeitos de estômatos, provavelmente decorreram de limitações não-estomáticas, permitindo inferir, ainda, baixa tolerância de seu aparelho fotossintético à desidratação foliar.

Com o avanço do déficit hídrico (até $Y_{\text{m}} = -2,7\text{MPa}$), redução em A não foi seguida por concomitante redução em g_s nos dois cultivares, mas incrementos de 15 e 32% em C_{se} foram detectados, em Conilon e Catuaí, respectivamente, possivelmente como resultado de elevação das taxas de fotorrespiração e, ou, de algum dano à maquinaria fotossintética (ARAUS e HOGAN, 1994). Esses resultados sugerem, preliminarmente, que inibição da carboxilação, ao invés de fechamento estomático, foi a principal limitação da fotossíntese. Por outro lado, C_{se} pode ter sido sobrestimada, em razão de provável fechamento desuniforme dos estômatos e, em adição, C_{se} não é, *per se*, uma medida da concentração efetiva de CO₂ nos sítios de carboxilação (PARKHURST, 1994), podendo invalidar, até certo ponto, a conclusão supracitada. Não obstante, decréscimos adicionais de $A_{\text{máx}}$ e Φ substancialmente maiores em Catuaí, foram observados sob CO₂ saturante e portanto sem efeitos de estômatos, devendo-se, pois, fundamentalmente, a efeitos diretos do déficit hídrico sobre reações fotossintéticas, em nível de cloroplasto. É provável que, nessa condição, não somente a capacidade de regeneração da **ribulose-1,5-bisfosfato**, mas também a atividade da Rubisco, sejam profundamente afetadas (KICHEVA et al., 1994). Adicionalmente, as reduções de $A_{\text{máx}}$ e Φ podem ser, pelo menos em parte, resultantes de alterações do gradiente de prótons, causadas por acidificação do

QUADRO 7- Fluorescências Inicial (Fo) e Máxima (Fm) e Razão de Fluorescência Variável/Máxima (Fv/Fm), de Dois Cultivares de Cafeeiros, Irrigados e sob Défice Hídrico Moderado e Severo (Respectivamente, Potencial Hídrico de antemanhã, Yam = -0,2, -1,5 e -2,7 MPa). Valores São Médias de Seis Repetições. Números entre Parênteses Indicam o Erro Padrão da Média.

CULTIVAR	Yam, " P a	Fo	Fm	Fv/Fm
CATUAÍ	0,2	644 (14)	3615 (114)	0,82 (0,01)
	1,5	656 (23)	3743 (187)	0,82 (0,01)
	2.7	718 (46)	3939 (247)	0.82 (0,01)
CONILON	0,2	592 (31)	3389 (227)	0.83 (0,01)
	1,5	616 (44)	3493 (210)	0,82 (0,00)
	2.7	661 (32)	3655 (295)	0,82 (0,01)

estroma induzida por deficiência hídrica (RUBINSTEIN et al., 1992; van RENSBURG e KRÜGER, 1993).

É interessante ressaltar as diferenças exibidas por Conilon e Catuaí, no que diz respeito à velocidade de perda de água. Enquanto no primeiro cultivar, Yam atingiu valores em torno de -2,7MPa, após 6d sem irrigação, essa condição somente foi observada, em Catuaí, após 9d de deficiência hídrica, em razão de sua baixa g_s e de sua menor DE, quando comparada com Conilon. Todavia, menor g_s não se traduziu em maior eficiência instantânea do uso de água (A/E) em Catuaí, provavelmente em razão da sua baixa capacidade mesofílica para assimilar CO_2 . Conilon, por outro lado, maximizou a assimilação de carbono às expensas de conservação de água. Associados ao seu maior potencial de ajustamento osmótico (DA MATTA et al., 1993), maior acúmulo de solutos osmorreguladores (MAESTRI et al., 1995) e sistema radicular mais profundo (INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ, 1985), incrementos em A/E , em Conilon, revestem-se de efeitos positivos óbvios sobre sua produtividade, mesmo sob disponibilidade

hídrica limitada. Em concordância com MEINZER et al. (1990), adaptação diferencial à seca, entre genótipos de cafeeiros, pode, portanto, ser governada pelas taxas de uso de água e, ou, eficiência de extração da água do solo, embora, durante secas prolongadas, maior resistência possa ser conferida pela capacidade de retardar o estabelecimento de défices hídricos foliares severos (JONES, 1993; MEINZER et al., 1990).

Em cafeeiros sob severa desidratação, foram observados incrementos de F_o da ordem de 12%, indicando decréscimos na dissipação não-fotoquímica de energia radiante pelas antenas ou pelos centros de reação do FSII (HAVAUX, 1994). Variações de F_o ocorreram em paralelo com aumentos não significativos de F_m ($R^2=0,84$), concorrendo, pois, para manter inalterada a razão F_v/F_m (Quadro 7). Esses resultados corroboram várias observações de que a eficiência fotoquímica do FSII é francamente tolerante ao déficit hídrico (BENVENISTE-LEVKOVITZ et al., 1993; DI MARCO et al., 1988; EASTMAN e CAMM, 1995; GENTY et al., 1987; HAVAUX, 1992; KICHEVA et al., 1994; MASSACCI e JONES, 1990) e, portanto, não reflete as fortes diferenças em $A_{m\acute{a}x}$ e Φ exibidas por Catuaí e Conilon. É mais provável que reduções em $A_{m\acute{a}x}$ e em Φ estejam associadas com outros fatores, como, por exemplo, decréscimos na difusão gasosa através do mesófilo e na atividade de carboxilação (EASTMAN e CAMM, 1995), além de inibição do lado doador do FSII (BENVENISTE-LEVKOVITZ et al., 1993).

A deficiência hídrica não acarretou alteração na concentração de clorofilas, conforme mostra o Quadro 8, em contraste com o conceito estabelecido acerca da sensibilidade desse parâmetro à seca (CASTRILLO e TRUJILLO, 1994; HSIAO, 1973). Relatos semelhantes são raros na literatura (por exemplo, KULSHRESHTHA et al., 1987). Curiosamente, quando Conilon foi submetido a déficit hídrico, sob $80\mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (7d sem irrigação, $\Psi_{am}=-2,3\text{MPa}$),

QUADRO 8- Concentrações Foliares de Açúcares totais, Amido e Clorofilas, de Dois Cultivares de Cafeeiros, Irrigados e sob Défice Hídrico Moderado e Severo (Respectivamente, $\Psi_{am} = -0,2, -1,5$ e $-2,7$ MPa). Valores São Médias de Seis Repetições. Números entre Parênteses Indicam o Erro Padrão da Média

CULTIVAR	Ψ_{am} [-MPa]	AÇÚCARES [mg g(MS) ⁻¹]	AMIDO [mg g (MS) ⁻¹]	CLOROFILA a+b [g m ⁻²]
CATUAI	0,2	29,7 (2,5)	24,7 (2,2)	0,59 (0,04)
	1,5	32,5 (1,0)	21,6 (2,2)	0,60 (0,05)
	2,7	37,9 (2,6)	15,3 (2,4)	0,57 (0,05)
CONILON	0,2	28,8 (1,7)	26,2 (3,1)	0,53 (0,04)
	1,5	37,0 (3,3)	18,4 (1,7)	0,50 (0,05)
	2,7	42,3 (2,8)	11,1 (0,8)	0,51 (0,06)

foi observado incremento de 37% na concentração de clorofilas, especialmente *b* (resultados não mostrados). O fato de o cafeeiro apresentar alto teor relativo de água, mesmo a potenciais hídricos consideravelmente baixos (ALMEIDA, 1993; DA MATTA et al., 1993; JOSIS et al., 1983) pode explicar essas observações, na medida que um teor de água mínimo é necessário para evitar degradação de clorofilas (HASPEL-HORVATOVIC e HOLÚBKOVÁ, 1981, citados por CASTRELO e TRUJILLO, 1994).

A concentração de amido foi reduzida em resposta à seca, paralelamente a aumentos na concentração de açúcares totais, com diferenças mais expressivas em Conilon (Quadro 8). Provavelmente, sacarose foi o principal açúcar acumulado, em razão de incrementos na ativação da sintase da sacarose-fosfato, acompanhados por degradação de amido, conforme revisado por PEREIRA e CHAVES (1993). Essas observações invalidam a proposição de DA MATTA et al. (1993), que explicaram a redução da área foliar específica observada em diversos genótipos de cafeeiros sob seca, pelo incremento da concentração de

amido foliar. Com efeito, nenhuma alteração da área foliar específica foi observada neste experimento (resultados não mostrados).

Fotoinibição da fotossíntese foi manifestada por reduções decorrentes de extinção de F_m e aumento de F_o . Não foram observadas diferenças na extensão da fotoinibição e na sua reversão em discos foliares de plantas sob tensão hídrica moderada. Nessa situação, não houve alterações de F_v/F_m , tanto em Catuaí como em Conilon, quando a fotoinibição foi conduzida a 22 ou a 35°C. Contudo, quando discos de folhas severamente desidratadas foram submetidos a altas irradiâncias, a redução de F_v/F_m foi fortemente acentuada, especialmente a 35°C (Fig. 7). Todavia toma-se difícil asseverar a ocorrência de efeitos sinérgicos entre altas temperaturas e déficit hídrico severo sobre a atividade do FSII, em razão dos elevados erros padrão observados, provavelmente como consequência da heterogeneidade da turgescência foliar do material utilizado. Pela mesma razão, tendência de maior sensibilidade de Catuaí à fotoinibição associada com déficit hídrico, assim como no seu restabelecimento, quando comparado com Conilon, pode ter sido meramente circunstancial.

Vários relatos mostram que recuperação da eficiência do FSII, após tratamento fotoinibitório, somente ocorre sob baixas irradiâncias, mas não no escuro. No entanto, F_v/F_m , quando medida após 0,5h de obscuridade após a fotoinibição, foi sempre maior a 35°C, especialmente em discos foliares oriundos de plantas irrigadas (Fig. 7), sugerindo a existência de um componente do restabelecimento daquele parâmetro modulado por temperatura e, pelo menos em parte, insensível à irradiância. Considerando-se que recuperação da atividade do FSII envolve degradação e ressíntese da proteína D1 de centros de reação fotodanificados (Capítulo 1), ambos os processos podendo ocorrer sob obscuridade (ANDERSSON et al., 1994; OHAD et al., 1994), possivelmente, maiores valores de F_v/F_m naquelas condições podem ser consequência do

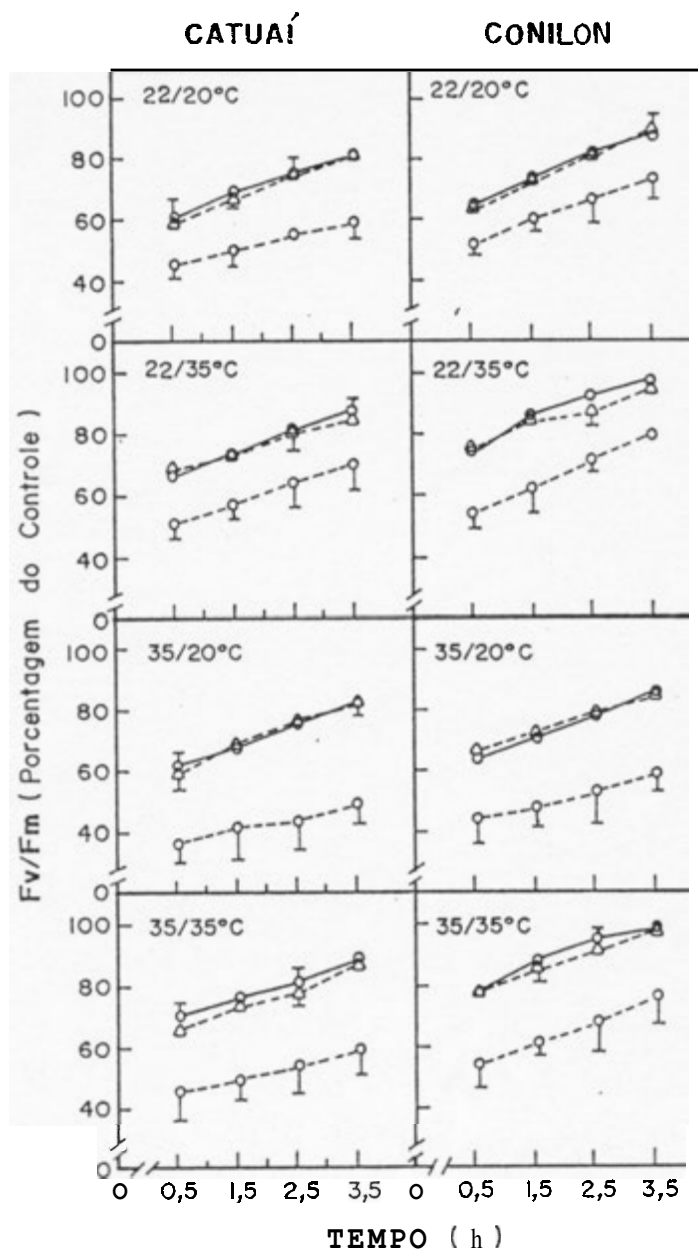


FIGURA 7- Recuperação da Eficiência Fotoquímica do FSII, Avaliada pela Razão de Fluorescência Variável/Máxima (F_v/F_m) de Dois Cultivares de Cafeeiros, Após 2h de Fotoinibição. Números Dentro das Figuras Indicam, Respectivamente, as Temperaturas nas Quais Foram Efetuadas a Fotoinibição e a Sua Recuperação. Recuperação Ocorreu sob $50\mu\text{mol}$ de Fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Cada Símbolo É Média de Cinco Repetições, e Barras Indicam Erro Padrão; Quando Não Mostrado, o Erro Padrão Foi Menor que Tamanho dos Símbolos. (●), (▲) e (○) Indicam, Respectivamente, F_v/F_m de Plantas Irrigadas e sob Défices Hídricos Moderado e Severo. Valores de F_v/F_m Foram $0,82\pm 0,01$ Antes do Tratamento Fotoinibitório.

aumento do giro de D1. Como regra, a recuperação da fotoinibição foi largamente dependente da temperatura; em todas as situações, o restabelecimento de F_v/F_m foi maior a 35 do que a 20°C, conforme também observado em feijão (GREER et al., 1986) e em *kiwi* (GREER e LAING, 1988). Essa dependência pode ser decorrente do incremento das taxas de remoção, difusão e reparo de complexos-protéicos de centros de reação do FSII, associadas com temperaturas relativamente elevadas (ver Capítulo 2).

Conforme mostra a Fig. 8, a capacidade fotossintética máxima de Catuaí e de Conilon não foi consistentemente afetada pelas temperaturas nas quais foram estudadas a fotoinibição e a sua reversão, como também não foram observados efeitos aditivos de déficit hídrico moderado e alta irradiância sobre $A_{máx}$ naqueles cultivares. No entanto, sob forte tensão hídrica, $A_{máx}$, em Catuaí, foi drasticamente reduzida, enquanto em Conilon esse declínio foi sensivelmente menor e revertido na fase de recuperação da fotoinibição, evidenciando maior tolerância de seu aparelho fotossintético à seca acoplada a irradiâncias fotoinibitórias. Contudo, em cafeeiros em campo, o potencial hídrico raramente cai a valores abaixo de -1,5MPa (RENA et al., 1994) e, adicionalmente, sob condições naturais, o déficit hídrico é estabelecido gradualmente, permitindo às plantas ajustarem-se a essa condição, minimizando, pois, impactos de tensões ambientes. Nesse respeito, especialmente em Conilon, observa-se, visualmente, enrolamento da folhagem e alteração de seu ângulo de orientação, interceptando, desse modo, menor fluxo de fótons, com conseqüente redução do potencial fotoinibitório do excesso de luz. Portanto, em nível de campo, redução da capacidade fotossintética de cafeeiros, desde que temperaturas sejam favoráveis, deve estar associada fundamentalmente à disponibilidade de água do solo, com efeitos menores de irradiâncias superiores àquelas necessárias para saturar a fotossíntese.

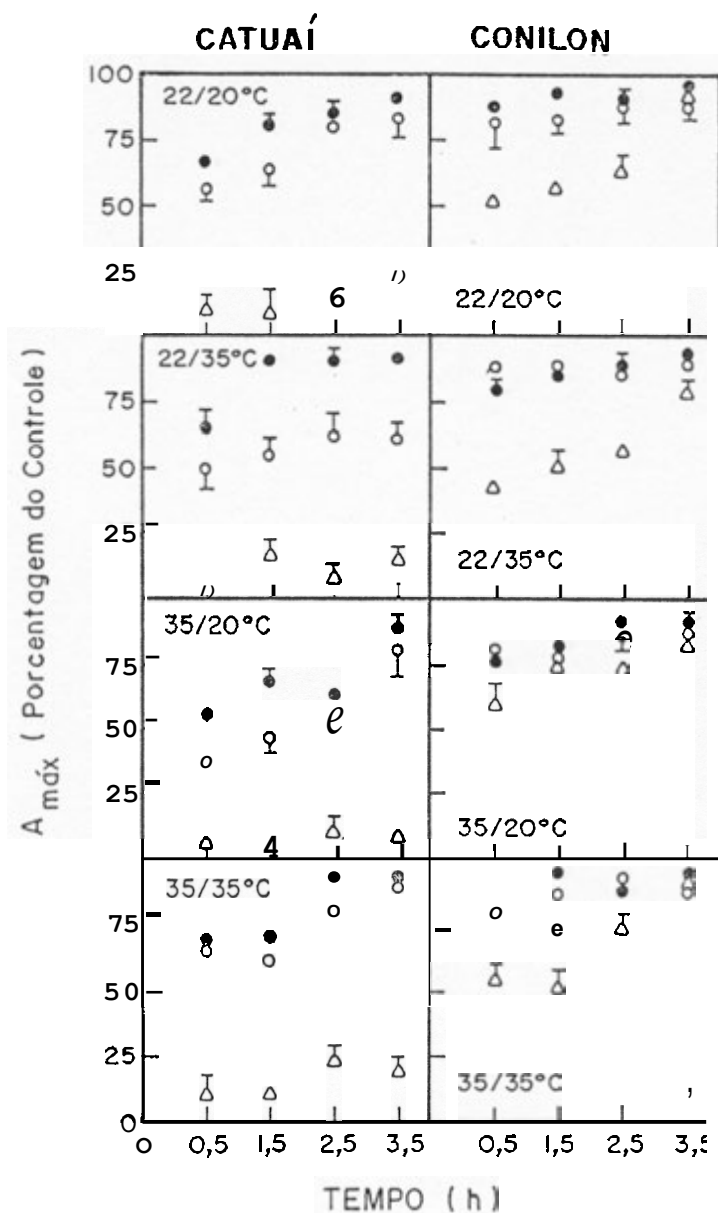


FIGURA 8- Variações na Evolução do Oxigênio Fotossintético ($A_{máx}$) de Dois Cultivares de Careeiros, Após 2h de Fotoinibição. Números Dentro das Figuras Indicam, Respectivamente, as Temperaturas nas Quais Foram Efetuadas a Fotoinibição e a Sua Recuperação. Recuperação Ocorreu sob $50\mu\text{mol de Fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Cada Símbolo É Média de Cincos Repetições, e Barras Indicam Erro Padrão; Quando Não Mostrado, o Erro Padrão Foi Menor que Tamanho dos Símbolos. (●), (A) e (o) Indicam, Respectivamente, $A_{máx}$ de Plantas Irrigadas e sob Défices Hídricos Moderado e Severo, Cujos Controles, Nessa ordem, Mostraram Valores de $25,9\pm 3,8$, $11,4\pm 2,0$ e $6,4\pm 0,9$ para Catuaí, e $30,3\pm 2,9$, $23,6\pm 4,0$ e $18,0\pm 2,7$ para Conilon, Antes do Tratamento Fotoinibitório.

RESUMO E CONCLUSÕES

Foram investigadas respostas fisiológicas decorrentes de tensões luminosa, térmica e hídrica, sobre o aparelho fotossintético de *Coffea arabica* cv Catuaí Vermelho e *C. canephora* cv Conillon. Sob alta irradiância, a fotoinibição foi manifestada por decréscimos lineares da eficiência fotoquímica do fotossistema II (FSII). Cloranfenicol (CAP) intensificou a extensão da fotoinibição e bloqueou completamente o seu restabelecimento sob baixa irradiância, sem quaisquer efeitos aparentes de ditiotreitol (DTT). Não foi observada separação de fases na reversão da fotoinibição. A evolução de oxigênio fotossintético, sob condições fotoinibitórias, foi reduzida por CAP e DTT, sendo decrescida apenas marginalmente nas plantas-controles de Catuaí, porém com pronta recuperação após 90min de exposição a baixa irradiância. Com relação à temperatura, o desempenho fotossintético de Conilon e Catuaí foi reduzido em folhas que se desenvolveram no inverno, com decréscimos mais drásticos no primeiro cultivar, principalmente devidos a fatores não-estomáticos. O teor de amido foliar foi significativamente maior no inverno, Catuaí mostrando teores 70% superiores

àqueles observados em Conilon. Foi verificada, naquele cultivar, uma estreita correlação entre a evolução de oxigênio fotossintético e a concentração foliar de amido. Quando os níveis desse carboidrato foram reduzidos à metade, a evolução do oxigênio fotossintético e a eficiência fotoquímica do FSI foram restabelecidas a taxas semelhantes às aquelas medidas em folhas desenvolvidas no verão. Conilon acumulou prolina e ascorbato em maior extensão do que Catuaí, no inverno, ocorrendo o oposto com relação a malondialdeído. A constante da taxa de recuperação da fotoinibição, no inverno, foi quatro vezes menor em Catuaí, sendo incrementada no verão, mas a valores inferiores aos mostrados por Conilon. Nesse cultivar, a redução da fotossíntese nas fases iniciais da seca foi governada, principalmente, por fatores não-estomáticos, enquanto em Catuaí, tanto fatores estomáticos quanto não-estomáticos estiveram associados com a redução do seu desempenho fotossintético. Sob déficit hídrico severo, limitações não-estomáticas foram as mais importantes, no controle das taxas fotossintéticas, com menores decréscimos em Conilon, que maximizou o ganho de carbono às expensas de conservação de água. Deficiência hídrica moderada, *per se*, não afetou consistentemente a evolução do oxigênio fotossintético na recuperação da fotoinibição em ambos os cultivares, porém, sob seca severa, a capacidade fotossintética de Catuaí foi drasticamente reduzida. De modo geral, o aparelho fotossintético do Conilon foi menos sensível do que o do Catuaí a altas irradiâncias, à temperatura e ao déficit hídrico.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, W. W. & DEMMIG-ADAMS B. Energy and photoprotection in leaves of higher plants. *In: YAMAMOTO, H. Y. & SMITH, C. M. eds, Photosynthetic responses to the environment.* Maryland, American Society of Plant Physiology, 1993. v.8, p. 27-36.
- ADAMSON, H. Y.; CHOW, W. S.; ANDERSON, J. M.; VESK, M.; SUTHERLAND, M. Photosynthetic acclimation of *Tradescantia albiflora* to growth irradiance: morphological, ultrastructural and growth responses. *Physiol. Plant.*, 82:353-359, 1991.
- ALMEIDA, A-A. F. *Emissão de fluorescência e evolução de oxigênio fotossintético em Coffea arabica L. durante um ciclo de desidratação/reidratação.* Viçosa, MG, UFV, 1993. 107p. (Tese D.S.).
- AMARAL, J. A. T. *Crescimento vegetativo estacional do cafeeiro e suas inter-relações com fontes de nitrogênio, fotoperíodo, fotossíntese e assimilação do nitrogênio.* Viçosa, MG, UFV, 1991. 139p. (Tese D. S.).
- ANDERSON, J. M.; CHOW, W. S.; ÖQUIST, G. Dynamics of photosystem II: photoinhibition as a protective acclimation strategy. *In: YAMAMOTO, H. Y. & SMITH, C. M. eds, Photosynthetic responses to the environment.* Maryland, American Society of Plant Physiology, 1993. p. 14-26.
- ANDERSON, J. V.; CHEVONE, B. L; HESS, J. L. Seasonal variation in the antioxidant system of eastern white pine needles. *Plant. Physiol.*, 98: 501-508. 1992.

- ANDERSSON, B.; PONTICOS, M.; BARBER, J.; KOIVUNIEMI, A.; ARO E-M.; HAGMAN, A.; SALTER, A. H.; DAN-HUI, Y.; LINDAHL, M. Light induced proteolysis of photosystem II reaction centre and light-harvesting complex II proteins in isolated preparations. *In: BAKER, N. R. & BOWYER, J. R. eds, Photoinhibition of photosynthesis - from molecular mechanisms to the field.* Oxford, Bios Scientific Publishers, 1994. p. 143-159.
- ARAUS, J. L. & HOGAN, K. P. Leaf structure and patterns of photoinhibition in two neotropical palms in clearings and forest understory during the drying season. *Am. J. Bot.*, **81**: 726-738, 1994.
- ARO, E-M.; HUNDAHL, T.; CARLBEG, I. In vitro studies on light-induced inhibition of photosystem II and D1 protein degradation at low temperatures. *Biochim. Biophys. Acta*, **1019**: 269-275, 1990.
- ARO, E-M.; McCAFERRY, S.; ANDERSON, J. M. Recovery from photoinhibition in peas (*Pisum sativum* L.) acclimated to varying growth irradiances: role of D1 protein turnover. *Plant Physiol.*, **104**: 1033-1041, 1994.
- BADIANI, M.; PAOLACCI, A. R.; D'ANNIBALE, A.; SERMANNI, G. G. (1993) Antioxidants and photosynthesis in the leaves of *Triticum durum* L. acclimated to low, non-chilling temperature. *J. Plant. Physiol.*, **142**: 18-24
- BAKER, N. R. Light-use efficiency and photoinhibition in plants under environmental stress. *In: SMITH, J. A. C. & GRIFFITHS, H. eds, Water deficits - plant responses from cell to community.* Oxford, Bios Scientific Publishers, 1993. p. 221-235.
- BARBER, J. & ANDERSSON, B. Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.*, **17**: 61-66, 1992.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; Teare, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, **39**: 205-207, 1973.
- BAUER, H.; WIERER, R.; HATHEWAY, H.; LARCHER, W. Photosynthesis of *Coffea arabica* L. after chilling. *Physiol. Plant.*, **64**: 449-454, 1985.
- BEN, G. Y.; OSMOND, C. B.; SHARKEY, T. S. Comparisons of photosynthetic responses of *Xanthium strumarium* and *Helianthus annuus* to chronic and acute water stress in sun and shade. *Plant. Physiol.*, **84**: 476-482, 1987.
- BENVENISTE-LEV KOVITZ, P.; CANAANI, O.; GROMET-ELHANAN, Z.; ATSMON, D. Characterization of drought resistance in a wild relative of wheat, *Triticum kotschyi*. *Photosynth Res.*, **35**: 149-158, 1993.

- BERRY, J. & BJÖRKMAN, O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 31: 491-543, 1980.
- BILGER, W. & BJÖRKMAN, O. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.*, 25: 173-185, 1990.
- BILGER, W.; BJÖRKMAN, O.; THAYER, S. Light induced spectral absorbance changes in relation to the epoxidation state of xanthophyll cycle components in cotton leaves. *Plant Physiol.*, 91: 542-545, 1990.
- BOESE, S. R. & HUNER, N. P. A. Developmental history affects the susceptibility of spinach leaves to *in vivo* low temperature photoinhibition. *Plant Physiol.*, 99: 1141-1145, 1992.
- CARLBEG, L.; BINGSMARK, S.; VENNIGERHOLZ, F.; LARSSON, U. K.; ANDERSSON, B. Low temperature effects on thylakoid protein phosphorylation and membrane dynamics. *Biochim. Biophys. Acta*, 1099: 111-117, 1992.
- CASTRILLO, M. & TRUJILLO, I. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity and chlorophyll and protein contents in two cultivars of french bean plants under water stress and rewatering. *Photosynthetica*, 30: 175-181, 1994.
- CHAVES, M. M. Effects of water deficits on carbon assimilation. *J. Exp. Bot.*, 42: 1-16, 1991.
- CORNIC, G. & BRIANTAIS, J. M. Partitioning of photosynthetic CO₂ and O₂ reduction in a C₃ leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO₂ concentrations during drought stress. *Planta*, 183: 178-184, 1991.
- CRITCHLEY, C. & RUSSEL, A. W. Photoinhibition of photosynthesis *in vivo*: the role of protein turnover in photosystem II. *Physiol. Plant.*, 92: 188-196, 1994.
- DA MATTA, F. M.; MAESTRI, M.; BARROS, R.S.; REGAZZI, A.J. Water relations of coffee leaves (*Coffea arabica* and *C. canephora*) in response to drought. *J. Hort. Sci.*, 68: 741-746, 1993.
- DEMMIG-ADAMS, B. & ADAMS, W. W. Photoprotection and other responses of plants to high-light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, 43: 559-626, 1992.

- DEMMIG, B. & BJÖRKMAN, O. 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, 1987.
- DEMMIG, B.; WINTER, K.; KRUGER, A.; CZYGAN, F.C. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant Physiol.*, **84**: 218-224, 1987.
- DI MARCO, G.; MASSACCI, A.; GABRIELLI, R. Drought effects on photosynthesis and fluorescence in hard wheat cultivars grown in the field. *Physiol. Plant.*, **74**: 385-390, 1988.
- DOWNTOWN, W. J. S.; LOVEYES, B. R.; GRANT, W. J. R. Stomatal closure fully accounts for the inhibition of photosynthesis by abscisic acid. *New Phytol.*, **108**: 263-266, 1988.
- DUA, A.; TALWAR, G.; SINGAL, H.R.; SINGH, R. CO₂ exchange, primary photochemical reactions and enzymes of photosynthetic carbon reduction cycle in *Brassica* pods during water stress and recovery. *Photosynthetica*, **30**: 261-268, 1994.
- EASTMAN, P. A. K. & CAMM, E. L. Regulation of photosynthesis in interior spruce during water stress: changes in gas exchange and chlorophyll fluorescence. *Tree Physiol.*, **15**: 229-235, 1995.
- FARQUHAR, G. D. & SHARKEY, T. D. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **33**: 317-345, 1982.
- FOYER, C.; FURBANK, R.; HARBINSON, J.; HORTON, P. The mechanisms contributing to photosynthetic control of electron transport by carbon assimilation. *Photosynth. Res.*, **25**: 83-100, 1990.
- FRANKLIN, L. A.; LEVAVASSEUR, G.; OSMOND, C. B.; HENLEY, W. J.; RAMUS, J. Two components of onset and recovery during photoinhibition of *Ulva rotundata*. *Planta*, **186**: 399-408, 1992.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M.; VIEIRA da SILVA, J. B. Effects of drought on primary photosynthetic processes of cotton leaves. *Plant Physiol.*, **83**: 360-364, 1987.
- GODDE, D. & HEFER, M. Photoinhibition and light-dependent turnover of the D1 reaction-centre polypeptide of photosystem II are enhanced by mineral-stress condition. *Planta*, **193**: 290-299, 1994.

- GREER, D. H.; BERRY, J. A.; BJÖRKMAN, O. Photoinhibition of photosynthesis in intact bean leaves: role of light and temperature, and requirement of chloroplast-protein synthesis during recovery. *Planta*, 168: 253-260, 1986.
- GREER, D. H. & LAING, W. A. Photoinhibition of photosynthesis in intact kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) leaves: Recovery and its dependence on temperature. *Planta*, 174: 159-165, 1988.
- GREER, D. H.; LAING, W. A.; WOOLEY, D. J. The effect of chloramphenicol on photoinhibition of photosynthesis and its recovery in intact kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) leaves. *Aust. J. Plant Physiol.*, 20: 33-43, 1993.
- GREER, D. H.; OTTANDER, C.; ÖQUIST, G. Photoinhibition and recovery of photosynthesis in intact barley leaves at 5 and 20°C. *Physiol. Plant.*, 81: 203-210, 1991.
- HANELT, D. & NULTSCH, W. Field studies of photoinhibition show non-correlations between oxygen and fluorescence measurements in the arctic red alga *Palmariapalmata*. *J. Plant Physiol.*, 145: 31-38, 1995.
- HAVAUX, M. Stress tolerance of photosystem II in vivo. Antagonistic effects of water, heat, and photoinhibition stresses. *Plant Physiol.*, 100: 424-432, 1992.
- HAVAUX, M. Temperature-dependent modulation of the photoinhibition-sensitivity of photosystem II in *Solanum tuberosum* leaves. *Plant Cell Physiol.*, 35: 757-766, 1994.
- HEATH, R. L. & PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochim. Biophys.*, 126: 189-198, 1968.
- HEBER, U.; TYANKOVA, L.; SANTARIUS, H. A. Effects of freezing on biological membranes in vivo and in vitro. *Acta Biochim. Biophys.*, 291: 27-37, 1973.
- HENDRY, G. A.F.; THORPE, P. C.; MERZLYAK, M. N. Stress indicators - Lipid peroxidation. In: HENDRY, G. A. F. & GRIME, J. P. eds, *Methods in comparative plant ecology*. London, Chapman & Hall, 1993. p. 154-156.
- HETHERINGTON, S. E.; HE, J.; SMILLIE, R. M. Photoinhibition at low temperature in chilling-sensitive and -resistant plants. *Plant Physiol.*, 90: 1609-1615, 1989.

- HORTON, P. & BOWYER, J. R. Chlorophyll fluorescence transients. In: HARWOOD, J. L. & BOWYER, J. R. eds, *Methods in plant biochemistry*. London, Academic Press, 1990. v. 4, p. 259-296.
- HORTON, P.; RUBAN, A.; WALTERS, R. G. Regulation of light harvesting in green plants. Indication by nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol.*, 106: 415-420, 1994.
- HSLAO, T. C. Plant responses to water stress. *Annu Rev. Plant Physiol.*, 24: 519-570, 1973
- HUANG, K. L.; WONG, S. C.; TERASHIMA, L.; ZHANG, X.; LIN, D.X.; OSMOND, C. B. Chilling injury in mature leaves of rice. I. Varietal differences in the effects of chilling on canopy photosynthesis under simulated dry cold dew wind conditions experienced in south-east China. *Aust. J. Plant Physiol.*, 16, 321-337, 1989.
- HURRY, V. M. & HUNER, N. P. A. Low growth temperature affects a differential inhibition of photosynthesis in spring and winter wheat. *Plant Physiol.*, 96: 491-497, 1991.
- HURRY, V. M. & HUNER, N. P. A. Effect of cold hardening on sensitivity of winter and spring wheat leaves to short-term photoinhibition and recovery of photosynthesis. *Plant Physiol.*, 100: 1283-1290, 1992.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO CAFÉ. *Cultura do Café no Brasil - manual de recomendações*. Rio de Janeiro, Grupo Executivo de Racionalização da Cafeicultura, 1985. 580 p.
- ITAI, C. & PALEG, L. G. Responses of water-stressed *Hordeum distichum* L. and *Cucumis sativus* to proline and betaine. *Plant Sci. Lett.*, 25: 329-335, 1982.
- JAHNKE, L. S.; HULL, M. R.; LONG, S. P. Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis*. *Plant Cell Environ.*, 14: 97-104, 1991.
- JEFFERIES, R. A. Drought and chlorophyll fluorescence in field-grown potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol. Plant.*, 90: 93-97, 1994.
- JONES, H. G. Drought tolerance and water-use efficiency. In: SMITH, J. A. C. & GRIFFITHS, H eds, *Water deficits - plant responses from cell to community*. Oxford, Bios Scientific Publishers, 1993. p. 193-203.

- JOSIS, P.; NDAYISHIMIYE, V.; RÉNARD, C. Étude des relations hydriques chez *Coffea arabica* L. II. Évaluation de la résistance à la sécheresse de divers cultivars à Ghisa (Burundi). *Café Cacao Thé*, 27: 275-282, 1983.
- JOUVE, L.; ENGELMANN, F.; NOIROT, M.; CHARRIER, A. Evaluation of biochemical markers (sugar, proline, malonedialdehyde and ethylene) for cold sensitivity in microcuttings of two coffee species. *Plant Sci.*, 91: 109-116, 1993.
- KICHEVA, M. L.; TSONEV, T. D.; POPOVA, L. P. Stomatal and nonstomatal limitations to photosynthesis in two wheat cultivars subjected to water stress. *Photosynthetica*, 30: 107-116, 1994.
- KOBZA, J. & EDWARDS, G. E. Influences of leaf temperature on photosynthetic carbon metabolism in wheat. *Plant Physiol.*, 75: 60-74, 1987.
- KRAUSE, G. H. Photoinhibition of photosynthesis: an evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol. Plant.*, 74: 566-574, 1988.
- KRAUSE, G. H. Photoinhibition induced by low temperatures. In: BAKER, N. R. & BOWYER, J. R. eds, *Photoinhibition of photosynthesis - from molecular mechanisms to the field*. Oxford, Bios Scientific Publishers, 1994. p. 331-348.
- KRAUSE, G. H.; SOMERSALO, S.; ZUMBUSCH, E.; WEYERS, B.; LAASCH, H. On the mechanism of photoinhibition of chloroplasts: relationship between changes in fluorescence and activity of photosystem II. *J. Plant Physiol.*, 136: 472-479, 1990.
- KRAUSE, G. H. & WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basic. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, 42: 313-349, 1991.
- KULSHRESHTHA, S.; MISHRA, D. P.; GUPTA, R. K. Changes in contents of chlorophyll, proteins and lipids in whole chloroplasts and chloroplast membrane fractions at different leaf water potentials in drought resistant and sensitive genotypes of wheat. *Photosynthetica*, 21: 65-70, 1987.
- KUMAR, D. & TIESZEN, L. L. Photosynthesis in *Coffea arabica*. I. Effects of light and temperature. *Expl. Agric.*, 16: 13-19, 1980.
- LEITSCH, J.; SCHNETTGER, B.; CRITCHLEY, C.; KRAUSE, G. H. Two mechanisms of recovery from photoinhibition in vivo: reactivation of photosystem II related and unrelated to D1-protein turnover. *Planta*, 194: 15-21, 1994.

- LEVERENZ, J. W.; ÖQUIST, G.; WINGSLE, G. Photosynthesis and photoinhibition in leaves of chlorophyll h-less barley in relation to absorbed light. *Physiol. Plant.*, **85**:495-502, 1992.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.*, **148**:92-102, 1987.
- LONG, S. P.; HUMPHRIES, S.; FALKOWSKI, P. G. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, **45**:633-662, 1994.
- LUDLOW, M. M. & BJÖRKMAN, O. 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, 1984.
- MAESTRI, M.; DA MATTA, F. M.; REGAZZI, A. J.; BARROS, R. S. Accumulation of proline and quaternary ammonium compounds in mature leaves of water-stressed coffee plants (*Coffea arabica* and *C. canephora*). *J. Hort. Sci.*, **70**:229-233, 1995.
- MANSFIELD, T. A.; HETHERINGTON, A. M.; ATKINSON, C. J. Some current aspects of stomatal physiology. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, **41**:55-75, 1990.
- MASOJÍDEK, J.; TRIVEDI, S.; HALSHAW, L.; ALEXIOU, A.; HALL, D. O. The synergistic effect of drought and light stresses in sorghum and pearl millet. *Plant Physiol.*, **96**:198-207, 1991.
- MASSACCI, A. & JONES, H. G. Use of simultaneous analysis of gas-exchange and chlorophyll fluorescence quenching for analysing the effects of water stress on photosynthesis in apple leaves. *Trees*, **4** 1-8, 1990.
- McCREADY, R. M.; GUGGLOZ, J.; SILVEIRA, V.; OWENS, H. S. Determination of starch and amylose in vegetables: application to peas. *Anal. Chem.*, **22**:1156-1158, 1950.
- MEINZER, F. C.; GRANTZ, D. A.; GOLDSTEW, G.; SALIENDRA, N. Z. Leaf water relations and maintenance of gas exchange in coffee cultivars grown in drying soil. *Plant Physiol.*, **94**:1781-1787, 1990.
- NUNES, M. A. Water relations in coffee. Significance of plant water deficits to growth and yield: a review. *J. Coffee Res.*, **6**:4-21, 1976.

NUNES, M. A. & DUARTE, N. T. Resistência à seca em *Coffea arabica*. Estudo comparativo de duas seleções. *Est. Agronômicos*, 10:75-85, 1969.

NUNES, M. A.; RAMALHO, J. D. C.; DIAS, M. A. Effect of nitrogen supply on the photosynthetic performance of leaves from coffee plants exposed to bright light. *J. Exp. Bot.*, 44:893-899, 1993.

ÖGREN, E. & EVANS, J. R. Photosynthetic light-response curves. I. The influence of CO₂ partial pressure and leaf inversion. *Planta*, 189: 182-190, 1993.

ÖGREN, E. & ÖQUIST, G. Effects of drought on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition susceptibility in intact willow leaves. *Planta*, 166: 380-388, 1985.

OHAD, I.; ADIR, N.; KOIKE, H.; KYLE, D. J.; INOUE, Y. Mechanism of photoinhibition in vivo. *J. Biol. Chem.*, 265: 1972-1979, 1990.

OHAD, L.; KEREN, N.; ZER, H.; GONG, H.; MOR, T. S.; GAL, A.; TAL, S.; DOMOVICH, Y. Light induced degradation of the photosystem II reaction centre D1 protein in vivo: an integrative approach. In: BAKER, N. R. & BOWYER, J. R. eds, *Photoinhibition of photosynthesis - from molecular mechanisms to the field*. Oxford, Bios Scientific Publishers, 1994. p. 161-177.

OKADA, K.; SATOH, K.; SATOH, S. Chloramphenicol is an inhibitor of photosynthesis. *FEBS Lett.*, 295: 155-158, 1991.

ÖQUIST, G.; ANDERSON, J. M.; McCAFFERY, S.; CHOW, W. S. Mechanistic differences in photoinhibition of sun and shade plants. *Planta*, 188: 422-431, 1992.

ÖQUIST, G.; HURRY, G. V. M.; HUNER, N. P. A. Low-temperature effects on photosynthesis and correlation with freezing tolerance in spring and winter cultivars of wheat and rye. *Plant Physiol.*, 101: 245-250, 1993.

OSMOND, C. B. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: BAKER, N. R. & BOWYER, J. R. eds, *Photoinhibition of photosynthesis - from molecular mechanisms to the field*. Oxford, Bios Scientific Publishers, 1994. p. 1-24.

OSMOND, C. B.; HINDAL, T.; ANDERSSON, B.; HUNER, N. P. A.; ÖQUIST, G. Fluorescence quenching during photosynthesis and photoinhibition of *Ulva rotundata* Blid. *Planta*, 190: 91-106, 1993.

- OWENS, T. G. Excitation energy transfer between chlorophylls and carotenoids. A proposed molecular mechanism for non-photochemical quenching. In: BAKER, N. R. & BOWYER, J. R. eds, *Photoinhibition of photosynthesis - from molecular mechanisms to the field*. Oxford, Bios Scientific Publishers, 1994. p. 95-109.
- PARKHURST, D. F. Diffusion of CO₂ and other gases inside leaves. *New Phytol.*, 126: 449-479, 1994.
- PEREIRA, J. S. & CHAVES, M. M. Plant water deficits in Mediterranean ecosystems. In: SMITH, J. A. C. & GRIFFITHS, H. eds, *Water deficits - plant responses from cell to community*. Oxford, Bios Scientific Publishers, 1993. p. 237-251.
- QUICK, W. P.; CHAVES, M. M.; WENDLER, R.; DAVID, M. M.; RODRIGUES, M. L.; PASSARINHO, J. A.; PEREIRA, J. S.; ADCOCK, M. D.; LEEGOOD, R. C.; STITT, M. The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant Cell Environ.*, 15: 25-35, 1992.
- RAGGI, V. Changes in water relations and in some physiological functions of bean under very light osmotic shock induced by polyethylene glycol. *Physiol. Plant.*, 84: 537-548, 1992.
- RENA, A. B.; BARROS, R. S.; MAESTRI, M.; SÖNDAHL, M. R. Coffee. In: SCHAFFER, B. & ANDERSEN, P. C. eds, *Handbook of environmental physiology of fruit crops - subtropical and tropical crops*. Boca Raton, CRC Press, 1994. v. II, p. 101-122.
- RINTAMÄKI, E.; SALO, R.; ARO, E.-M. Rapid turnover of the D1 reaction-centre protein of photosystem II as a protection mechanism against photoinhibition in a moss, *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. *Planta*, 193: 520-529, 1994.
- RUBINSTEIN, B. A.; STERN, A. I.; CHALMERS, J. D. C. Relationship between electron transport across the plasmalemma and a pH decrease in the bulk medium. *Plant Physiol.*, 98: 988-994, 1992.
- SCHNETTGER, B.; CRITCHLEY, C.; SANTORE, U. J.; GRAF, M.; KRAUSE, G. H. Relationship between photoinhibition of photosynthesis, D1 protein turnover and chloroplast structure: effects of protein synthesis inhibitors. *Plant Cell Environ.*, 17: 55-64, 1994.

- SCHNETTGER, B.; LEITSCH, J.; KRAUSE, G. H. Photoinhibition of photosystem II *in vivo* occurring without net D1 protein degradation. *Photosynthetica*, 27: 261-265, 1992.
- SCHÖNER, S. & KRAUSE, G. H. Protective systems against active oxygen species in spinach: response to cold acclimation in excess light. *Planta*, 180: 383-389, 1990.
- SHARP, R. E. & BOYER, J. S. Photosynthesis at low water potentials in sunflower: lack of photoinhibitory effects. *Plant Physiol.*, 82: 90-95, 1986.
- SOMERSALO, S. & KRAUSE, G. H. Photoinhibition at chilling temperatures and effects of freezing stress on cold acclimated spinach leaves in the field. A fluorescence study. *Physiol. Plant.*, 79: 617-622, 1990.
- TELFER, A. & BARBER, J. Elucidating the molecular mechanisms of photoinhibition by studying isolated photosystem II reaction centres. In: BAKER, N. R. & BOWYER, J. R. eds, *Photoinhibition of photosynthesis - from molecular mechanism to the field*. Oxford, Bios Scientific Publishers, 1994. p. 25-49.
- TERASHIMA, I.; WONG, S-C.; OSMOND, C. B.; FARQUHAR, G. D. Characterization of non-uniform photosynthesis induced by abscisic acid in leaves having different mesophyll anatomies. *Plant Cell Physiol.*, 29: 385-394, 1988.
- TYYSTJÄRVI, E.; ALI-YRKKÖ, K.; KETTUNEN, R.; ARO, E-M. Slow degradation of the D1 protein is related to the susceptibility of low-light-grown pumpkin plants to photoinhibition. *Plant Physiol.*, 100: 1310-1317, 1992.
- VAN RENSBURG, L. & KRÜGER, G. H. J. Differential inhibition of photosynthesis (*in vivo* and *in vitro*), and changes in chlorophyll a fluorescence induction kinetics of four tobacco cultivars under water stress. *J. Plant Physiol.*, 141: 357-365, 1993.
- VAN WIJK, K. J. & KRAUSE, G. H. Oxygen dependence of photoinhibition at low temperature in intact protoplasts of *Valerianella locusta* L. *Planta*, 186: 135-142, 1991.
- VAN WIJK, K. J. & VAN HASSELT, P. R. Kinetic resolution of different recovery phases of photoinhibited photosystem II in cold-acclimated and non-acclimated spinach leaves. *Physiol. Plant.*, 87: 187-189, 1993.

- WALKER, D. *The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis*. Sheffield, Oxgraphics, 1987. 188 p.
- WISE, R. R. & NAYLOR, A. W. Chilling-induced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiol.*, 83: 278-282, 1987.
- WISE, R. R.; ORTIZ-LOPEZ, A.; ORT, D. R. Spatial distribution of photosynthesis during drought in field-grown and acclimated and nonacclimated growth chamber-grown cotton. *Plant Physiol.*, 100: 26-32, 1992.
- ZRENNER, R. & STITT, M. Comparison of the effect of rapidly and gradually developing water-stress on carbohydrate metabolism in spinach leaves. *Plant Cell Environ.*, 14: 939-946, 1991.