

# EFEITOS DE BAIXAS TEMPERATURAS POSITIVAS NA FOTOSSÍNTESE E ESTABILIDADE MEMBRANAR EM 5 GENÓTIPOS DE *Coffea* sp.

J.C. RAMALHO<sup>1</sup>, V.L. QUARTIN<sup>2</sup>, P.S. CAMPOS<sup>3</sup>, M.L. CARELLI<sup>4</sup>, J.I. FAHL<sup>4</sup> e M.A. NUNES<sup>1</sup>

1. Inst. Inv. Cient. Tropical-CEPTA, Tapada Ajuda, Ap. 3014, 1301-901 Lisboa, Portugal (cochichor@mail.telepac.pt). 2. U.A.N.-Fac. Ciências Agrárias, PO Box 815, Luanda, Angola. 3. Dept. Fisiologia Vegetal-E.A.N., 2784-505, Oeiras, Portugal. 4. I.A.C.-Centro de Ecofisiologia e Biofísica, PO Box 28, 13.001-970 Campinas-SP, Brasil.

**RESUMO:** Índícios de diferenças na sensibilidade ao frio por parte de cafeeiros, observadas no campo durante as severas geadas de 1994 no Brasil, serviram de ponto de partida para o presente trabalho. Estudaram-se diversos parâmetros, em nível foliar, em plantas de 5 genótipos de *Coffea* (*C. canephora* cv. Apoatã; *C. arabica* cv. Catuaí; *C. dewevrei*; Icatu, um híbrido de *C. canephora* X *C. arabica*; Piatã, um híbrido de *C. dewevrei* X *C. arabica*), às quais se aplicou um esquema de aclimação ao frio e de submissão a baixas temperaturas positivas (“chilling”), acompanhando-se também a sua recuperação após o tratamento de frio. Os resultados dos parâmetros fotossintéticos e de estabilidade membranar mostram diferenças de sensibilidade aos tratamentos de frio, que apontam para uma tolerância contrastante entre *C. dewevrei* (mais sensível) e Icatu (mais tolerante). Essas diferenças observaram-se não só durante o período de sujeição das plantas ao tratamento de “chilling” (3 noites a 4 °C), mas também em frio moderado (15/10 °C) e na recuperação do estresse. A análise sumária de crescimento indicia maior vigor de Piatã, reflectido em maior crescimento e acumulação de biomassa, mas que não teve correspondência positiva nos parâmetros fisiológicos estudados quando as plantas foram submetidas aos tratamentos de “chilling”.

**ABSTRACT:** Some indications of contrasting sensitivity of coffee plants, obtained in the field during the severe cold in 1994 in Brazil, led us to carry out this work. At leaf level, several parameters were studied in plants of 5 *Coffea* genotypes (*C. canephora* cv. Apoatã; *C. arabica* cv. Catuaí; *C. dewevrei*; Icatu, is an hybrid of *C. canephora* X *C. arabica*; Piatã, is an hybrid of *C. dewevrei* X *C. arabica*), to which was applied an acclimation period, followed by a chilling treatment. After that, recovery was also monitored. Results from photosynthetic parameters and of membrane stability showed the existence of contrasting sensitivity to low positive temperatures between *C. dewevrei* (more sensitive) and Icatu (more tolerant). Such differences were observed not only after the chilling treatment (3 nights at 4 °C), but also during moderate cold (15/10 °C) and recovery periods. A quick growth analysis points to a better performance of Piatã, reflected in higher growth and biomass accumulation. However, that was not positively reflected on the studied physiological parameters when these plants were submitted to the cold treatments.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Coffea* sp., “chilling”, estabilidade membranar, fotossíntese, frio.

## INTRODUÇÃO

Nas condições meteorológicas prevaletentes nas áreas cafeeiras do Brasil, as agressões provenientes de baixas temperaturas positivas (“chilling”), pela frequência da sua ocorrência, têm tido conseqüências significativas na produção (do próprio ano por efeito direto e nos anos seguintes, pelos efeitos causados às plantas) e no crescimento. O prejuízo resultante desta agressão está em grande parte relacionado com a estabilidade funcional da célula, principalmente das suas membranas, e pelos efeitos causados no metabolismo fotossintético. Os principais objetivos do presente trabalho passam pela avaliação de progênies de cafeeiro relativamente à sua capacidade para tolerar a exposição a baixas temperaturas positivas (“chilling”), a fim de serem posteriormente utilizadas para cultivo ou melhoramento genético, e pela tentativa de identificar alguns mecanismos envolvidos na tolerância ao frio.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Material vegetal** - Foram avaliados 5 genótipos de *Coffea*: *C. canephora* cv. Apoatã; *C. arabica* cv. Catuaí; *C. dewevrei*; Icatu, um híbrido de *C. canephora* X *C. arabica*; Piatã, um híbrido de *C. dewevrei* X *C. arabica*. **Tratamento de baixas temperaturas positivas (“chilling”)** - As plantas cresceram envasadas, em estufa até à idade de cerca de 2,5 anos, com irradiância ca. 70-100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e UR do ar ca. 60-80%. Nutrição adequada foi providenciada pela adição de solução de Hoagland de 15-15 dias. Para os ensaios de frio as plantas foram colocadas numa câmara climatizada (700 EDTU, Aralab, Portugal) a 25/20 °C (dia/noite), 65-70% UR, irradiância ca. 400-500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 12 h. Sujeitaram-se então a um abaixamento

gradual (1°C de 2-2 dias) da temperatura até atingir 15/10 °C (período de aclimação), após o que foram submetidas a 15°/4 °C três noites consecutivas (tratamento de “chilling”). Procedeu-se igualmente ao estudo da recuperação colocando as plantas a 25°/20 °C durante 6 dias.

**Parâmetros de crescimento** - Trabalho efetuado no Brasil em plantas de 2 anos, desenvolvidas em condições naturais, em contentores de 100 L, de forma a permitir o crescimento radicular sem limitações. Analisou-se a acumulação da biomassa radicular e da parte aérea de forma a caracterizar o material vegetal.

**Determinações de trocas gasosas** - As taxas de fotossíntese líquida ( $A$ ) e de condutância estomática ( $g_s$ ) foram medidas nas condições existentes na câmara de crescimento, após um mínimo de 2 h de exposição das plantas à luz, utilizando um porômetro de CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (CIRAS I, PP Systems, UK). As determinações da capacidade fotossintética ( $A_{max}$ ) foram realizadas em discos foliares (1,5 cm<sup>2</sup>), num eletrodo de O<sub>2</sub> (LD2/2, Hansatech, Kings Lynn, UK), em condições saturantes de luz (*ca.* 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e de CO<sub>2</sub> (*ca.* 7%), a 25°C.

**Determinação de parâmetros de fluorescência da clorofila *a*** - Estas medições foram efetuadas de forma semelhante ao descrito em [1], utilizando um sistema PAM-2000 (H. Walz, Effeltrich Germany), e incluíram os “quenching” fotoquímico ( $q_p$ ) e não-fotoquímico ( $q_N$ ), o “quenching” de energização das membranas tilacoidais ( $q_E$ ), a eficiência fotoquímica do fotossistema II em condições de iluminação ( $F_v'/F_m'$ ) e a estimativa do rendimento quântico do transporte linear de elétrons ( $\phi_e$ ). As determinações decorreram em condições de equilíbrio dinâmico (“steady-state”) de fotossíntese, com irradiância de *ca.* 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e “flashes” de *ca.* 6000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com duração de 0,8 s, em condições saturantes de CO<sub>2</sub>, a 25 °C.

**Determinação da condutividade iônica** - 15 discos (0,5 cm<sup>2</sup> cada) foram lavados e postos a flutuar em frascos contendo 10 mL de água desionizada. A condutividade elétrica/iônica do líquido de suspensão foi lida ao fim de 4, 5 e 22 h, à temperatura ambiente, e foi expressa em percentagem da condutividade total. A condutividade total dos discos foi obtida após colocação dos frascos numa estufa a 90 °C durante 2 h.

**Determinação de aldeído malônico (MDA)** - Usou-se o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) descrito em [2], com algumas alterações, para avaliação da lipoperoxidação do conjunto de membranas celulares. Para os cálculos usou-se o valor do pico de absorvância a 532 nm e o coeficiente de absorvidade de 155 mM<sup>-1</sup>.

**Análise estatística** - Os dados obtidos nos vários parâmetros estudados foram analisados estatisticamente usando uma análise de variância (ANOVA) de fator duplo com repetição, para  $P < 0,05$ . Com base nos resultados dessa análise, efetuou-se o Teste de Tukey para comparação de médias (95% nível de confiança).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a descida gradual da temperatura entre 25/20 °C (dia/noite) e 15/10 °C observou-se um decréscimo paralelo de  $A$  e  $g_s$ , mais evidente na generalidade dos genótipos para temperaturas inferiores a 18/13 °C (Fig. 1), que se acentuaram durante o tratamento de “chilling”. De fato, após o tratamento de “chilling”  $A$  era negligível, ou apresentava valores negativos. Apesar de não haver grandes diferenças, nessa altura Catuaí e Piatã foram mais afetados. Após o tratamento de “chilling” Icatu e Piatã destacaram-se pela rápida recuperação de  $A$ . Por seu turno, *C. dewevrei* foi o único genótipo a mostrar uma recuperação incompleta de  $A$ , devido aos baixos valores de  $g_s$  que manteve, já que  $A_{max}$  recuperou-se totalmente em todos os genótipos. (Fig. 1). Já no período de “chilling”, houve afetação do mesófilo, pois  $A_{max}$  apresentou decréscimos significativos em todos os genótipos, exceto em Icatu. De fato, em Icatu diminuiu apenas 15%, enquanto que nos restantes genótipos decresceu 31% (Catuaí), 36% (Apoatã), 47% (*C. dewevrei*) e 70% (Piatã) (Fig. 1). *C. dewevrei* e Piatã mostram uma redução significativa de  $A_{max}$  já a 15/10 °C.

Para uma análise mais detalhada dos efeitos do tratamento de “chilling” no aparelho fotossintético efetuou-se a determinação de alguns parâmetros da fluorescência da clorofila *a* em condições de equilíbrio dinâmico do processo fotossintético, de forma a observar a sua funcionalidade. Os valores de  $F_v'/F_m'$  e de  $\phi_e$  foram afetados em todos os genótipos pela descida de temperatura (Fig. 2). A razão  $F_v'/F_m'$  diminuiu de forma gradual com a descida de temperatura, Icatu mostrando o menor (48%) e Piatã o maior (68%) decréscimo após o tratamento de “chilling”. A 15/10 °C apenas Icatu e Catuaí não mostraram reduções significativas de  $\phi_e$ , o que não sucedeu após o tratamento de “chilling” em que todos os genótipos foram significativamente afetados (Fig. 2). No entanto, Icatu foi menos afetado e mostrou os maiores valores absolutos de  $F_v'/F_m'$  e  $\phi_e$ . Após 6 dias a 25/20 °C todos os genótipos apresentaram completa recuperação desses parâmetros.

Em paralelo, analisou-se também a diminuição da fluorescência devido ao uso da energia captada para processos fotoquímicos ( $q_p$ ) e não-fotoquímicos ( $q_N$  e  $q_E$ ), sendo estes últimos ligados a processos de dissipação de energia (Fig. 2). Os resultados obtidos mostram que Icatu é o genótipo menos afetado (7%) na eficiência do uso da energia para fotossíntese ( $q_p$ ). Piatã apresentou o maior decréscimo (*ca.* 29%) de  $q_p$ .

No que se refere aos processos dissipativos não-fotoquímicos ( $q_N$ ), não houve grandes alterações em

qualquer dos genótipos. No entanto, um dos seus componentes, o coeficiente de extinção da fluorescência por energização das membranas tilacóidais (“high-energy quenching”),  $q_E$ , diminuiu significativamente em todos os genótipos, entre um mínimo de 57% (Catuaí) e um máximo de 79% (Piatã), após o tratamento de “chilling”. Um decréscimo significativo observou-se já a 15/10 °C, exceto em Apoatã. Em geral,  $q_E$  aumenta quando há um excesso de energia acumulada na forma de gradiente intratilacoidal ( $\Delta pH$ ). No nosso caso  $q_E$  diminuiu pelo que o  $\Delta pH$  não se terá desenvolvido, provavelmente devido à afetação do transporte de elétrons ( $\phi_e$ ) (Fig. 2). Por outro lado, se  $q_E$  diminuiu e  $q_N$  se manteve então  $q_I$ , o coeficiente de extinção da fluorescência relacionado com problemas de fotoinibição, terá aumentado, o que corrobora os efeitos observados ao nível do  $F_v'/F_m'$  (Fig. 2).

Durante o período de aclimação observou-se um aumento da perda de íons em todos os genótipos, exceto em Apoatã (Fig. 3). Com a exposição a 4 °C obtiveram-se os níveis máximos de afetação membranar, exceto em Icatu que não mostrou aumento da permeabilidade membranar e manteve os menores valores de perda de electrólitos. Deve-se notar que, no período de recuperação, os genótipos apresentaram uma redução da perda de íons para valores muito próximos aos das plantas-controle, exceto em *C. dewevrei*, indiciando a presença de mecanismos de reparação das membranas, principalmente os que envolvem o metabolismo dos lípidos (dados não apresentados).

Não se observaram alterações muito acentuadas dos teores de MDA, refletindo a ausência de uma degradação intensa de lípidos, já que o MDA é um dos produtos resultantes da peroxidação dos lípidos por processos enzimáticos (por ataque às ligações insaturadas). Ressalte-se que, exceto em *C. dewevrei*, os genótipos mostram tendência para diminuir o teor de MDA a 4 °C e na recuperação (Fig. 3). Tal terá por base alterações ao nível da composição lipídica das membranas que, no caso de Icatu, passam, principalmente, pela diminuição do teor de C18:3 (dados não apresentados), fato já observado em Catuaí em condições de alta irradiância [3]. Por sua vez, *C. dewevrei* mostra uma correlação entre o aumento do MDA (com o frio) e o aumento da perda de íons, sendo também afetado na síntese de ácidos graxos (dados não apresentados).

Os genótipos Piatã e Apoatã apresentaram a maior raiz pivô (Tab. 1). Icatu apresentou um comprimento da raiz pivô semelhante ao de *C. dewevrei* e significativamente maior do que a de Catuaí, o que lhe confere maior capacidade de exploração da água em camadas mais profundas do solo, relativamente a Catuaí.

Com relação ao peso de massa seca de raízes (primária, secundária e de ordem superior) houve uma predominância significativa de Piatã sobre Apoatã, que por sua vez foi superior aos demais materiais genéticos, que não diferiram entre si. Piatã mostra ainda a maior biomassa foliar, seguido de *C. dewevrei*. Os restantes 3 genótipos apresentam biomassa foliar significativamente menor, não diferindo entre si.

## CONCLUSÕES

Evidenciaram-se, nos diversos parâmetros estudados, diferenças entre genótipos nos tratamentos de “chilling”, que apontam para uma tolerância contrastante entre *C. dewevrei* (mais sensível) e Icatu (mais tolerante). Tais diferenças observaram-se não só durante o período de sujeição das plantas ao tratamento de “chilling” (3 noites a 4 °C), mas também em condições de frio moderado (15/10 °C) e de recuperação do tratamento de “chilling”. A maior (*C. dewevrei*) e menor (Icatu) sensibilidade ao frio imposto, observada nos vários parâmetros fotossintéticos, teve correspondência com as variações nos valores de perda de electrólitos e produção de MDA.

A análise sumária de crescimento parece indicar um maior vigor de Piatã, refletido em maior crescimento e acumulação de biomassa. No entanto, isso não teve correspondência positiva com os parâmetros fisiológicos estudados quando as plantas foram submetidas aos tratamentos de “chilling”.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- RAMALHO J.C., Pons T.L., Groeneveld H.W., Azinheira H.G. e Nunes M.A. (2000) Photosynthetic acclimation to high light conditions in mature leaves of *Coffea arabica* L.: role of xanthophylls, quenching mechanisms and nitrogen nutrition. *Aust. J. Pl. Physiol.* 27: 43-51.
- CAKMAK I. e Horst W. J. (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.* 83: 463-468.
- RAMALHO J.C., Campos P.S., Teixeira M. e Nunes M.A. (1998) Nitrogen dependent changes in antioxidant systems and in fatty acid composition of chloroplast membranes from *Coffea arabica* L. plants submitted to high irradiance. *Plant Sci.* 135: 115-124.

## **AVISO**

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS  
SEGUINTE ENDEREÇOS:

### **FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES**

Edifício Sede, s/nº. - Campus Universitário da UFV  
Viçosa - MG  
Cep: 36571-000  
Tels: (31) 3891-3204 / 3899-2485  
Fax : (31) 3891-3911

### **EMBRAPA CAFÉ**

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (Final)  
Edifício Sede da Embrapa - sala 321  
Brasília - DF  
Cep: 70770-901  
Tel: (61) 448-4378  
Fax: (61) 448-4425