

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, NUTRICIONAIS, FISIOLÓGICOS  
E BIOQUÍMICOS EM CAFEIRO

**FÁBIO LUIZ PARTELLI**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JULHO – 2008

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, NUTRICIONAIS, FISIOLÓGICOS  
E BIOQUÍMICOS EM CAFEIRO

**FÁBIO LUIZ PARTELLI**

"Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das Exigências para obtenção do  
título de Doutor em Produção Vegetal"

Orientador: Prof. Henrique Duarte Vieira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JULHO – 2008

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA/ UENF 061/2008

Partelli, Fábio Luiz

Aspectos microbiológicos, nutricionais, fisiológicos e bioquímicos em cafeeiro / Fábio Luiz Partelli. – 2008.

227 f. : il.

Orientador: Henrique Duarte Ferreira

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2008.

Bibliografia: f. 196 – 227.

1. Café 2. Ciclagem de nutrientes 3. Agricultura sustentável 4. Fisiologia vegetal 5. Bioquímica vegetal I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD– 633.73

# ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, NUTRICIONAIS, FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS EM CAFEIRO

**FÁBIO LUIZ PARTELLI**

"Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal"

Aprovada em 04 de julho de 2008.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira (Dr., Biologia Vegetal) - UENF

---

Prof. Marco Antônio Martins (Ph.D, Microbiologia do Solo) - UENF

---

Pesq. José Antonio Azevedo Espindola (Dr., Agronomia) - EMBRAPA

---

Prof. Henrique Duarte Vieira (Dr., Produção Vegetal) – UENF  
Orientador

***Aos meus pais:***

***Rosa e Hermes***

***“Longe, mas tão perto.  
Das aventuras, dos amigos do peito, do boteco, daquele futebol, dentre  
outras coisas, as quais quando longe sentimos muita falta, mas muitas  
vezes, quando perto não damos o devido valor.  
Longe, mas com “coração” repleto de alegrias em conhecer o novo, e com a  
expectativa do longe estar perto. Afinal o que é estar longe, quando se têm a  
confiança de que o desejado está perto e/ou dentro do coração.”***

***Pensamos sempre positivo!!!  
Fábio Luiz Partelli***

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, por nos dar muito mais que pedimos.

Aos meus pais, pelos ensinamentos, muitos deles adquiridos através de exemplos. Agradeço também pelo apoio, alegrias, entusiasmo e pelo amor.

Aos meus irmãos, pela simplicidade e apoio.

Aos meus sobrinhos/afilhado, por proporcionar alegrias e ótimas lembranças e auxiliar a viver de maneira mais simples e alegre.

Agradeço aos demais familiares de “sangue” e de “consideração”.

Ao professor Henrique Duarte Vieira, pela amizade, oportunidade, ensinamentos, companheirismo e pela orientação.

Ao pesquisador José Cochicho Ramalho, pela Co-orientação, aconselhamento e apoio nos trabalhos realizados em Portugal.

Aos pesquisadores da Embrapa Agrobiologia José Antonio A. Espindola e Segundo Urquiaga, pelas sugestões e apoio em parte dos trabalhos.

A outros professores da UENF que contribuíram com meus trabalhos de doutorado (Marco A. Martins, Alexandre Pio Viana, Silvério Paiva Freitas, Jurandi G. de Oliveira, Pedro H. Monnerat e Eliemar Campostrini).

Ao professor José A. Teixeira do Amaral pelos primeiros ensinamentos em pesquisa, durante o curso de Engenharia Agrônômica na UFES.

Agradeço às amigas e amigos brasileiros e residentes na nossa querida nação, que me proporcionaram bons momentos, me ajudando a “crescer”, e que, em muitos momentos, foram a minha família. (aqui, felizmente não irei citar nomes, pois são muitos!!!).

Às amigas e amigos brasileiros residentes em Portugal, que foram especiais na minha trajetória fora do país, fazendo sentir-me “em casa”.

Aos amigos e amigas Portuguesas e de outras nacionalidades, bem como os profissionais dedicados à investigação que ajudaram a desenvolver meus trabalhos em Portugal: as Ana (s), as Paula (s), as Inês (s), Isabel, Virginia, Manuela Chaves, Elizabet, Eduardo, Semedo e Santiago.

À família Alves, que me acolheram dentro de sua casa e de sua família.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, pela estrutura, na qual proporcionou a realização deste trabalho.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, pelo apoio financeiro de parte do trabalho e pela bolsa.

À EMBRAPA Agrobiologia, por fornecer estrutura para realização das análises de <sup>15</sup>N e de biomassa microbiana, além de algumas sementes de leguminosas e Rizóbios.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro – PESAGRO/RIO, por disponibilizar área com café Conilon para pesquisa.

Ao INCAPER, Fullin Laboratório, Chão Vivo e Projeto Café Sustentável, pela colaboração na realização de algumas análises e eventos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa “Sanduíche”.

Ao Instituto de Investigação Científica Tropical – IICT, pela estrutura de Laboratório, apoiado também pelo Instituto de Tecnologia Química e Biologia - ITQB e pelo - Instituto Nacional de Recursos Biológicos - INRB.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia - FCT e ao fundo europeu FEDER, pelo financiamento da pesquisa realizada em Portugal.

Aos agricultores, Gerson Coser e Jaudemir Bettim, que abriram as “porteiros” da propriedade, bem como o auxílio no campo e hospitalidade.

Ao professor Carlos Pimentel, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelas sementes de Milheto.

Ao viveirista Gabriel Burgarelli, por disponibilizar as mudas de café e ao Eng<sup>o</sup> Agrônomo Antônio Carlos Medeiros, Célio Espinosa e Jones da Silva Claudino, por contribuírem no processo de exportação de mudas de café.

Aos técnicos de laboratório e estagiários das instituições acima citadas.

A ELAS!!!!

## **BIOGRAFIA**

**Fábio Luiz Partelli**, filho de Hermes Joaquim Partelli e Rosa Maria Traspadini Partelli, nascido em Linhares, Espírito Santo, aos 06 dias de julho de 1979.

Formou-se em Técnico em Agropecuária em 1997, pela Escola Família Agrícola de Boa Esperança (EFABE).

Em março de 1998 iniciou o curso de Agronomia pela Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, onde foi bolsista de extensão e iniciação científica por 18 e 12 meses, respectivamente, e bolsista de iniciação científica do CNPq por 12 meses, sob orientação do Prof. José Augusto Teixeira do Amaral.

Em novembro de 2002, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal do Espírito Santo - UFES.

Em março de 2003 iniciou o curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, em nível de Mestrado, pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, obtendo o título de Mestre em Agosto de 2004, orientado pelo prof. Henrique Duarte Vieira.

Em agosto de 2004 iniciou o curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, em nível de Doutorado, pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Nesse período também realizou parte do doutorado “Sanduíche” em Portugal.



## SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	06
2.1. Cultura do café ( <i>Coffea</i> sp.)	06
2. 2. Produção orgânica	07
2. 3. Qualidade do solo	09
2. 4. Matéria orgânica	13
2. 5. Nitrogênio	14
2. 5. 1. Formas disponíveis no solo	14
2. 5. 2. Dinâmica do elemento no solo	15
2. 5. 3. Fixação biológica de nitrogênio	16
2. 5. 4. Adubação verde	17
2. 5. 5. Adubação verde no cafeeiro	20
2. 6. Baixas temperaturas positivas	27

3. TRABALHOS	31
3.1. CAPÍTULO 1: Aspectos microbiológicos e nutricionais em cafeeiro	31
Aspectos fitossociológicos e controle de plantas espontâneas utilizando espécies de cobertura no cafeeiro Conilon orgânico	31
Resumo	31
Abstract	32
Introdução	33
Material e métodos	35
Resultados e discussão	37
Conclusões	45
Agradecimentos	46
Referências bibliográficas	46
Fixação biológica e ciclagem de nutrientes de plantas de cobertura e seus efeitos em lavouras de café Conilon orgânico	50
Resumo	50
Abstract	51
Introdução	52
Material e métodos	54
Resultados e discussão	57
Conclusões	64
Agradecimentos	65
Referências bibliográficas	65
Atributos químicos e microbiológicos do solo em cafeeiro Conilon sob manejo orgânico e convencional	72
Resumo	72
Abstract	73
Introdução	74
Material e métodos	76
Resultados e discussão	81
Conclusões	91
Agradecimentos	91
Referências bibliográficas	92

3.2. CAPÍTULO 2: Aspectos fisiológicos e bioquímicos em cafeeiro	99
Classes lipídicas e ácidos graxos de cloroplastos de <i>Coffea</i> sp. submetidos a baixa temperatura positiva	99
Resumo	99
Abstract	100
Introdução	102
Material e métodos	104
Resultados	108
Discussão	125
Conclusões	132
Agradecimentos	133
Referências bibliográficas	134
Alterações fisiológicas e bioquímicas em genótipos de cafeeiro ( <i>Coffea</i> sp.) submetidos a baixas temperaturas positivas	140
Resumo	140
Abstract	142
Introdução	143
Material e métodos	145
Resultados	131
Discussão	168
Conclusões	181
Agradecimentos	182
Referências bibliográficas	182
4. RESUMO E CONCLUSÕES	193
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	196

## RESUMO

PARTELLI, Fábio Luiz; Engenheiro Agrônomo, D. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; julho, 2008; **Aspectos microbiológicos, nutricionais, fisiológicos e bioquímicos em cafeeiro**. Prof. Orientador: Henrique Duarte Vieira.

O trabalho foi dividido em dois capítulos. **Capítulo 1:** As plantas de cobertura proporcionam benefícios para a agricultura, entretanto se mal manejadas podem prejudicar o desenvolvimento da cultura. Os objetivos deste trabalho foram: (a) avaliar, em condições de campo, a interferência que as plantas de cobertura cultivadas nas entrelinhas de *Coffea canephora* cv. Conilon impõem sobre as plantas espontâneas, bem como verificar seu comportamento fitossociológico; (b) avaliar a ciclagem de nutrientes, a fixação biológica de nitrogênio e o efeito que as plantas de cobertura podem causar em lavoura de *C. canephora* cv. Conilon, sob manejo orgânico; (c) avaliar as características químicas e microbiológicas do solo sob cafeeiros Conilon (*C. canephora*) em manejo orgânico e convencional. Plantas de cobertura foram semeadas nas entrelinhas de um cafezal de 6,5 anos, conduzido sob manejo orgânico, com espaçamento de 2,0 x 1,5 m. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com quatro repetições, num arranjo fatorial com tratamentos adicionais: testemunha, milheto (*Pennisetum glaucum*) e as leguminosas feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), mucuna-anã (*Mucuna deeringiana*) e feijão-guandu (*Cajanus cajan*), com e sem inoculação com Rizóbio. Foram determinadas a matéria seca das plantas de cobertura, o crescimento e as concentrações de nutrientes no cafeeiro. Determinou-se, ainda,

a densidade, a frequência e abundância relativa, o índice de valor de importância e de similaridade das plantas espontâneas. Efetuaram-se, também, análises químicas de solo e das partes vegetativas das plantas espontâneas e de cobertura, bem como as concentrações foliares do cafeeiro. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) foi determinada pela técnica da abundância natural. Foram selecionadas duas áreas cultivadas com café Conilon (manejo orgânico e convencional) e uma área de fragmento de mata Atlântica, utilizada como referência. Realizou-se análise química, granulométrica, concentração do carbono e de nitrogênio da biomassa microbiana e atividade respiratória de microrganismos do solo, em janeiro e julho, nas profundidades de 0-10 cm e 10 a 20 cm. Os dados foram submetidos à análise multivariada e análise descritiva das variáveis. Foram identificadas 27 espécies, destacando-se *Bidens subalternans* e *Commelina benghalensis*. As plantas de cobertura promoveram modificações na dinâmica de sucessão de plantas espontâneas e não prejudicam o desenvolvimento do cafeeiro. Feijão-de-porco, mucuna-anã e milheto auxiliaram no controle de plantas espontâneas. A FBN contribuiu com cerca de 80% do N acumulado pelas leguminosas, sendo que a contribuição foi equivalente a 27 - 35 kg N ha<sup>-1</sup>. Dessa forma, as leguminosas podem suprir parte da necessidade de nitrogênio do cafeeiro Conilon. Não se observou efeito significativo das plantas de cobertura sobre as concentrações de nutrientes e o crescimento do cafeeiro Conilon. A inoculação com rizóbio não influenciou a ciclagem de nutrientes e FBN. O carbono da biomassa microbiana foi o atributo microbiológico do solo que mais contribuiu para agrupar as diferentes formas de cultivo. O solo do fragmento de mata Atlântica, seguido pelo solo de café Conilon sob manejo orgânico, apresentaram os melhores índices de qualidade de solo. Os atributos microbiológicos variaram conforme a época do ano e profundidade do solo, apresentando maiores valores de carbono e nitrogênio da biomassa microbiana na camada superficial, no mês de janeiro. Do ponto de vista nutricional, os sistemas de manejo estudados (orgânico e convencional) apresentaram respostas similares. **Capítulo 2:** Temperaturas baixas positivas afetam diversos componentes fisiológicos e bioquímicos das plantas. Contudo, essas possuem mecanismos de aclimatação que conferem tolerância a essas condições limitantes e uma melhor capacidade de recuperação após o fim do estresse. Os objetivos deste trabalho foram: (a) avaliar o impacto de baixas temperaturas

positivas no aparato fotossintético, através da análise da composição lipídica das membranas dos cloroplastos e na taxa fotossintética, em dois genótipos de *Coffea* sp. submetidos a baixas temperaturas positivas; e (b) contribuir na caracterização das respostas fisiológicas e bioquímicas de dois importantes genótipos de *C. canephora* e um genótipo de *C. arabica*, submetidos a baixas temperaturas positivas e ao período de recuperação subsequente, permitindo elucidar os mecanismos envolvidos em diferentes suscetibilidades a baixas temperaturas. Plantas com cerca de 1 ano de idade foram colocadas em câmaras de crescimento, onde permaneceram em condições controladas, quais sejam: temperatura de 25/20°C (dia/noite), irradiância 700-900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , atmosfera com 380  $\mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ , umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12h durante cerca de 10 dias. As plantas foram depois submetidas sucessivamente a um decréscimo gradual de 0,5°C diários da temperatura, desde 25/20°C até 13/8°C, um ciclo de 3 dias a 13/4°C e 14 dias de recuperação. Durante o experimento, foram avaliadas as trocas gasosas, a emissão de fluorescência da clorofila *a*, a atividade de algumas enzimáticas relacionadas com as vias fotossintéticas e respiratórias, assim como os teores de pigmentos fotossintéticos e de açúcares solúveis. Com a imposição das condições de baixas temperaturas observou-se a queda na taxa de fotossíntese líquida, acompanhada de um aumento da concentração interna de  $\text{CO}_2$ . Assim, o decréscimo daquela pode estar associada a problemas não-estomáticos, nomeadamente, relacionados com o funcionamento das membranas. O Conilon clone 02 foi o genótipo mais afetado, apresentando maior perda de folhas e menor recuperação da fotossíntese líquida após o fim das condições de estresse, seguido pelo clone 153, sendo Catucaí o menos afetado nesses parâmetros. O Catucaí apresentou maior grau de insaturação de lipídios (18/13°C) e maior porcentagem de ácido linolênico no fosfatidilglicerol, entre o controle e 13/8°C, sugerindo uma maior fluidez membranar. Os genótipos estudados apresentam sensibilidade a baixas temperaturas, mas com tolerância e capacidade de recuperação diferente, o que, conjugado com a análise a outros parâmetros, pode contribuir para uma correta escolha de cultivares e no melhoramento do gênero *Coffea* no que diz respeito à tolerância a baixas temperaturas. Em relação aos genótipos estudados, observou-se que ocorre melhor recuperação do Catucaí IPR 102, em comparação ao Conilon clone 02, o que poderá estar associado, além de outros fatores, à maior

taxa de atividade da ribulose-5P cinase (no período de recuperação), rubisco e malato desidrogenase (nos ciclos de baixas temperaturas e no início da recuperação), bem como a maiores concentrações de clorofilas e carotenóides totais (no período de recuperação), zeaxantina e luteína (em praticamente todos os pontos avaliados). A manutenção de maior grau de funcionalidade dos tecidos vegetais poderá, assim, estar ligada à manutenção da concentração da sacarose, com a imposição de baixas temperaturas. Por razões similares, o Conilon clone 153 apresentou melhor recuperação em comparação ao clone 02, sugerindo que, mesmo em diferentes genótipos selecionados a partir de uma mesma cultivar (*C. canephora* cv. Conilon), pode existir variabilidade genética relativamente aos mecanismos de proteção e aclimatação a baixas temperaturas. Em termos gerais, o genótipo Catucaí IPR 102 foi o que apresentou melhor recuperação (relativamente a diversos parâmetros, mas em particular à taxa de fotossíntese líquida) após o fim do período de estresse mais severo, seguindo-se o clone 153.

## ABSTRACT

PARTELLI, Fábio Luiz; Agronomist Engineer, D. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; July, 2008; **Microbiological, nutritional, physiological and biochemical aspects in coffee**. Prof. Adviser: Henrique Duarte Vieira.

The work was divided into two chapters. **Chapter 1:** The plants provide coverage for benefits for agriculture, however if poorly managed can harm the development of culture. The objectives of this work were: (a) evaluate the effect that cover crops, associated with *Coffea canephora* cv. Conilon, imposes to weed community; (b) The objective of this work was to evaluate nutrient cycling, nitrogen's biological fixation and the effect of cover crops over organic *C. canephora* cv. Conilon crops and (c) evaluate soil chemical and microbiological characteristics under conventional and organic management in Conilon (*C. canephora*) coffee areas. Cover crops were planted between the rows of an organic coffee plantation of 6.5 years old, with a 2.0 x 1.5 m arrange between coffee trees. The experiment was arranged in a complete randomized block design with four replicates in a factorial scheme with additional treatments: control, *Pennisetum glaucum* and legumes: *Canavalia ensiformis*, *Mucuna deeringiana* and *Cajanus cajan* with and without Rizobium inoculation. Cover crops dry weight, growth and nutrient contents on coffee trees were determined. Weeds density, frequency, relative abundance, importance value index and plant similarity index were also determined. The analysis of soil chemistry and vegetative parts of



spontaneous and cover plants, as well as the coffee leaf nutrient concentration were also performed. Biological Nitrogen Fixation (BNF) was determined by the natural abundance technique. Two areas cultivated with Conilon coffee (conventional and organic management) and one area of Atlantic Forest (used as reference), were selected. Chemical, texture, carbon and nitrogen microbial biomass and soil microorganism respiratory activity analysis were performed in January and July, at 0-10 cm and 10-20 cm depth. Multivariate and descriptive data analysis were performed. Twenty seven species were identified, with special emphasis on *Bidens subalternans* and *Commelina benghalensis*. Cover crops promote modifications on the succession dynamics of weeds and do not interfere with the development of coffee trees. *Canavalia ensiformis*, *Mucuna deeringiana* and *Pennisetum glaucum* help on weeds control. BNF contributed with near 80 % of the nitrogen accumulated by the leguminous plants, corresponding to 27 to 35 kg N ha<sup>-1</sup> nitrogen contribution of dry biomass. Thus, leguminous plants may supply part of the Conilon coffee nitrogen requirements. No significant effect of the treatments over Conilon coffee nutrient concentration or growth was observed. Rhizobium inoculation did not influence nutrient cycling and BNF. Microbial biomass carbon was the soil attribute that contributed the most to cluster the different cultivation methods. Atlantic Forest soil followed by the Conilon coffee under organic management showed the best soil quality indexes. Microbiological attributes vary according to year season and soil depth, showing higher values of carbon and nitrogen of the microbial biomass on surface levels in January. From the nutritional point of view, the management systems studied (conventional and organic coffee) had similar results. **Chapter 2:** Low positive temperatures affect several plant physiological and biochemical components. However, the plants present acclimation mechanisms that confer tolerance to such limiting conditions and better recovery ability after the exposure to stress. The objectives of this work were: (a) evaluate the impact of low positive temperatures (*chilling*) in the photosynthetic machinery, through the analysis of the lipid composition of chloroplast membranes, of leaf loss and of leaf gas exchange and characterize the (b) physiological and biochemical responses of *Coffea canephora* and *C. arabica* genotypes submitted to low positive temperatures, allowing to elucidate the mechanisms involved in cold tolerance/sensitivity. One year old plants were placed under control conditions of 25/20°C (day/night), irradiance of 700-900 µmol

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $380 \mu\text{L de CO}_2 \text{ L}^{-1}$ , 70% relative humidity and a photoperiod of 12 h, for about 10 days. The plants were then and submitted successively to 1) a gradual temperature decrease ( $0.5^\circ\text{C}$  per day) from  $25/20^\circ\text{C}$  to  $13/8^\circ\text{C}$ , 2) a 3 day chilling cycle ( $3 \times 13/4^\circ\text{C}$ ) and to 3) a recovery period of 14 days. During the experiment were evaluated at leaf level the gas exchanges, fluorescence of chlorophyll a, some enzyme activities (relate to photosynthetic and respiratory pathways), as well as the contents of photosynthetic pigments and soluble sugars. TWith cold imposition was observed a decrease in the net photosynthetic rate, accompanied by a rise in the internal  $\text{CO}_2$  concentration. In this way, such decrease will be associated to non-stomatal problems, namely with those related to the functioning of the membranes. Conilon clone 02 was the most affected genotype, showing the higher value of leaf loss and the lowest photosynthetic recovery after the stress imposition, followed by clone 153, being Catucaí the genotype less affected in these parameters. This genotype presented higher lipid unsaturation ( $18/13^\circ\text{C}$ ) and higher percentage of linolenic acid in phosphatidilglycerol between control and  $13/8^\circ\text{C}$ , suggesting a higher membrane fluidity. The studied genotypes present cold sensitivity but display differential tolerance and recovery capabilities, what, together with the analysis of other parameters may contribute for a correct selection of genotypes and to the breeding of *Coffea* genus in what concerns cold tolerance. In what concerns the studied genotypes, it observed that Catucaí IPR 102 presents a better recovery in comparison to Conilon clone 02, what might be associated, namely, to the higher activities of ribulose-5P kinase (during the recovery period), rubisco and malate dehydrogenase (during the low temperature cycles and in the beginning of recovery), as well as, due to higher total chlorophyll and carotenoid contents (under recovery), zeaxanthin and lutein (in almost of the evaluated data points). The maintenance of a higher functional status might be in turn related to the maintenance of sucrose contents during the cold imposition. By the same reasons clone 153 showed a better recovery in relation to clone 02, suggesting that even in genotypes selected from the same cultivar (*C. canephora* cv. Conilon) might exist genetic variability in relation to protection and acclimation mechanisms to low temperatures. In global terms the Catucaí IPR 102 genotype recovery better (concerning several parameters, in particular net photosynthetic rate) after the end of the stressful period, followed by the clone 153.

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o café movimenta anualmente aproximadamente 100 bilhões de dólares no mundo. A cadeia do café emprega direta e indiretamente meio bilhão de pessoas em todo o mundo (Embrapa, 2004). A cafeicultura brasileira destaca-se como um dos setores agrícolas mais importantes do país, pois é rentável, gera divisas e postos de trabalho, e, conseqüentemente, fixa o homem no campo, promove melhor interiorização e desenvolvimento nos municípios onde se produz e/ou processa (Silva e Costa, 1995; Matiello, et al., 2005).

O consumo moderado de café torrado e moído proporciona melhor concentração e aprendizado, inclusive para crianças (Encarnação e Lima, 2003), apresenta propriedades antioxidantes (Svilaas et al., 2003) e é antagonista opióide (Suzuk et al., 2002), que de forma indireta pode vir a reduzir o consumo de drogas (Encarnação e Lima, 2003). Além disso, o café pode diminuir a probabilidade de as pessoas apresentarem infarto do miocárdio (Matetzky et al., 2003), colesterol (Strandhagen e Thelle., 2003) e mal de Parkison (Ross et al., 2000).

O cultivo de café, utilizando o manejo convencional, ocorre em grande parte do território brasileiro, entretanto, com uma percepção de maior sustentabilidade de tal sistema de produção, a utilização de técnicas baseadas no manejo orgânico tem crescido, criando um novo nicho de mercado muito peculiar de cafés especiais, o nicho dos cafés orgânicos. Segundo Pedini (2000) e Penteado (2000), no cultivo de café orgânico existem alguns pontos favoráveis,

dentre eles, o enquadramento no mercado justo (mercado solidário, proveniente da agricultura familiar e que preserva os recursos naturais), a não existência de barreiras ambientais e a existência de um mercado disposto a pagar maior valor pelo produto, variando de 30 a 50%. Por outro lado, possuem limitações, como custo de certificação, falta de profissionais na área, falta de pesquisas específicas, custo de insumos e dificuldades em substituir a adubação nitrogenada (Pedini, 2000; Penteado, 2000). Para os cafeicultores orgânicos do café Conilon, além desses itens, há como limitações a não diferenciação do preço e a queda da produtividade das lavouras, sendo a última associada a dificuldade de encontrar insumos orgânicos disponíveis (Partelli et al., 2006a).

Nos últimos anos têm se observado a expansão da cafeicultura orgânica, mas os técnicos e agricultores envolvidos na atividade encontram dificuldades no cultivo das lavouras, principalmente, em conseguir produtividades elevadas com baixo custo de produção, na qual estão envolvidos questões de conservação de solo, microbiologia, física e química de solo e suprimento de nutrientes na lavoura. Esses problemas tornam-se muito significativos se considerar que o produtor rural atua num mercado altamente competitivo, de economia globalizada.

Estima-se que os gastos com fertilizantes e calcários representem 30% do custo total da produção do cafeeiro. Desses insumos utilizados no cafeeiro, os fertilizantes nitrogenados são responsáveis pelo consumo de, aproximadamente 200 mil toneladas por ano, representando um gasto estimado de cerca de R\$ 400 milhões no Brasil (Embrapa, 2004). Dessa forma, a melhoria da fertilidade e substituição de nitrogênio através de outras formas pode levar a produtividades satisfatórias, com menor custo de produção e maior sustentabilidade. A utilização de matéria orgânica é uma realidade entre os agricultores orgânicos e, de acordo com Fernandes et al. (2000), pode substituir a adubação química, desde que seja utilizada de forma equilibrada e balanceada.

Segundo Reich et al. (2001), a fixação mundial de N pela indústria é superior a 80 milhões de toneladas, enquanto a proveniente da fixação biológica fica em torno de 170 milhões de toneladas (Schlesinger, 1997). Esse valor pode ser influenciado, dentre outros fatores, pela inoculação de estirpes de bactérias apropriadas (Oliveira et al., 2002a) e aplicação de adubos fosfatados (Somado et al., 2006; Oberson et al., 2007; Pons et al., 2007).

A utilização de plantas de cobertura desponta como uma prática viável,

uma vez que tais espécies favorecem a densidade e diversidade de microrganismos edáficos, principalmente solubilizadores de P (Carneiro et al., 2004), melhora a estrutura do solo (Carvalho et al., 2004), proporciona a ciclagem de nutrientes e, quando se utilizam leguminosas, também promove, juntamente com bactérias específicas a fixação biológica do nitrogênio atmosférico (Oliveira et al., 2002a; Perin et al., 2004; Ricci et al., 2005; Alves et al., 2006; Teixeira et al., 2006; Pietsch et al., 2007). Dessa forma, tal prática contribui positivamente para o balanço de N e P (Castro et al., 2004; Chu et al., 2004; Alves et al., 2004), aumento do estoque de C e N no solo (Bayer et al., 2000) e, conseqüentemente, pode proporcionar aumento na produção das culturas (Heinrichs et al., 2002; Oliveira et al., 2002b; Spagnollo et al., 2002; Kaizzi et al., 2006) e também podem reduzir a infestação de plantas espontâneas em diversas culturas (Caetano et al., 2001; Fávero et al. 2001; Anthofer e Kroschel, 2005; Silva et al., 2006b).

No entanto, quando manejadas de maneira inadequada, podem provocar queda da produção (Paulo et al., 2006; Heinrichs et al., 2002). Assim, torna-se necessária a escolha de plantas de cobertura adaptadas às condições edafoclimáticas e com elevada capacidade de produção de biomassa. Dentre as características desejáveis para essas espécies, podem ser destacadas boa tolerância à seca, baixa exigência nutricional, rápido crescimento e boa capacidade de cobertura do solo. Dessa forma, a melhoria da fertilidade do solo e substituição e/ou complemento de N com a utilização de plantas fixadoras de N<sub>2</sub>, podem levar a produtividades satisfatórias com menor custo de produção e com maior sustentabilidade.

Temperaturas baixas positivas afetam diversos componentes do processo fotossintético, pois reduzem a energia cinética das moléculas, a condutância estomática, fotossíntese líquida, eficiência fotoquímica do fotossistema II, transporte tilacóidal de elétrons, atividade enzimática, metabolismo do carbono e o crescimento vegetal, alterando ainda a composição e a estrutura dos complexos de pigmentos fotossintéticos (Haldimann, 1998; Salonen et al., 1998; Allen e Ort, 2001; Strauss et al., 2007; Hund et al., 2008; Suzuki et al., 2008; Zhu et al., 2008) e a composição lipídica dos cloroplastos (Campos et al., 2003; Bohn et al., 2007). Esses efeitos também foram observados no gênero *Coffea* (Oliveira et al., 2002b; Silva et al., 2004), com intensidades distintas entre diferentes espécies (Campos et al., 2003; Ramalho et al., 2003; Silva et al., 2004), devido provavelmente a

características morfo-fisiológicas distintas entre as espécies, como acontece entre *C. arabica* e *C. canephora* (DaMatta et al., 1997; Carvalho et al., 2001; Ramalho et al., 2003).

O cafeeiro, quando cultivado em latitudes superiores a 15° S, apresenta um decréscimo acentuado na taxa de crescimento no inverno (Barros e Maestri, 1974; Barros et al., 1997; Mota et al., 1997; Libardi et al., 1998; DaMatta et al., 1999; Amaral et al., 2001, 2006; Nazareno et al., 2003; Silva et al., 2004). Contudo, os cafeeiros possuem mecanismos de defesa/aclimação que passam por alterações quantitativas e qualitativas dos lipídios membranares e pelo aumento da capacidade de dissipação do excesso de energia, que conferem uma maior tolerância ao frio e uma melhor recuperação após o fim do estresse (Campos et al., 2003; Ramalho et al., 2003). Além disso, podem possuir enzimas antioxidantes, fundamentais na defesa da planta (Dewir et al., 2006).

Recentemente, o cultivo de café Conilon em áreas de maior altitude (temperatura baixa positiva) tem crescido. Agricultores e pesquisadores acreditam que o cultivo do Conilon pode ser mais uma alternativa de cultivo nestas condições, uma vez que a espécie apresenta maior tolerância a condições de estresse biótico e abiótico, apesar de ser mais susceptível a baixas temperaturas em comparação ao café Arábica (DaMatta et al., 1997; Ramalho et al., 2003), podendo, portanto, ser uma alternativa.

Um conhecimento interdisciplinar que permita integrar os diversos componentes de um agrossistema (solo - planta - ambiente) é importante para melhor entender os fatores que estão relacionados à produtividade e manejo dos cafeeiros. Assim, estudos sobre questões microbiológicas, químicas e físicas do solo, nutricionais, fisiológicas e bioquímicas da planta e a utilização de leguminosas podem contribuir para um melhor manejo dessas lavouras, podendo colaborar para um melhor manejo.

No Brasil, existem muitas lavouras sob o sistema de cultivo convencional, em transição e orgânico; portanto, este trabalho poderá dar suporte aos produtores e profissionais da área agrícola sobre questões de conservação de solo, utilização de leguminosas e nutrição do cafeeiro, fatores que estão intimamente relacionados com a proteção e conservação do ambiente, a produtividade da lavoura e com o custo de produção do café e, conseqüentemente, com a sustentabilidade da atividade. Também, por intermédio

de estudo fisiológico e bioquímico do desenvolvimento do cafeeiro no decorrer do ano e sob estresse a baixas temperaturas, pode-se esclarecer os mecanismos fisiológicos e bioquímicos de defesa e adaptação das plantas a essas condições, podendo auxiliar no manejo e no processo de seleção de variedades tolerantes a baixas temperaturas.

Dessa forma, os objetivos deste trabalho são:

1. Avaliar, em condições de campo, a interferência que as plantas de cobertura cultivadas nas entrelinhas de *Coffea canephora* cv. Conilon impõem sobre as plantas espontâneas, bem como verificar seu comportamento fitossociológico.

2. Avaliar a ciclagem de nutrientes, a fixação biológica de nitrogênio e o efeito que as plantas de cobertura podem causar em lavoura de *C. canephora* cv. Conilon, sob manejo orgânico.

3. Avaliar as características químicas e microbiológicas do solo sob cafeeiros Conilon (*C. canephora*) em manejo orgânico e convencional.

4. Avaliar o impacto de baixas temperaturas positivas no aparelho fotossintético através da análise da composição lipídica das membranas dos cloroplastos e na taxa fotossintética, em dois genótipos de *Coffea* sp., submetidos a baixas temperaturas positivas.

5. Contribuir para a caracterização das respostas fisiológicas e bioquímicas de dois importantes genótipos de *C. canephora* e um genótipo de *C. arabica*, a baixas temperaturas positivas e ao período de recuperação subsequente, permitindo elucidar os mecanismos envolvidos em diferentes suscetibilidade a baixas temperaturas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Cultura do café (*Coffea* sp.)

O genero *Coffea* é representado por pelo menos 103 espécies, no entanto o *C. arabica* e *C. canephora* são aqueles que se destacam comercialmente (Davis et al., 2006). A produção mundial do café nos últimos anos tem sido superior a 110 milhões de sacas, produzido principalmente nos países considerados em desenvolvimento, como o Brasil (1<sup>o</sup>), seguido pelo Vietnã, Colômbia, Indonésia, Etiópia, Peru e México (ICO, 2008). O agronegócio cafeeiro movimenta aproximadamente 100 bilhões de dólares e emprega direta e indiretamente 500 milhões de pessoas em todo o mundo (Embrapa, 2004). Os Estados Unidos, seguido pela Alemanha, Japão, Itália e França, são os maiores importadores. (ICO, 2008).

O Brasil também é o maior exportador mundial de café, gerando divisas e postos de trabalho e, conseqüentemente, fixando o homem no campo e promovendo melhor interiorização e desenvolvimento nos municípios onde se produz e/ou se processa o café, o que faz da cultura um dos setores agrícolas mais importantes do país (Matiello et al., 2005). Na safra de 2006/2007 a produção brasileira de café Arábica foi de 33 milhões de sacas e de café Conilon foi de 9,5 milhões, numa área de 2,15 milhões de hectares com 5,67 bilhões de cafeeiros (Conab, 2007), sendo exportados, em 2007, 28 milhões de sacas, o que



equivale a 65% da produção nacional e aproximadamente, 29% das exportações mundiais do produto (ICO, 2008).

A cultura de café no Brasil está concentrada principalmente nos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo. Apresentou uma produção de 42,5 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado na safra de 2006/2007, numa área de 2,3 milhões de hectares (92,7% em produção e 7,3% em formação), e num total de, aproximadamente, 5,5 milhões de cafeeiros (Conab, 2007). A cultura está presente em 1850 municípios e em 300 mil propriedades, empregando direta e indiretamente 8,4 milhões de pessoas (Coelho, 2002).

Dentre as espécies do gênero *Coffea*, *C. arabica* e *C. canephora* são as duas espécies cultivadas no Brasil, as quais representam uma produção de, aproximadamente, 77,7% e 22,3%, respectivamente (Conab, 2007). O café Arábica representa 100% da produção do café nos Estados de São Paulo e Paraná, 99,9% em Minas Gerais, 76,6% na Bahia e 23,6% no Espírito Santo, sendo cultivado em áreas com altitude geralmente superior a 400 metros. Por outro lado, o café Robusta (*C. canephora*), do qual a cultivar Conilon é preponderante, representa 100% da produção dos Estados de Rondônia e Pará e 76,4% no Espírito Santo (Conab, 2007), sendo cultivado, predominantemente, em áreas com altitude até 400 metros e latitude inferior a 21º Sul.

A bebida do café Conilon é mais encorpada, menos aromática e apresenta pouca acidez e mais sólidos solúveis (Leite e Silva, 2000), sendo essa espécie apropriada para solubilização e elaboração de “blends”, para cafés torrados (Silva e Leite, 2000), expressos e solúveis (Reuvas et al., 1997), segmento este que tem apresentado boas oportunidades, pois há um aumento do consumo de cafés prontos. De acordo com Lima (1991) e Encarnação e Lima (2003), o café torrado e tomado moderadamente faz bem a saúde, sendo a quarta bebida na preferência nacional, depois da água, refrigerante e sucos naturais.

## **2. 2. Produção orgânica**

O sistema orgânico de produção agropecuária é aquele em que se adotam tecnologias que otimizem o uso de recursos naturais e socioeconômicos, respeitando a integridade cultural. Tem como objetivo a auto-sustentação, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energias

não renováveis e a eliminação do uso de agrotóxicos e outros insumos artificiais tóxicos, organismos geneticamente modificados-OGM/transgênicos, ou radiações ionizantes em qualquer fase do processo de produção, armazenamento e de consumo, e entre os mesmos. Dessa forma, privilegia a preservação da saúde ambiental e humana, assegurando a transparência em todos os estágios da produção e da transformação (Brasil, 2003). Deve ser economicamente viável, ecologicamente sustentável, socialmente justa e culturalmente aceitável (Alvarenga et al., 2002).

A agricultura convencional trouxe muito progresso para a Ciência Agrônoma em termos de conhecimentos e de produtividade por unidade de área a curtos prazos; entretanto, trouxe problemas como a perda de fertilidade dos solos, aumento do ataque de insetos/pragas e doenças das plantas, decréscimos da qualidade ambiental pela contaminação de alimentos e degradação do meio por agroquímicos e exploração inadequada das culturas (Paschoal, 1995). Nesse contexto, a agricultura orgânica desponta no início do Século XXI como o novo paradigma para a solução de parte desses problemas, podendo promover um desenvolvimento rural mais sustentável, principalmente no que se refere à agricultura familiar (Deffune, 2001; Theodoro, 2001; Ricci et al., 2002).

No Mundo, existem cerca de 23 milhões de hectares, que são manejados organicamente em aproximadamente 400.000 propriedades, representando, aproximadamente, 1% do total das terras agrícolas do mundo (Yussefi, 2003). De acordo com Kortbech-Olesen (2003), citado por Darolt (2003), o comércio mundial de alimentos orgânicos (considerando 16 países Europeus, América do Norte e Japão) movimentou, aproximadamente, US\$ 17,5 bilhões em 2000, e cerca de US\$ 21 bilhões em 2001, podendo atingir entre US\$ 29 a 31 bilhões em 2005. Entretanto, é importante destacar que esses dados não são oficiais.

No Brasil foram cultivados 275.576 hectares por 14.868 produtores em 2001, ocupando 0,08% das terras agricultáveis do país, isto sem considerar o recente acréscimo de cerca de 500.000 hectares de pastagens orgânicas (Darolt, 2003). Em relação ao café orgânico brasileiro, tem-se notado um salto na produção, onde no ano de 1995 exportou-se 432 sacas de 60 kg (Caixeta e Pedini, 2002), e em 2004 exportou-se, aproximadamente, 5.000 sacas orgânicas de café arábica. O consumo de cafés especiais tem crescido numa taxa de 15%

ao ano (Embrapa, 2004), entretanto, os cafeicultores de café Conilon não estão atingindo um mercado diferenciado e satisfatório (Partelli et al., 2006a).

### **2. 3. Qualidade do solo**

Na avaliação da qualidade do solo levam-se em consideração os seus aspectos funcionais e, segundo Doran e Parkin (1994), a qualidade do solo é a capacidade desse funcionar dentro dos limites do ecossistema para sustentar a produtividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde de plantas e animais e, de acordo com Kimpe e Warkentin (1998), citado por D'Andrea et al. (2002), a restauração da qualidade do solo, após cultivos desordenados e conseqüentes processos de degradação, relaciona-se diretamente com o restabelecimento dessas funções.

Os microrganismos são cruciais ao equilíbrio e sustentação dos ecossistemas terrestres e aquáticos, pois desempenham funções ímpares e fundamentais, como ciclagem de nutrientes, decomposição de resíduos orgânicos, fertilização de solos, controle biológico, fixação biológica de nitrogênio, dentre muitas outras funções. Por outro lado, podem acarretar problemas como doenças às plantas, produzir hormônios indesejáveis para determinada situação e outras, mas longe de se comparar com os benefícios advindos pelos mesmos (Moreira e Siqueira, 2002).

Os microrganismos são importantes tanto na biociclagem, como no armazenamento de nutrientes em suas células, protegendo-os, principalmente, o fósforo da absorção pelos colóides do solo e, conseqüentemente, mantendo maior quantidade de nutrientes na forma disponível por mais tempo (Conte et al., 2002).

Apesar de se conhecer as imensas vantagens dos microrganismos, que são insubstituíveis, e saber das mudanças de ambiente ocasionadas principalmente pelo desmatamento, queimadas e uso inadequado das tecnologias agrícolas, o homem tem agido de forma irracional e insustentável, acarretando perda do potencial agrícola e redução de atividade, diversidade e quantidade microbiana. Dessa forma, tem se buscado obter um conhecimento mais abrangente sobre os microrganismos do solo, para, assim, empregá-los na agricultura de uma maneira eficiente, prática e sustentável.

O carbono presente na biomassa microbiana (Cmic) é o carbono em início de transformação no solo e funciona como energia armazenada para processos microbianos e, devido apresentar respostas rápidas às alterações no solo, pode ser utilizado como identificador precoce de alterações na matéria orgânica (D'Andréa et al., 2002) e indicar qualidade do solo (D'Andréa et al., 2002; Matsuoka et al., 2003), sendo um indicativo de alterações na atividade microbiana do solo (Pereira et al., 2004).

Pesquisadores como D'Andréa et al. (2002), Matsuoka et al. (2003), Mendes et al. (2003), Perez et al. (2004) têm relatado que o valor do Cmic é maior em solos não alterados (vegetação nativa), e o mesmo ocorre com o fósforo microbiano e com a atividade da fosfatase ácida (Conte et al., 2002), o que é uma situação bastante particular para microbiota do solo nesse sistema, sendo estimulada pelo fornecimento contínuo de materiais orgânicos distintos, com diferentes graus de susceptibilidade à decomposição, provenientes da grande diversidade da vegetação nativa. Nesse ambiente também existe maior diversidade de compostos orgânicos depositados na rizosfera, o que, segundo D'Andréa et al. (2002), constitui um fator favorável à sobrevivência e crescimento dos diferentes grupos de microrganismos do solo.

Por outro lado, Theodoro et al. (2003a), ao trabalharem com café Arábica sob diferentes manejos (orgânico, convencional e em conversão), contrastando com mata nativa, verificaram que não houve diferença no carbono da biomassa microbiana entre os sistemas estudados; portanto, relatam que cinco anos de sistema orgânico não foram suficientes para verificar diferenças significativas. Verificaram-se diferenças apenas entre as épocas estudadas, sendo maior no verão (época chuvosa) em relação ao inverno (época seca), o que, segundo os mesmos autores, pode estar relacionado com a manutenção da umidade do solo, a liberação de exudatos radiculares e a morte das células das raízes.

Trabalhos comparando sistemas de plantio direto com convencional têm demonstrado que há maior presença de Cmic no sistema de plantio direto com passar de vários anos (Balota et al., 1998; D'Andréa et al., 2002; Mendes et al., 2003). Assim, a diversidade e abundância de microrganismos decompositores, juntamente com a ausência de perturbações decorrentes de atividade antrópica, tornam possível a existência de maiores teores de biomassa microbiana, indicando o maior equilíbrio da microbiota do solo nesse ambiente.

O quociente microbiano (relação  $C_{mic}/\text{carbono orgânico} - CO$ ), segundo Sparling (1992), é influenciado pelo grau de estabilidade do carbono orgânico e o histórico do manejo do solo; portanto, expõe que é necessário estabelecer um valor base para cada região de estudo e, segundo o mesmo autor, não deve ser avaliada isoladamente, devido o seu comportamento variado. Balota et al. (1998), verificaram valores mais elevados de  $C_{mic}/CO$  no plantio direto em relação ao convencional.

A atividade microbiana da biomassa pode ser avaliada pela respiração basal, pela liberação de  $CO_2$  em amostras coletadas no campo, sendo a quantidade de carbono liberado indicativo de carbono lábil ou prontamente metabolizável do solo (Doran e Parkin, 1996). Estudos realizados por Balota et al. (1998), mostraram valores maiores da respiração basal no plantio direto em relação ao convencional e atribuíram essa ocorrência ao fato de que nesse sistema há uma maior atividade biológica, justificada pelo acúmulo de matéria orgânica rica em frações lábeis à superfície do solo (Vargas e Scholles, 2000), e, segundo Nsabimana et al. (2004), a adição de matéria orgânica proporciona maior atividade e catabolismo na comunidade microbiana.

Segundo Assis Júnior et al. (2003), o sistema de mata nativa com 559,37  $mg CO_2 m^{-2} h^{-1}$  e pastagens em monocultura e consorciada com eucalipto com 538,25 e 488,81  $mg CO_2 m^{-2} h^{-1}$ , respectivamente, que apresentaram maior atividade biológica, enquanto os menores valores foram registrados no arroz e na área desmatada com 202,82 e 165,16  $mg CO_2 m^{-2} h^{-1}$ , respectivamente. Esses mesmos pesquisadores descrevem que altos valores da taxa respiratória em sistemas com pastagens solteira e consorciada com eucalipto podem estar relacionados à grande quantidade de biomassa microbiana acumulada na serapilheira e nas fezes de animais sob essas coberturas vegetais.

O quociente metabólico,  $qCO_2$  (relação entre a quantidade de  $CO_2$  produzido por unidade de carbono da biomassa microbiana e por unidade de tempo), segundo Anderson e Domsch (1993), permite avaliar os efeitos ambientais e antropogênicos sobre a atividade microbiana do solo e, em solos sob floresta, foi indicador sensível para estimar o potencial de decomposição da matéria orgânica (Gama-Rodrigues et al., 1997). No sistema convencional, o revolvimento do solo contribui para promover perturbações promotoras de estresse na população microbiana, e as adições de carbono nesses sistemas são

pequenas; assim os microrganismos terminam por consumir o carbono orgânico do solo, causando sua redução. Nesse sentido, Anderson e Domsch (1993), sugerem que maiores valores de  $q\text{CO}_2$  indicam que a população microbiana está consumindo mais carbono oxidável para a sua manutenção, fato encontrado por Balota et al. (1998) em plantio convencional.

Deve-se considerar, também, que apenas 15 a 30% da biomassa microbiana do solo é ativa (Mac Donald, 1986) e que o restante dos microrganismos do solo ocorre em formas latentes ou inativas, com baixa atividade metabólica (Moreira e Siqueira, 2002). Isso pode causar dificuldades na interpretação dos valores de  $q\text{CO}_2$ , pois esse leva em consideração o teor total de carbono da biomassa microbiana do solo.

Considerando todo o nitrogênio encontrado na matéria viva, 94% encontra-se nas plantas, 4% na microbiota e 2% nos animais. O nitrogênio encontra-se distribuído no solo, principalmente em quatro formas, dentre elas o  $\text{N}_2$ , N orgânico, N- $\text{NH}_4$  e N- $\text{NO}_3$ , contendo, respectivamente, 11.500, 7.250, 10 e 50  $\text{kg ha}^{-1}$  (Moreira e Siqueira, 2002). Assim, o solo pode ser considerado o principal reservatório de ligação entre os componentes da biosfera (Rochette e Angers, 1999).

A biomassa microbiana é a parte viva da matéria orgânica do solo e contém de 1 a 4% de carbono e de 3 a 5% de nitrogênio, os quais representam um reservatório de nutrientes para as plantas, que através do processo de decomposição da matéria orgânica, promove a sustentabilidade biológica e a produtividade nos ecossistemas (Schloter et al., 2003). A imobilização ou liberação dos nutrientes depende da dinâmica dos microrganismos do solo, da quantidade de resíduos vegetais e da eficiência da utilização de carbono pela microbiota presente (Baudoin et al., 2003). A biomassa microbiana responde de maneira rápida a adição de insumos orgânicos aplicados no solo, determinando a decomposição da matéria orgânica, a relação C:N, a mineralização e a imobilização de nutrientes (Hatch et al., 2000).

O rápido retorno de N no solo pelos microorganismos contribui para o processo de mineralização e é considerado relevante para a manutenção de ecossistemas naturais (Jenkinson et al., 2000). Gama-Rodrigues et al. (1997) relataram que a baixa fertilidade do solo em áreas sob cerrado nativo pode reduzir

a taxa de decomposição da matéria orgânica, acarretando uma imobilização de N na biomassa microbiana, e esta funcionando como reserva.

Perez et al. (2005), ao trabalharem com diferentes sistemas de manejo (semeadura direta, uma gradagem, subsolagem e duas gradagens), comparando com solo do cerrado nativo, concluíram que o nitrogênio da biomassa microbiana em solos não perturbados apresentam maiores valores em comparação aos solos cultivados e que o nitrogênio microbiano e total diminuem com o aumento da profundidade do solo.

A simbiose micorrízica no cafeeiro é importante, pois o cafeeiro apresenta elevada tendência a se associar com fungos micorrízicos arbusculares, principalmente na fase de mudas, e essa simbiose pode ser influenciada de acordo com tipo de manejo (Moreira e Siqueira, 2002). Em um trabalho realizado por Theodoro et al. (2003a), com café Arábica sob diferentes manejos (orgânico, convencional e em conversão), contrastando com mata nativa, a colonização micorrízica, bem como a interação entre sistemas e épocas não apresentou diferenças significativas entre os quatro sistemas estudados. Nesse mesmo trabalho, relatam que há diferenças de predominância de certas espécies de fungos de acordo com sistema de cultivo, pois esses solos apresentam-se diferentes, entretanto, a diversidade foi similar entre as quatro áreas estudadas. Trabalhos relatados por Marschner e Dell (1994), Martins e Read (1996) e Martins e Cruz (1998) mostram que há transferência representativa de nutrientes entre plantas através de micorrizas.

#### **2. 4. Matéria orgânica**

A matéria orgânica do solo representa um sistema complexo de substâncias, cuja dinâmica é governada pela adição de insumos orgânicos de diversas naturezas e formas e pela sua transformação contínua sob ação de fatores biológicos, químicos e físicos. A matéria orgânica tem sua formação auxiliada por bactérias e fungos, contendo, em média, de 2 a 5 % do carbono orgânico, de 1 a 5% do nitrogênio e de 2 a 20% do fósforo orgânico nos solos tropicais (Smith e Paul, 1990) e, segundo Conte et al. (2002), a matéria orgânica protege as enzimas da decomposição. Na superfície do solo, a matéria orgânica também fornece nutrientes para as espécies vegetais, com influência na retenção

de cátions, estabilidade da estrutura do solo, infiltração e retenção de água, na aeração do solo e na atividade da biomassa microbiana, constituindo-se, dessa forma, um componente essencial da capacidade produtiva do solo e, conseqüentemente, das culturas (Santos e Camargo, 1999).

A matéria orgânica é constituída pelos produtos da decomposição dos resíduos orgânicos e do metabolismo microbiano, como carboidratos, resinas, ligninas, aminoácidos, proteínas e outros resíduos. Outra parte da matéria orgânica no solo, cuja representatividade fica entre 85 a 90% da reserva total de carbono orgânico, são as substâncias húmicas, que metodologicamente podem ser separadas em frações, usualmente separadas em três categorias: as huminas, que é a matéria orgânica intimamente ligada à fração mineral do solo, sendo, portanto, insolúvel; os ácidos fúlvicos, os quais possuem conteúdo elevado de grupamentos funcionais oxigenados, portanto, são solúveis em meio ácido e básico; e os ácidos húmicos, insolúveis em meio fortemente ácido, pois com a protonação dos grupamentos funcionais, há ocorrência de colapso da estrutura e precipitação das macromoléculas, e é a fração mais estável da matéria orgânica humificada (Zech et al., 1997, citado por Schiavo, 2005). Dessa forma, o estudo das frações humificadas pode ser utilizado para verificar a qualidade da matéria orgânica, do humus (Schiavo, 2005) e, possivelmente, verificar a atividade microbiana do solo.

Geralmente, quando os solos são cultivados há diminuição nos teores de matéria orgânica e de fósforo orgânico, devido a ocorrência de alterações na vegetação, mobilização e arejamento do solo, com conseqüente aumento da atividade microbiana e retirada de nutrientes (Magid et al., 1996, citado por Conte et al., 2002).

## **2. 5. Nitrogênio**

### **2. 5. 1. Formas disponíveis no solo**

O nitrogênio é um constituinte importante do planeta, principalmente na litosfera, onde é distribuído nas rochas, fundo dos oceanos e sedimentos, que contêm  $1.10^{23}$  g de nitrogênio, representando 98% do nitrogênio existente. O nitrogênio na forma gasosa está na concentração de 78% da atmosfera, a qual



tem um estoque estimado de  $3,9 \cdot 10^{21}$  g nitrogênio em formas não combinadas ( $N_2$ ), sendo o segundo maior reservatório. Na biosfera encontra-se entre 2,8 a  $6,5 \cdot 10^{21}$  g de nitrogênio, sendo que do total de nitrogênio orgânico terrestre, 96% estão na matéria orgânica morta e apenas 4%, nos organismos vivos. O nitrogênio da matéria orgânica viva encontra-se predominantemente nas plantas (94%), 4% na microbiota e 2% nos animais (Moreira e Siqueira, 2002).

No solo o nitrogênio encontra-se distribuído em vários compartimentos com os seguintes valores em  $kg \cdot ha^{-1}$ :  $N_2 = 11.500$ , N-orgânico = 7.250,  $N-NH_4^+ = 10$  e  $N-NO_3^- = 50$ . O nitrogênio encontra-se no solo em forma de nitrato ( $NO_3^-$ ), amônio ( $NH_4^+$ ), nitrito ( $NO_2^-$ ), óxido nitroso ( $N_2O$ ), óxido nítrico (NO), nitrogênio elementar ( $N_2$ ), como uréia, proteínas, aminoácidos livres, aminas, açúcares, peptídeos, quitina, quitobiase, peptidoglicano, ácidos nucleicos, bases nitrogenadas, aminados e nos compostos orgânicos (Moreira e Siqueira, 2002). No entanto, estes valores podem variar de maneira significativa conforme, principalmente, a origem do solo, condições climáticas e manejo do solo.

### 2. 5. 2. Dinâmica do elemento no solo

A maior parte das reservas de nitrogênio do solo é proveniente da fixação biológica, sendo que também há incremento de nitrogênio através de fertilizantes, descargas elétricas e antropogênica. Entretanto, há perdas por desnitrificação, deposição, lixiviação e erosão (Tabela 1).

**Tabela 1** – Fluxo global do N no solo. Fonte: Paul e Clark (1996), citado por Moreira e Siqueira (2002)

<b>Processo</b>	<b>Milhões de toneladas de nitrogênio/ano</b>	<b>Processo</b>	<b>Milhões de toneladas de nitrogênio/ano</b>
N- mineralizado no solo	3000	Absorção pelas plantas	1200
<b>Adições totais</b>	<b>320 (100)</b>	<b>Perdas totais</b>	<b>312 (100)</b>
Fixação biológica	175 (56)	Desnitrificação	135 (43)
Fertilizantes	85 (26)	Deposição de $NH_3$	62 (20)
Deposição atmosférica	20 (6)	Lixiviação	90 (29)
Antropogênica	40 (12)	Erosão	25 (8)

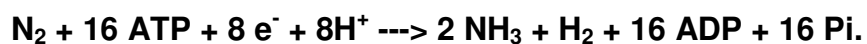
Números entre parênteses são contribuições relativas de cada processo em relação ao total.

Através da descarga elétrica ocorre a formação de óxidos de nitrogênio, que são arrastados e incorporados ao solo. Já no processo industrial, denominado de Haber-Bosch, o nitrogênio e hidrogênio, na forma de gases, são submetidos a altas temperaturas (500 a 600°C) e alta pressão atmosférica (200 atmosferas).  $N_2 + 3H_2 = 2NH_3$  (amônia) (Epstein e Bloom, 2006).

### 2. 5. 3. Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio é encontrado de forma abundante na atmosfera na forma estável, devido a uma forte ligação triplíce entre as duas moléculas de nitrogênio. Mesmo sendo encontrado em grandes quantidades, a maioria dos organismos, animais e vegetais, não consegue incorporar essa forma de nitrogênio a esqueletos de carbono, portanto, este pode ter suas ligações rompidas por alguns microrganismos e ser incorporado de outras formas (Epstein e Bloom, 2006).

A fixação biológica do  $N_2$  ocorre devido a uma enzima, denominada nitrogenase, que se encontra presente em alguns organismos fixadores de N. Do ponto de vista energético, ela é dispendiosa para o organismo que a realiza, pois segundo Heytler et al. (1984), citado por Epstein e Bloom (2006), no metabolismo de carboidrato em leguminosas a planta consome 12 gramas de carbono orgânico por grama de  $N_2$  fixado, entretanto, há relatos que a maioria dos gastos energéticos fica em torno de 6 a 8 gramas de carbono por grama de nitrogênio (Moreira e Siqueira, 2002). Apesar disso, devido à presença de um sistema enzimático, a reação pode ocorrer à temperatura ambiente e pressão atmosférica de acordo com a Reação:



A associação entre plantas e procariontes que fixam nitrogênio tem muitas formas. Essas bactérias ocupam parte do tecido vegetal e podem fornecer quantidades significativas de nitrogênio (Urquiaga et al., 1992; Oliveira et al., 2002b). Dessa forma, pode-se citar exemplos conhecidos de associações entre bactérias Rhizobiaceae e plantas leguminosas: o gênero *Azorhizobium* com o gênero *Sesbania*, *Bradyrhizobium japonicum* com *Glycine max* (soja), *Rhizobium meliloti* com *Medicago sativa* (alfafa), *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* com *Vicia faba* e com *Pisum sativum* (ervilha) e, *Rhizobium leguminosarum* biovar

phaseoli com *Phaseolus vulgaris*, dentre outros. Vale lembrar que também há uma série de organismos de vida livre que fixam nitrogênio (Moreira e Siqueira, 2002).

A simbiose entre leguminosas e rizóbios não é obrigatória. Os rizóbios ocorrem de maneira livre no solo e as plantas crescem independentes desses. No entanto, principalmente sob condições de limitação de nitrogênio, os simbiotes, por meio de troca de sinais, se “encontram”. Depois da sinalização ocorre o processo de infecção, desenvolvimento dos módulos e fixação do nitrogênio (Epstein e Bloom, 2006), processo que envolve a nitrogenase (Taiz e Zieger, 2002). Para ocorrer esses processos o ambiente deve estar propício. Vários genes de plantas e de rizóbios estão envolvidos e participam na formação de nódulos (Heidstra e Bisseling, 1996; van Rhijn et al., 1998) e mais de 50 genes envolvidos nos outros processos (Moreira e Siqueira, 2002).

Vários fatores podem afetar a fixação biológica de nitrogênio, dentre eles destacam-se: a espécie, o genótipo, a idade da planta, o pH do meio, a fertilidade do solo, umidade, salinidade, temperatura, elemento tóxico e outros fatores (Moreira e Siqueira, 2002).

#### **2. 5. 4. Adubação verde**

A adubação verde consiste em cultivar espécies vegetais para produzirem biomassa, que após seu corte serão adicionados ao solo, objetivando manter e/ou aumentar a matéria orgânica e a cobertura do solo e, conseqüentemente, deixá-lo em melhores condições para o desenvolvimento da cultura de interesse comercial (Bayer e Mielniczuk, 1997). Vários pontos básicos devem ser considerados para conceituar adubação verde: a planta deve proporcionar cobertura e proteção do solo, deve melhorar e/ou manter as condições físicas, químicas e biológicas do solo, promover aração biológica e introdução de micro-vida em profundidade no solo e servir como uso eventual na alimentação animal ou outras finalidades (Calegari et al., 1993).

A utilização de plantas de cobertura proporciona proteção do solo das gotas de água proveniente das chuvas e/ou irrigação; melhora a infiltração e manutenção da água no solo, diminuindo a erosão; mobiliza e recicla nutrientes; aporta nitrogênio; ajuda a diminuir infestação de plantas espontâneas e melhora a vida do solo; proporciona alelopatia benéfica; atenua as oscilações térmicas;

recupera solos degradados; solubiliza fósforo; diminui a lixiviação de nutrientes, em especial o nitrogênio; aumenta a capacidade de troca catiônica efetiva, melhorando, indiretamente, a estabilidade de agregados; ajuda a controlar doenças radiculares (Calegari et al., 1993) e melhora a eficiência de adubos (Souza e Pires, 2002).

Além disso, algumas leguminosas ajudam no controle de nematóides (Santos e Ruano, 1987), pois liberam na sua decomposição substâncias aleloquímicas e aumentam a atividade biológica do solo (Costa, 1993). A utilização de resíduos culturais também pode aumentar o crescimento e a atividade microbiana na camada superficial do solo (Vargas e Scholles, 2000; Vargas et al., 2004). Entretanto, as plantas de cobertura podem competir com as plantas de interesse econômico, hospedar pragas e/ou doenças (Souza e Pires, 2002) e ocasionar alelopatia negativa (Calegari et al., 1993). Os efeitos da adubação verde variam de acordo com o clima, espécie utilizada como adubação verde, cultura de interesse econômico, classe do solo, manejo adotado nas espécies e outros (Souza e Pires, 2002).

Para uma melhor eficiência da adubação verde, as plantas a serem utilizadas devem apresentar boa resistência a seca, pouca exigência em nutrientes, rápido crescimento, grande produtividade de massa, boa produção de sementes, boa capacidade de cobertura do solo e reciclagem de nutrientes, apresentar simbiose com microorganismos benéficos e boa capacidade de rebrota, quando necessário; por outro lado, não deve hospedar pragas e/ou doenças das culturas de interesse econômico e na maioria dos casos não ser volúvel, quando cultivadas em determinados tipos de consórcio (Souza e Pires, 2002).

A adubação verde vem sendo empregada nos cultivos comerciais, principalmente em plantio direto e em cultivos orgânicos. As espécies da família das leguminosas se destacam por formarem associações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, resultando em aporte desse nutriente na planta (Spagnollo et al., 2002; Perin et al., 2003; Castro et al., 2004; Chu et al., 2004; Perin et al., 2004; Ricci et al., 2005; Alves et al., 2006; Espindola et al., 2006b), contribuindo positivamente com balanço de nitrogênio (Castro et al., 2004; Chu et al., 2004; Alves et al., 2006) e fósforo (Alves et al., 2004), com a nutrição das culturas (Heinrichs et al., 2002; Castro et al., 2004) e,

conseqüentemente, com a produção (Heinrichs et al., 2002; Spagnollo et al., 2002).

Entretanto, quando manejados de maneira inadequada, podem provocar queda da produção (Heinrichs et al., 2002) e, segundo Paulo et al. (2001), em um trabalho realizado em cafeeiro Arábica, as leguminosas *Crotalária juncea* e guandu ocasionaram menor produção no triênio avaliado e os demais adubos verdes não diferiram da área sem plantio intercalar.

As leguminosas também possuem baixa relação carbono/nitrogênio (em torno de 25/1) quando comparadas a plantas de outras famílias, o que facilita a decomposição dos resíduos vegetais. Segundo Castro et al. (2004) e Perin et al. (2004), as leguminosas têm contribuído mais em produção de fitomassa do que em vegetação espontânea; além disso, protegem o solo dos efeitos da erosão hídrica, reduzindo a perda de nutrientes. De acordo com Scivittaro et al. (2003), as leguminosas ainda proporcionam melhor aproveitamento de nitrogênio da uréia pelo milho e menor perda de nitrogênio no sistema solo - planta. Fato semelhante também é relatado por Ambrosano et al. (2005) em cana-de-açúcar. Além do nitrogênio, as leguminosas podem aumentar a disponibilidade de fósforo para as plantas (Canellas et al., 2004a), podem incorporar carbono e nitrogênio e conferir maior grau de condensação de ácidos húmicos na camada superficial dos solos cultivados (Canellas et al., 2004b).

Segundo Meda et al. (2002), as plantas invasoras ou daninhas apresentam potencial para aumentar a eficiência da calagem na correção da acidez da sub-superfície do solo, devido à presença de moléculas orgânicas presentes nos extratos vegetais como complexos de cálcio, o que facilita o movimento vertical do insumo. Da mesma forma, as plantas utilizadas na adubação verde, como as leguminosas, podem agir de maneira semelhante ou até com maior eficiência, já que geralmente possuem um sistema radicular mais desenvolvido e profundo. Além disso, de acordo com Carvalho et al. (2004), o guandu pode proporcionar diminuição da densidade do solo. No entanto, há trabalhos científicos mostrando que depois de três anos de cultivo de leguminosas as características como carbono orgânico, densidade do solo, porosidade e estabilidade de agregados do solo manteve-se inalterada (Nascimento et al., 2006), bem como a produtividade da cultura (Carvalho et al., 2004).

As leguminosas apresentam altas concentrações de nitrogênio em seus tecidos vegetais, o que acarretará, depois da queda das folhas ou corte das plantas, uma contribuição de nitrogênio para o sistema solo - planta (Castro et al., 2004; Perin et al., 2004), apresentando, nos trabalhos realizados por Castro et al. (2004), um percentual médio de nitrogênio proveniente da fixação biológica de 60,8% pela crotalária e de 72,6% pelo feijão caupi, e, de acordo com Perin et al. (2004), a fixação de nitrogênio na crotalária foi de 61%, quando consorciada e de 57%, quando cultivada isoladamente, quando cultivados num Cambissolo. No cultivo da soja a fixação biológica de nitrogênio foi superior a 82% (Alves et al., 2006).

De acordo com Chu et al. (2004), o nitrogênio, fixação pelo amendoim (*Arachis hypogaea*), foi de 76,1%, quando fertilizado com 15 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio e de 50,7%, quando adubado com 150 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio no solo cultivado com a cultura do arroz na China, indicando que quando o solo da lavoura se encontra bem nutrido, com nitrogênio, por intermédios de adubos orgânicos ou minerais, a eficiência da fixação biológica é significadamente prejudicada.

Ao avaliar a produção de bananeiras consorciadas com leguminosas herbáceas perenes, Espindola et al. (2006a) verificaram que algumas dessas espécies possibilitam aporte superior a 200 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, favorecendo, conseqüentemente, um desenvolvimento mais rápido das bananeiras, bem como maiores valores de peso de cachos e de pencas em relação à área sem a presença de adubação verde.

### **2. 5. 5. Adubação Verde no Cafeeiro**

Na adubação verde do cafeeiro podem se utilizar plantas perenes ou anuais, de pequeno ou grande porte, antes ou após o plantio do cafeeiro, sendo muitas as espécies que podem ser utilizadas, destacando-se as leguminosas, as quais apresentam diferentes características de interesse, no entanto, cuidados devem ser tomados, principalmente com as arbóreas e volúveis (Tabela 2).

No cafeeiro, a utilização de adubação verde em pré-cultivo é menos usual, pois o cafeeiro é uma cultura perene, na qual sua maior exigência de nutrientes encontra-se na fase de produção (Matiello et al., 2005), a partir dos dois anos de idade. Nessa ocasião, o nitrogênio proveniente destes resíduos já teria sido praticamente perdido por lixiviação e ou desnitrificação (Marschner,

1995), pois em condições de altas temperaturas e alta umidade no solo ocorre uma rápida mineralização de nutrientes constituídos nos tecidos vegetais das plantas mortas (Moreira e Siqueira, 2002; Espindola et al., 2006a).

**Tabela 2:** Características de algumas leguminosas que podem ser utilizadas como adubo verde em culturas perenes (Adaptado de Calegari, 1998).

<b>Espécies</b>	<b>Hábito de cresc.</b>	<b>Floração plena (dias)</b>	<b>Biomassa (t/ha/ano) Verde e Seca</b>		<b>Espaçamen to na entre linha</b>	<b>Quant. sementes (kg/ha)</b>	<b>N fixado (kg/ha/ ano)</b>
Calopogônio ( <i>Calopogonium muconoides</i> )	Volúvel	180-210	15-40	4-10	0,5-1	10	64-450
Caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> )	Ereto	70-110	12-47	2,5-5,4	0,4	60-75	50-354
Centrosema ( <i>Centrosema pubescens</i> )	Rasteiro	200-220	16-35	3-7	0,4-0,8	-	93-398
<i>Crotalaria breviflora</i>	Ereto	100	10-21	3-5	0,25	20	154
<i>Crotalaria grantiana</i>	Ereto	140-160	7-28	2,5-6	0,25	8	154
<i>Crotalaria juncea</i>	Ereto	80-130	15-60	5-15	0,25	40	150-165
<i>Crotalaria mucronata</i>	Ereto	120-150	10-63	2,5-12	0,25	10	154
<i>Crotalaria paulina</i>	Ereto	120-150	50-80	5-9	0,25	-	154
<i>Crotalaria spectabilis</i>	Ereto	110-140	15-30	3-8	0,25	15	154
Feijão de porco ( <i>Canavalia ensiformis</i> )	Ereto	100-120	14-30	3,2-7	0,5-1,5	150-180	49-190
Guandu ( <i>Cajanus cajan</i> )	Ereto	140-180	9-70	3-22	0,5-1,5	50	41-280
Guandu anão ( <i>Cajanus cajan</i> )	Ereto	100	12-20	2,5-5,6	0,6-0,7	-	-
Guandu arbóreo ( <i>Cajanus cajan</i> )	Ereto	156-175	-	-	-	-	-
Indigófera ( <i>Indigofera</i> sp)	Ereto	240-270	15-30	4-10	0,5-1,5	-	-
Kudzu tropical ( <i>Peuraria phaseoloides</i> )	Rasteiro	240-270	15-36	3,5-8	0,5-1	-	30-100
Lab-Lab ( <i>Lablab purpureum</i> )	Volúvel	130-140	18-30	3,9-13	0,5-0,8	45	-
Leucena ( <i>Leucaena leucocephala</i> )	Ereto	120	60-120	15-40	1,5-5	-	400-600
Mucuna cinza ( <i>Mucuna pruriens</i> var <i>utilis</i> )	Volúvel	130-150	20-46	5-9	0,5-1,5	60-90	-
Mucuna preta ( <i>Mucuna pruriens</i> var <i>pruriens</i> )	Volúvel	140-170	10-40	4-7,5	0,5-1	60-80	157
Mucuna rajada ( <i>Mucuna pruriens</i> )	-	166	21,5	4,8	-	-	163
Siratro ( <i>Macroptilium atropurpureum</i> )	Rasteiro	210-240	14-28	3-6,5	0,5-1	-	70-140
Soja perene ( <i>Neonotonia wightii</i> )	Rasteiro	210-240	25-40	4-10	0,5-1	-	40-450

Assim, no caso de culturas perenes como o café, essa forma de cultivo de adubação verde não seria, isoladamente, praticável. Portanto, a utilização de culturas intercalares é mais indicada, pois possibilita a disponibilidade de nutrientes, principalmente de nitrogênio, durante o ciclo da cultura, por meio do corte programado do adubo verde e, conseqüentemente, de sua mineralização, o que proporcionará nutrientes para cultura de maneira controlada (Castro et al., 2004). Para isso, deve-se levar em consideração a exigência nutricional da lavoura principal, época do ano e espécie de cobertura vegetal, pois, de acordo com Espindola et al. (2006a), a liberação de nutrientes dos tecidos das plantas de cobertura para as plantas cultivadas ocorre em função da época do ano (estação seca ou chuvosa); espécie de leguminosa, por apresentarem relação carbono/nitrogênio; teores de lignina e hemicelulose em concentrações distintas.

Nas condições estudadas por Lima et al. (2005), a decomposição das leguminosas já foi significativa nos primeiros quinze dias, sendo o *Calopogonium mucunoides*, *Arachis pintoi* e *Cajanus cajan* as espécies que apresentaram maior velocidade de decomposição em relação à *Crotalaria juncea*, *Dolichus lablab*, *Stylobium aterrimum* e *Stylozanthus guyanensis*, quando cultivadas na entre linha do cafeeiro.

A maioria das plantas de coberturas utilizadas no cafeeiro é formada por leguminosas, pois essas apresentam uma vantagem ímpar sobre as outras plantas de cobertura; a fixação biológica de nitrogênio. Além disso, geralmente as outras plantas de cobertura apresentam metabolismo C<sub>4</sub>, o qual, de maneira generalizada, necessitam de maior energia proveniente da radiação para fixar carbono em relação às plantas que fotossintetizam somente via o ciclo fotossintético de Calvin (C<sub>3</sub>) (Chinthapalli et al., 2002; Taiz e Zieger, 2002), sendo, portanto, mais afetadas quando essas plantas são submetidas ao sombreamento, fato que ocorre quando cultivadas na entre linha do cafeeiro, isso quando essas plantas apresentam pequeno ou médio porte e o cafeeiro encontra-se formado.

Em sistema agroflorestal com café, estudado por Mendonça et al. (2001), a utilização de leguminosas perenes e de porte alto provocou aumento da capacidade de troca catiônica efetiva e a pH sete, aumento do carbono e nitrogênio totais e promovem maior reciclagem de nutrientes, podendo ser adotada principalmente, em áreas acidatadas, aumentando a capacidade do solo em promover melhores condições de produtividade da cultura em médio e



longo prazo, entretanto, para isso ocorrer estas plantas devem ser podadas todos os anos (Mendonça et al., 2001).

Dentre as leguminosas arbóreas, a *Leucena* sp. e *Gliricidia* são as mais cultivadas. Geralmente no verão essas espécies proporcionam sombra para o cafeeiro, no qual pode sofrer redução da capacidade fotossintética, condutância estomática e da fotossíntese líquida quando expostos em condições de radiação de  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (cafeeiro Arábica em casa de vegetação) (Ramalho et al., 1997) e, além disso, Oliveira et al. (2006) relatam que níveis menores de radiação favorecem as trocas gasosas no cafeeiro. Contudo, Nascimento et al. (2006) descrevem que plantas de café Arábica sob seringueira apresentaram menores valores de taxas fotossintéticas, condutância estomática e transpiração em relação às plantas crescidas em pleno sol, as quais apresentaram médias superiores de espessura de parênquimas e maior índice estomático, verificando-se, assim, plasticidade de adaptação.

Segundo Faria et al. (1999), o uso de grevilea (*Grevillea robusta*) para o sombreamento no cafeeiro proporcionou menor concentração de prolina nos tecidos dessa cultura, indicando que o cafeeiro sombreado por esta planta sofre menor estresse hídrico, corroborando com Barbosa et al. (2005), que descrevem que a acácia e leucena permitiram que os efeitos da seca e do frio fossem reduzidos, favorecendo o crescimento do cafeeiro no início da época chuvosa e com Bebé et al. (2005), ao relatarem que o cafeeiro Arábica apresentou maior abscisão foliar, quando cultivados à maior distância das plantas de grevilea. Esses fatos podem estar associados à proteção do excesso de radiação e/ou de uma melhor umidade do solo, uma vez que Matsumoto et al. (2001) relatam que há maior umidade no solo do cafeeiro quando cultivado mais próximo à grevilea.

Moreira et al. (2002), concluíram, baseado no seu experimento, que o cafeeiro Mundo Novo submetido à sombra por *Platycyamus regnellii* apresentaram melhor bebida e tamanho de grãos e menos defeitos em relação ao cafeeiro cultivado a pleno sol, entretanto, os pesquisadores não apresentam dados estatísticos.

Ricci et al. (2002) verificaram que a produtividade do cafeeiro Conilon não diferiu quando foi cultivado ao pleno sol, sombreado com *Gliricidia sepium* ou com *Eritrina variegata* e com o uso de mamona no cafeeiro Arábica (Castro Neto et al., 2004). Contrastando parte desses resultados, Santinato et al. (2003) descreveram

que a grevilea foi prejudicial, diminuindo a produtividade do cafeeiro Arábica cultivado na Bahia, e Prezotti e Rocha (2005) relataram que a produtividade do cafeeiro Arábica na região serrana do Espírito Santo foi menor quando utilizou o calopogônio.

DaMatta (2004) descrevem que o cafeeiro, quando submetido à pouca luminosidade, apresenta maior estímulo ao crescimento vegetativo que ao reprodutivo e há um menor número de nós e flores por ramos, afetando diretamente a produtividade do cafeeiro. Contudo, Souza et al. (2000) descreveram que quando o sombreamento no cafeeiro foi de 30% ocasionou favorecimento da atividade da enzima redutase do nitrato, maiores teores de clorofila e maiores teores de açúcares solúveis nos tecidos do cafeeiro Rubi. Dessa forma, o manejo adequado das podas deve ser adotado, para proporcionar uma proteção do excesso de radiação, sem, no entanto, limitar a luminosidade mínima necessária para o cafeeiro. Além disso, é através da poda que a maioria dos resíduos irão decompor e, posteriormente, disponibilizar nutrientes para o solo e plantas.

Geralmente a poda das leguminosas de grande porte ocorre no início do inverno, isso para proporcionar a entrada de luz no inverno e favorecer a proteção da radiação no verão nas plantas cultivadas.

No que se refere a leguminosas de pequeno porte, cultivadas na entre linha de cafeeiros, são encontrados trabalhos relatando vantagens e desvantagens. Em relação às vantagens das leguminosas de pequeno porte, o trabalho de Ricci et al. (2005) em cafeeiro Arábica se destaca pelo fato de os pesquisadores relatarem que a crotalária (*Crotalaria juncea*) reciclou 444, 21, 241, 191 e 44 kg<sup>-1</sup> ha de N, P, K, Ca e Mg, respectivamente, e que a fixação biológica foi responsável por um aporte de nitrogênio superior a 200 kg ha<sup>-1</sup>, o que, certamente, proporcionou que a concentração acumulada do nitrogênio do tecido foliar mantivesse inalterado no decorrer de um ano, ao contrário de cafeeiros que não receberam a crotalária como adubação verde. Araújo (2001) relatou que o guandu, cultivado na entre linha do cafeeiro orgânico, plantado na região serrana do Espírito Santo, apresentou uma produção de 3,35 a 5,81 toneladas de matéria seca por hectare, o que correspondeu a 111 a 212 kg de nitrogênio reciclado e fixado.

O trabalho de Colozzi Filho e Cardoso (2000) mostrou que o cultivo da crotalária na entre linha do cafeeiro Arábica aumentou a concentração de esporos de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera do cafeeiro, indicando que esta prática agrícola pode favorecer maior presença de fungos micorrízicos arbusculares, associado às raízes do cafeeiro, aumentando, assim, a área superficial do sistema radicular e a absorção de nutrientes pelo cafeeiro, pois as micorrizas podem transferir nutrientes para as plantas (Marschner e Dell, 1994; Marschner, 1995), como o carbono e nitrogênio (Martins e Read, 1996) e fósforo (Martins e Cruz, 1998; Novais e Smyth, 1999).

Leônidas et al. (2000) relataram que em um cafezal de cinco anos de idade, cultivado no Estado de Rondônia, os adubos verdes (*Arachis pintoi* e *Pueraria phaseoloides*) foram eficientes no controle de plantas daninhas, fato também relatado por Gorreta (1998), quando utilizou o guandu, por Coelho et al. (2005), ao utilizarem gliricídia e banana nas entre linhas do cafeeiro Conilon e, por Chaves (1999), ao utilizar leucena na entre linha do cafeeiro. Leônidas et al. (2000) relataram, também, que a produtividade do cafeeiro foi maior onde nas entre linhas dos cafeeiros foram cultivados *Arachis pintoi*, *Desmodium ovamodium*, seguida pela capina manual, no entanto, não apresentaram testes estatísticos.

As plantas consideradas como adubos verdes também podem ser utilizadas para amenizar efeitos do frio, geada e vento nos cafeeiros, principalmente quando novos e cultivados em regiões de altitude, propicia a baixas temperaturas (Gorreta, 1998; Caramori et al., 1998), sendo o guandu o adubo verde que apresentou melhor proteção do cafeeiro (Caramori e Moraes, 1999).

Dependendo da espécie de leguminosa utilizada pode-se melhorar ou atrapalhar a produtividade do cafeeiro, fato relatado por Bergo et al. (2006), as quais descrevem que no Estado do Acre o cafeeiro Arábica cultivado a 160 metros de altitude foi beneficiado com a utilização da *Mucuna aterrima* e *Flemingia congesta*; no entanto, o cafeeiro teve a produtividade afetada com a utilização da *Canavalia emiformis* e *Cajanus cajan*, indicando que, dependendo da espécie e região cultivada, os adubos verdes podem apresentar comportamentos bem distintos.

Dois trabalhos publicados em periódicos relataram que o uso de leguminosas como o guandu (*Cajanus cajan*) (Paulo et al., 2001, 2006) e crotalaria (*Crotalaria juncea*) (Paulo et al., 2001) prejudicaram a produção do cafeeiro Arábica, enquanto que as outras leguminosas (*Crotalaria spectabilis*, *Stizolobium deeringeanum* e *Glycine max*) não alteraram a produção em relação à testemunha (sem utilização de adubos verdes). Estes resultados podem estar associados a competição, principalmente nas leguminosas com período de florescimento mais longo e, devido à seca no período (Paulo et al., 2001, 2006), essa queda de produtividade pode estar associada a um manejo inadequado das leguminosas, já que foram plantadas cinco linhas de leguminosas na entre linha do cafeeiro, ficando duas fileira (uma de cada lado do cafeeiro) a apenas 50 centímetros do tronco, o que, provavelmente, ocasionou uma competição acirrada, inclusive por luminosidade, quando o cafeeiro ainda estava com porte pequeno, isso depois da recepa.

As leguminosas de menor porte devem ser podadas na floração, ocasião em que apresenta máximo de acúmulo de nitrogênio nos tecidos vegetais, para, assim, maximizar a eficiência da reciclagem de nutrientes e fixação de nitrogênio, bem como evitar a competição por nutrientes e água de maneira agressiva ao cafeeiro. Geralmente essas leguminosas não exercem competição por luminosidade em lavouras adultas, desde que não sejam trepadeiras. Na maioria dos casos, essas leguminosas são plantadas no início da estação chuvosa e têm o corte a partir de, aproximadamente, 80 dias após o plantio, variando muito em função da espécie (Tabela 2).

À princípio, as plantas de adubação verde e os procedimentos adotados no manejo parecem perfeitos, no entanto, com grande deposição de massa verde no solo, proveniente de plantas com grande capacidade de produção de fitomassa e com baixa relação C/N, de uma única vez, podem proporcionar a imobilização de nitrogênio (Marschner, 1995; Vargas e Scholles, 1998; Vargas et al., 2004), podendo depois suceder a mineralização concentrada em um curto período do ano. Com isso, perdas de N será uma realidade, pois a exigência nutricional do cafeeiro ocorre durante todo o ano, havendo maior exigência na fase de formação e maturação dos grãos (Matiello et al., 2005), nos meses de janeiro a junho (Rena e Maestri, 1986; Bragança et al., 2001; Camargo e Camargo, 2001), pois os frutos são os drenos fortes de nutrientes (Rena e

Maestri, 1986; Malavolta et al., 2002; Laviola, 2004). Assim, ao realizar o corte apenas no início do inverno o problema pode ser mais intensificado.

Dessa forma, uma alternativa seria o plantio de leguminosas de ciclo curto e longo em linhas alternadas da lavoura, e/ou com diferente liberação de nutrientes, e se possível cultivar ainda adubos verdes de grande porte, para poder, assim, haver uma maior sincronia na decomposição de resíduos e, conseqüentemente, a sua assimilação pela planta de maneira otimizada.

Por exemplo: corte das leguminosas arbóreas em junho, a qual irá ocorrer uma mineralização lenta no inverno, sendo intensificada no início de setembro, devido ao regime hídrico e a elevadas temperaturas; corte de uma das leguminosas de menor porte em janeiro e corte da outra leguminosa em março/abril. Contudo, sabe-se que isso não é tão simples, exige um conhecimento multidisciplinar e desenvolvimento de mais pesquisas, inclusive regionais, conforme cada situação.

## **2. 6. Baixas temperaturas positivas**

No Brasil, como em outros países produtores de café, o crescimento e desenvolvimento do cafeeiro depende de vários fatores relacionados ao manejo (adubação, controle fitossanitário, irrigação e outros), podendo essas técnicas serem facilmente controladas, e, também, pelas condições ambientais (temperatura, umidade relativa, radiação, precipitação, e outras), as quais são determinantes para implantação e manutenção de uma cultura em uma determinada região, influenciando decisivamente no desempenho da cultura, determinando zonas de plantios e práticas agrícolas economicamente viáveis para a espécie e/ou variedade. Dessa forma, um conhecimento e compreensão dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos das espécies (Arábica e Conilon), bem como um conhecimento do clima regional, são imprescindíveis para a definição de cultivar ou não e, caso favorável ao plantio do café, qual a espécie e variedade a ser cultivada.

As plantas, quando submetidas ao estresse, começam perder a estabilidade das estruturas e funções, as quais mantêm as atividades vitais; por conseguinte, prejudica seu desenvolvimento. Contudo, as plantas possuem capacidade fenotípica de adaptação, apresentando capacidade de retornar ao seu

estado normal quando o estresse é considerado pequeno, e com menor intensidade de desenvolvimento quando o estresse é forte (Larcher, 2000; Lawlor e Cornic, 2002).

Entre outros fatores que podem afetar o crescimento vegetativo, a temperatura amena (baixa positiva) tem merecido destaque, pois o frio afeta muitos componentes fotossintéticos; reduz a condutância estomática, a fotossíntese líquida; altera os complexos de pigmentos fotossintéticos, da fluorescência da clorofila *a*; proporciona decréscimo no transporte de elétrons nas membranas dos tilacoides e reduz a atividade enzimática e o metabolismo do carbono em muitas espécies (Salonen et al., 1998; Allen e Ort, 2001) e no café (Campos et al., 2003; Ramalho et al., 2003).

Dessa forma, o cafeeiro, quando cultivado em latitudes superiores a 15°S, apresentam um decréscimo acentuado no crescimento nos meses mais frios e com dias mais curtos do ano (Barros e Maestri, 1974; Barros et al., 1997; Mota et al., 1997; Libardi et al., 1998; DaMatta et al., 1999; Partelli et al., 2001; Nazareno et al., 2003; Silva et al., 2004; Amaral et al., 2006), e não com a presença de grãos nos ramos, ainda que os ramos sem frutos possam apresentar maiores taxas de crescimento (Mota et al., 1997; Libardi et al., 1998; Amaral et al., 2001, 2006), e sequer com o fotoperíodo (Mota et al., 1997; Amaral et al., 2006).

Historicamente, o Estado do Paraná, bem como algumas regiões de São Paulo e Minas Gerais tem sofrido com geadas e/ou temperaturas muito baixas, havendo perda da produtividade das lavouras e migração do café nessas áreas. Também ocorre decréscimo no crescimento do cafeeiro Conilon no inverno, mesmo nas regiões quentes do Estado do Espírito Santo (Libardi et al., 1998; Partelli et al., 2001), o que pode acarretar menor recuperação do cafeeiro após a colheita e, conseqüentemente, influenciar na produtividade da futura safra agrícola. Em contra partida, com o aquecimento global (Joos et al., 1999), pode haver migração do Conilon em áreas antes plantadas com Arábica e cultivo de Arábica onde não se plantava a espécie por limitações de temperaturas mínimas baixas.

Estudos indicam que a temperatura ótima para o crescimento do cafeeiro Arábica jovem é cerca de 30°C durante o dia e 23°C à noite, sendo que plantas de café acima de 18 meses, as temperaturas ideais diminuem para 23°C diurno e 17°C noturno, tendo a faixa ideal entre 18 e 23°C e, para o sistema radicular,

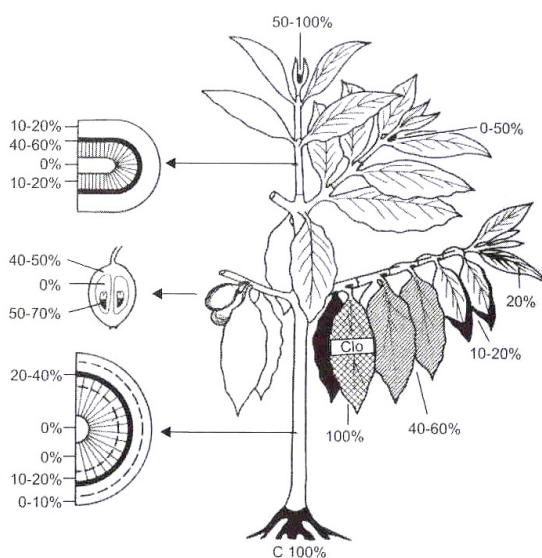
situa-se na faixa de 24 a 27°C (Matiello et al., 2005). Outros pesquisadores descrevem que a temperatura ideal é de 28/23°C (dia/noite) (Drinnan e Meinzer, 1995), todavia, Alègre (1959) relata que a temperatura média favorável ao crescimento para a mesma espécie se situa entre 16 e 23°C, com um ótimo de 18 a 21°C. Entretanto, quando os pesquisadores Drinnan e Meinzer (1995) estudaram o cafeeiro em casa de vegetação, verificaram que, embora o desenvolvimento vegetativo total fosse maior a 33/28°C, a contínua exposição a elevadas temperaturas induziu a maior abscisão foliar, deixando as folhas cloróticas e pequenas e, além disso, comprometeu a floração.

Quando a temperatura noturna permanece várias horas entre 0 e 10°C, seguida por várias noites, as extremidades das brotações novas do café ficam distorcidas, murcham e podem tornar-se negras, podendo levar a morte (Rena, 2000). Além disso, quando atingem valores de 3 a 4°C ou inferiores, as folhas podem sofrer descoloração não uniforme, com maior incidência nas margem da lâmina foliar e necroses, podendo, em seguida, senescer, sendo essas características variáveis de acordo com a cultivar (Campos et al., 2003; Ramalho et al., 2003). Esses distúrbios são provocados pela defasagem entre a perda de água por transpiração e pela sua absorção radicular e translocação pelo xilema, em consequência da alta viscosidade da água e da menor condutância hidráulica das raízes, impostas pela baixa temperatura (Rena, 2000) e pelo comprometimento dos mecanismos fotossintéticos (Campos et al., 2003; Ramalho et al., 2003). Assim, mesmo que não tenha ocorrido geada, o frio pode causar morte das gemas terminais, com perda da dominância apical e alterar a fisiologia das gemas axilares dos ramos plagiotrópicos, as quais são potencialmente floríferas, promovendo, posteriormente, uma excessiva brotação e desenvolvimento vegetativo (Rena, 2000). Ocorre também que temperaturas médias baixas, inferiores a 18°C, provocam o atraso no desenvolvimento dos frutos, cuja maturação pode sobrepor-se ou ultrapassar a florada seguinte, prejudicando a vegetação e a produção do cafeeiro.

O sistema radicular, em particular o ápice radicular de mudas do cafeeiro, é sensível a baixas temperaturas, sendo completamente inibido a temperaturas menores que 10°C, sofrendo danos quando a temperatura é inferior a 15°C durante 6 dias consecutivos (Queiroz et al., 2000).

Já o cafeeiro Conilon apresenta maior taxa de crescimento quando a temperatura média fica em torno de 23,1°C, a média da mínima de 18,3°C e a média da máxima de 27,2°C (Partelli et al., 2001), corroborando com Rena e Maestri (1986), que relatam que a temperatura média adequada para o cafeeiro Conilon fica entre 22 a 26°C e, com outros pesquisadores como Viani (1986) e Wrigley (1988), que descrevem que as temperaturas ótimas para essa espécie situam entre 18 a 27°C. Portanto, há acentuada queda do crescimento do cafeeiro Conilon no inverno, associado a baixas temperaturas (Libardi et al., 1998; Partelli et al., 2001) e, quando submetidos a longos períodos a 15°C sofrem danos, os frutos podem ser destruídos a 5°C (Willson, 1985) sendo muito sensível a geadas (Feio, 1991). Além disso, Sakai e Larcher (1987), descrevem que em plantas jovens de cafeeiro as raízes são os tecidos mais sensíveis às baixas temperaturas (Figura 1).

Diferente do Arábica, cultivar Icatu, o cafeeiro Conilon cultivar Apatã é altamente sensível ao frio e sofre maior impacto negativo na fotossíntese líquida. Esse fato pode estar relacionado com a baixa atividade inicial da enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase em ambas espécies. Provavelmente, assim como no cafeeiro Arábica, a diminuição do crescimento de ramos do cafeeiro Conilon sob baixas temperaturas também pode estar relacionado com a redução da integridade da membrana celular (Campos et al., 2003), com a diminuição do metabolismo respiratório (Oliveira et al., 2002a) e com resistências bioquímicas nos cloroplastídios (Amaral et al., 2006).



**Figura 1.** Sensibilidade de plantas jovens de cafeeiro submetidas a baixas temperaturas positivas.



### **3. TRABALHOS**

#### **3.1. CAPÍTULO 1: Aspectos microbiológicos e nutricionais em cafeeiro**

## **ASPECTOS FITOSSOCIOLÓGICOS E MANEJO DE PLANTAS ESPONTÂNEAS UTILIZANDO ESPÉCIES DE COBERTURA EM CAFEEIRO CONILON ORGÂNICO**

### **RESUMO**

As plantas espontâneas competem com as culturas por recursos escassos, quando mal manejadas. No entanto, podem trazer benefícios à agricultura. Neste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito que plantas de cobertura, consorciadas com *Coffea canephora* cv. Conilon, impõem à comunidade de plantas espontâneas. Plantas de cobertura foram semeadas nas entrelinhas de um cafezal de 6,5 anos conduzido sob manejo orgânico, com espaçamento de 2,0 x 1,5 m entre plantas. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com quatro repetições, num arranjo fatorial com tratamentos adicionais: testemunha,

milheto - *Pennisetum glaucum*, e as leguminosas feijão-de-porco - *Canavalia ensiformis*, mucuna-anã - *Mucuna deeringiana*, e feijão-guandu - *Cajanus cajan*, com e sem inoculação com rizóbio. Determinou-se a matéria seca das plantas de cobertura, as concentrações de nutrientes no cafeeiro, a densidade, frequência e abundância relativas, assim como o índice de valor de importância e de similaridade das plantas espontâneas. Foram identificadas 27 espécies, destacando-se *Bidens subalternans* e *Commelina benghalensis*. As espécies de cobertura promovem modificações na população de plantas espontâneas e não prejudicam o cafeeiro. Feijão-de-porco, mucuna-anã e milheto auxiliam na supressão de plantas espontâneas.

## PHYTOSOCIOLOGICAL ASPECTS AND WEED MANAGMENT USING COVER CROPS ON ORGANIC CONILON COFFEE

### ABSTRACT

Weeds can bring benefits to agriculture, but when incorrectly managed they compete with commercial crops for resources. The objective of this work was to evaluate the effect that cover crops, associated with *Coffea canephora* cv. Conilon, imposes to weed community. Cover crops were planted between the rows of an organic coffee plantation of 6.5 years old, with a 2.0 x 1.5 m arrange between coffee trees. The experiment was arranged in a complete randomized block design, with four replicates, in a factorial scheme with additional treatments: control, *Pennisetum glaucum* and legumes: *Canavalia ensiformis*, *Mucuna deeringiana* and *Cajanus cajan*, with and without Rizobium inoculation. Cover crops dry weight and nutrient contents on coffee trees were determined. Weeds

density, frequency, relative abundance, importance value index and plant similarity index were also determined. Twenty seven species were identified, with special emphasis on *Bidens subalternans* and *Commelina benghalensis*. Cover crops promote modifications on the succession dynamics of weeds and do not interfere with the development of coffee trees. *Canavalia ensiformis*, *Mucuna deeringiana* and *Pennisetum glaucum* help on weeds control.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, a que gera divisas, postos de trabalho e promove o desenvolvimento onde é produzido e/ou é processado. Na safra 2006/2007, a produção nacional foi de 42,5 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado, obtida numa área de 2,3 milhões de hectares (Conab, 2007).

Quando as culturas são exploradas de forma inadequada pode ocorrer a degradação do solo e do ambiente. Nesse contexto, uma agricultura mais sustentável, com adoção de práticas conservacionistas, desponta como alternativa para mitigar parte desses problemas. No norte do Estado do Espírito Santo o cultivo de café em sistema orgânico caracteriza-se como uma atividade familiar, sendo responsável por 68 % da renda agrícola e 51 % da renda total das famílias envolvidas (Partelli et al., 2006).

As plantas espontâneas podem proporcionar benefícios, como ciclagem de nutrientes, incorporação de calcário e proteção do solo contra a erosão (Meda et al., 2002). Entretanto, podem competir com outras espécies vegetais por recursos escassos (água, luz e nutrientes), por meio da competição direta, ou por liberação de substâncias alelopáticas (Moyer-Henry et al., 2006; Kong et al., 2007), prejudicando o desenvolvimento de culturas como o cafeeiro (Dias et al., 2004; Ronchi e Silva, 2006).

Plantas de cobertura do solo representam uma alternativa viável para cafeicultura, pois favorecem as populações e a densidade e diversidade de microrganismos edáficos (Carneiro et al., 2004), melhoram a estrutura física do solo (Carvalho et al., 2004), reciclam nutrientes e, quando se utilizam leguminosas, também promovem, juntamente com bactérias específicas, a fixação biológica do nitrogênio atmosférico, podendo acarretar maior fixação quando inoculadas (Oliveira et al., 2002; Anthofer e Kroschel, 2005; Ricci et al., 2005; Espindola et al., 2006; Teixeira et al., 2006; Pietsch et al., 2007). Também contribuem para substituir parte ou até mesmo toda a adubação nitrogenada nas áreas cultivadas. Além disso, as plantas de cobertura podem reduzir a infestação de plantas espontâneas em diversas culturas (Fernandes et al., 1999; Caetano et al., 2001; Fávero et al. 2001; Anthofer e Kroschel, 2005; Silva et al., 2006; Araujo et al., 2007), sendo este efeito mais eficiente quando as espécies apresentam características como tolerância à seca, baixa exigência nutricional, rápido crescimento e densa cobertura do solo.

A liberação de substâncias alelopáticas pelos resíduos de plantas de cobertura pode atuar sobre algumas espécies vegetais através da inibição da germinação de sementes e do desenvolvimento de plantas espontâneas (Souza Filho et al., 1997, 2005; Xuan et al., 2005). Essas substâncias atuam sobre a fisiologia e a bioquímica das plantas, modificando a síntese de proteínas, divisão celular, fotossíntese e outros processos (Seigler, 1996). Assim, o conhecimento do comportamento das plantas espontâneas em cafezais onde se empregam plantas de cobertura pode auxiliar no manejo da lavoura.

Apesar da relevância do tema, os trabalhos sobre manejo de plantas espontâneas associado à utilização de plantas de cobertura no campo não são numerosos, principalmente para a cultura do café Conilon. Assim, objetivou-se nesse trabalho avaliar, em condições de campo, a interferência que plantas de cobertura, cultivadas nas entrelinhas de *Coffea canephora* cv. Conilon, submetido a manejo orgânico, impõem às plantas espontâneas, bem como verificar seu comportamento fitossociológico.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em unidade de produção familiar, no Município de Jaguaré, Espírito Santo - Brasil, localizado à altitude de, aproximadamente, 80 m, com coordenadas 18°54' latitude Sul e 40°04' longitude Oeste de Greenwich. A região caracteriza-se pelo clima tropical, com verão quente e úmido e inverno seco. A precipitação anual média fica em torno de 1200 mm e a temperatura, nos meses mais frios, é superior a 12 °C, e nos meses mais quentes, é inferior a 34 °C (Incaper, 2007). No ano de condução do experimento, os dados meteorológicos foram similares à tendência histórica, entretanto, a precipitação no inverno foi acima da média (dados não apresentados).

A área experimental consistiu num cafezal (*C. canephora* cv. Conilon) de 6,5 anos, com plantas espaçadas de 2,0 x 1,5 m. A lavoura vem sendo cultivada conforme as normas de produção orgânica (Brasil, 2003) e, no último ano foi adubada com 80 g de fosfato natural e 2 kg de composto por cova (300 kg e 10 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>, respectivamente). O solo, coletado no início do experimento, apresentou textura franco arenosa (areia, silte e argila de 79, 5 e 16 %, respectivamente). A análise química do solo apresentou pH de 4,82, teor de matéria orgânica igual a 1,07 dag kg<sup>-1</sup>, teores de P pelo extrator Mehlich 1, K, Zn, Fe, Mn, Cu e B de 4,52; 40,0; 2,48; 51,6; 17,5; 0,15; e 0,16 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, conforme metodologia da Embrapa (1999). Os teores de Ca, Mg, Al, H+Al, soma de bases e capacidade de troca catiônica a pH 7 foram de 1,91; 0,55; 0,08; 2,86; 2,62; e 4,49 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, respectivamente, e a saturação de bases foi de 58,4 %. Na mesma ocasião, as folhas do cafeeiro apresentavam concentrações de 25,0; 0,70; 13,4; 1,50; 0,43 e 0,14 g kg<sup>-1</sup> de N, P, K, Ca, Mg e S, respectivamente, e de 9,7; 98,0; 25,6; 24,4; e 51,0 mg kg<sup>-1</sup> para Zn, Fe, Mn, Cu e B, analisados de acordo com Embrapa (1999). As amostras para avaliação de solo e folhas proveram de quatro repetições. A lavoura de café não cobria toda área, o que permitiu a semeadura de plantas de cobertura nas entrelinhas, já que esta pode ser prejudicada por baixa irradiância (Baligar et al., 2006). O controle das plantas espontâneas foi realizado antes da semeadura, por meio de capina manual.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com quatro repetições, num arranjo fatorial, com tratamentos adicionais, apresentando a

testemunha (sem utilização de plantas de cobertura) milho (*Pennisetum glaucum* cv. ENA 1) e as leguminosas feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), mucuna-anã (*Stizolobium deeringeanum*) e feijão-guandu (*Cajanus cajan*), com e sem inoculação de rizóbio específico para cada espécie.

A semeadura das plantas de cobertura nas entrelinhas do cafeeiro foi realizada em outubro de 2005. Foram preparadas covas espaçadas a 0,4 m umas das outras, depositando-se nas mesmas de duas a seis sementes para as leguminosas e 20 sementes para o milho. Foram aplicados 20 g de fosfato natural por cova, o que correspondeu à aplicação de 250 kg de fosfato natural ha<sup>-1</sup>. A inoculação do Rizóbio foi realizada em forma de pasta úmida.

A coleta de amostras das plantas de cobertura e das plantas espontâneas foi realizada 76 dias após a semeadura, quando as plantas de cobertura estavam em estágio de floração. Foi determinado o peso da matéria fresca correspondente às plantas localizadas nos 5 m centrais da fileira mediana das plantas de cobertura, perfazendo uma área útil de 10 m<sup>2</sup> (5 m de linha por 2 m de largura), tendo cada parcela área total de 45 m<sup>2</sup>. Subamostras com cerca de 300 g das plantas de cobertura foram coletadas em cada parcela e colocadas em estufa para secagem à temperatura de 65 °C até atingirem peso constante, visando determinar o peso da matéria seca.

Para determinação das plantas espontâneas, foi utilizado um retângulo equivalente à área de 0,5 m<sup>2</sup> (1,0 x 0,5 m), o qual foi colocado sempre na direção da terceira planta de café, entre a linha da planta de cobertura (no meio da carreira de café) e a linha da carreira de café. As plantas espontâneas foram transportadas em caixas de isopor para o laboratório, para se proceder sua identificação segundo família, gênero e espécie, contagem das plantas e peso da matéria seca. Foram calculados a densidade, frequência e abundância relativas, índice de valor de importância e índice de similaridade, conforme descritos em Tuffi Santos et al. (2004) e Silva et al. (2006).

Foi avaliado, ainda, o comprimento de dois ramos plagiotrópicos jovens e os teores de N, P e K nas folhas dos cafeeiros Conilon conforme Embrapa (1999). As folhas coletadas situavam-se no terceiro e/ou no quarto nó do ramo plagiotrópico a partir do ápice do ramo localizado no terço mediano superior da planta.

Os procedimentos estatísticos constaram da análise de variância e teste F. Nas fontes de variação, onde houve diferença significativa, aplicou-se o teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) para comparação de médias. Também foi efetuada correlação linear de Pearson para alguns dos parâmetros avaliados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificadas 27 espécies de plantas espontâneas na área experimental, distribuídas em 24 gêneros e 12 famílias (Quadro 1 e Figura 1). Detectou-se uma diversidade de plantas espontâneas na área, com predominância de espécies da classe das Dicotiledôneas (Magnoliopsida), corroborando com levantamento fitossociológico realizado por Silva et al. (2006) em cafeeiro Arábica (*C. arabica*). As principais espécies espontâneas encontradas da classe Monocotiledôneas (Liliopsida) apresentam metabolismo  $C_4$ , enquanto as principais Dicotiledôneas, metabolismo  $C_3$  (Klink e Joly, 1989; Nayyar & Gupta, 2006). Essa predominância de plantas de metabolismo  $C_3$  pode estar relacionada com a baixa irradiância, devido ao sombreamento proporcionado pelo cafeeiro. Isso se explica pelo fato de essas espécies apresentarem menor gasto energético e maior rendimento quântico do que a maioria das plantas de metabolismo  $C_4$  em ambiente com menor intensidade luminosa (Klink e Joly, 1989; Sage e Kubien, 2003) e com boa disponibilidade hídrica (Epstein et al., 1997; Nayyar e Gupta, 2006). Essas condições ocorreram no período novembro/dezembro, em pleno desenvolvimento vegetativo das plantas espontâneas e do cafeeiro.

Apesar da dominância de espécies Dicotiledôneas, as Monocotiledôneas representam 18,5% das espécies encontradas (Quadro 1). Possivelmente, estas plantas de metabolismo  $C_4$  desenvolveram-se devido à baixa fertilidade do solo, principalmente reduzido teor de nitrogênio, uma vez que a matéria orgânica do solo era da ordem de  $1,07 \text{ dag kg}^{-1}$ . Tais espécies apresentam maior eficiência na utilização do nitrogênio, refletindo, por exemplo, em maior capacidade de

absorção de CO<sub>2</sub>, com menor concentração de rubisco (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase) para o processo fotossintético (Sage e Kubien, 2003). Estas plantas também apresentam maior tolerância às altas temperaturas (Chinthapalli et al., 2003), ocorridas no verão (Figura 1A), o que também teria influenciado a pressão de seleção.

**Quadro 1.** Espécies de plantas espontâneas coletadas em área de produção orgânica de café Conilon consorciado com plantas de cobertura nas entrelinhas, depois de 76 dias da semeadura dessas. Jaguaré, ES.

Classe / Família	Espécie	Nome popular
Monocotiledôneas	-	-
Cyperaceae	<i>Cyperus luzulae</i>	capim-de-botão
Poaceae	<i>Brachiaria plantaginea</i>	capim-marmelada
	<i>Digitaria sanguinalis</i>	capim-colchão
	<i>Paspalum maritimum</i>	capim-pernambuco
	<i>Setaria geniculata</i>	capim-rabo-de-raposa
Dicotiledônea	-	-
Asteraceae	<i>Ageratum conyzoides</i>	mentrasto
	<i>Bidens subalternans</i>	picão-preto
	<i>Conyza canadensis</i>	buva
	<i>Emilia coccínea</i>	serralhinha
	<i>Jaegeria hirta</i>	botão-de-ouro
	<i>Melampodium divaricatum</i>	flor-de-ouro
	<i>Porophyllum ruderale</i>	couve-cravinho
Commelinaceae	<i>Commelina benghalensis</i>	trapoeiraba
Euphorbiaceae	<i>Chamaesyce hirta</i>	erva-de-santa-luzia
	<i>Chamaesyce hyssopifolia</i>	erva-de-andorinha
Fabaceae	<i>Chamaecrista rotundifolia</i>	erva-coração
Malvaceae	<i>Sida claziovii</i>	guanxuma
	<i>Sida linifolia</i>	guanxuma
	<i>Sida rhombifolia</i>	guanxuma
Nyctaginaceae	<i>Boerhavia diffusa</i>	erva-tostão
Papilionoideae	<i>Crotalaria spectabilis</i>	crotalária
	<i>Indigofera hirsuta</i>	anileia
	<i>Macroptilium atropurpureu</i>	siratro
Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i>	beldroega
Rubiaceae	<i>Richardia scabra</i>	poaia-do-cerrado
	<i>Spermacoce verticillata</i>	poaia-botão
Verbenaceae	<i>Lantana trifólia</i>	cangica



A inoculação com rizóbio não proporcionou efeito nas variáveis avaliadas. Assim, os dados das leguminosas de mesma espécie foram avaliados conjuntamente, desconsiderando-se o efeito da inoculação. Observa-se que as plantas de cobertura influenciaram no manejo das plantas espontâneas (Quadro 2), conforme relatado por diversos autores (Fernandes et al., 1999; Caetano et al., 2001; Fávero et al., 2001; Anthofer e Kroschel, 2005; Silva et al., 2006; Araujo et al., 2007). Esse resultado pode ser reforçado pela correlação significativa e negativa ( $r = -0,47$ ) entre o peso da matéria seca das plantas de cobertura e o da matéria seca média de cada planta espontânea.

**Quadro 2.** Médias de peso da matéria seca de plantas espontâneas (MSPE), número de plantas espontâneas (NPE), peso da matéria seca de cada planta espontânea (MSM) e peso da matéria seca das plantas de cobertura (MSPC), coletadas em área de produção orgânica de café Conilon, consorciadas com plantas de cobertura nas entrelinhas. Jaguaré, ES.

Tratamento	MSPE (g 10 m <sup>-2</sup> )	NPE (em 10 m <sup>-2</sup> )	MSM (g unidade <sup>-1</sup> )	MSPC (g 10 m <sup>-2</sup> )
Testemunha	1217 a	1445 a	0,84 a	-
Milheto	271 b	520 a	0,76 ab	704 bc
Feijão-de-porco	413 b	1272 a	0,30 b	1343 a
Mucuna-anã	440 b	1295 a	0,43 ab	1047 ab
Feijão-guandu	679 ab	875 a	0,90 a	397 c
CV (%)	72,9	71,0	49,5	32,3

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem-se entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

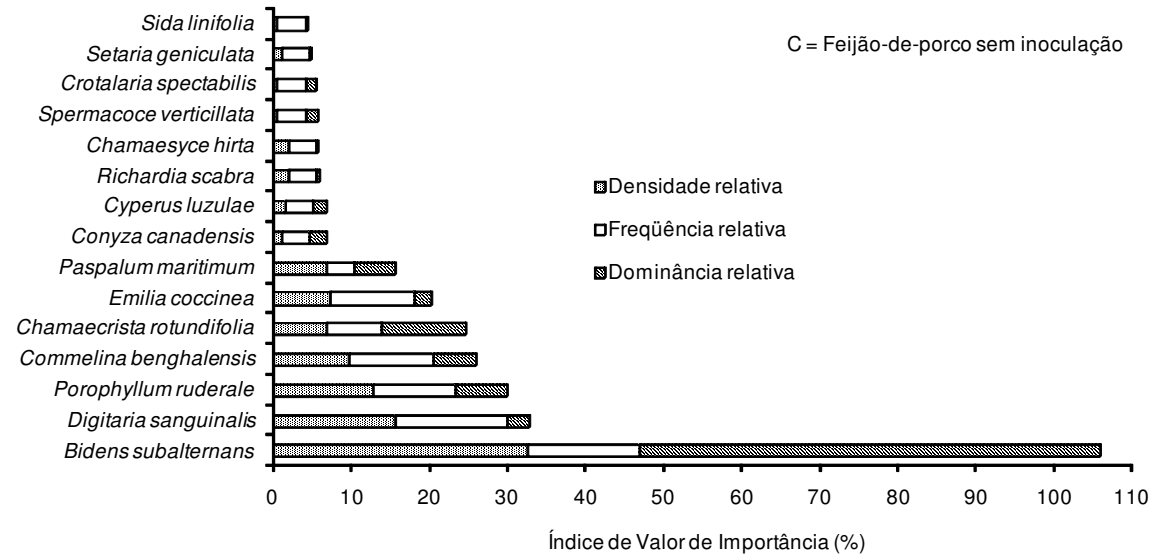
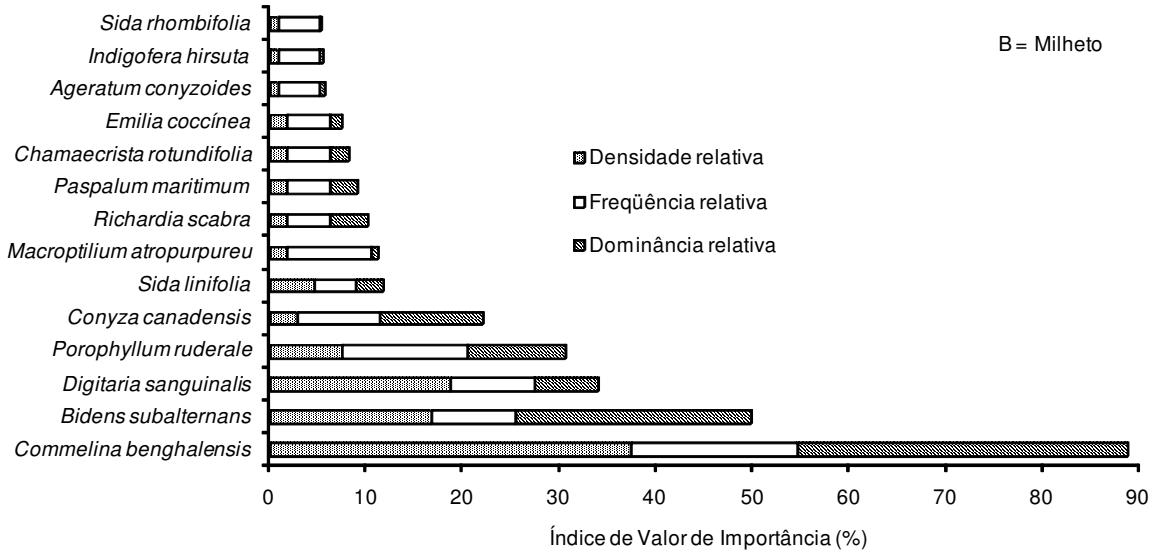
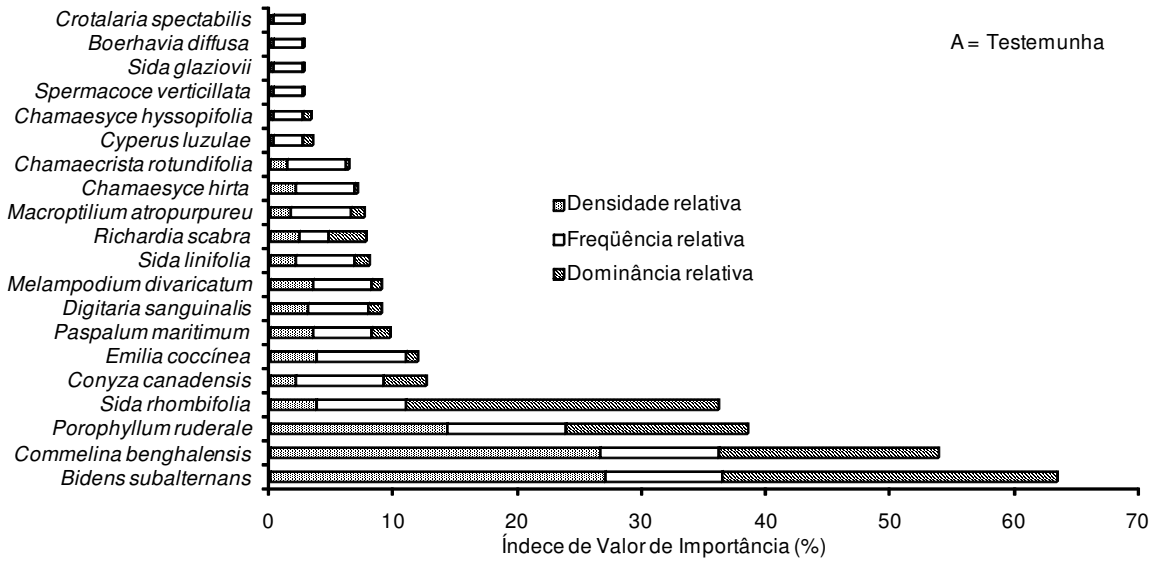
Feijão-de-porco e mucuna-anã proporcionaram redução da matéria seca das plantas espontâneas em relação ao tratamento testemunha. Além disso, o feijão de porco causou redução de peso médio das plantas espontâneas (Quadro 2). A interferência, possivelmente, deve-se ao incremento do efeito físico, por dificultar a entrada de fótons de luz até as plantas espontâneas, prejudicando seu crescimento por limitação energética para ativar os fotossistemas e pela competição por nutrientes (Sage e Kubien, 2003). Essas leguminosas apresentaram rápido crescimento inicial, altas produção de biomassa (Quadro 2)

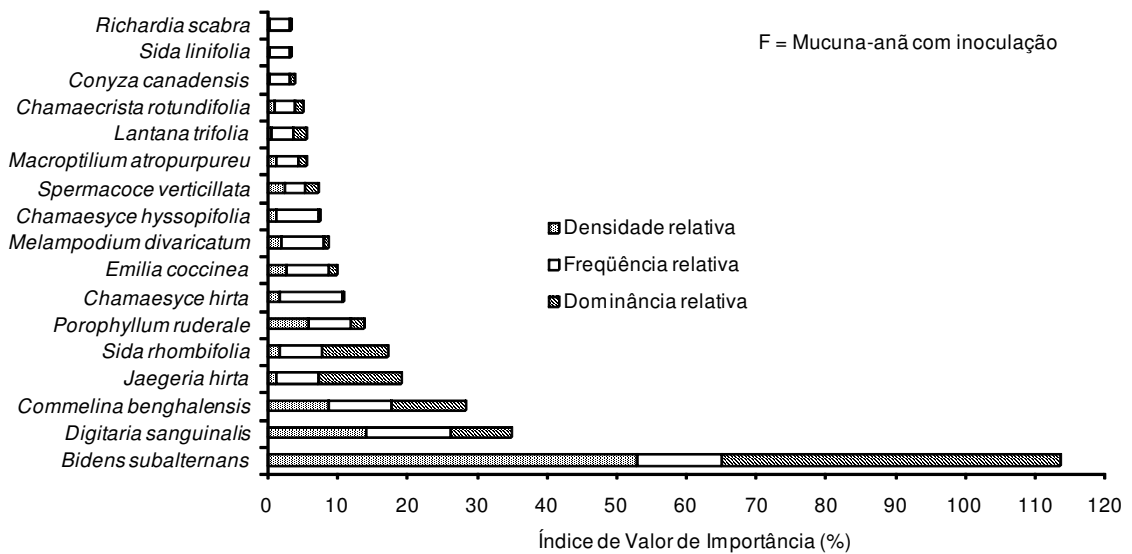
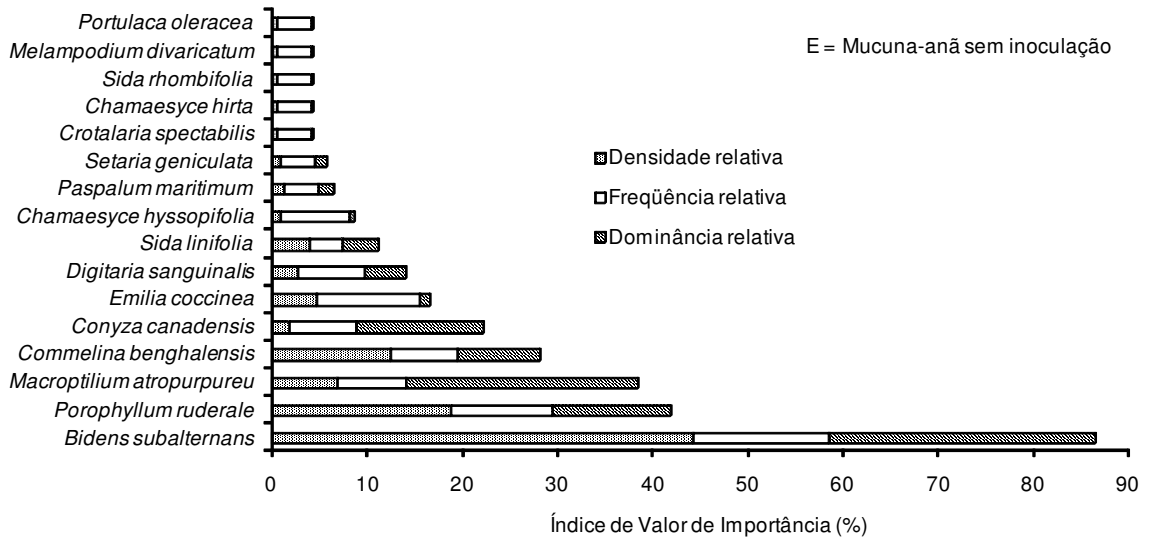
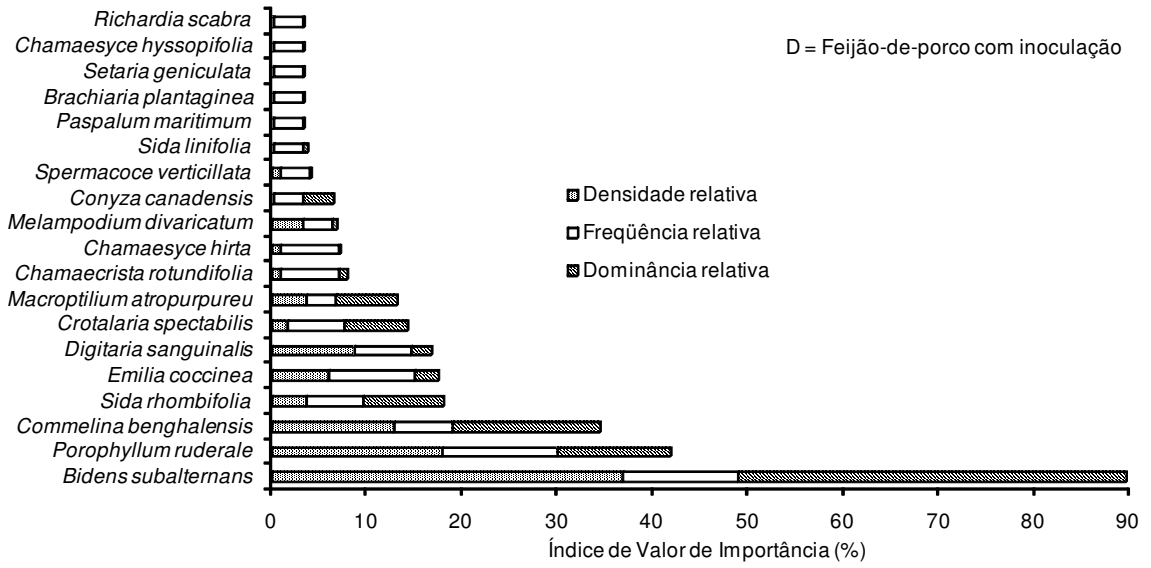
e capacidade de cobertura do solo (Baligar et al., 2006), promovendo maior supressão das plantas espontâneas.

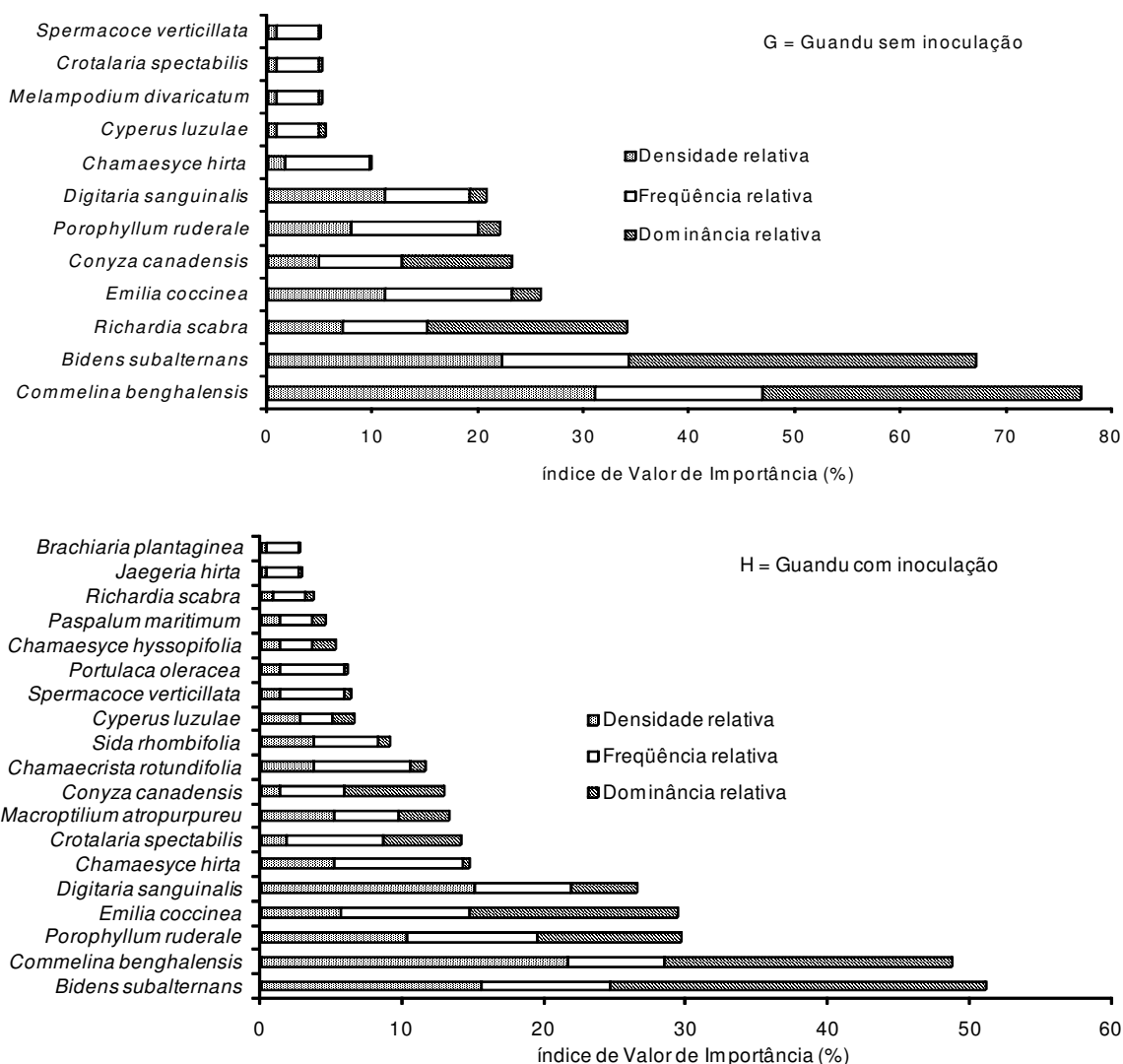
O milho é uma espécie com grande potencial de produção de biomassa; entretanto, neste experimento, apresentou baixa produção de biomassa (Quadro 2), fato que pode estar relacionado com o sombreamento imposto pelo cafeeiro, já que apresenta metabolismo C<sub>4</sub>. Os resultados indicam que a supressão das plantas espontâneas exercido pelo milho não se relaciona, unicamente, com a produção de biomassa, apontando que tal efeito também pode decorrer da liberação de substâncias alelopáticas (Souza Filho et al., 1997, 2005; Xuan et al., 2005), no entanto, os dados do presente trabalho não permitem precisar esta hipótese.

Por sua vez, o feijão-gandu não diferiu da testemunha com relação à supressão de plantas espontâneas, o que pode estar associado ao lento crescimento inicial e porte ereto, ocasionando baixa cobertura do solo e reduzida capacidade de produção de biomassa até os 76 dias (Quadro 2). Esses resultados corroboram aqueles obtidos por Fernandes et al. (1999), os quais relataram que o feijão-gandu apresentou controle menos eficiente de plantas espontâneas do que outras leguminosas, como feijão-de-porco. Entretanto, Caetano et al. (2001) observaram que o feijão-gandu, cultivado nas entrelinhas de citros em formação, suprime significativamente a germinação de plantas espontâneas comparado ao manejo com gradagem e roçagem. Esses resultados discordantes podem dever-se à densidade de semeadura, cultura principal e/ou ao fato de o corte neste experimento ter ocorrido aos 76 dias após a semeadura.

As parcelas onde não foram cultivadas plantas de cobertura apresentaram maior diversidade de espécies espontâneas e, destas, quatro espécies apresentaram os maiores Índices de Valor de Importância (IVI), ou seja, predominância superior a 35% (Figura 1A), enquanto os demais tratamentos (Figura 1BCDEF e G), com exceção do que utilizou gandu com inoculação (Figura 1H), apresentaram predominância de apenas uma ou duas espécies.







**Figura 1.** Densidade, frequência e dominância relativa e índice de valor de importância de plantas espontâneas presentes no cultivo orgânico de cafeeiro Conilon, consorciado com plantas de cobertura nas entrelinhas. Jaguaré - ES.

Dentre as plantas espontâneas, *Bidens subalternans* destacou-se como a espécie que apresentou, em todos os tratamentos, IVI superior a 50%, seguindo-se *Commelina benghalensis*, com IVI superior a 50% em três tratamentos e superior a 40% em cinco tratamentos. Isso configura a predominância de Dicotiledôneas em relação às Monocotiledôneas, na qual *Digitaria sanguinalis* foi a espécie mais representativa da classe (Figura 1). Esses resultados, associados aos de índice de similaridade (Quadro 3), indicam que o uso de plantas de cobertura promove modificações na dinâmica nas populações de plantas espontâneas, concordando com Fávero et al. (2001) e Silva et al. (2006).

**Quadro 3.** Índices de similaridade de plantas espontâneas presentes em diferentes plantas de cobertura consorciadas na entrelinha de cafeeiro Conilon. Jaguaré, ES.

-	Índice de Similaridade (%)						
	Tratamentos	Milheto	FP/SI	FP/CI	MA/SI	MA/CI	FG/SI
Testemunha	70,6	80,0	87,2	77,8	81,1	75,0	82,0
Milheto	-	69,0	72,7	66,7	71,0	53,9	61,1
FP/SI	-	-	82,4	71,0	68,8	81,5	76,5
FP/CI	-	-	-	85,7	83,3	71,0	84,2
MA/SI	-	-	-	-	66,7	64,3	75,0
MA/CI	-	-	-	-	-	69,0	77,8
FG/SI	-	-	-	-	-	-	71,0

FP: feijão-de-porco, MA: mucuna-anã, FG: feijão-guandu, SI. Sem inoculação de rizóbio e CI: com inoculação de rizóbio.

Os índices de similaridade entre os tratamentos foram superiores a 53%, sendo a metade superior a 75%. Os menores índices foram encontrados no tratamento que utilizou milho como planta de cobertura (Quadro 3), indicando que essa gramínea atua de forma diferenciada na supressão de plantas espontâneas, em comparação às outras plantas de cobertura utilizadas.

As plantas de cobertura não exerceram influência negativa nem no crescimento dos ramos plagiotrópicos e nas concentrações de N, P e K das folhas do cafeeiro, em relação à testemunha sem cultivo de plantas de cobertura (Quadro 4), corroborando as informações referidas por Ricci et al. (2005).

**Quadro 4.** Crescimento de ramos plagiotrópicos (20/10/2005 a 05/01/2006) e concentração foliar de N, P e K do cafeeiro Conilon, consorciado com plantas de cobertura nas entrelinhas, no dia da coleta das plantas espontâneas e de cobertura. Jaguaré, ES.

Tratamento	Crescimento do ramo (cm)	Concentração foliar (g kg <sup>-1</sup> )		
		N	P	K
-				
Testemunha	14,3 a	28,3 a	1,42 a	20,0 a
Milheto	14,5 a	30,9 a	1,46 a	18,1 a
Feijão-de-porco	13,1 a	29,1 a	1,40 a	20,7 a
Mucuna-anã	12,5 a	29,2 a	1,43 a	19,4 a
Feijão-guandu	16,9 a	30,4 a	1,40 a	19,4 a
CV (%)	23,1	5,6	7,6	14,3

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não difere entre si pelo teste de Student a 5% de probabilidade.

## CONCLUSÕES

Plantas de cobertura cultivadas nas entrelinhas do cafeeiro Conilon promoveram modificações nas populações de plantas espontâneas e apresentaram efeitos diferenciados.

Plantas de cobertura auxiliaram na supressão de plantas espontâneas e, quando manejadas corretamente, não exerceram influência negativa sobre o cafeeiro, constituindo forma alternativa de manejo.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo e Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, ao agricultor Jaudemir Bettim, ao Fullin Laboratório de Análises Agronômicas, pelo suporte em algumas análises, e ao professor Carlos Pimentel, pelas sementes de milheto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anthofer, J., Kroschel, J. (2005) Above-ground biomass, nutrients, and persistence of an early and a late maturing *Mucuna* variety in the Forest-Savannah Transitional Zone of Ghana. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 110: 59-77.
- Araujo, J. C., Moura, E. G., Aguiar, A. C. F., Mendonça, V. C. M. (2007) Supressão de plantas daninhas por leguminosas anuais em sistema agroecológico na Pré-Amazônia. *Planta Daninha*, 25: 267-275.
- Baligar, V. C., Fageria, N. K., Paiva, A. Q., Silveira, A., Pomella, A. W. V., Machado R. C. R. (2006) Light intensity effects on growth and micronutrient uptake by tropical legume cover crops. *Journal of Plant Nutrition*, 29: 1959-1974.
- BRASIL. (2003) Presidência da República. Casa Civil Sub-chefia de Assuntos Jurídicos. Lei nº 10831 de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de dezembro de 2003.
- Caetano, R. S. X., Christoffoleti, P. J., Victoria Filho, R. (2001) “Banco” de sementes de plantas daninhas em pomar de laranja ‘Pera’. *Scientia Agricola*, 58: 509-517.
- Carneiro, R. G., Mendes, I. De C., Lovato, P. E., Carvalho, A. M. de, Vivaldi, L. J. (2004) Indicadores biológicos associados ao ciclo de fósforo em solos de Cerrado sob plantio direto e plantio convencional. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39:661-669.



- Carvalho, M. A. C. de, Athayde, L. F., Soratto, R. P., Alves, M. C., Sá, M. E. de (2004) Adubação verde e sistemas de manejo do solo na produtividade do algodoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39:1205-1211.
- Chinthapalli, B., Murmu, L., Raghavendra, A. S. (2003) Dramatic difference in the responses of phosphoenolpyruvate carboxylase to temperature in leaves of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Journal of Experimental Botany*, 54: 707-714.
- Conab, Companhia Nacional de Abastecimento (2007) *Primeiro levantamento de café 2007/2008*. Acesso em: 15 de Fevereiro de 2007. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3BoletimCafe.pdf>.
- Dias, G. F. da S., Alves, P. L. da C. A., Souza, T. C. de. (2004) *Brachiaria decumbens* supresses the initial growth of *Coffea arabica*. *Scientia Agrícola*, 61: 579-583.
- Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Solos (1999). *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPS, 412p.
- Epstein, H. E., Lauenroth, W. K., Burke, I. C., Coffin, D. P. (1997) Productivity patterns of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> functional types in the US Great Plains. *Ecology*, 78: 722-731.
- Espindola, J. A. A., Guerra, J. G. M., Perin, A., Teixeira, M. G., Almeida, D. L., Urquiaga, S., Busquet, E. N. B. (2006) Bananeiras consorciadas com leguminosas herbáceas perenes utilizadas como coberturas vivas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41: 415-420.
- Fávero, C., Jucksch, I., Alvarenga, R. C., Costa, L. M. da. (2001) Modificações na população de plantas espontâneas na presença de adubos verdes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36: 1355-1362.
- Fernandes, M. F., Barreto, A. C., Emídio Filho, J. (1999) Fitomassa de adubos verdes e controle de plantas daninhas em diferentes densidades populacionais de leguminosas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34: 1593-1600.
- INCAPER – Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. (2007) *Caraterização climática do município de Jaguaré*. Disponível em: [http://siag.incaper.es.gov.br/jaguare\\_carac.htm](http://siag.incaper.es.gov.br/jaguare_carac.htm). Acesso em: 16 de fevereiro de 2007.
- Klink, C. A., Joly, C. A. (1989) Identification and distribution of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> grasses in open and shaded habitats in São Paulo State, Brazil. *Biotropica*, 21: 30-34.
- Kong, C-H., Wang, P., Xu, X-H. (2007) Allelopathic interference of *Ambrosia trifida* with wheat (*Triticum aestivum*). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 119: 416-420.
- Meda, A. R., Pavan, M. A., Miyazawa, M., Cassiolato, M. E. (2002) Plantas invasoras para melhorar a eficiência da calagem na correção da acidez subsuperficial do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 26: 647-654.

- Moyer-Henry, K. A., Burton, J. W., Israel, D. W., Ruffy, T. W. (2006) Nitrogen transfer between plants: A  $^{15}\text{N}$  natural abundance study with crop and weed species. *Plant and Soil*, 282: 7-20.
- Nayyar, H., Gupta, D. (2006) Differential sensitivity of  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_4$  plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. *Environmental and Experimental Botany*, 58: 106-113.
- Oliveira, A. L. M., Urquiaga, S., Dobereiner, J., Baldani, J. I. (2002a) The effect of inoculating endophytic  $\text{N}_2$ -fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, 242: 205-215.
- Partelli, F. L., Vieira, H. D., Souza, P. M., Golynski, A., Ponciano, N. J. (2006) Perfil socioeconômico dos produtores de café orgânico do norte do Estado do Espírito Santo – satisfação com a atividade e razões de adesão à certificação. *Revista Ceres*, 53: 55-64.
- Pietsch, G., Friedel, J. K., Freyer, B. (2007) Lucerne management in an organic farming system under dry site conditions. *Field Crops Research*, 102: 104-118.
- Ricci, M. S. F., Alves, B. J. R., Miranda, S. C., Oliveira, F. F. (2005) Growth rate and nutritional status of an organic coffee cropping system. *Scientia Agricola*, 62: 138-144.
- Ronchi, C. P., Silva, A. A. (2006) Effects of weed species competition on the growth of young coffee plants. *Planta Daninha*, 24: 415-423.
- Sage, R. F., Kubien, D. S. (2003) *Quo vadis C<sub>4</sub>?* An ecophysiological perspective on global change and the future of  $\text{C}_4$  plants. *Photosynthesis Research*, 77: 209-225.
- Seigler, D. S. (1996) Chemistry and mechanisms of allelopathic interactions. *Agronomy Journal*, 88: 876-885.
- Silva, S. de O., Matsumoto, S. N., Bebé, F. V., José, A. R. S. (2006b) Diversidade e frequência de plantas daninhas em associações entre cafeeiros e grevileas. *Coffee Science*, 1: 126-134.
- Souza Filho, A. P. S., Rodrigues, L. R. A., Rodrigues, T. J. D. (1997) Efeitos do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sob três invasoras de pastagens. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 32: 165-170.
- Souza Filho, A. P. S., Pereira, A. A. G., Bayma, J. C. (2005) Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. *Planta Daninha*, 23: 25-32.
- Teixeira, F. C. P., Reinert, F., Rumjanek, N. G., Boddey, R. M. (2006) Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to *Cratylia mollis* using the  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique in the semi-arid Caatinga region of Brazil. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 1989-1993.

Tuffi Santos, L. D., Santos, I. C., Oliveira, C. H., Santos, M. V., Ferreira, F. A., Queiroz, D. S. (2004) Levantamento fitossociológico em pastagens degradadas sob condições de várzea. *Planta Daninha*, 22: 343-349.

Xuan, T. D., Shinkichi, T., Khanh, T. D., Min, C. I. (2005) Biological control of weeds and plant pathogens in paddy rice by exploiting plant allelopathy: an overview. *Crop Protection*, 24: 197-206.

## **FIXAÇÃO BIOLÓGICA E CICLAGEM DE NUTRIENTES POR PLANTAS DE COBERTURA E SEUS EFEITOS SOBRE CAFÉ CONILON ORGÂNICO**

### **RESUMO**

Objetivou-se, com este trabalho avaliar a ciclagem de nutrientes, a fixação biológica de nitrogênio e o efeito que plantas de cobertura podem causar em lavoura de *C. canephora* cv. Conilon, sob manejo orgânico. O experimento foi conduzido no Estado do Espírito Santo - Brasil, em uma lavoura de café orgânico. Os tratamentos constaram de testemunha (ausência de plantas de cobertura), milho (*Pennisetum glaucum*) e as leguminosas feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), mucuna-anã (*Mucuna deeringiana*) e feijão-guandu (*Cajanus cajan*), com e sem inoculação de rizóbio específico para cada espécie. Efetuaram-se análises químicas de solo e da parte aérea das plantas espontâneas e de cobertura, bem como as concentrações foliares de nutrientes do cafeeiro. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) foi determinada pela técnica da abundância natural. A FBN contribuiu com cerca de 80% do N acumulado pelas leguminosas, sendo que essa contribuição foi equivalente a 27 - 35 kg N ha<sup>-1</sup>. Desta forma, as leguminosas podem suprir parte da necessidade de nitrogênio do cafeeiro Conilon. Não se observou efeito significativo dos tratamentos sobre as

concentrações de nutrientes e o crescimento do cafeeiro Conilon. A inoculação com rizóbio não influenciou a ciclagem de nutrientes e FBN.

## **BIOLOGIC FIXATION AND NUTRIENT CYCLING IN COVER CROPS AND THEIR EFFECT ON ORGANIC CONILON COFFEE**

### **ABSTRACT**

The objective of this work was to evaluate nutrient cycling, biological nitrogen fixation and the effect of cover crops on organic ally grown *Coffea canephora* cv. Conilon. The experiment was performed in an organic ally grown coffee plantation at Espiritu Santo state, Brazil. The treatments consisted on pearl millet (*Pennisetum glaucum*), leguminous plants: jack bean (*Canavalia ensiformis*) and pigeon pea (*Cajanus cajan*), with and without an specific rhizobium inoculation for each species, and a control plot without the use of cover crops. The chemical analysis of soil and weeds and cover plants shoot, as well as the coffee leaves nutrient concentration were also performed. Biological nitrogen fixation (BNF) was determined by the natural abundance technique. BNF contributed with near 80 % of the nitrogen accumulated by the leguminous plants, corresponding to 27 to 35 kg N ha<sup>-1</sup> nitrogen contribution of dry biomass. Thus, leguminous plants may supply part of the Conilon coffee nitrogen requirements. No significant effect of the treatments on Conilon coffee nutrients concentration or growth was observed. Rhizobium inoculation did not influence nutrient cycling and BNF.

## INTRODUÇÃO

A produção mundial de café nos últimos anos tem sido superior a 110 milhões de sacas, obtidas principalmente nos países em desenvolvimento (ICO, 2008). O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café (*Coffea* sp.), gerando divisas e postos de trabalho, além de promover o desenvolvimento rural. Na safra de 2006/2007, a produção nacional foi de 42,5 milhões de sacas, numa área de 2,15 milhões de hectares e com um total de 5,67 bilhões de cafeeiros (Conab, 2007). No ano de 2008, foram exportadas 28 milhões de sacas, o que equivale a, aproximadamente, 65% da produção brasileira e 29% de todo café exportado no mundo (ICO, 2008).

Estima-se que os gastos com fertilizantes e corretivos representem 30% do custo total da produção do cafeeiro. Dos insumos utilizados na cultura do café, aproximadamente, 200 mil toneladas por ano correspondem aos fertilizantes nitrogenados, uma vez que é um dos nutrientes mais exigidos pelas plantas, representando um gasto estimado de cerca de 200 milhões de dólares no Brasil (Embrapa, 2004).

A adoção de práticas conservacionistas, dentre elas a utilização de plantas de cobertura, desponta como uma prática viável. Isso se justifica pois o cultivo de tais espécies favorece a densidade e diversidade de microrganismos edáficos, principalmente solubilizadores de P (Carneiro et al., 2004), melhora a estrutura do solo (Carvalho et al., 2004), proporciona a ciclagem de nutrientes e, quando se utilizam leguminosas, também promove, juntamente com bactérias específicas, a fixação biológica do nitrogênio atmosférico (Oliveira et al., 2002a; Perin et al., 2004; Anthofer e Kroschel, 2005; Ricci et al., 2005; Alves et al., 2006; Teixeira et al., 2006; Pietsch et al., 2007). Dessa forma, tal prática contribui positivamente para o balanço de N e P (Castro et al., 2004; Chu et al., 2004; Alves et al., 2004), aumento do estoque de C e N no solo (Bayer et al., 2000) e, conseqüentemente, pode proporcionar aumento na produção das culturas (Heinrichs et al., 2002; Oliveira et al., 2002b; Spagnollo et al., 2002; Kaizzi et al., 2006).

As plantas de cobertura também podem reduzir a infestação de plantas espontâneas em diversas culturas (Fernandes et al., 1999; Caetano et al., 2001; Fávero et al. 2001; Anthofer e Kroschel, 2005; Silva et al., 2006b). No entanto, quando manejadas de maneira inadequada, podem provocar queda da produção (Paulo et al., 2006; Heinrichs et al., 2002). Assim, torna-se necessária a escolha de plantas de cobertura adaptadas às condições edafoclimáticas e com elevada capacidade de produção de biomassa. Dentre as características desejáveis para essas espécies, podem ser destacadas boa tolerância à seca, baixa exigência nutricional, rápido crescimento e boa capacidade de cobertura do solo.

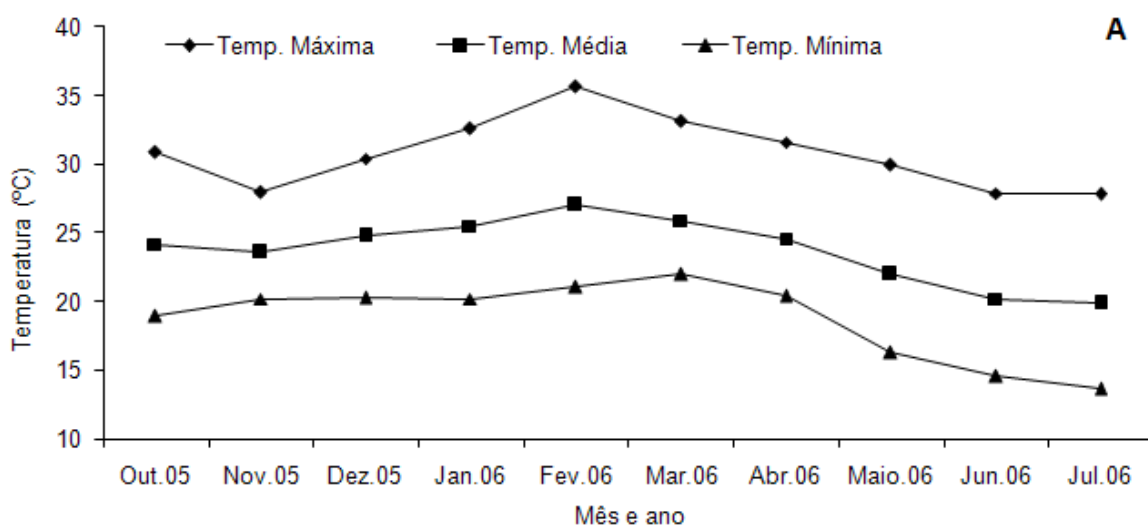
A redução do nitrogênio molecular do ar ( $N_2$ ) até duas moléculas de amônia ( $2 NH_3$ ) ocorre por meio da enzima nitrogenase, através de uma série de processos biológicos que catalisam a redução biológica (Rees e Howard, 2000; Santos et al., 2007). Esse processo implica em gastos de energia (Howard e Rees, 1996; Rees e Howard, 2000).

Segundo Reich et al. (2001), a fixação mundial de N pela indústria é superior a 80 milhões de toneladas, enquanto a proveniente da fixação biológica fica em torno de 170 milhões de toneladas (Schlesinger, 1997). Esse valor pode ser influenciado, dentre outros fatores, pela inoculação de estirpes de bactérias apropriadas (Oliveira et al., 2002a) e aplicação de adubos fosfatados, pois a baixa disponibilidade de P no solo prejudica a fixação biológica de  $N_2$  (Somado et al., 2006; Oberson et al., 2007; Pons et al., 2007). Dessa forma, a melhoria da fertilidade do solo, por meio da ciclagem de nutrientes e substituição e/ou complemento de N com a utilização de plantas fixadoras de  $N_2$ , podem levar a produtividades satisfatórias, com menor custo de produção e com maior sustentabilidade.

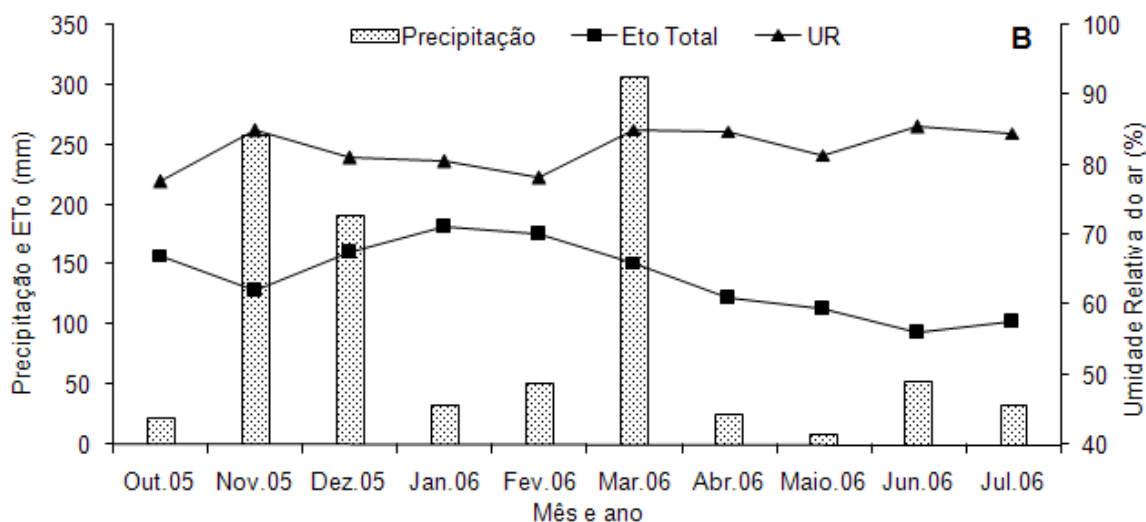
Apesar da relevância do tema, ainda existe necessidade de maiores estudos sobre ciclagem de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio em lavouras de café Conilon (*C. canephora* cv. Conilon), associado à utilização de plantas de cobertura. Assim, objetivou-se, neste trabalho avaliar a ciclagem de nutrientes, a fixação biológica de nitrogênio e o efeito que as plantas de cobertura podem causar em lavoura de *C. canephora*, sob manejo orgânico.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no município de Jaguaré, Espírito Santo - Brasil, localizado a uma altitude de, aproximadamente, 80 m, com coordenadas 18° latitude Sul e 40° longitude Oeste de Greenwich. A região apresenta clima tropical, com verão quente e úmido e inverno seco. A precipitação média anual é de 1200 mm, sendo que a temperatura nos meses mais frios é superior a 12 °C, enquanto nos meses mais quentes é inferior a 34 °C (Incaper, 2007). No período de realização do ensaio, partes dos dados climáticos foram similares à tendência histórica, entretanto ocorreu baixa precipitação nos meses de janeiro e fevereiro, seguido de uma precipitação muito superior à média no mês de março (Figura 1A e B).







**Figura 1** - Médias das temperaturas máximas, média e mínima da atmosfera local (A) e umidade relativa, evapotranspiração total e precipitação total (B) registrados na Estação Meteorológica de Sooretama, ES (distante 40 km da área experimental).

A área experimental consistiu num cafezal formado por *C. canephora* cv. Conilon com 6,5 anos, em espaçamento de 2,0 x 1,5 m, sendo cultivado conforme as normas de produção orgânica (Brasil, 2003). No último ano, foi adubado com 80 g de fosfato natural e 2 kg de composto por cova, correspondendo a 300 kg e 10 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>, respectivamente.

As análises químicas e granulométricas do solo foram realizadas de acordo com Silva (1999). O solo coletado no início do experimento apresentou textura franco arenosa, com 79% de areia, 5% de silte e 16% de argila. O Solo apresentou pH de 4,82, matéria orgânica igual a 1,07 dag kg<sup>-1</sup> e P pelo extrator Mehlich 1, K, Zn, Fe, Mn, Cu e B de 4,52; 40,0; 2,48; 51,6; 17,5; 0,15 e 0,16 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. As concentrações de Ca, Mg, Al, H+Al, soma de bases e capacidade de troca catiônica a pH 7 foram de 1,91; 0,55; 0,08; 2,86; 2,62; e 4,49 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> e saturação de bases de 58,4%. Na mesma ocasião, as folhas do cafeeiro apresentaram 25,0; 0,70; 13,4; 1,50; 0,43 e 0,14 g kg<sup>-1</sup> de N, P, K, Ca, Mg e S, respectivamente, e 9,7; 98,0; 25,6; 24,4; e 51,0 mg kg<sup>-1</sup> de Zn, Fe, Mn, Cu e B, seguidamente, sendo analisadas de acordo com Silva (1999). As amostras para avaliação de solo e folhas foram provenientes de 4 repetições.

As plantas de café não cobriam toda área, permitindo o plantio das espécies de cobertura nas entrelinhas do cafeeiro. O controle das plantas

espontâneas foi realizado anteriormente à condução do experimento por intermédio de capina manual.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, em arranjo fatorial com tratamentos adicionais, com quatro repetições. Os tratamentos constaram de testemunha (sem plantio de plantas de cobertura), milheto (*Pennisetum glaucum* cv. ENA 1) e as leguminosas feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), mucuna-anã (*Mucuna deeringiana*) e feijão-guandu (*Cajanus cajan*), com e sem inoculação de rizóbio específico para cada espécie.

A semeadura das plantas de cobertura foi realizada em outubro de 2005. As covas foram espaçadas 0,4 m umas das outras, em uma única linha por carreira de café, aplicando-se 20 g de fosfato natural por cova (correspondente a 250 kg ha<sup>-1</sup>). A inoculação das sementes de leguminosas com rizóbio foi realizada em forma de pasta úmida, por ocasião da semeadura. Em seguida, foram colocadas 2 a 6 sementes por cova, para as leguminosas e 20 sementes para o milheto.

A coleta das plantas espontâneas foi realizada aos 76 dias após a semeadura das plantas de cobertura, utilizando-se um retângulo de vergalhão, equivalente a 0,5 m<sup>2</sup> (1,0 x 0,5 m), o qual foi colocado sempre na direção da 3ª planta de café, entre a linha da planta de cobertura (no meio da carreira de café) e a linha da carreira de café. As coletas de milheto, feijão-de-porco e mucuna-anã também foram realizadas aos 76 dias após o semeio e a do feijão-guandu aos 170 dias, quando as plantas de cobertura estavam em estágio de floração. Foi determinada a matéria fresca correspondente às plantas localizadas nos 5 m centrais da fileira do meio das plantas de cobertura, perfazendo uma área útil de 10 m<sup>2</sup>, ou seja, 5 m de linha por 2 m de largura da carreira do cafeeiro, tendo cada parcela duas carreiras de bordaduras. Sub-amostras, com cerca de 300 g das plantas de cobertura e de plantas espontâneas, foram coletadas em cada parcela e secas em estufa de circulação forçada à temperatura de 65°C até atingir peso constante, visando determinar a matéria seca, concentração e acúmulo de nutrientes e a fixação biológica de N<sub>2</sub> nas leguminosas.

O acúmulo de nutrientes na parte aérea foi obtido pelo produto da matéria seca pela concentração de nutrientes, analisados conforme Silva (1999). A contribuição da FBN nas leguminosas foi calculada pela técnica da abundância natural de <sup>15</sup>N ( $\delta^{15}\text{N}$ ), conforme Shearer e Kohl (1996) e Boddey et al. (2000), com

a utilização de um espectrômetro de massa Finniga MAT, modelo Delta Plus Alemanha. A contribuição da FBN foi calculada pela equação:

$$\% \text{ FBN} = 100(\delta^{15}\text{N planta testemunha} - \delta^{15}\text{N planta fixadora}) / (\delta^{15}\text{N planta testemunha} - B)$$
, sendo B a proporção de  $^{15}\text{N}$  da planta fixadora crescida em condições de total dependência de fixação biológica de  $\text{N}_2$ , na qual foi utilizado o valor de -0,9 para feijão-guandu (Boddey et al., 2000) e -1 para feijão-de-porco e mucuna-anã, baseado em outras espécies semelhantes relatadas na revisão feita por Boddey et al. (2000). Como referência das plantas não fixadoras de  $\text{N}_2$  foram utilizados o milho (*Pennisetum glaucum*), picão preto (*Bidens subalternans*) e capim pernambuco (*Paspalum maritimum*).

Foi avaliado, ainda, o comprimento de 2 ramos plagiotrópicos jovens (um a dois pares de folhas) e 1 ortotrópico, além das concentrações de N, P e K em folhas dos cafeeiros Conilon, em diferentes períodos: na instalação do ensaio, aos 76 dias após o semeio (corte da 1ª remessa de plantas de cobertura e plantas espontâneas), 170 dias (corte do feijão-guandu) e aos 257 dias após o semeio das plantas de cobertura (período de decomposição da biomassa das espécies). As folhas coletadas estavam situadas no 3º e/ou 4º nó do ramo plagiotrópico, a partir do ápice do ramo localizado no terço mediano superior da planta.

Os procedimentos estatísticos constaram da análise de variância, levando-se em consideração o cálculo de 2 resíduos (um para o fatorial e outro para os tratamentos adicionais). Nas fontes de variação, onde houve diferença significativa, aplicou-se o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para a comparação de médias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por intermédio da análise de variância, foi verificado que a inoculação com estipes de rizóbio proporcionou efeito somente na concentração de ferro na parte aérea do feijão-de-porco (dados não apresentados), apresentando maior valor quando as sementes foram inoculadas ( $61,52 \text{ mg}^{-1}\text{kg}$ ). Possivelmente, esta maior concentração está relacionada ao fato de que no processo de redução do

N<sub>2</sub> envolve proteínas ricas em Fe e ter como cofator da nitrogenase a proteína MoFe (Rees e Howard, 2000; Szilagy et al., 2000; Parro e Moreno-Paz, 2004; Santos et al., 2007). Portanto, a inoculação não exerceu influência direta nas demais variáveis avaliadas, que foram então avaliadas conjuntamente, desconsiderando-se o efeito da inoculação.

As concentrações de N da parte aérea do feijão-de-porco e mucuna-anã foram maiores que os das demais plantas de cobertura (Quadro 1). Normalmente, as leguminosas apresentam altas concentrações de N em seus tecidos vegetais, o que acarreta, depois do seu corte, uma contribuição significativa de N para o sistema solo - planta (Castro et al., 2004; Perin et al., 2004). Nos demais nutrientes quantificados, as concentrações de nutrientes encontradas nas plantas espontâneas foram geralmente maiores (K e Mg) ou semelhantes aos observados em algumas plantas de cobertura, indicando a boa capacidade de ciclagem de nutrientes das plantas espontâneas.

**Quadro 1** - Concentração de nutrientes da parte aérea das plantas de cobertura e espontâneas.

Tratamento	N	P	K	Ca	Mg	S	Zn	Fe*	Mn	Cu	B
-	..... (g <sup>-1</sup> kg) .....						..... (mg <sup>-1</sup> kg) .....				
Espontâneas**	17,5bc	9,08a	22,8a	14,8ab	4,18a	0,95a	50,7ab	82,9a	80,3a	12,4a	22,1a
Milheto	12,1c	7,65ab	13,6b	5,30c	3,10b	1,28a	60,3a	46,3b	21,7b	4,98b	5,97c
Feijão-de-porco	29,1a	8,34ab	13,0b	17,9a	2,66bc	0,96a	27,3d	55,8b	28,6b	5,38b	19,6a
Mucuna-anã	32,6a	10,2a	13,5b	13,4b	2,28c	1,26a	39,4bc	81,2a	66,1a	14,0a	20,3a
Feijão-guandu	19,0b	5,39b	5,59c	7,19c	1,98c	0,46b	20,3d	51,7b	26,1b	6,53b	13,4b
CV (%)	12,81	18,08	20,72	11,18	13,08	18,07	15,01	11,53	34,81	24,07	9,06

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

\* Houve influência da inoculação apenas para o Fe.

\*\* Sem semeio de plantas de cobertura.

A produção de matéria seca do feijão-guandu foi maior que nos demais tratamentos (Quadro 2) ao considerar o seu potencial máximo, o que pode ser explicado pelo fato de essa espécie haver apresentado o maior período vegetativo (170 dias após a semeadura) em relação às demais plantas de cobertura. No entanto, por ocasião do corte das outras plantas de cobertura (76 dias após a semeadura), essa leguminosa apresentava a menor biomassa entre as leguminosas, com apenas 397 kg<sup>-1</sup>ha.

**Quadro 2** - Produtividade de matéria seca (MS) e acúmulo de nutrientes na parte aérea das plantas de cobertura (PC) no início da floração e das plantas espontâneas (PE), por ocasião do corte e adição das palhadas à superfície do solo.

Tratamento	MS (kg <sup>-1</sup> ha)		N (kg <sup>-1</sup> ha)		P (kg <sup>-1</sup> ha)		K (kg <sup>-1</sup> ha)		Ca (kg <sup>-1</sup> ha)		Mg (kg <sup>-1</sup> ha)	
	PC*	PE	PC	PE	PC	PE	PC	PE	PC	PE	PC	PE
Testemunha	1217b	1217a	21,2bc	21,2a	10,7ab	10,7a	27a	27a	18,0a	18,0a	5,2a	5,2a
Milheto	704b	271b	8,4c	4,7b	5,31b	2,5b	9,5b	6,2b	3,7b	4,0b	2,2b	1,1b
F-de-porco	1343b	413ab	39,3ab	7,2ab	11,2ab	3,8ab	17ab	9,4ab	23,9a	6,2ab	3,7ab	1,7ab
M-anã	1047b	440ab	33,9ab	7,7ab	10,6ab	4,0ab	14b	10ab	14,1ab	6,6ab	2,4b	1,9ab
F-guandu	2408a	679ab	44,7a	11,9ab	12,6a	6,2ab	14b	16ab	17,5a	10,1ab	4,7ab	2,9ab
CV (%)	32,0	72,9	32,2	74,6	29,8	73,3	36,9	72,2	36,7	73,6	34,5	74,7
Tratamento	S (kg <sup>-1</sup> ha)		Zn (g <sup>-1</sup> ha)		Fe (g <sup>-1</sup> ha)		Mn (g <sup>-1</sup> ha)		Cu (g <sup>-1</sup> ha)		B (g <sup>-1</sup> ha)	
	PC	PE	PC	PE	PC	PE	PC	PE	PC	PE	PC	PE
Testemunha	1,1a	1,1a	61,8a	61,8a	101a	101a	94a	94a	14,9a	14,9a	27,7a	27,7a
Milheto	0,9a	0,3b	41,9a	13,7b	32,7b	22,4b	16c	22b	3,4b	3,4b	4,3b	6,0b
F-de-porco	1,3a	0,4ab	36,2a	20,9ab	74,0ab	34,2ab	38bc	33ab	7,2ab	5,1ab	26,2a	9,1ab
M-anã	1,3a	0,4ab	40,5a	22,3ab	85,8ab	36,5ab	68ab	35b	14,5a	5,4ab	21,2ab	9,7ab
F-guandu	1,1a	0,7ab	48,7a	34,4ab	124a	56,3ab	62ab	54ab	15,7a	8,4ab	32,4a	15,0ab
CV (%)	28,9	69,2	28,9	70,9	33,3	72,3	37,3	71,9	39,0	73,9	38,9	76,8

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \*Em janeiro o feijão-guandu apresentava apenas 397" c" kg<sup>-1</sup>ha.

Ao considerar o N contido nos tecidos vegetais da parte aérea das leguminosas somados aos das plantas espontâneas, na mesma área onde se cultivou as leguminosas, percebe-se que a ciclagem total de N foi superior ao tratamento sem plantas de cobertura e a área semeada com milho (dados não apresentados), corroborando com Castro et al. (2004) e Perin et al. (2004). Além disso, as leguminosas podem proporcionar melhor aproveitamento de adubos nitrogenados e menor perda de N no sistema solo - planta (Scivittaro et al., 2003; Ambrosano et al., 2005), além de promover melhora da fertilidade do solo (Carvalho et al., 2004). No entanto, há pesquisas mostrando que depois de 3 anos de cultivo de leguminosas as características como carbono orgânico, densidade do solo, porosidade e estabilidade de agregados do solo mantiveram-se inalteradas (Nascimento et al., 2005), bem como a produtividade da cultura (Carvalho et al., 2004). Quando toda a biomassa e as bases contidas na mesma retornam ao solo, a acidez antes produzida durante a assimilação de N, que pode

facilitar a absorção de P (Marschner e Romheld, 1983) é neutralizada durante a sua decomposição e não há mudanças do pH no solo (Nyatsanga e Pierre, 1973).

A acumulação de P pelas leguminosas e plantas espontâneas foi representativa, com maior destaque para o feijão-guandu. Trabalho de Colozzi Filho e Cardoso (2000) mostra que o cultivo da crotalária (*Crotalaria juncea*) na entrelinha de *C. arabica* aumentou a concentração de esporos de fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera do cafeeiro, indicando que essa prática agrícola pode favorecer a presença de tais microrganismos, associados às raízes do cafeeiro, favorecendo, assim, o aumento da absorção de nutrientes como P e C (Marschner e Dell, 1994; Martins e Cruz, 1998). Estudos também indicam que a associação entre micorrizas arbusculares e rizóbios na leguminosa pode melhorar a fixação biológica de N<sub>2</sub> (Chalk et al., 2006).

O acúmulo dos demais nutrientes presentes nos tecidos das plantas de cobertura e espontâneas mostra o potencial que possuem essas espécies para reciclar nutrientes, até mesmo das camadas mais profundas do solo, e, posteriormente (depois do corte e decomposição), disponibilizá-los para as plantas de café. Resultados similares foram relatados por Oliveira et al. (2002b), que estudaram várias espécies de plantas de cobertura cultivadas em monocultura e consorciadas.

O milho é uma planta com grande potencial de produção de biomassa (Boer et al., 2007). Entretanto, no presente trabalho, apresentou baixa produção de massa seca (Quadro 2), fato que pode estar relacionado à sensibilidade dessa espécie à baixa irradiância (Baligar et al., 2006) ocasionada pelo sombreamento do cafeeiro. Tal comportamento se explica porque o milho apresenta metabolismo C<sub>4</sub>, necessitando de elevada luminosidade para desenvolver todo seu potencial de crescimento.

Observa-se que as plantas de cobertura influenciaram no controle das plantas espontâneas (Quadro 2), como relatado por diversos autores (Fernandes et al., 1999; Caetano et al., 2001; Fávero et al., 2001; Anthofer e Kroschel, 2005; Silva et al., 2006b). A interferência, possivelmente, deve-se a um efeito físico, por dificultar a entrada de fótons de luz até as plantas espontâneas, prejudicando seu crescimento por limitação energética e pela competição por nutrientes e água (Sage e Kubien, 2003), já que tais leguminosas apresentaram rápido crescimento inicial e grande produção de massa (Quadro 2), promovendo maior pressão sobre

as plantas espontâneas e, conseqüentemente, exercendo melhor controle sobre essas. Esse efeito também pode ser devido a efeitos alelopáticos (Seigler, 1996), principalmente para o milho, no entanto, os dados do presente trabalho não permitem precisar essa hipótese.

Nota-se, também, que as plantas espontâneas ciclaram grandes quantidades de nutrientes, em alguns casos similares às plantas de cobertura (Quadro 2). Essas proporcionam, segundo Meda et al. (2002), ciclagem de nutrientes, incorporação de calcário e proteção do solo contra a erosão, entretanto, podem competir com a espécie vegetal cultivada por recursos escassos (água, luz e nutrientes), por meio de competição direta, ou liberação de substâncias alelopáticas (Kong et al., 2007), prejudicando, também, o desenvolvimento do cafeeiro (Dias et al., 2004; Ronchi e Silva, 2006).

Os valores de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  encontrados na parte aérea das leguminosas foram significativamente menores do que as testemunhas não fixadoras empregadas como referência (6,986 ‰), indicando uma grande contribuição da FBN na nutrição nitrogenada das leguminosas em estudo. A porcentagem e quantidade de N nas plantas proveniente da FBN entre as leguminosas não diferiram estatisticamente (Quadro 3). Cerca de 80% do N acumulado pelas plantas foram derivados da FBN, de forma similar aos resultados encontrados por Ramos et al. (2001), Chu et al. (2004), Alves et al. (2006) e superior aos relatados por Castro et al. (2004), Perin et al. (2004), Kaizzi et al. (2006), Ovalle et al. (2006), Somado et al. (2006), Teixeira et al. (2006), Oberson et al. (2007), Pietsch et al. (2007).

**Quadro 3** - Valores de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) das leguminosas usadas na adubação verde e contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Tratamento	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	FBN (%)	FBN ( $\text{kg ha}^{-1}$ )
Feijão-de-porco	0,4683	81,37	31,82
Mucuna-anã	0,5100	80,51	27,43
Feijão-guandu	0,8367	77,73	34,87
CV (%)	51,18	5,25	27,17

O valor de  $\delta^{15}\text{N}$  da planta não fixadora de  $\text{N}_2$  foi de  $6,9867 \pm 0,8534$ , em que se utilizaram 3 repetições de cada uma das espécies: *Pennisetum glaucum*, *Bidens subalternans* e *Paspalum maritimum*. Não houve diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste t.

A FBN contribuiu com 27 a 34 kg N<sup>-1</sup>ha para o sistema de produção, sem considerar a contribuição das raízes, quantidades que podem ser consideradas modestas, mas essa contribuição depende da produção de biomassa das plantas (Reining, 2005) e pode ser subestimada também pelas perdas de N fixado transferido para o solo ou para outras plantas do consórcio (Sierra e Nigre, 2006; Dias et al., 2007). Os elevados valores de FBN podem estar relacionados ao fato de que o solo apresentava baixos valores de N (não adubado com adubos industrializados/solúveis e baixo conteúdo de matéria orgânica) e a boa disponibilidade de água proveniente de chuvas (Figura 1) e da irrigação na época de desenvolvimento das plantas, os quais são fatores que favorecem a fixação biológica de N<sub>2</sub> (Hungria e Vargas, 2000; Ramos et al., 2001; Reining, 2005; Teixeira et al., 2006; Patra et al., 2007; Pietsch et al., 2007).

Trabalhos realizados por Castro et al. (2004) indicaram que a crotalária (*C. juncea*) apresentou um percentual médio de 53% de N proveniente da fixação. Segundo Perin et al. (2004), quando consorciada, a crotalária atinge 61% de N proveniente da fixação e de 57% quando cultivada isoladamente. No cultivo da soja a fixação biológica de N foi superior a 82% (Alves et al., 2006). Pietsche et al., 2007 relatam que o *Medicago sativa* incorporou ao solo 89 a 125 kg ha<sup>-1</sup> de N, sendo 27 a 33% proveniente da fixação biológica. Segundo Ramos et al. (2001), a fixação biológica de N da *C. juncea* foi de 70% e *Mucuna aterrima* de 40%. Ovalle et al. (2006) encontraram no Chile valores de 74 a 94% de N proveniente da fixação biológica em leguminosas forrageiras. Silva et al. (2006a) mostraram que a crotalária, em 2 anos agrícolas, proporcionou no milho cultivado sem a aplicação de N, um efeito similar à aplicação de 56 e 73 kg ha<sup>-1</sup> de N-uréia.

A inoculação com estirpes apropriadas de bactérias fixadoras em sementes de leguminosas pode proporcionar um aumento da FBN na ordem de 30% em relação às espécies que não foram inoculadas (Oliveira et al., 2002a). Entretanto, no presente trabalho, isso não ocorreu. Tal fato pode estar relacionado com a presença natural do rizóbio na área experimental, uma vez que nos anos anteriores a área já tinha sido cultivada com espécies de leguminosas.

As plantas de cobertura, assim como as plantas espontâneas do tratamento testemunha, não exerceram influência diferenciada no crescimento dos ramos plagiotrópicos e ortotrópicos do cafeeiro (Quadro 4), corroborando as informações de Ricci et al. (2005). Por conseguinte, percebe-se que ocorrem



variações nas concentrações foliares de N, P e K do cafeeiro em períodos distintos. Isso possivelmente está associado ao próprio comportamento do cafeeiro em apresentar variações da concentração foliar dos nutrientes conforme a época do ano (Partelli et al., 2007), porém, dentro do mesmo período avaliado, não houve diferença entre os tratamentos (Quadro 5).

**Quadro 4** - Crescimento vegetativo (cm) de ramos plagiotrópicos e ortotrópicos do cafeeiro em diferentes períodos: montagem do ensaio até o primeiro corte (0-76 dias), primeiro corte até corte do feijão-guandu (76-94 dias) e crescimento da montagem até período posterior a decomposição da matéria seca (94- 257 dias).

Tratamento	Ramos plagiotrópicos			Ramos ortotrópicos		
	0-76 dias	76-94 dias	94- 257 dias	0-76 dias	76-94 dias	94- 257 dias
-						
Testemunha	14,3	9,55	26,0	7,15	6,13	15,2
Milheto	14,5	10,6	26,6	7,58	8,20	18,0
Feijão-de-porco	11,1	10,8	24,9	5,53	8,16	17,2
Mucuna-anã	12,5	8,74	23,1	7,26	7,43	17,6
Feijão-guandu	16,9	11,2	30,4	7,86	6,54	16,6
CV (%)	24,73	37,58	23,01	23,35	34,71	23,35

Não houve diferenças significativas pelo teste de t a 5% de probabilidade.

**Quadro 5** - Concentração foliares de N, P e K do cafeeiro em diferentes períodos: montagem do ensaio (N0, P0 e K0), primeiro corte (N1, P1 e K1), corte do feijão-guandu (N2, P2 e K2) e período posterior a decomposição da matéria seca (N3, P3 e K3).

Tratamento	N0	N1	N2	N3	P0	P1	P2	P3	K0	K1	K2	K3
-	..... (g <sup>-1</sup> kg) .....											
Testemunha	25ab	28,3a	28,6a	21,8b	0,7c	1,42a	1,36a	1,06b	13,4b	20,0a	18,3ab	16,7ab
Milheto	25b	30,9a	29,9a	23,2b	0,7c	1,46a	1,35ab	1,06b	13,4a	18,1a	15,83a	14,4a
F-de-porco	25bc	29,1a	28,8ab	23,8c	0,7c	1,40a	1,24a	1,07b	13,4b	20,0a	16,8ab	16,9ab
M-anã	25bc	29,2a	28,4ab	22,8c	0,7c	1,43a	1,34ab	1,06b	13,4b	19,4a	16,9ab	16,7ab
F-guandu	25b	30,4a	27,3ab	24,4b	0,7c	1,40a	1,24ab	1,08b	13,4b	19,4a	15,5ab	16,7ab
CV (%)		6,52				8,98				14,55		

Não houve diferenças na concentração foliar de todos os nutrientes na coluna. Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Estudos conduzidos por Bergo et al. (2006) indicam que a eficiência do uso de plantas de cobertura consorciadas com *C. canephora* depende da espécie,

espaçamento, idade da lavoura, região cultivada e outros fatores que podem influenciar o comportamento dos adubos verdes. Segundo Paulo et al. (2006), o feijão-guandu (*C. cajan*) prejudica a produção de *C. arabica*, enquanto que as outras leguminosas (*C. spectabilis*, *M. deeringeanu*, *C. juncea* e *G. max*) não alteram a produção.

A liberação de nutrientes dos tecidos das plantas de cobertura e espontâneas para as plantas cultivadas ocorre em função de fatores como condições climáticas (estação seca ou chuvosa) e espécie de leguminosa, em razão da relação carbono/nitrogênio, teores de lignina e hemicelulose (Espindola et al., 2006), sendo que a decomposição pode ser superior a 50% para a maioria dos nutrientes já nos primeiros 30 dias posteriores ao corte (Salmi et al., 2006; Boer et al., 2007). Dessa forma, as plantas de cobertura cortadas no final de dezembro podem fornecer nutrientes, inclusive N proveniente da fixação biológica, já em janeiro/fevereiro, época em que o cafeeiro está em pleno enchimento de grãos, apresentando grande necessidade de nutrientes (Bragança et al., 2001; Camargo e Camargo, 2001). O feijão-guandu forneceu nutriente depois de julho, dois meses antes do início da floração do café Conilon, época importante, uma vez que a adubação deve começar antes do florescimento (Malavolta et al., 2002).

## CONCLUSÕES

A FBN contribuiu com cerca de 80% do N acumulado pelas leguminosas, sendo que em função da produção de biomassa seca a contribuição foi equivalente a 27 – 35 kg N ha<sup>-1</sup>. Desta forma, as leguminosas podem suprir parte da necessidade de nitrogênio do cafeeiro Conilon.

O feijão-de-porco e mucuna-anã apresentaram maior concentração de N e B e o acúmulo de nutrientes variaram entre as plantas de cobertura.

No período experimental não se observou efeito significativo dos tratamentos sobre as concentrações de nutrientes e o crescimento do cafeeiro Conilon.

A inoculação com rizóbio não influenciou a acumulação de nutrientes e fixação biológica de N.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, pela bolsa de doutorado do primeiro autor e estrutura para realização dos trabalhos. À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, pelo financiamento de parte da pesquisa. Ao agricultor Jaudemir Bettim, por disponibilizar a lavoura e ajudar na manutenção e na coleta no campo. Ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER, pelo suporte em algumas análises. À EMBRAPA Agrobiologia, pelo suporte nas análises de  $^{15}\text{N}$ .

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, B. J. R., Zotarelli, L., Fernandes, F. M., Heckler, J. C., Macedo, R. A. T., Boddey, R. M., Jantalia, C. P., Urquiaga, S. (2006) Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41: 449-456.

- Alves, S. M. C., Abboud, A. C., Ribeiro, R. L. D., Almeida, D. L. (2004) Balanço do nitrogênio e fósforo em solo com cultivo orgânico de horaliças após a incorporação de biomassa de guandu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 1111-1117.
- Ambrosano, E. J., Trivelin, P. C. O., Cantarella, H., Ambrosano, G. M. B., Schammas, E. A., Guirado, N., Rossi, F., Mendes, P. C. D., Muraoka, T. (2005) Utilization of nitrogen from green manure and mineral fertilizer by sugarcane. *Scientia Agrícola*, 62: 534-542.
- Anthofer, J., Kroschel, J. (2005) Above-ground biomass, nutrients, and persistence of an early and a late maturing *Mucuna* variety in the Forest-Savannah Transitional Zone of Ghana. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 110: 59-77.
- Baligar, V. C., Fageria, N. K., Paiva, A. Q., Silveira, A., Pomella, A. W. V., Machado, R. C. R. (2006) Light intensity effects on growth and micronutrient uptake by tropical legume cover crops. *Journal of Plant Nutrition*, 29: 1959-1974.
- Bayer, C., Mielniczuck, J., Amado, T. J. C., Martin-Neto, L., Fernandes, S. V. (2000) Organic matter storage in a Sandy Clay loam Acrisoleffected tillage and cropping systems in southern Brazil. *Soil & Tillage Research*, 54: 101-109.
- Bergo, C. L., Pacheco, E. P., Mendonça, H. A., Marinho, J. T. S. (2006) Avaliação de espécies leguminosas na formação de cafezais no segmento da agricultura familiar no Acre. *Acta Amazônica*, 36: 19-24.
- Boddey, R. M., Peoples, M. B., Palmer, B., Dart, P. J. (2000) Use of <sup>15</sup>N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 57: 235-270.
- Boer, C. A., Assis, R. L. de, Silva, G. P., Braz, A. J. B. P., Barroso, A. L. de L., Cargnelutti Filho, A., Pires, F. R. (2007) Ciclagem de nutrientes por plantas de cobertura na entressafra em um solo de cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42: 1269-1276.
- Bragança, S. M., Carvalho, C. H. S., Fonseca, A. F. A., Ferrão, R. V. (2001) Variedades clonais de café Conilon para o Estado do Espírito Santo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36: 765-770.
- BRASIL. (2003) Presidência da República. Casa Civil Sub-chefia de Assuntos Jurídicos. Lei nº 10831 de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de dezembro de 2003.
- Caetano, R. S. X., Christoffoleti, P. J., Victoria Filho, R. (2001) "Banco" de sementes de plantas daninhas em pomar de laranja 'Pera'. *Scientia Agrícola*, 58: 509-517.

- Camargo, A. P. de, Camargo, M. B. P. de. (2001) Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. *Bragantia*, 60: 65-68.
- Carneiro, R. G., Mendes, I. de C., Lovato, P. E., Carvalho, A. M. de, Vivaldi, L. J. (2004) Indicadores biológicos associados ao ciclo de fósforo em solos de Cerrado sob plantio direto e plantio convencional. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 661-669.
- Carvalho, M. A. C. de, Athayde, L. F., Soratto, R. P., Alves, M. C., Sá, M. E. de. (2004) Adubação verde e sistemas de manejo do solo na produtividade do algodoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 1205-1211.
- Castro, C. M. de, Alves, B. J. R., Almeida, D. L. de, Ribeiro, R. de L. D. (2004) Adubação verde como fonte de nitrogênio para a cultura da berinjela em sistema orgânico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 779-785.
- Chalk, P. M., Souza, R. de F., Urquiaga, S., Alves, B. J. R., Boddey, R. M. (2006) The role of arbuscular mycorrhiza in legume symbiotic performance. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 2944-2951.
- Chu, G. X., Shen, Q. R., Cao, J. L. (2004) Nitrogen fixation and N transfer from peanut to rice cultivated in aerobic soil in an intercropping system and its affect on soil N fertility. *Plant and Soil*, 263: 17-27.
- Colozzi Filho, A., Cardoso, E. J. B. N. (2000) Detecção de fungos micorrízicos arbusculares em raízes de cafeeiro e de crotalária cultivada na entrelinha. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35: 2033-2042.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). (2007) *3º levantamento de café 2007/2008 - agosto 2007*. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/Boletim.pdf>. Acesso em: 7 de dezembro. 2007.
- Dias, G. F. da S., Alves, P. L. da C. A., Souza, T. C. de. (2004) *Brachiaria decumbens* supresses the initial growth of *Coffea arabica*. *Scientia Agrícola*, 61: 579-583.
- Dias, P. F., Souto, S. M., Resende, A. S., Urquiaga, S., Rocha, G. P., Moreira, J. F., Franco, A. A. (2007) Transferência do N fixado por leguminosas arbóreas para o capim *Survenola* crescido em consórcio. *Ciência Rural*, 37: 352-356.
- Embrapa, Café (2004) *Consórcio Brasileiro de Pesquisas e desenvolvimento do café*. 147p.
- Espindola, J. A. A., Guerra, J. G. M., Almeida, D. L., Teixeira, M. G., Urquiaga, S. (2006) Decomposição e liberação de nutrientes acumulados em leguminosas herbáceas perenes consorciadas com bananeira. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30: 321-328.

- Fávero, C., Jucksch, I., Alvarenga, R. C., Costa, L. M. da. (2001) Modificações na população de plantas espontâneas na presença de adubos verdes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36: 1355-1362.
- Fernandes, M. F., Barreto, A. C., Emídio Filho, J. (1999) Fitomassa de adubos verdes e controle de plantas daninhas em diferentes densidades populacionais de leguminosas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34: 1593-1600.
- Heinrichs, R., Vitti, G. C., Moreira, A., Fancelli, A. L. (2002) Produção e estado nutricional do milho em cultivo intercalar com adubos verdes. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 26: 225-230.
- Howard, J. B., Rees, D. C. (1996) Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chemistry*, 96: 2965-2982.
- Hungria, M., Vargas, M. A. T. (2000) Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65: 151-164.
- ICO, International Coffee Organization. (2008) *Trade statistics*. Disponível em: [http://www.ico.org/coffee\\_prices.asp](http://www.ico.org/coffee_prices.asp). Acesso em: 21 de fevereiro de 2008.
- INCAPER – Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. (2007) *Caraterização climática do município de Jaguaré*. Disponível em: [http://siag.incaper.es.gov.br/jaguare\\_carac.htm](http://siag.incaper.es.gov.br/jaguare_carac.htm). Acesso em: 16 de fevereiro de 2007.
- Kaizzi, C. K., Ssali, H., Vlek, P. L., G. (2006) Differential use and benefits of Velvet bean (*Mucuna pruriens* var. *utilis*) and N fertilizers in maize production in contrasting agro-ecological zones of E. Uganda. *Agricultural Systems*, 88, 44-60.
- Kong, C-H., Wang, P., Xu, X-H. (2007) Allelopathic interference of Ambrosia trifida with wheat (*Triticum aestivum*). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 119: 416-420.
- Malavolta, E., Favarin, J. L., Malavolta, M., Cabral, C. P, Heinrichs, R., Silveira, J. S. M. (2002) Repartição de nutrientes nos ramos, folhas e flores do cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37: 1017-1022.
- Marschner, H., Dell, B. (1994) Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*, 159: 89-102.
- Marschner, H., Romheld, V. (1983) In vivo measurement of root-induced pH changes at the soil-root interface: effect of plant species and nitrogen source. *Zeitschrift fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde*, 111: 241-251.
- Martins, M. A., Cruz, A. F. (1998) The role of the external mycelial network of arbuscular mycorrhizal fungi. III. A study of nitogen transfer between plants interconnected by a common mycelium, *Revista de Microbiologia*, 29: 289-294.

- Meda, A. R., Pavan, M. A., Miyazawa, M., Cassiolato, M. E. (2002) Plantas invasoras para melhorar a eficiência da calagem na correção da acidez subsuperficial do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 26: 647-654.
- Nascimento, J. T., Silva, I. F., Santiago, R. D., Silva Neto, L. F. (2005) Efeito de leguminosas nos atributos físicos e carbono orgânico de um Luvissole. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29: 825-831.
- Nyatsanga, T., Pierre, W. H. (1973) Effect on nitrogen fixation by legumes on soil acidity. *Agronomy Journal*, 65: 936-940.
- Oberson, A., Nanzer, S., Bosshard, C., Dubois, D., Mader, P., Frossard, E. (2007) Symbiotic N<sub>2</sub> fixation by soybean in organic and conventional cropping systems estimated by <sup>15</sup>N dilution and <sup>15</sup>N natural abundance. *Plant and Soil*, 290: 69-83.
- Oliveira, A. L. M., Urquiaga, S., Dobereiner, J., Baldani, J. I. (2002a) The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, 242: 205-215.
- Oliveira, T. K. de, Carvalho, G. J. de, Moraes, R. N. de S. (2002) Plantas de cobertura e seus efeitos sobre o feijoeiro em plantio direto. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37: 1079-1087.
- Ovalle, C., Urquiaga, S., Del Pozo, A., Zagal, E., (2006) Arredondo, S. Nitrogen fixation in six forage legumes in Mediterranean central Chile. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 56: 277-283.
- Partelli, F. L., Vieira, H. D., Carvalho, V. B. de, Mourão Filho, F. de A. A. (2007) Diagnosis and recommendation integrated system norms, sufficiency range, and nutritional evaluation of *Arabian coffee* in two sampling periods. *Journal of Plant Nutrition*, 30: 1651-1667.
- Parro, V., Moreno-Paz, M. (2004) Nitrogen fixation in acidophile iron-oxidizing bacteria: The *nif* regulon of *Leptospirillum ferrooxidans*. *Research in Microbiology*, 155, 703-709.
- Patra, A. K., Le Roux, X., Abbadie, L., Clays-Josserand, A., Poly, F., Loiseau, P., Louault, F. (2007) Effect of microbial activity and nitrogen mineralization on free-living nitrogen fixation in permanent grassland soils. *Journal Agronomy & Crop Science*, 193: 153-156.
- Paulo, E. M., Berton, R. S., Cavichioli, J. C., Bulisani, E. A., Kasai, F. S. (2006) Produtividade do cafeeiro Mundo Novo enxertado e submetido à adubação verde antes e após recepa da lavoura. *Bragantia*, 65: 115-120.
- Perin, A., Santos, R. H. S., Urquiaga, S., Guerra, J. G. M., Cecon, P. R. (2004) Produção de fitomassa, acumulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39:35-40.

- Pietsch, G., Friedel, J. K., Freyer, B. (2007) Lucerne management in an organic farming system under dry site conditions. *Field Crops Research*, 102: 104-118.
- Pons, T. L., Perreijn, K., van Kessel, C., Werger, M. J. A. (2007) Symbiotic nitrogen fixation in a tropical rainforest:  $^{15}\text{N}$  natural abundance measurements supported by experimental isotopic enrichment. *New Phytologist*, 173: 154-167.
- Ramos, M. G., Villatoro, M. a. A., Urquiaga, S., Alves, B, J. R., Boddey, R. M. (2001) Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to tropical green manure crops and the residual benefit to a subsequent maize crop using  $^{15}\text{N}$ -isotope techniques. *Journal of Biotechnology*, 91: 105-115.
- Rees, D. C., Howard, J. B. (2000) Nitrogenase: standing at the crossroads. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4: 559-566.
- Reich, P. B., Knops, J., Tilman, D., Craine, J., Ellsworth, D., Tjoelker, M., Lee, T., Wedink, D., Naeem, S., Bahaeddin, D., George, D., Hendrey, G., Jose, S., Wrage, K., Goth, J., Bengston, W. (2001) Plant diversity enhances ecosystem responses to elevated  $\text{CO}_2$  and nitrogen deposition. *Nature*, 410: 809-812.
- Reining, E. (2005) Assessment tool for biological nitrogen fixation of *Vicia faba* cultivated as spring main crop. *European Journal of Agronomy*, 23: 392-400.
- Ricci, M. S. F., Alves, B. J. R., Miranda, S. C., Oliveira, F. F. (2005) Growth rate and nutritional status of an organic coffee cropping system. *Scientia Agricola*, 62: 138-144.
- Ronchi, C. P., Silva, A. A. (2006) Effects of weed species competition on the growth of young coffee plants. *Planta Daninha*, 24: 415-423.
- Sage, R. F., Kubien, D. S. (2003) *Quo vadis C<sub>4</sub>*? An ecophysiological perspective on global change and the future of  $\text{C}_4$  plants. *Photosynthesis Research*, 77: 209-225.
- Salmi, S. P., Salmi, A. P., Abboud, A. C. de S. (2006) Dinâmica de decomposição e liberação de nutrientes de genótipos de guandu sob cultivo em aléias. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41: 673-678.
- Santos, P. C. dos, Mayer, S. M., Barney, B. M., Seefeldt, L. C., Dean, D. R. (2007) Alkyne substrate interaction within the nitrogenase MoFe protein. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101: 1642-1648.
- Schlesinger, W. H. (1997) *Biogeochemistry: an analysis of global change*. 2<sup>nd</sup> Edition. Academic Press, San Diego, 443p.
- Scivittaro, W. B., Muraoka, T., Boaretto, A. E., Trivelin, P. C. O. (2003) Transformação do nitrogênio proveniente de mucuna-preta e uréia utilizando como adubo na cultura do milho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 26: 225-230.



- Seigler, D. S. (1996) Chemistry and mechanisms of allelopathic interactions. *Agronomy Journal*, 88: 876-885.
- Shearer, G.; Kohl, D. H. (1996) N<sub>2</sub>-fixation in field settings: estimations based on natural <sup>15</sup>N abundance. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13: 699-756.
- Sierra, J., Nygren, P. (2006) Transfer of N fixed by a legume tree to the associated grass in a tropical silvopastoral system. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 1893-1903.
- Silva, E. C. da, Muraoka, T., Buzetti, S., Veloso, m. E. da C., Trivelin, P. C. O. (2006a) Aproveitamento do nitrogênio (<sup>15</sup>N) da crotalária e do milheto pelo milho sob plantio direto em Latossolo Vermelho de Cerrado. *Ciência Rural*, 36: 739-746.
- Silva, F. C. da (org) (1999). *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Brasília: EMBRAPA, 370p.
- Silva, S. de O., Matsumoto, S. N., Bebé, F. V., José, A. R. S. (2006b) Diversidade e frequência de plantas daninhas em associações entre cafeeiros e Grevileas. *Coffee Science*, 1: 126-134.
- Somado, E. A., Sahrawat, K. L., Kuehne, R. F. (2006) Rock phosphate-P enhances biomass and nitrogen accumulation by legumes in upland crop production systems in humid West Africa. *Biology and Fertility Soils*, 43: 124-130.
- Spagnollo, E., Bayer, C., Wildner, L. P., Ernani, P. R., Albuquerque, J. A., Proença, M. M. (2002) Leguminosas estivais intercalares como fonte de nitrogênio para o milho, no sul do Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 417-423.
- Szilagyi, R. K., Musaev, D. G., Morokuma, K. (2000) Theoretical studies of biological nitrogen fixation. Part II. Hydrogen bonded networks as possible reactant and product channels. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 506: 131-146.
- Teixeira, F. C. P., Reinert, F., Rumjanek, N. G., Boddey, R. M. (2006) Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to *Cratylia mollis* using the <sup>15</sup>N natural abundance technique in the semi-arid Caatinga region of Brazil. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 1989-1993.

## **ATRIBUTOS QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DO SOLO EM CAFEIEIRO CONILON SOB MANEJO ORGÂNICO E CONVENCIONAL**

### **RESUMO**

O cultivo de *Coffea* sp. utilizando o manejo convencional e orgânico abrange grandes áreas, entretanto, há falta de informação sobre a sustentabilidade dessas formas de cultivo. No presente trabalho, teve-se por objetivo avaliar as características químicas e microbiológicas do solo cultivado com cafeeiros Conilon (*C. canephora*) em manejo orgânico e convencional. Foram selecionadas duas áreas cultivadas com café Conilon (manejo orgânico e convencional) e uma área de fragmento de mata Atlântica, utilizada como referência. Realizou-se análise química, granulométrica, carbono e nitrogênio da biomassa microbiana e atividade respiratória de microrganismos do solo, em janeiro e julho, na profundidade de 0 a 10 cm e 10 a 20 cm. Os dados foram submetidos à análise multivariada e análise descritiva das variáveis. O carbono da biomassa microbiana foi o atributo microbiológico do solo que mais contribuiu para agrupar as diferentes formas de cultivo. O solo do fragmento de mata Atlântica, seguido pelo solo de café Conilon sob manejo orgânico, apresentaram os melhores indicadores de qualidade de solo. Os atributos microbiológicos

variaram conforme a época do ano e profundidade do solo, apresentando maiores valores de carbono e nitrogênio da biomassa microbiana na camada superficial no mês de janeiro. Do ponto de vista nutricional, os sistemas de manejo estudados (orgânico e convencional) apresentaram comportamento similar.

## **CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL SOIL CHARACTERISTICS OF CONILON COFFEE UNDER CONVENTIONAL AND ORGANIC MANAGEMENT**

### **ABSTRACT**

Coffee crops under conventional and organic management have a great area extension; nevertheless, there is a lack of information about the sustainability of these cultivation methods. This work has the objective of evaluate soil chemical and microbiological characteristics under conventional and organic management in Conilon (*C. canephora*) coffee areas. Two areas cultivated with Conilon coffee (conventional and organic management) and one area of Atlantic Forest (used as reference), were selected. Chemical, texture, carbon and nitrogen microbial biomass and soil microorganism respiratory activity analysis were performed in January and July, at 0-10 cm and 10-20 cm depth. Multivariate and descriptive data analysis were performed. Microbial biomass carbon was the soil attribute that showed the highest contribution to cluster the different cultivation methods. Atlantic Forest soil followed by the Conilon coffee under organic management, showed the best soil quality indexes. Microbiological attributes vary according to year season and soil depth, showing higher values of carbon and nitrogen of the microbial biomass on surface levels in January. From the nutritional point of view, the management systems studied (conventional and organic) had similar results.

## INTRODUÇÃO

A produção mundial de café nos últimos anos tem sido superior a 110 milhões de sacas, produzido principalmente nos países em desenvolvimento (ICO, 2008). Na safra de 2006/2007, a produção nacional de *C. canephora* foi de 9,5 milhões de sacas e a produção total de 42,5 milhões de sacas, numa área de 2,15 milhões de hectares com 5,67 bilhões de cafeeiros (Conab, 2007), sendo exportados em 2007, 28 milhões de sacas, o que equivale a 65% da produção nacional e, aproximadamente, 29% das exportações mundiais do produto (ICO, 2008).

O cultivo de *Coffea* sp., utilizando o manejo convencional, ocorre na maioria das áreas cafeeiras do Brasil, entretanto, o manejo orgânico tem crescido, criando um novo nicho de mercado muito peculiar de cafés especiais, o nicho dos “cafés orgânicos”. Essa forma de produção pode ser favorecida pela existência de um mercado disposto a pagar maior valor pelo produto e enquadramento no “mercado justo”. Contudo, possui limitações, como custo de certificação, falta de profissionais e pesquisas específicas para o manejo da cultura, dificuldades em substituir a adubação e em obtenção de melhores preços (Partelli et al., 2006b).

A biomassa microbiana é a parte viva da matéria orgânica do solo e contém de 1 a 4% de carbono e de 3 a 5% de nitrogênio, os quais representam um reservatório de nutrientes para as plantas, que através do processo de decomposição da matéria orgânica, promove a sustentabilidade biológica e a produtividade nos ecossistemas (Schloter et al., 2003). A imobilização e liberação dos nutrientes dependem da dinâmica dos microrganismos do solo, da quantidade de resíduos vegetais e da eficiência de utilização de C pela microbiota presente (Baudoin et al., 2003). A biomassa microbiana pode apresentar mudanças rápidas com a adição de insumos orgânicos aplicados no solo, determinando a decomposição da matéria orgânica, a relação C:N, a mineralização e a imobilização de nutrientes (Hatch et al., 2000). O rápido retorno de N ao solo pelos microrganismos contribui para o processo de mineralização, sendo considerado relevante para a manutenção de ecossistemas naturais (Jenkinson et al., 2000; Conte et al., 2002).

A agricultura convencional trouxe muito progresso para a Ciência Agrônômica em termos de conhecimentos e de produtividade por unidade de área a curto prazo, entretanto, o uso inadequado dessa tecnologia tem ocasionado degradação do solo e do ambiente (Balota et al., 1998; Oliveira et al., 2003; Carneiro et al., 2004). A agricultura convencional também requer maior consumo de energia fóssil, principalmente pelo alto consumo de fertilizantes e defensivos agrícolas (Castellini et al., 2006; Gündoğmuş, 2006), e contribui para o efeito estufa através do aumento da liberação de CO<sub>2</sub> para atmosfera (Kaltsas et al., 2007), colocando em cheque a sobrevivência deste modelo de desenvolvimento. Assim, novos conceitos e procedimentos agrícolas surgem em busca de sustentabilidade, dentre eles a agricultura orgânica (Brasil, 2003), a qual pode promover um desenvolvimento rural mais sustentável, principalmente para a agricultura familiar (Partelli et al., 2006b).

Nos ecossistemas agrícolas e naturais, o solo pode ser considerado como o principal elo entre os componentes da biosfera (Rochette e Angers, 1999). O carbono presente na biomassa microbiana (CBM) é o C em início de transformação no solo, o qual proporciona energia armazenada para processos microbianos, apresentando respostas rápidas às alterações no solo, podendo ser utilizado como indicador precoce de modificações na matéria orgânica e alterações na atividade microbiana e qualidade do solo (D'Andrea et al., 2002; Matsuoka et al., 2003; Pereira et al., 2004), bem como o nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) (Perez et al., 2005).

Um conhecimento interdisciplinar que permita integrar os diversos componentes de um agrossistema (solo - planta - ambiente) é importante para melhor entender os fatores que estão relacionados à produtividade e ao manejo dos cafeeiros orgânicos e convencionais. Assim, no presente trabalho teve-se por objetivo avaliar as características químicas e microbiológicas do solo cultivado com cafeeiros Conilon (*C. canephora*) em manejo orgânico e convencional.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no município de Jaguaré, Estado do Espírito Santo - Brasil, localizado a uma altitude de, aproximadamente 80 m, com coordenadas 18º latitude Sul e 40º longitude Oeste. A região é caracterizada pelo clima tropical, com verão quente e úmido e inverno seco. A precipitação anual média é de 1200 mm e a temperatura nos meses mais frios é superior a 12°C, e nos meses mais quentes, inferior a 34°C (Incaper, 2007). No período de realização do experimento, parte dos dados climáticos foram similares à tendência histórica; entretanto, ocorreu baixa precipitação nos meses de janeiro e fevereiro, enquanto em março houve maior precipitação que a média histórica (Figura 1A e B). A estação meteorológica fica localizada a 40 km de distância da área experimental.

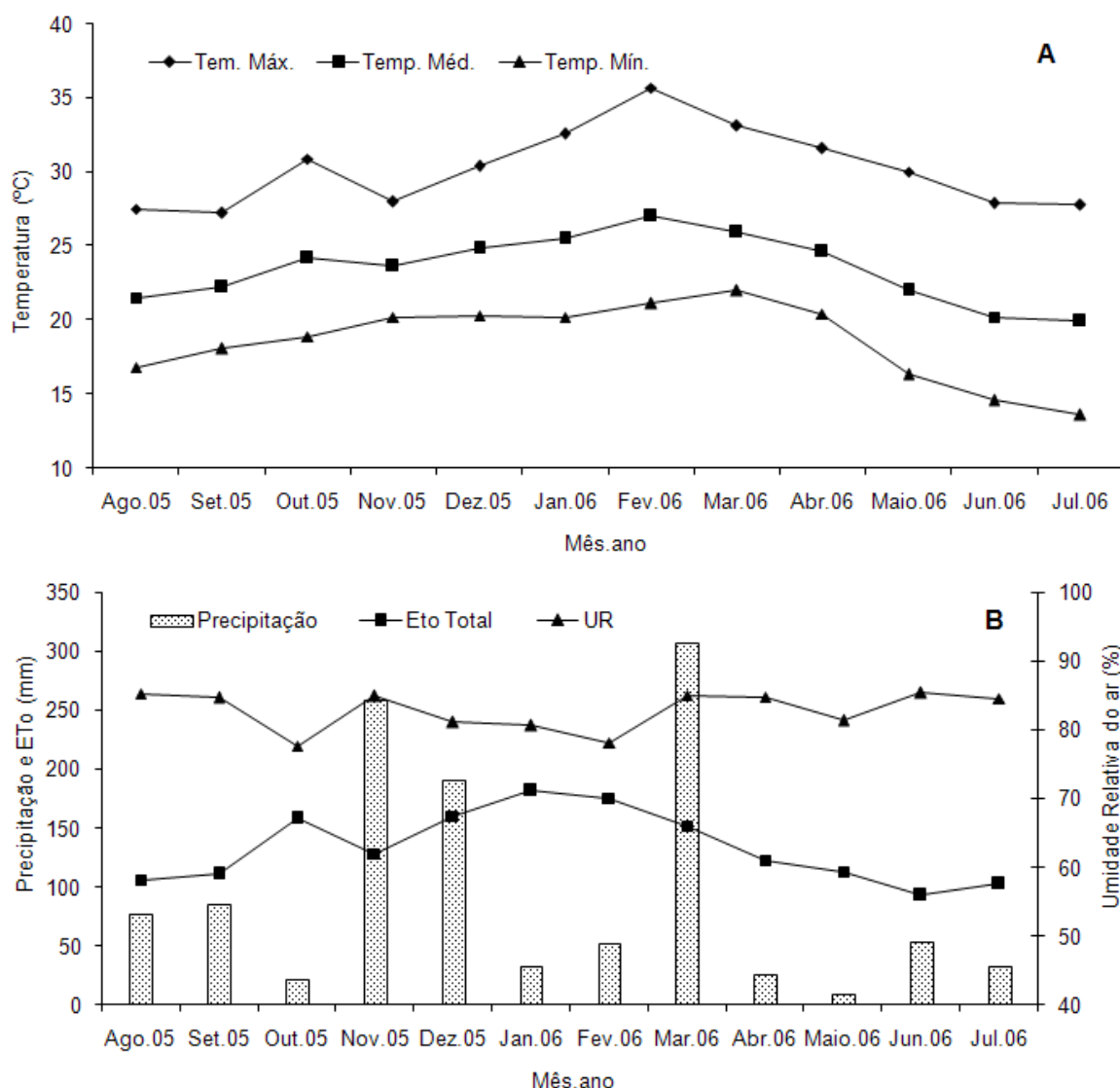
### Áreas de estudo:

Foram selecionadas duas áreas cultivadas com *Coffea canephora* cv. Conilon (manejo orgânico e convencional) e outra área de fragmento de mata Atlântica, sendo utilizada como referência. Os solos das três áreas estudadas apresentaram textura franco argilo arenoso.

A área de fragmento de mata Atlântica não sofreu queimada nos últimos 25 anos, mas há 15 anos foram retiradas árvores de valor comercial.

A área de café orgânico caracterizava-se por ser certificada desde o plantio, como regulamentado em lei brasileira (Brasil, 2003). A lavoura com 8 anos de idade foi implantada com mudas de estacas, conduzida com aproximadamente 20.000 hastes ortotrópicas ha<sup>-1</sup>, irrigada por gotejamento, com produtividade de 50 sacas ha<sup>-1</sup> em 2005 e em 2006. Em nenhum momento foi aplicado calcário no solo, sendo que no plantio aplicou-se 30g de rocha moída fonte de micronutrientes (FTE) por cova e, aos 5 anos de idade, utilizou-se 2 toneladas de MB4 (agrosílico). Ao longo de todos os anos, do plantio até os 6 anos de idade, foi realizada adubação com 4 a 5 kg por cova de esterco de gado misturado com palha de café. Nos últimos anos, o cafeeiro foi adubado duas vezes por ano com esterco bovino e com turfa líquida. O controle fitossanitário foi

realizado com caldas específicas, permitidas pela Lei que dispõe sobre a agricultura orgânica. Antes do plantio do café, a área era ocupada por capoeira.



**Figura 1** - Médias da temperatura máxima, média e mínima da atmosfera local (A) e umidade relativa, evapotranspiração total e precipitação total (B), registrados na Estação Metereológica de Sooretama, ES.

**Nota:** Temp. = Temperatura, Máx. = Máxima, Méd. = Média, Mín. = Mínima, ETo total = Evapotranspiração Total e UR = Umidade Relativa.

A área do cafeeiro sob manejo convencional com 9 anos de cultivo, proveniente de mudas de estacas, apresentava, aproximadamente, 20.000 hastes ortotrópicas  $\text{ha}^{-1}$ , produtividade de 60 sacas em 2005 e em 2006. A lavoura recebeu aplicação de 4 litros de palha de café decomposta aos 6 anos de idade. Há dois anos, foram adicionadas duas toneladas de calcário  $\text{ha}^{-1}$ . No ano anterior à coleta de amostras do solo e folhas, foram adicionadas ao solo 4 aplicações de

150 g cada, de nitrogênio, fósforo e potássio (25, 05, 20%, respectivamente) e foi feita uma capina manual e duas capinas com aplicação de herbicidas e uma pulverização com fungicida composto por epoxiconazole e piraclostrobina, aplicadas com trator. A lavoura é irrigada por gotejamento e, quando nova, utilizava-se enxada rotativa para limpeza das plantas espontâneas da lavoura. Antes do plantio do café a área era ocupada por capoeira e pastagem.

### **Procedimentos de coleta e análise química**

As áreas de estudo foram divididas em quatro talhões de, aproximadamente, 5.000m<sup>2</sup> cada, representando quatro repetições. Foram retiradas amostras compostas de solo, proveniente de 12 coletas simples, retiradas com trado tipo sonda em janeiro (verão) e julho (inverno) de 2006, coletadas na projeção da copa do cafeeiro nas profundidades de 0 a 10 cm e 10 a 20 cm de profundidade. No mesmo período, também foram coletadas folhas de cafeeiro, formando amostras compostas para análise química.

Uma sub-amostra de solo foi retirada para análise química, sendo realizada conforme Silva (1999): pH em água; P, Na, K, Fe, Zn, Mn e Cu pelo extrator Mehlich 1; Ca, Mg e Al pelo extrator KCl; H+Al por meio do extrator SMP; B extraído por água quente; S pelo extrator fosfato monocalcício em ácido acético; carbono orgânico total (CT) e nitrogênio total (NT), por oxidação úmida e granulometria por meio de pipeta.

Outra sub-amostra do solo foi usada para análises microbiológicas, sendo acondicionada em sacos plásticos, protegida da luz e mantida em caixas térmicas sob refrigeração e transportada para o laboratório no prazo de até 24 horas após a coleta. Posteriormente, as amostras foram peneiradas em malhas com 2 mm, sendo acondicionadas em sacos plásticos com suspiros e mantidas sob resfriamento de 4°C, como realizado por Perez et al. (2005), para analisar biomassa e atividade respiratória dos microrganismos. As análises de C e N da biomassa microbiana foram feitas em triplicata e as de atividade respiratória com quatro repetições.

Na quantificação dos nutrientes nas amostras foliares, a análise foi realizada conforme metodologia descrita por Silva (1999). Os tecidos foliares coletados foram secos em estufa de circulação forçada por 72 horas, sendo a concentração de N obtida pelo método de Nessler, após a digestão do material



seco com ácido sulfúrico e água oxigenada. A concentração de P foi analisada colorimetricamente pelo método do molibdato. Quantificou-se a concentração de K por fotometria de chama, as concentrações de Ca, Mg, Mn, Zn, Fe e Cu, por espectrofotometria de absorção atômica, e a concentração de S, por turbidimetria, após digestão do material seco com ácido nítrico e ácido perclórico. A concentração de B foi analisada por colorimetria com azometina-H, depois da incineração do material vegetal em mufla a 550°C (Silva, 1999).

### **Análise de carbono da biomassa microbiana**

O carbono da biomassa microbiana (CBM) foi quantificado pelo método da fumigação-extração (Vance et al., 1987), com algumas modificações sugeridas por De-Polli e Guerra (1999). A extração do C no solo fumigado e não fumigado foi realizada com a utilização de  $K_2SO_4$  0,5 mol L<sup>-1</sup> e alíquotas de  $K_2Cr_2O_7$  0,0667 mol L<sup>-1</sup> e  $H_2SO_4/H_3PO_4$  (1:2), com aquecimento. A titulação foi feita com uma solução de sulfato ferroso amoniacal 0,03333 mol L<sup>-1</sup> e o CBM calculado através da seguinte expressão:  $CBM = (F-NF)/Kec$ , em que: CBM: Carbono da biomassa microbiana ( $\mu g\ g^{-1}$ ); F:  $\mu g\ g^{-1}$  de carbono da amostra fumigada; NF:  $\mu g\ g^{-1}$  de carbono da amostra não fumigada; Kec: fator para converter o carbono extraído a CBM, sendo utilizado 0,33 como utilizado por Ferreira et al. (1999) e por Xavier et al. (2006). Posteriormente, foi calculado o quociente microbiano (relação CBM/CT), conforme Sparling (1992).

### **Análise da atividade microbiana do solo**

A taxa de atividade microbiana foi estimada por meio da hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA), de acordo com procedimentos adotados por Perucci et al. (2000), Adam e Duncan (2001), Pereira et al. (2004), Green et al. (2005) e Das et al. (2007). Foram pesados 5g de solo, colocados em Erlenmeyer, juntamente com 20 mL de tampão fosfato de potássio 60 mmol L<sup>-1</sup> (8,7 g de  $K_2HPO_4$  e 1,3 g de  $KH_2PO_4$  por L de água destilada com pH 7,6). A reação de hidrólise de FDA foi iniciada ao adicionar 0,2 mL de solução estoque de FDA (2g L<sup>-1</sup> acetona). A seguir, as amostras foram incubadas por 20 minutos em agitador (427 g) a 25°C. Posteriormente, a reação foi interrompida pela adição de 20 mL de acetona. Após, o material foi filtrado e acondicionado em tubos de ensaio. Em seguida, procedeu-se a leitura da absorbância num espectrofotômetro a 490 nm.

Para obtenção da taxa de FDA hidrolisado ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de FDA hidrolisado do solo) foi determinada a curva padrão, a qual foi obtida adicionando-se FDA, nas quantidades de 0, 100, 200, 300 e 400  $\mu\text{g}$ , em 5 ml de tampão fosfato. Depois os tubos foram mantidos por 60 minutos em banho maria com água a  $100^{\circ}\text{C}$ , para hidrolisar o FDA. Após a hidrólise, o FDA foi transferido a frasco Erlenmeyer contendo 5g de solo e 15mL de tampão fosfato, em três repetições. A seguir, utilizaram-se os mesmos procedimentos adotados para as amostras de solo. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de fluoresceína g de solo seco $^{-1}$  h $^{-1}$ .

### **Quociente metabólico**

O quociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ) foi determinado seguindo os procedimentos adotados por Anderson e Domsch (1993) e Anderson (2003). No entanto, foi utilizada a atividade microbiana obtida pelo método FDA, partindo do princípio que o  $q\text{CO}_2$  baseia-se na relação entre a quantidade de  $\text{CO}_2$  produzido por unidade de C da biomassa microbiana, por unidade de tempo, sendo um indicador sensível de qualidade de solo (Gama Rodrigues et al., 1997) e que correlaciona-se positivamente com o método da respiração basal (Paulucio, 2007).

### **Análise de nitrogênio da biomassa microbiana**

Para análise de nitrogênio da biomassa microbiana (NBM), metade das amostras foram fumigadas com clorofórmio e a outra metade não fumigada. A extração do N foi feita com 60mL de  $\text{K}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , com pH ajustado entre 6,5 a 6,8, e agitados com movimento circular horizontal por 40 minutos. Depois da decantação por 30 minutos, foi realizada a filtração em papel-filtro. Posteriormente, alíquotas de 20mL foram transferidas para tubos de ensaio na presença de 3mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e 1g de catalisador. Foi realizada uma pré-digestão a  $80^{\circ}\text{C}$  por 12 horas. Em seguida, a temperatura foi elevada para  $150^{\circ}\text{C}$  por uma hora e 30 minutos, sendo a digestão concluída a  $300^{\circ}\text{C}$ . A digestão foi realizada com 20mL de  $\text{NaOH}$   $400 \text{ g L}^{-1}$  e o destilado foi recolhido em frasco Erlenmeyer de  $125 \text{ cm}^3$  contendo 10 mL de  $\text{H}_3\text{BO}_3$   $20 \text{ g L}^{-1}$ , acrescentando-se 15 mL de verde de bromocresol a 0,1% em meio alcoólico e 6 mL de vermelho de metila a 0,1% em meio alcoólico e três gotas de hidróxido de sódio 0,1 N. Depois se procedeu a titulação com  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,0025 \text{ mol L}^{-1}$  (Perez et al., 2005).

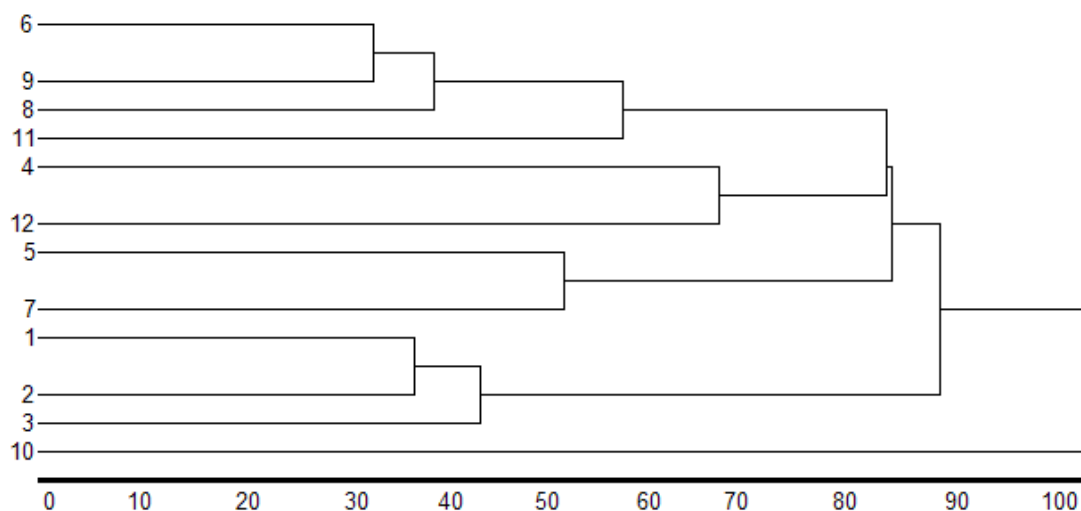
O NBM foi calculado pela fórmula  $NB = (N_F - N_{NF}) k_N^{-1}$ , em que  $N_F$  e  $N_{NF}$  são as quantidades totais de N mineral liberados pelos solos fumigados e não fumigados, respectivamente, durante o período de incubação;  $k_N$  é uma constante que, nesse caso, foi de 0,54, como utilizado por Coser et al. (2007) e por Wang et al. (2007).

### **Análise dos dados**

Os dados oriundos dos sistemas de manejo foram submetidos à análise multivariada. Estimou-se a distância entre tratamentos utilizando-se a distância Euclidiana média. Em seguida, procedeu-se o agrupamento utilizando-se o método do vizinho mais próximo (ligação completa). De forma complementar, estimou-se, por meio do método de Singh (1981), a contribuição relativa dos caracteres para a discriminação da diferença entre os tratamentos utilizando o programa Genes, desenvolvido por Cruz (2001). Realizou-se, também, análise descritiva das variáveis de estudo através da estimação da média e erro padrão da média.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O carbono da biomassa microbiana (CBM) foi o principal atributo microbiológico para separar as distintas situações estudadas, com contribuição relativa de 54,15%, corroborando com Maluche-Baretta et al. (2006), ao estudar macieiras (*Malus domestica*) sob cultivo orgânico e convencional. Seguidamente, o nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) e atividade microbiana de microrganismos pelo FDA apresentaram as maiores contribuições relativas (23,83 e 14,02%, respectivamente), os quais, junto com outras características microbiológicas avaliadas, permitiram agrupar as situações estudadas em cinco grupos pelo método do vizinho mais próximo (Figura 2).



**Figura 2** - Divergência entre os sistemas de manejo e fragmento de mata Atlântica, utilizando-se a distância Euclidiana média, através do método do vizinho mais próximo, com base nas características microbiológicas do solo.

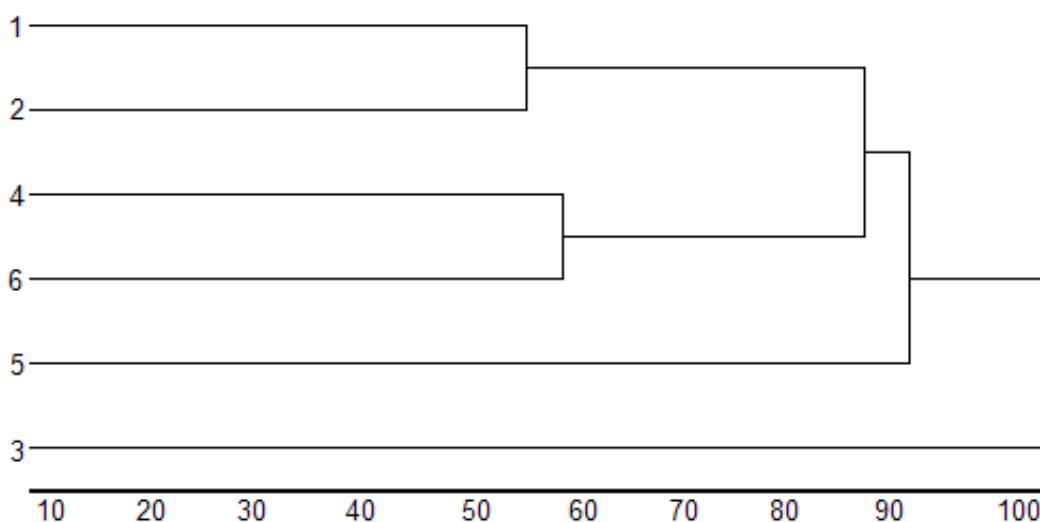
**Nota:** 1. Café convencional 0-10 cm em janeiro, 2. Café convencional 10-20 cm em janeiro, 3. Café convencional 0-10 cm em julho, 4. Café convencional 10-20 cm em julho, 5. Fragmento de Mata Atlântica 0-10 cm em janeiro, 6. Fragmento de Mata Atlântica 10-20 cm em janeiro, 7. Fragmento de Mata Atlântica 0-10 cm em julho, 8. Fragmento de Mata Atlântica 10-20 cm em julho, 9. Café orgânico 0-10 cm em janeiro, 10. Café orgânico 10-20 cm em janeiro, 11. Café orgânico 0-10 cm em julho, 12. Café orgânico 10-20 cm em julho.

Ao relacionar os grupos com o manejo adotado, observa-se que a lavoura de café sob cultivo convencional, em janeiro, nas camadas de 0-10 e 10-20 cm e em julho, na camada de 0-10 cm de solo (nº 1, 2 e 3) formou um grupo, enquanto que o café orgânico na camada de 0-10 cm e fragmento de Atlântica na camada de 10-20 cm nos meses de janeiro e julho formou outro grupo (nº 6, 8, 9 e 11), indicando divergência entre os dois grupos e similaridade entre os solos do mesmo grupo. A mata, na camada de 0-10 cm, nos meses de janeiro e julho formou mais um grupo (nº 5 e 7).

As lavouras sob manejo orgânico e convencional, em julho, na camada de 10 a 20 cm de solo agruparam-se (Figura 2), indicando certa similaridade entre as duas formas de cultivo nessa ocasião e profundidade. Esse fato corrobora com D'Andréa et al. (2002), que demonstraram que as diferenças entre manejos ocorrem de maneira mais significativa na camada superficial do solo, pois essa camada está mais sujeita a maiores variações de seus atributos microbiológicos, físicos e químicos. Entretanto, não há agrupamento destas formas de cultivo na profundidade de 10 a 20 cm no mês de janeiro e com a mata, pois podem ocorrer

variações nas camadas mais profundas conforme a forma de cultivo (Matsuoka et al., 2003; Balota et al. (2004).

Nas características químicas e granulométricas do solo, as maiores influências no agrupamento dos manejos foram provenientes da concentração de Mn, K, saturação de bases, P, S, Fe e Na, que reuniu, pelo método do vizinho mais próximo, o solo da lavoura de café convencional na camada de 0-10 cm com o mesmo solo na camada de 10-20 cm (Figura 3). Contudo, outro grupo foi formado pelo solo da mata, na camada de 10-20 cm, com o solo da lavoura orgânica na mesma camada. Estes resultados, associados aos microbiológicos, indicam certa divergência entre os manejos de café orgânico e convencional e uma maior proximidade do manejo do café Conilon orgânico com o fragmento de mata Atlântica de referência. Entretanto, Theodoro et al. (2003ab) não observaram diferenças significativas entre o solo da mata e o solo de lavoura de café Arábica (*C. arabica*), sob manejo orgânico e convencional.



**Figura 3.** Divergência entre os sistemas de manejo e fragmento de mata Atlântica, utilizando-se a distância Euclidiana média, através do método do vizinho mais próximo, com base nas características químicas e granulométricas do solo.

**Nota:** 1. Café convencional 0-10 cm, 2. Café convencional 10-20 cm, 3. Fragmento de Mata Atlântica 0-10 cm, 4. Fragmento de Mata Atlântica 10-20 cm, 5. Café orgânico 0-10 cm, 6. Café orgânico 10-20 cm.

As maiores quantidades de C e N da biomassa microbiana (Quadro 1) ocorreram na camada mais superficial (67,2 e 24,4%, respectivamente, superior em relação à camada de 10-20 cm), corroborando com vários pesquisadores

(Conte et al., 2002; Souza e Melo, 2003; Agnelli et al., 2004; Carneiro et al., 2004; Castellazzi et al., 2004; Moreira e Malavolta, 2004; Nsabimana et al., 2004; Perez et al., 2005; Garcia e Nahas, 2007), fato que pode estar relacionado com a maior quantidade de carbono e nitrogênio total (CT e NT) presentes na camada superior (Quadro 1). Além disso, foram observadas correlações positivas e significativas entre CT e CBM (0,78) e entre NB e NBM (0,59).

Os maiores valores de quociente metabólico  $qCO_2$  foram encontrados na camada de 10 a 20 cm em relação à camada de 0 a 10 cm, (na ordem de 92,3% na média - Quadro 1), corroborando com D'Andréa et al. (2002) e Agnelli et al. (2004), os quais relatam que esse fato pode estar relacionado a maiores gastos de energia para metabolizar os resíduos orgânicos.

Os indicadores estudados, que sugerem melhor qualidade de solo, foram encontrados na área referência de fragmento de mata Atlântica, o que pode estar associado, além de outros fatores, à alta quantidade de carbono total (Quadro 1), pois a matéria orgânica representa um sistema complexo de substâncias, cuja dinâmica é governada pela adição de materiais orgânicos de diversa natureza e formas e, pela sua transformação contínua sob ação de fatores biológicos, químicos e físicos. Na camada superior do solo a matéria orgânica influencia a retenção de cátions, estabilidade da estrutura do solo, infiltração e retenção de água, aeração do solo, proteção de microrganismos e fornecimento de nutrientes para as espécies vegetais, podendo também aumentar a quantidade de biomassa dos microrganismos (Balesdent et al., 2000; Graham et al., 2002; Dufranc et al., 2004).

Maiores quantidades de CBM foram encontradas nos solos da mata (Quadro 1), corroborando com Pimentel et al. (2006), o que pode ter sido estimulado pelo fornecimento contínuo de distintos materiais orgânicos, com diferentes graus de susceptibilidade à decomposição (Conte et al., 2002), provenientes da diversidade da vegetação nativa. A sobrevivência e crescimento dos microrganismos do solo também foram beneficiados pelos materiais orgânicos depositados (D'Andréa et al., 2002; Theodoro et al., 2003a).

**Quadro 1** - Atividade microbiana (AM,  $\mu\text{g}$  de FDA hidrolisado  $\text{g solo}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), carbono da biomassa microbiana (CBM,  $\mu\text{g C g solo}^{-1}$ ), nitrogênio da biomassa microbiana (NBM  $\mu\text{g N g solo}^{-1}$ ), relação entre CBM e NBM (C/N), carbono total (CT,  $\text{g kg}^{-1}$ ), nitrogênio total (NT,  $\text{g kg}^{-1}$ ), relação entre CT e NT (CT/NT), quociente microbiano (CB/C e NB/N (em porcentagem) e quociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ,  $\mu\text{g}$  FDA hidrolisado  $\mu\text{g CBM h}^{-1}$ ), na profundidade de 0 a 10 cm e 10 a 20 cm do solo em duas épocas do ano (janeiro e julho de 2006), em lavouras de café orgânico, convencional e sob fragmento de mata Atlântica.

Tratamento	Prof.	AM	CBM	NBM	C/N	CT	NT	CT/NT	CB/C	NB/N	$q\text{CO}_2$
Conv. Janeiro	0-10	146	147	20,3	8,7	7,35	0,84	8,79	1,97	2,4	1,17
Erro padrão médio		15,2	26,7	4,1	2,89	0,93	0,02	1,16	0,26	0,45	0,32
Conv. Julho	0-10	161	73,3	10,1	8,33	7,28	0,86	8,45	1,03	1,2	2,33
Erro padrão médio		11,9	11,9	2,05	2,68	0,96	0,04	1,08	0,17	0,28	0,29
Mata Janeiro	0-10	229	282	66	4,42	17,3	1,48	11,6	1,75	4,95	0,81
Erro padrão médio		9,24	15,42	6,3	0,55	2,7	0,19	0,73	0,26	1,3	0,03
Mata Julho	0-10	273	189	44,3	4,38	17,2	1,57	11,3	1,17	2,82	1,5
Erro padrão médio		27	16,2	4,23	0,5	2,72	0,08	2,35	0,16	0,24	0,26
Org. Janeiro	0-10	222	189	72,4	2,8	10,1	1,28	7,91	1,92	5,64	1,19
Erro padrão médio		21,3	21,5	12,2	0,49	1,01	0,12	0,25	0,27	0,69	0,07
Org. Julho	0-10	167	78,3	29,9	2,86	10,1	1,18	8,82	0,81	2,73	2,17
Erro padrão médio		12,4	4,41	5,05	0,53	0,99	0,15	1,17	0,11	0,61	0,24
Conv. Janeiro	10-20	110	79,1	17,8	6,3	5,16	0,78	6,65	1,78	2,17	1,6
Erro padrão médio		9,05	16,6	4,86	2,76	0,92	0,09	0,58	0,58	0,33	0,34
Conv. Julho	10-20	129	23,5	5,93	5,05	5,15	0,83	6,15	0,5	0,7	6,76
Erro padrão médio		10,3	7,03	1,62	1,67	0,92	0,09	0,62	0,14	0,13	1,71
Mata Janeiro	10-20	265	189	51,8	3,97	8,16	1,19	7	2,49	4,35	1,34
Erro padrão médio		17,6	14,2	4,03	0,62	1,02	0,06	1,18	0,17	0,3	0,05
Mata Julho	10-20	260	126	33	3,89	8,12	1,07	7,68	1,69	3,08	2,15
Erro padrão médio		21,6	14,5	2,57	0,51	1	0,05	1,18	0,42	0,2	0,29
Org. Janeiro	10-20	172	109	63,7	1,9	4,48	0,78	5,68	2,45	8,19	1,74
Erro padrão médio		14,1	18,9	10,4	0,51	0,58	0,03	0,59	0,31	1,36	0,36
Org. Julho	10-20	127	37,5	21,9	1,73	4,48	0,93	4,85	0,95	2,42	4,12
Erro padrão médio		18,2	10,2	3,59	0,37	0,59	0,04	0,7	0,39	0,47	1,01
<b>Conv. jan. e jul.</b>	<b>0-20</b>	<b>136</b>	<b>80,6</b>	<b>13,5</b>	<b>7,09</b>	<b>6,23</b>	<b>0,83</b>	<b>7,49</b>	<b>1,32</b>	<b>1,62</b>	<b>2,97</b>
Erro padrão médio		7,2	13,6	2,14	1,2	0,5	0,03	0,5	0,21	0,23	0,7
<b>Mata jan. e jul.</b>	<b>0-20</b>	<b>257</b>	<b>199</b>	<b>48,8</b>	<b>4,17</b>	<b>12,7</b>	<b>1,33</b>	<b>9,39</b>	<b>1,77</b>	<b>3,8</b>	<b>1,45</b>
Erro padrão médio		9,94	15,9	3,69	0,25	1,49	0,07	0,85	0,17	0,38	0,15
<b>Org. jan. e jul.</b>	<b>0-20</b>	<b>172</b>	<b>103</b>	<b>47</b>	<b>2,32</b>	<b>7,28</b>	<b>1,04</b>	<b>6,81</b>	<b>1,53</b>	<b>4,74</b>	<b>2,31</b>
Erro padrão médio		11,5	15,9	6,75	0,25	0,81	0,07	0,54	0,22	0,72	0,38
<b>Media geral J e J</b>	<b>0-10</b>	<b>200</b>	<b>160</b>	<b>40,5</b>	<b>5,25</b>	<b>11,5</b>	<b>1,2</b>	<b>9,47</b>	<b>1,44</b>	<b>3,29</b>	<b>1,53</b>
Erro padrão médio		11,1	15,9	5,19	0,77	1,05	0,07	0,54	0,12	0,4	0,14
<b>Media geral J e J</b>	<b>10-20</b>	<b>177</b>	<b>95,5</b>	<b>32,4</b>	<b>3,81</b>	<b>5,92</b>	<b>0,93</b>	<b>6,32</b>	<b>1,64</b>	<b>3,48</b>	<b>2,95</b>
Erro padrão médio		14	12,9	4,48	0,59	0,44	0,04	0,35	0,2	0,53	0,49
<b>Media geral jan.</b>	<b>0-20</b>	<b>191</b>	<b>167</b>	<b>48,6</b>	<b>4,68</b>	<b>8,75</b>	<b>1,06</b>	<b>7,93</b>	<b>2,06</b>	<b>4,62</b>	<b>1,31</b>
Erro padrão médio		12	15,1	5,22	0,75	0,99	0,07	0,49	0,13	0,51	0,11
<b>Media geral Jul.</b>	<b>0-20</b>	<b>186</b>	<b>87,9</b>	<b>24,2</b>	<b>4,37</b>	<b>8,72</b>	<b>1,07</b>	<b>7,87</b>	<b>1,02</b>	<b>2,16</b>	<b>3,17</b>
Erro padrão médio		13,6	12,1	2,96	0,64	0,99	0,06	0,62	0,12	0,22	0,47

No solo do cafeeiro sob cultivo orgânico foram encontrados valores de CBM maiores que no solo de café convencional. Possivelmente, este fato está relacionado à aplicação de insumos orgânicos, os quais podem aumentar a quantidade de carbono e nitrogênio no solo (Quadro 1). Segundo Nardi et al. (2004) e Ouédraogo et al. (2007), também há aumento da atividade de enzimas, como a nitrato redutase e glutamato síntetase com adição de compostos orgânicos nitrogenados. Depois de anos, a adição freqüente de insumos orgânicos pode melhorar as propriedades químicas e a qualidade da matéria orgânica e o conteúdo de substâncias húmicas alcalino solúveis mais condensadas do solo (Canellas et al., 2003). Entretanto, Andrade et al. (2005) verificaram que mesmo depois de 5 anos a quantidade de nitrogênio total (NT) e carbono total (CT) do solo não diferiu entre a aplicação de 30 toneladas de esterco em comparação com a adubação química e sem adubação, em eucalipto e em várias profundidades do solo.

A quantidade de NBM no solo de mata também pode estar associada ao fornecimento contínuo de distintos materiais orgânicos, com diferente grau de susceptibilidade à decomposição, como relatado no caso do CBM (Conte et al., 2002), e, também, com a pouca disponibilidade de nutrientes minerais, como o fósforo (Quadro 2), uma vez que Gama-Rodrigues et al. (1997) relataram que a baixa fertilidade do solo em áreas sob cerrado nativo pode reduzir a taxa de decomposição da matéria orgânica, acarretando uma imobilização de N na biomassa microbiana, e esta se tornando reserva. Contudo, a quantidade de NBM nas lavouras de café orgânico pode estar associada ao uso de adubos orgânicos concentrados em N, uma vez que Singh et al. (2007) relatam que a adição de adubo orgânico proporcionou aumento de 185% no CBM e 220% no NBM no solo em relação à adubação com fertilizantes solúveis em solos cultivados com cana de açúcar (*Saccharum* spp.), favorecendo também a produtividade.

Observou-se que os valores de NBM são 20% inferiores na profundidade de 10-20 cm do solo em comparação à camada superficial, comportamento semelhante ao relatado por Coser et al. (2007), uma vez que nessa camada há menor quantidade de matéria orgânica e fósforo (Quadros 1 e 2).

No solo do cafeeiro sob cultivo convencional foram detectadas atividade microbiana e quantidade de C e N da biomassa dos microrganismos 20,7, 22,1 e 71,2% menores que no solo cultivado com café orgânico, respectivamente



(Quadro 1). No solo da lavoura convencional também foi verificada maiores taxas de  $qCO_2$  (29,5%) em relação ao solo da lavoura orgânica, indicando menor qualidade do solo no manejo convencional em comparação ao manejo orgânico. Resultados semelhantes foram encontrados por Maluche-Baretta et al. (2007) ao estudarem maçãs (*M. domestica*) sob cultivo orgânico e convencional e por Oberson et al. (2007) ao estudarem cultivo de soja biodinâmica, orgânica e convencional.

A menor qualidade do solo sob manejo convencional pode estar relacionada com a utilização constante de máquinas (capinas e aplicações de defensivos agrícolas), o que promove perturbações no solo, afetando a população microbiana, o que, associado às menores adições de C e aliado ao consumo de carbono do solo pelos microrganismos, terminam por consumir o carbono orgânico, resultando, conseqüentemente, em perdas da qualidade do solo quando submetido a essas práticas agrícolas (Anderson e Domsch, 1993; Anderson, 2003). Além desses fatores, o uso de herbicidas ou outros defensivos agrícolas também podem afetar a população microbiana no solo, diminuindo a CBM (Perucci et al., 2000; Santos et al., 2005; Das et al., 2007; Zilli et al., 2007), aumentando a atividade microbiana (Perucci et al., 2000) e o  $qCO_2$  (Perucci et al., 2000; Santos et al., 2005).

Nesse sentido, Anderson e Domsch (1993) e Anderson (2003) sugerem que maiores valores de  $qCO_2$  indicam que a população microbiana, em condições desfavoráveis, consomem mais carbono oxidável para a sua manutenção. Também, verificou-se que os menores valores de  $qCO_2$  foram encontrados na mata (Quadro 1), indicando melhor qualidade de solo em relação às áreas cultivadas. Entretanto, Pimentel et al. (2006) encontraram taxas mais altas de  $qCO_2$  na mata em comparação a área de café Arábica orgânico.

Trabalhos comparando sistemas de plantio direto e convencional têm demonstrado que há maior presença de CBM no sistema de plantio direto com o passar do tempo (Balota et al., 1998; D'Andréa et al., 2002; Mendes et al., 2003), bem como no cultivo orgânico de *M. domestica* em relação ao seu cultivo convencional (Glover et al., 2000). Assim, a diversidade e abundância de microrganismos decompositores, juntamente com a ausência de perturbações decorrentes de atividade antrópica, tornam possível a existência de maiores quantidades de biomassa microbiana, indicando o maior equilíbrio da microbiota

do solo nesse ambiente. Em sistemas agroecológicos complexos, interações positivas entre biota do solo podem promover melhorias na estrutura e fertilidade do mesmo, resultando em um ambiente favorável a processos biológicos (Altieri, 1999; Glover et al., 2000).

**Quadro 2** - Características químicas e granulométricas do solo, na profundidade de 0 a 10 cm e 10 a 20 cm, em janeiro de 2006, em lavouras de café orgânico, convencional e o fragmento de mata Atlântica.

Tratamento	Prof.	pH	P	K	S	Na	Zn	Fe	Mn	Cu	B
Unidade	cm	-	..... mg dm <sup>-3</sup> .....								
Café convencional	0-10	4,45	25,1	110	24,5	24,2	11	40,7	66,6	0,98	0,36
Erro padrão médio		0,06	1,92	2,63	3,52	0,63	1,2	1,46	2,66	0,06	0,02
Café convencional	10-20	4,38	8,95	90,2	42	20,5	5,78	45	65,2	0,66	0,36
Erro padrão médio		0,09	2,33	3,54	6,54	0,65	1,28	1,26	4,55	0,11	0,04
Mata Atlântica	0-10	5,98	2,9	90,5	8	25	4,5	15,8	95,3	0,22	0,47
Erro padrão médio		0,10	0,4	6,36	0,91	1,87	0,9	5,77	16,3	0,02	0,02
Mata Atlântica	10-20	5,65	1,78	64,2	8,25	20	2,3	39,5	59,9	0,33	0,37
Erro padrão médio		0,26	0,1	5,19	0,75	1,96	0,38	10,9	10,4	0,02	0,02
Café orgânico	0-10	6,73	39,1	156	6,5	38,2	3,88	20,2	151	0,43	0,35
Erro padrão médio		0,19	11,4	4,69	0,87	1,8	0,25	1,59	3,5	0,07	0,02
Café orgânico	10-20	6,65	10,4	83,8	10,2	22,5	2,65	33,5	101	0,44	0,29
Erro padrão médio		0,24	3,13	7,1	1,11	1,44	0,19	2,81	13,7	0,08	0,01
Tratamento	Prof.	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V	Areia	Silte	Argila
Unidade	cm	.....cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> .....						..... % .....			
Café convencional	0-10	1,21	0,22	0,57	3,55	1,81	5,36	34	66,5	4,5	29
Erro padrão médio		0,07	0,02	0,07	0,24	0,09	0,21	2,35	0,87	0,87	0
Café convencional	10-20	1,18	0,19	0,49	2,68	1,69	4,37	38,7	65,2	5,25	29,5
Erro padrão médio		0,12	0,01	0,08	0,14	0,13	0,16	2,64	1,38	1,18	0,96
Mata Atlântica	0-10	4,97	1,04	0,01	1,59	6,36	7,94	78,4	73,5	5,25	21,2
Erro padrão médio		1,05	0,09	0,01	0,11	1,14	1,05	4,44	1,66	0,63	1,03
Mata Atlântica	10-20	2,62	0,69	0,05	1,6	3,56	5,16	67,1	68	7	25
Erro padrão médio		0,6	0,05	0,04	0,18	0,65	0,48	6,96	1,29	0,41	1,22
Café orgânico	0-10	4,4	0,94	0	1,14	5,91	7,04	83,6	61,8	12,8	25,5
Erro padrão médio		0,37	0,06	0	0,08	0,45	0,37	2,05	2,17	1,11	1,71
Café orgânico	10-20	3,55	0,51	0	1,06	4,38	5,44	80	61	12	27
Erro padrão médio		0,39	0,03	0	0,13	0,41	0,29	3,37	1,96	0,91	1,73

SB = soma de bases, CTC = capacidade de troca catiônica, a pH 7 e V = índice de saturação de bases.

O quociente microbiano do carbono foi 34,1% maior no solo da mata e 15,9% maior no solo cultivado com café orgânico, em relação ao solo cultivado com café convencional (Quadro 1). De maneira mais expressiva, o quociente microbiano do nitrogênio foi 192,6% maior no solo do café orgânico e 134,6% maior no solo da mata em relação ao solo do café convencional, corroborando com resultados apresentados por Maluche-Baretta et al. (2007). Possivelmente, maior valor de quociente microbiano do nitrogênio no solo sob café orgânico está associado ao uso de matéria orgânica rica em nitrogênio. O quociente microbiano é um indicador de qualidade de solo, no qual, maiores valores evidenciam melhor qualidade de solo, maior eficiência das comunidades microbianas em utilizar o C e N da matéria orgânica mineralizável (Balota et al., 1998; Maluche-Baretta et al., 2007).

A quantidade de NBM foi 90,3% maior na estação quente (Figura 1A) em relação ao inverno, bem como a quantidade de CBM (101,1%), época também de maior precipitação (Figura 1B - novembro e dezembro), corroborando com Theodoro et al. (2003a). Este fato pode estar relacionado com a umidade do solo, liberação de exudatos radiculares e morte de células radiculares; entretanto, a atividade microbiana não foi afetada (Quadro 1). Por outro lado, foi observado que o quociente metabólico foi maior nas três áreas e nas duas profundidades estudadas, no mês de julho em relação ao mês de janeiro (em média, 145,4% maior em julho), corroborando com Maluche-Baretta et al. (2007), uma vez que no inverno ocorrem condições mais desfavoráveis para a formação da biomassa microbiana (Anderson, 2003), como menor disponibilidade de água e/ou baixas temperaturas (Figura 1).

Observou-se que no solo do fragmento de mata Atlântica a concentração de P é menor em relação às áreas cultivadas (Quadro 2), uma vez que nunca foi suprida com adubos fosfatados, aliado a solo naturalmente pobre nesse nutriente. Entretanto, o solo com mata, apresenta 103,7 e 74,3% de CT em relação ao solo cultivado com café convencional e orgânico, respectivamente (Quadro 1), em decorrência da constante renovação de material vegetal.

Os solos das áreas cultivadas apresentaram concentrações semelhantes de alguns nutrientes (Quadro 2), indicando similaridade na reposição de nutrientes em ambas as formas de adubação. No caso do P, apesar de ser fornecido na lavoura orgânica na forma insolúvel (rochas moídas), tornou-se

disponível para as plantas, com a ação de microrganismos (Conte et al., 2002). A disponibilidade do fósforo para as plantas pode ter sido aumentada com a adição de esterco, por meio da redução da capacidade máxima de adsorção de P, melhorando, assim, a disponibilidade para as plantas (Souza et al., 2006).

Na área de café convencional o solo apresentou quantidades representativas de Al trocável e pH mais baixo (Quadro 2), o que pode estar relacionado ao uso freqüente de adubos nitrogenados minerais, uma vez que adubos como sulfato de amônio e uréia acidificam o solo (Moore et al., 2000; Vitti et al., 2002). Por outro lado, o solo da lavoura de café orgânico, apesar de não ter recebido calcário, apresentou valores elevados de pH do solo e nem Al disponível, corroborando com Theodoro et al. (2003b). Isso pode estar relacionado ao uso de agrossilício (MB4) e/ou ao uso de matéria orgânica com ação alcalina (Reis e Rodella et al., 2002).

A concentração de nutrientes foliares do cafeeiro de ambas as formas de cultivo apresentaram valores adequados para alguns nutrientes e insatisfatórios para outros nutrientes, conforme normas específicas para café Conilon (Partelli et al., 2006a), indicando que houve limitação nutricional na lavoura orgânica e convencional da cultura. Observaram-se, também, variações das concentrações foliares conforme a época do ano (Quadro 3), fato que ocorre naturalmente no cafeeiro (Partelli et al., 2007). Apesar de as lavouras apresentarem limitações nutricionais, a produtividade foi superior a 50 sacas ha<sup>-1</sup>, indicando que tanto a adubação convencional como a orgânica supre as necessidades nutricionais das plantas, como relatado por Dadalto Júnior et al. (2006).

**Quadro 3** - Concentração foliar de nutrientes do cafeeiro Conilon sob sistema de manejo convencional e orgânico, em janeiro e julho de 2006.

Tratamento	Época mês	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
		g kg <sup>-1</sup>							mg kg <sup>-1</sup>			
Café convencional	janeiro	34,1	1,75	23,6	19,2	2,68	1,3	41,8	20,5	80,3	255	12,4
Erro padrão médio		0,78	0,07	0,94	0,69	0,06	0,04	1,32	0,28	5,65	30,5	0,1
Café convencional	julho	28,4	1,18	18	18,9	2,38	1,35	83,4	19,3	86,1	207	11,4
Erro padrão médio		0,35	0,03	0,6	0,64	0,13	0,03	5,93	7,59	6,53	18	0,43
Café orgânico	janeiro	28	1,81	19,8	17,1	3,13	1,23	39,1	27,2	100	69,2	11
Erro padrão médio		0,29	0,07	1,11	0,46	0,15	0,11	2,27	1,7	0,67	3,97	0,16
Café orgânico	julho	27	1,5	26	18,8	3,1	1,68	123	47,4	69,4	117	26,2
Erro padrão médio		0,2	0,09	1,26	0,57	0,12	0,09	5,17	2,66	2,94	11,9	1,28

## CONCLUSÕES

O carbono da biomassa microbiana foi o atributo microbiológico do solo que mais contribuiu para agrupar as diferentes formas de cultivo.

Os atributos microbiológicos do solo variaram conforme a época do ano e profundidade da camada de solo.

Do ponto de vista nutricional, os sistemas de manejo estudados (café orgânico e convencional) apresentaram resposta similar.

O solo de fragmento de mata Atlântica, seguido pelo do café Conilon sob manejo orgânico, apresentaram os melhores indicadores de qualidade de solo.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ e à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, pelo apoio financeiro da pesquisa. Ao agricultor Gerson Coser e à família Casagrande, por disponibilizar as lavouras estudadas. Ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER, pelo suporte em algumas análises. À EMBRAPA Agrobiologia, pelo suporte nas análises de C e N da biomassa microbiana.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, G., Duncan, H. (2001) Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 943-951.
- Agnelli, A., Ascherb, J., Ceccherinib, G. C. M. T., Nannipieri, P., Pietramellara, G. (2004) Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. *Soil Biology & Biochemistry*, 36: 859-868.
- Altieri, M. A. (1999) The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74: 19-31.
- Anderson, T. H. (2003) Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture Ecosystems Environment*, 98: 285-293.
- Anderson, T. H., Domsch, K. H. (1993) The metabolic quotient ( $qCO_2$ ) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 25: 393-395.
- Andrade, C. A. de, Oliveira, C. de, Cerri, C. C. (2005) Qualidade da matéria orgânica e estoques de carbono e nitrogênio em latossolo tratado com biossólido e cultivado com eucalipto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29: 803-816.
- Balesdent, J., Chenu, C., Balabane, M. (2000) Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil and Tillage Research*, 53: 215-230.
- Balota, E. L., Colozzi Filho, A., Andrade, D. S., Dick, R. P. (2004) Long-term tillage and crop rotation effects on microbial biomass and C and N mineralization in a Brazilian Oxisol. *Soil & Tillage Research*, 77: 137-145.
- Balota, E. L., Colozzi Filho, A., Andrade, D. S., Hungria, M. (1998) Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 22: 641-649.
- Baudoin, E., Benizri, E., Guckert, A. (2003) Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 1183-1192.
- BRASIL. (2003) Presidência da República. Casa Civil Sub-chefia de Assuntos Jurídicos. Lei nº 10831 de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de dezembro de 2003.

- Canellas, L. P., Velloso, A. C. X., Marciano, C. R., Ramalho, J. F. G. P., Rumjanek, V. M., Rezende, C. E., Santos, G. A. (2003) Propriedades químicas de um Cambissolo cultivado com cana-de-açúcar, com preservação do palhico e adição de vinhaça por longo tempo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 27: 935-944.
- Carneiro, R. G., Mendes, I. de C., Lovato, P. E., Carvalho, A. M. de, Vivaldi, L. J. (2004) Indicadores biológicos associados ao ciclo de fósforo em solos de Cerrado sob plantio direto e plantio convencional. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 661-669.
- Castellazzi, M. S., Brookes, P. C., Jenkinson, D. S. (2004) Distribution of microbial biomass down soil profiles under regeneration woodland. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1485-1489.
- Castellini, C., Bastianoni, S., Granai, C., Dal Bosco, A., Brunetti, M. (2006) Sustainability of poultry production using the emergy approach: Comparison of conventional and organic rearing systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 114: 343-350.
- Conab (Companhia Nacional de Abastecimento) (2007). *3º levantamento de café 2007/2008 - agosto 2007*. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/Boletim.pdf>. Acesso em: 7 de dezembro. 2007.
- Conte, E., Anghinoni, I., Rheinheimer, D. S. (2002) Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatase ácida após a aplicação de fosfato em solo no sistema de plantio direto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 26: 925-930.
- Coser, T. R., Ramos, M. L. G., Amabile, R. F., Ribeiro Júnior, W. K. (2007) Nitrogênio da biomassa microbiana em solo de Cerrado com aplicação de fertilizante nitrogenado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42: 399-406.
- Cruz, C.D. (2001) *Programa genes (Versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística*. Viçosa: UFV, 648p.
- Damatto Júnior, E. F., Leonel, S., Pedroso, C. J. (2005) Adubação orgânica na produção e qualidade de frutos de maracujá-doce. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 27: 188-190.
- D'Andréa, A. F., Silva, M. L. N., Curi, N., Siqueira, J. O., Carneiro, M. A. C. (2002) Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em sistemas de manejo na região do cerrado no Sul do Estado de Goiás. *Revista Brasileira de Ciência do solo*, 26: 913-923.
- Das, P., Pal, R., Chowdhury, A. (2007) Effect of novaluron on microbial biomass, respiration, and fluorescein diacetate-hydrolyzing activity in tropical soils. *Biology and Fertility of Soils*, 44: 387-391.

- De-Polli, H.; Guerra, J. G. M. C. (1999) N e P na biomassa microbiana do solo. In: Santos, G. A., Camargo, F. A. O. (Eds.). *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre: Gênese, p. 389-411.
- Dufranc, G., Dechen, C. F., Freitas, S. S., Camargo, O. A. (2004) Atributos físicos, químicos e biológicos relacionados com a estabilidade de agregados de dois Latossolo em plantio direto no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 28: 505-517.
- Ferreira, A. S., Camargo, F. A. O., Vidor, C. (1999) Utilização de microondas na avaliação da biomassa microbiana do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 23: 991-996.
- Gama-Rodrigues, E. F., Gama-Rodrigues, A. C., Barros, N. F. (1997) Biomassa microbiana de carbono e de nitrogênio de solos sob diferentes coberturas florestais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 21: 361-365.
- Garcia, M. R. L., Nahas, E. (2007) Biomassa e atividades microbianas em solo sob pastagem com diferentes lotações de ovinos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 31: 269-276.
- Glover, J. D.; Reganold, J. P.; Andrews, P. K. (2000) Systematic method for rating soil quality of conventional, organic, and integrated apple orchards in Washington State. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 80: 29-45.
- Graham, M. H.; Haynes, R. J.; Meyer, J. H. (2002) Soil organic matter content and quality: effects of fertilizer applications, burning and trash retention on a long-term sugarcane experiment in South Africa. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 93-102.
- Green, V. S., Stott, D. E., Diack, M. (2005) Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 693-701.
- Gündoğmuş, E. (2006) Energy use on organic farming: A comparative analysis on organic versus conventional apricot production on small holdings in Turkey. *Energy Conversion and Management*, 47: 3351-3359.
- Hatch, D. J., Lovell, R. D., Antil, R. S., Jarvis, S. C., Owen, P. M. (2000) Nitrogen mineralization and microbial activity in permanent pastures amended with nitrogen fertilizer or dung. *Biology and Fertility of Soils*, 30: 288-293.
- ICO - International Coffee Organization. (2008) *Trade statistics*. Disponível em: [http://www.ico.org/coffee\\_prices.asp](http://www.ico.org/coffee_prices.asp). Acesso em: 21 de fevereiro de 2008.
- INCAPER – Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (2007). *Caraterização climática do município de Jaguaré*. Disponível em: [http://siag.incaper.es.gov.br/jaguare\\_carac.htm](http://siag.incaper.es.gov.br/jaguare_carac.htm). Acesso em: 16 de fevereiro de 2007.



- Jenkinson, D. S., Brookes, P. C., Powlson, D. S. (2000) Measuring soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 5-7.
- Kaltsas, A. M., Mamolos, A. P., Tsatsarelis, C. A., Nanos, G. d., Kalburtji, k. L. (2007) Energy budget in organic and conventional olive groves. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 122: 243-251.
- Maluche-Baretta, C. R. D., Amarante, C. V. T. do, Klauberg Filho, O. (2006) Análise multivariada de atributos do solo em sistemas convencional e orgânico de produção de maçãs. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41: 1531-1539.
- Maluche-Baretta, C. R. D., Klauberg Filho, O., Amarante, C. V. T. do, Ribeiro, G. M., Almeida, D. (2007) Atributos microbianos e químicos do solo em sistemas de produção convencional e orgânico de maçãs no Estado de Santa Catarina. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 31: 655-665.
- Matsuoka, M., Mendes, I. C., Loureiro, M. F. (2003) Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 27: 425-433.
- Mendes, I. C., Souza, L. V., Rexch, D. V. S., Gomes, A. C. (2003) Propriedades biológicas em agregados de um latossolo vermelho-escuro sob plantio convencional e direto no cerrado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 27: 435-443.
- Moore, J. M., Klose, S., Tabatabai, M. A. (2000) Soil microbial biomass carbon and nitrogen as affected by cropping systems. *Biology and Fertility of Soils*, 31: 200-210.
- Moreira, A., Malavolta, E. (2004) Dinâmica da matéria orgânica e da biomassa microbiana em solos submetidos a diferentes sistemas de manejo na Amazônia Ocidental. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 1103-1110.
- Nardi, S., Morari, F., Berti, A., Tosoni, M., Giardini, L. (2004) Soil organic matter properties after 40 years of different use of organic and mineral fertilisers. *European Journal of Agronomy*, 21: 357-367.
- Nsabimana, D., Haynes, R. J., Wallis, F. M. (2004) Size, activity and catabolic diversity of the soil microbial biomass as affected by land use. *Applied Soil Ecology*, 26: 81-92.
- Oberson, A., Nanzer, S., Bosshard, C., Dubois, D., Mader, P., Frossard, E. (2007) Symbiotic N<sub>2</sub> fixation by soybean in organic and conventional cropping systems estimated by <sup>15</sup>N dilution and <sup>15</sup>N natural abundance. *Plant and Soil*, 290: 69-83.
- Oliveira, G. C. de, Dias Júnior, M. de S., Resck, D. V. S., Curi, N. (2003) Alterações estruturais e comportamento compressivo de um Latossolo Vermelho distrófico argiloso sob diferentes sistemas de uso e manejo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 291-299.

- Partelli, F. L., Vieira, H. D., Carvalho, V. B. de, Mourão Filho, F. de A. A. (2007) Diagnosis and recommendation integrated system norms, sufficiency range, and nutritional evaluation of *Arabian coffee* in two sampling periods. *Journal of Plant Nutrition*, 30: 1651-1667.
- Partelli, F. L., Vieira, H. D., Monnerat, P. H., Viana, A. P. (2006a) Estabelecimento de normas DRIS em cafeeiro Conilon orgânico e convencional no Estado do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30: 443-451.
- Partelli, F. L., Vieira, H. D., Souza, P. M., Golynski, A., Ponciano, N. J. (2006b) Perfil socioeconômico dos produtores de café orgânico do norte do Estado do Espírito Santo – satisfação com a atividade e razões de adesão à certificação. *Revista Ceres*, 53: 55-64.
- Paulucio, V. de O. (2007) *Qualidade química e biológica de áreas degradadas pela extração de argila revegetada com eucalipto e leguminosas inoculadas com micorrizas*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Campos dos Goytacazes - RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 106p.
- Pereira, S. V., Martinez, C. R., Porto, E. R., Oliveira, B. R. B., Maia, L. C. (2004) Atividade microbiana em solo do Semi-Árido sob cultivo de *Atriplex nummularia*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39 757-762.
- Perez, K. S. S., Ramos, M. L. G., McManus, C. (2005) Nitrogênio da biomassa microbiana em solo cultivado com soja, sob diferentes sistemas de manejo, nos Cerrados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40: 137-144.
- Perucci, P., Dumontet, S., Bufo, S.A., Mazzatura, A., Casucci, C. (2000) Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils*, 32: 17-23.
- Pimentel, M. S., Aquino, A. M. de, Correia, M. E. F., Costa, J. R., Ricci, M. dos S. F., De-Polli, H. (2006) Atributos biológicos do solo sob manejo orgânico de cafeeiro, pastagem e floresta em região do médio Paraíba Fluminense-RJ. *Coffee Science*, 1: 85-93.
- Ouédraogo, E., Brussaard, L., Stroosnijder, L. (2007) Soil fauna and organic amendment interactions affect soil carbon and crop performance in semi-arid West Africa. *Biology and Fertility of Soils*, 44: 343-351.
- Reis, T. C., Rodella, A. A. (2002) Cinética de degradação da matéria orgânica e variação do pH do solo sob diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 26: 619-626.
- Rochette, P., Angers, D. A. (1999) Soil surface carbon dioxide fluxes induced by spring, summer, and fall moldboard plowing in a sandy loam. *Soil Science Society of American Journal*, 63: 621-628.

- Santos, J. B., Jakelaitis, A., Silva, A. A., Vivian, R., Costa, M. D., Silva, A. F. (2005) Atividade Microbiana do solo após aplicação de herbicidas em sistemas de plantio direto e convencional. *Planta Daninha*, 23: 683-691.
- Schloter, M., Dilly, O., Munch, J. C. (2003) Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 98: 255-262.
- Silva, F. C. da (Org) (1999). *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Brasília: EMBRAPA, 370p.
- Singh, D. (1981) The relative importance of characters affecting genetic divergence. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 14: 237-245.
- Singh, K. P., Suman, S., Singh, P. N., Srivastava, T. K. (2007) Improving quality of sugarcane-growing soils by organic amendments under subtropical climatic conditions of India. *Biology and Fertility of Soils*, 44: 367-376.
- Souza, R. F. de, Faquin, V., Torres, P. R. F., Baliza, D. P. (2006) Calagem e adubação orgânica: influência na adsorção de fósforo em solos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30: 975-983.
- Souza, W. J. O., Melo, W. J. (2003) Matéria orgânica em um latossolo submetido a diferentes sistemas de produção de milho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 27: 1113-1122.
- Sparling, G. P. (1992) Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Australian Journal of Soil Research*, 30: 195-207.
- Theodoro, V. C. de A., Alvarenga, M. I. N., Guimarães, R. J., Mourão Júnior, M. (2003a) Carbono da biomassa microbiana e micorriza em solos sob mata nativa e agroecossistemas cafeeiros. *Acta Scientiarum Agronomy*, 25: 147-153.
- Theodoro, V. C. de A., Alvarenga, M. I. N., Guimarães, R. J., Souza, C. A. S. (2003b) Carbono da biomassa microbiana e micorriza em solos sob mata nativa e agroecossistemas cafeeiros. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 27: 1039-1047.
- Vance, E. D., Brookes, P. C., Jenkinson, D. S. (1987) An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 19: 703-707.
- Vitti, C. G., Tavares Júnior, J., Luz, P. H. C., Favarin, J. L., Costa, M. C. G. (2002) Influência da mistura de sulfato de amônio com uréia sobre a volatilização de nitrogênio amoniacal. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 26: 663-667.
- Wang, Q. R., Li, Y. C., Klassen, W. (2007) Changes of soil microbial biomass carbon and nitrogen with cover crops and irrigation in a tomato field. *Journal of Plant Nutrition*, 30: 623-639.

- Xavier, F. A. da S., Maia, S. M. F., Oliveira, T. S. de, Mendonça, E. de S. (2006) Biomassa microbiana e matéria orgânica leve em solos sob sistemas agrícolas orgânico e convencional na Chapada da Ibiapaba - CE. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30: 247-258.
- Zilli, J. L., Smiderle, O. J., Neves, M. C. P., Rumjanek, N. G. (2007) População microbiana em solo cultivado com soja e tratado com diferentes herbicidas em área de cerrado no Estado de Roraima. *Acta Amazônica*, 37: 201-212.

### **3.2. CAPÍTULO 2: Aspectos fisiológicos e bioquímicos em cafeeiro**

#### **CLASSES LIPÍDICAS E ÁCIDOS GRAXOS DE CLOROPLASTOS DE *Coffea* sp. SUBMETIDOS À BAIXA TEMPERATURA POSITIVA**

##### **RESUMO**

Temperaturas baixas positivas afetam diversos componentes fisiológicos e bioquímicos das plantas. Contudo, estas possuem mecanismos de aclimação que conferem tolerância a essas condições limitantes e uma melhor capacidade de recuperação após o fim do estresse. Objetivou-se, com este trabalho avaliar o impacto de baixas temperaturas positivas no aparelho fotossintético através da análise da composição lipídica das membranas dos cloroplastos, da perda de folhas e das trocas gasosas foliares. O trabalho foi efetuado em dois genótipos de *Coffea canephora* (clones 02 e 153) e um de *C. arabica* (Catucaí IPR 102). As plantas foram colocadas em câmaras de crescimento com condições ambientais controladas, onde permaneceram com regime de temperatura de 25/20°C (dia/noite), irradiância de 700-900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , concentração de  $\text{CO}_2$  de 380  $\mu\text{L L}^{-1}$

<sup>1</sup>, 70% de umidade relativa e 12 h de fotoperíodo. As plantas foram submetidas sucessivamente a um decréscimo gradual da temperatura (0,5°C diários), até 13/8°C, um ciclo de 3 dias a 13/4°C e 14 dias de recuperação na temperatura de 25/20°C . Com a imposição das condições de baixas temperaturas, observou-se a queda na taxa de fotossíntese líquida, acompanhada de um aumento da concentração interna de CO<sub>2</sub>. Assim, o decréscimo daquela deve estar associado a problemas não-estomáticos, nomeadamente, relacionados com o funcionamento das membranas. O Conilon clone 02 foi o genótipo mais afetado, apresentando maior perda de folhas e menor recuperação da fotossíntese líquida após o fim das condições de estresse, seguido pelo clone 153, sendo Catucaí o menos afetado nesses parâmetros. Esse genótipo apresentou maior grau de insaturação de lípidios e maior porcentagem de ácido linolênico no fosfatidilglicerol, entre o controle e 13/8°C, sugerindo uma maior fluidez membranar. Diferenças na quantidade e qualidade dos ácidos graxos e classes lipídicas dos cloroplastos, conjugados com a avaliação de queda de folhas e trocas gasosas foliares, poderão contribuir no manejo e na escolha de genótipos mais adequados para áreas sujeitas a períodos de baixas temperaturas, podendo constituir importantes ferramentas em programas de melhoramento de *Coffea* sp.

## **CHLOROPLAST LIPID CLASSES AND FATTY ACID COMPOSITION OF *Coffea* sp. SUBMITTED TO LOW POSITIVE TEMPERATURE**

### **ABSTRACT**

Low positive temperatures affect several plant physiological and biochemical components. However, the plants present acclimation mechanisms

that confer tolerance to such limiting conditions and better recovery ability after the exposure to stress. The main objective of the present work was to evaluate the impact of low positive temperatures (*chilling*) in the photosynthetic machinery, through the analysis of the lipid composition of chloroplast membranes, of leaf loss and of leaf gas exchange. The work was carried out using two genotypes of *Coffea canephora* (clones 02 and 153) and one of *C. arabica* (Catucaí IPR 102). The plants were placed in growth chambers under environmental controlled conditions, with temperature 25/20°C (day/night), irradiance of 700-900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 380  $\mu\text{L de CO}_2 \text{ L}^{-1}$ , 70% relative humidity and a photoperiod of 12 h and for about 10 days. The plants were then submitted successively to 1) a gradual temperature decrease (0.5°C per day) to 13/8°C, 2) a 3 day chilling cycle (3 x 13/4°C) and to 3) a recovery period of 14 days in 25/20°C. With cold imposition a decrease in the net photosynthetic rate was observed, accompanied by an increase in the internal CO<sub>2</sub> concentration. In this way, such decrease will be associated to non-stomatal problems, namely with those related to membranes functioning. Conilon clone 02 was the most affected genotype, showing the higher value of leaf loss and the lowest photosynthetic recovery after the stress imposition, followed by clone 153, being Catucaí less affected as regards these parameters. This genotype presented higher lipid unsaturation and higher percentage of linolenic acid in phosphatidilglycerol between control and 13/8°C, suggesting a higher membrane fluidity. Qualitative and quantitative differences of chloroplast fatty acids and lipid classes, together with the evaluation of leaf shed and gas exchanges would contribute for the management and selection of adequate genotypes to areas prone to cold occurrence, thus constituting important tools in breeding programs of *Coffea* sp.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea* é representado por pelo menos 103 espécies, destacando-se comercialmente *C. arabica* e *C. canephora* (Davis et al., 2006). A produção mundial de café nos últimos anos tem sido superior a 110 milhões de sacas, produzido principalmente nos países considerados em desenvolvimento (ICO, 2008). O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, cultura que gera divisas, postos de trabalho e promove o desenvolvimento onde este é produzido ou processado. Na safra de 2006/2007, a produção brasileira de *C. arabica* foi de 33 milhões de sacas e a de *C. canephora* de 9,5 milhões, numa área de 2,15 milhões de hectares com 5,67 bilhões de cafeeiros (Conab, 2007). Em 2007 foram exportados pelo Brasil 28 milhões de sacas, o que equivale a 65% da produção nacional e, aproximadamente, 29% das exportações mundiais do produto (ICO, 2008).

Na maioria das plantas, a submissão a temperaturas baixas positivas afetam diversos componentes do processo fotossintético, reduzindo a condutância estomática, a fotossíntese líquida, a eficiência fotoquímica do fotossistema II, o transporte tilacóidal de elétrons, a atividade enzimática, a fixação do carbono, alterando, ainda, a composição e a estrutura dos complexos de pigmentos fotossintéticos (Allen e Ort, 2001; Strauss et al., 2007; Hund et al., 2008; Suzuki et al., 2008; Zhu et al., 2008), bem como a composição lipídica das membranas dos cloroplastos (Campos et al., 2003; Bohn et al., 2007). Esses efeitos também foram observados no gênero *Coffea*, com intensidades distintas entre diferentes espécies (Oliveira et al., 2002; Campos et al., 2003; Ramalho et al., 2003; Silva et al., 2004), refletindo características morfo-fisiológicas distintas.

O cafeeiro, quando cultivado em latitudes superiores a 15° S, apresenta um decréscimo acentuado na taxa de crescimento no inverno (Barros e Maestri, 1974; Bauer et al., 1990; Barros et al., 1997; Mota et al., 1997; Libardi et al., 1998; Amaral et al., 2006; Nazareno et al., 2003; Silva et al., 2004). Contudo, os cafeeiros possuem mecanismos de aclimação que passam, nomeadamente, por alterações quantitativas e qualitativas dos lipídios de membranas e pelo aumento da capacidade de dissipação do excesso de energia, que conferem uma maior



tolerância a baixas temperaturas e uma melhor recuperação após o fim do estresse (Oliveira et al., 2002; Campos et al., 2003; Ramalho et al., 2003).

As membranas celulares são estruturas dinâmicas formadas essencialmente por lipídios e proteínas e constituem o suporte para inúmeras reações biofísicas e bioquímicas, destacando-se a regulação e transporte de íons e a atividade de inúmeras enzimas. Estas barreiras seletivas permeáveis, proporcionam o desencadear de muitas respostas biológicas. Contudo, as membranas são consideradas um dos principais alvos de estresses ambientais e, portanto, constituem papel fundamental na adaptação a condições adversas, inclusive a baixas temperaturas (Routaboul et al., 2000).

Alguns genótipos de *Coffea* sp., quando submetidos a baixas temperaturas, podem desencadear um aumento na proporção de ácidos graxos insaturados, tais como o ácido linolênico (C18:3), principalmente no início da aclimatação (Campos et al., 2003). Esta alteração favorece a fluidez membranar, pois as duplas ligações *cis* nas cadeias destes ácidos graxos induzem a formação de curvaturas que aumentam a flexibilidade dessas cadeias, garantindo adequada atividade fotossintética (Xin e Browse, 2000). Contudo, os ácidos graxos insaturados, mais abundantes nos galactolipídios são também o substrato preferencial de peroxidases e enzimas hidrolíticas (Sahsah et al. 1998; Campos et al., 2003; Kaniuga, 2007). Estas ligações duplas constituem alvos preferenciais para processos degradativos (Ferrari-Iliou et al., 1992; Campos e Pham-Thi, 1995; Smirnof, 1995), incluindo, provavelmente, a ação de espécies reativas de oxigênio, como sugerido por Ramalho et al. (1998) para *C. arabica* cv. Catuaí submetido a condições de alta irradiância.

Mudanças da fase fluída-cristalina dos lipídios para sólida-gel podem ocorrer em temperaturas que variam de 10 a 15°C nas espécies tropicais (Harwood, 1997). Isto implicará que a estrutura em bicamada lipídica das membranas se torne menos flexível, o que dificulta o movimento das proteínas e favorece a ação de enzimas hidrolíticas, podendo resultar em abertura de fendas e perda de solutos, impedindo a aclimatação e comprometendo a integridade da célula (Wismer et al., 1998), levando-a até a morte. Por conseguinte, alterações da composição de ácidos graxos, bem como das classes lipídicas, das membranas têm caráter adaptativo das plantas ao estresse (Ramalho et al., 1998; Campos et al., 1999; Routaboul et al., 2000; Campos et al., 2003), podendo

conferir viabilidade de cultivo de espécies e/ou genótipos em regiões potencialmente menos adequadas.

Recentemente, o cultivo de café Conilon em áreas de maior altitude (com temperatura amena) tem aumentado. Agricultores e pesquisadores acreditam que o cultivo de *C. canephora* cv. Conilon pode ser mais uma alternativa viável nestas condições, uma vez que geralmente apresenta maior tolerância a condições de estresse biótico e abiótico, apesar de ser mais susceptível a baixas temperaturas em comparação a *C. arabica* (DaMatta et al., 1997; Ramalho et al., 2003).

A compreensão dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos de resposta à baixa temperatura em *C. arabica* e *C. canephora* pode auxiliar no manejo e no processo de seleção de genótipos com maior grau de tolerância. Assim, objetivou-se neste trabalho, avaliar o impacto de baixas temperaturas positivas no aparelho fotossintético, através da análise da composição lipídica das membranas dos cloroplastos, da perda de área foliar (por senescência e/ou necrose das folhas) e da afetação das trocas gasosas foliares, em três genótipos de *Coffea* sp.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Vegetal e Implementação dos Estudos

Foram utilizados plantas de *Coffea canephora* cv. Conilon, clone 02 (de maturação precoce) e clone 153 (de maturação tardia) (Bragança et al., 2001) e *C. arabica* cv. Catucaí IPR 102 (Sera et al., 2007), com, aproximadamente, 12 meses de idade, desenvolvidas em vasos contendo 3 L de substrato, em casa de vegetação no Centro de Ecofisiologia, Bioquímica e Biotecnologia Vegetal, do Instituto de Investigação Tropical, em Oeiras, Portugal.

As plantas desenvolveram-se durante cerca de 1 ano em estufa, tendo então sido transferidas para câmaras de crescimento (tipo *walkin*, Fitoclima 10000 EHHF, ARALAB, Portugal). Essas permaneceram com irradiância de 700-900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , proporcionada por uma combinação otimizada de lâmpadas

fluorescentes de alta frequência, de vapor de sódio e de halogênio (Ramalho et al., 2002), concentração ambiente de CO<sub>2</sub> (cerca de 380 µL de CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>), umidade relativa de 70%, fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25/20°C (dia/noite), durante 15-20 dias para aclimação a estas condições consideradas de controle. As plantas foram então submetidas a um decréscimo gradual da temperatura (0,5°C diários) desde 25/20°C até 13/8°C, durante 24 dias, para permitir a expressão gradual do potencial de aclimação a baixas temperaturas. Seguidamente, foram submetidas a 3 ciclos consecutivos de 4°C durante a noite e as 4 primeiras horas do dia seguinte, permanecendo a 13°C durante o restante do dia (3 x 13/4°C), após o que a temperatura subiu de novo, para 20/15°C no 1º dia e 25/20°C nos seguintes, acompanhando-se a recuperação das plantas durante 14 dias.

Todas as análises (não destrutivas e destrutivas) foram realizadas em folhas recém maduras em pelo menos seis ocasiões distintas: 25/20°C (controle), 18/13°C (meio do período de aclimação), 13/8°C (final do período de aclimação), 3 x 13/4°C (após os três ciclos de baixa temperatura positiva) e durante o período de recuperação a 25/20°C (7 e 14 dias após os ciclos de temperaturas mínimas). As análises não destrutivas de trocas gasosas foliares e contagem de folhas foram ainda realizadas nas temperaturas de 21/16°C, durante o período de aclimação e a 25/20°C nos dias 1, 3 e 10 do período de recuperação.

A coleta das folhas para as análises destrutivas foi efetuada após 2-2:30 h de iluminação (por volta das 9:30-10:00 h). Colheram-se folhas de 6-8 plantas de cada genótipo, formando amostras compostas que foram utilizadas em várias determinações efetuadas de imediato (em material fresco) ou, posteriormente, sendo no último caso, congeladas em N<sub>2</sub> líquido e guardadas a -80°C.

### **Avaliação visual do impacto da temperatura nas folhas**

Fez-se a contagem do número de folhas (com mais de 50% de tecido vivo) em 8-10 plantas por genótipo, sendo separadas por estágio de desenvolvimento (folhas maduras e novas). Pela diferença do número de folhas presentes no início das avaliações, com os demais períodos avaliados, determinou-se a porcentagem de folhas presentes em cada período.

### **Trocas gasosas foliares**

As taxas de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A$ ), de condutância estomática ao vapor de água ( $g_s$ ) e de evapotranspiração ( $E$ ), assim como a concentração interna de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ), foram medidas utilizando um analisador portátil de gás por infravermelho (IRGA), de sistema aberto (CIRAS 1, PP Systems, Inglaterra), sob irradiância de, aproximadamente, 700-800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e cerca de 380  $\mu\text{L de CO}_2 \text{ L}^{-1}$ . Para cada dia de avaliação, ao longo do ensaio, foram feitas medições em 5 plantas por genótipo em cada hora (9:00, 11:00, 13:00, 15:00 e 17:00 h), totalizando 25 medições diárias.

Os valores de  $A$ ,  $g_s$ ,  $E$  e  $C_i$  foram analisados através da sua variação percentual (relativamente ao seu respectivo controle) por forma a facilitar a comparação entre genótipos.

### **Quantificação de lipídios das membranas dos cloroplastos**

Colheram-se 3 g de material foliar, que foram imediatamente macerados em 25 mL de tampão MES 50 mM (pH 6,4), contendo 0,4 M D-sorbitol, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,4% (p/v) BSA e 2 mM Na-ascorbato, num almofariz previamente esfriado. O homogenato foi filtrado com gaze (8 camadas) e centrifugado (5000  $g$ , 5 min, 4°C), descartando-se o sobrenadante e ressuspensando o depósito (contendo as membranas cloroplastidicas) em 9 mL de uma solução clorofórmio/metanol/água (1:1:1, v/v/v) (Allen et al., 1966). Desse volume, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  foi utilizada para a determinação espectrofotométrica das clorofilas e carotenóides totais (Lichtenthaler, 1987) e o restante foi centrifugado (4500  $g$ , 10 min, 4°C). Com uma pipeta de Pasteur foi depois recolhida a fase inferior (contendo os lipídios cloroplastidiais), que foi evaporada sob fluxo de nitrogênio. O resíduo seco foi resuspendido em 0,5 mL de solução de etanol/tolueno (1:4, v/v) e guardado a -20°C para posterior análise.

Para a análise de ácidos graxos totais, retiraram-se alíquotas de 50  $\mu\text{L}$ , que foram acondicionadas em tubos e saponificadas com 4 mL de uma solução de 0,5 M NaOH, em metanol, sendo colocadas em "banho maria" a 65°C, durante 15 min e posteriormente arrefecidas, parando a reação. Antes da metilação, foram adicionados 50  $\mu\text{g}$  por amostra de ácido heptadecanoico (C17:0) como padrão interno, para as determinações quantitativas de ácidos graxos. Para efetuar a

metilação, adicionaram-se 2 mL de metanol-BF<sub>3</sub> (complexo de trifluoreto de boro-metanol). Depois de agitada a mistura os tubos foram colocados em "banho maria" a 65°C por 15 min e arrefecidos (Metcalf et al., 1966). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram extraídos em pentano (10 mL de pentano e 2 mL de água). Após agitação da mistura, e uma pausa para permitir a decantação da mesma (aproximadamente 60 min), recolheu-se a fase superior com uma pipeta de Pasteur. Depois de evaporado o pentano sob fluxo de nitrogênio, cada amostra foi resuspendida em 300 µL de etanol:tolueno (1:4, v/v) sob atmosfera de nitrogênio, acondicionada num pequeno tubo e colocada a -20°C.

Antes da análise por cromatografia gás-líquido, as amostras foram evaporadas à secura, sendo depois resuspendidas em hexano (cerca de 50-100 µL). Para analisar os ácidos graxos um volume de, aproximadamente, 0,4 µL foi injetado no cromatógrafo gasoso UNICAM 610 (Unicam, Inglaterra) equipado com um detector de ionização de chama. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados numa coluna capilar de sílica fundida DB-Wax (J & W Scientific, Estados Unidos). A temperatura da coluna subiu de 80 a 200°C numa taxa de 12°C min<sup>-1</sup>, após 2 min à temperatura inicial. Temperaturas de injetor e detector foram 200 e 250°C, respectivamente. O hidrogênio com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup> (razão de mistura de 1:100) serviu como gás de transporte.

Por sua vez, para separação das classes lipídicas, foram evaporados com fluxo de nitrogênio gasoso 150 µL da solução guardada a -20°C em etanol:tolueno. Adicionaram-se 200 µL de clorofórmio no tubo para ressuspender os lipídios cloroplastidiais e procedeu-se a sua deposição numa placa de sílica gel G 60 (Merck) por meio de capilares de vidro. O tubo foi lavado com mais 100 µL de clorofórmio para permitir a recolha de todos os resíduos. Foram depositadas duas amostras por placa, em linha, na base da placa. Depois de a solução secar (5 a 10 min), as placas foram introduzidas nas tinas de cromatografia, contendo uma solução de clorofórmio:acetona:metanol:ácido acético:água (50:20:10:10:5, v/v) como fase móvel, conforme Lepage (1967) e Campos et al. (2003), ocorrendo a subida das amostras durante aproximadamente 115 min. As placas foram então transferidas para outra tina contendo uma mistura de éter de petróleo:éter dietílico:ácido acético (70:30:0,4, v/v) durante cerca de 1 h (Mangold, 1961). Terminada a eluição, as placas foram retiradas das tinas e deixadas por alguns minutos a secar. Depois de pulverizadas com primulina (0,01% em acetona a

80%), as placas foram observadas à luz ultravioleta, marcando-se com grafite as manchas fluorescentes correspondentes às diferentes classes lipídicas, sendo as mesmas raspadas com uma espátula e acondicionadas em tubos. Estas foram saponificadas, metiladas e analisadas por cromatografia gás-líquido como já descrito para a determinação de ácidos graxos totais, de modo a efetuar uma análise da composição dos ácidos graxos de cada classe lipídica.

Finalmente, os ésteres metílicos de ácidos graxos e classes lipídicas foram identificados por comparação com padrões conhecidos (Sigma). O valor para os ácidos graxos totais corresponde à soma dos ácidos graxos individuais, enquanto o índice de saturação,  $DBI = [(\% \text{ monoenes} + 2 \times \% \text{ dienes} + 3 \times \% \text{ trienes}) / (\% \text{ ácidos graxos saturados})]$ , foi calculado conforme Mazliak (1983).

### **Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância num esquema fatorial (genótipo vs. temperatura, incluindo o período de recuperação) ( $P = 0,05$ ). Utilizou-se o teste Tukey para comparação entre as médias, para um nível de confiança de 95%.

## **RESULTADOS**

### **Presença de folhas e avaliações visuais**

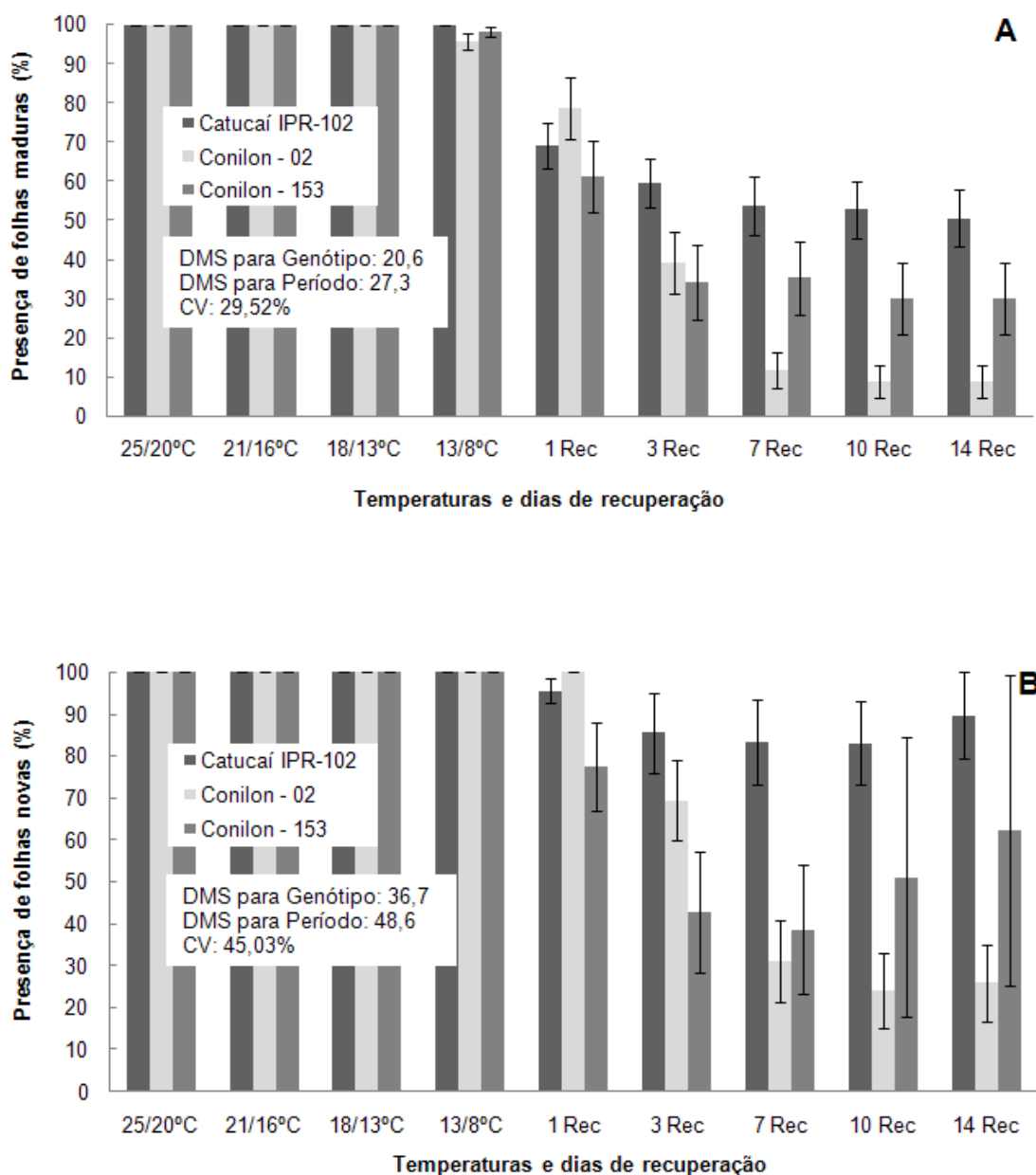
Até ao fim do período de aclimação (13/8°C) não foram observados efeitos significativos da descida gradual de temperatura. Contudo, imediatamente após o início dos ciclos de baixas temperaturas com 4°C, observou-se queda de folhas, sendo maior nas folhas maduras do que nas folhas jovens, em qualquer dos genótipos (Fig. 1A,B). No 1º dia após o ciclo de submissão, a 4°C, as folhas maduras em Catucaí IPR 102 e Conilon clone 153 apresentaram queda significativa, o mesmo não sucedendo no clone 02, que apresentou a menor porcentagem de queda de folhas. Contudo, os efeitos pós-estresse mostraram-se

mais acentuados neste genótipo a partir do 7º dia de recuperação, permanecendo apenas 8,7% das folhas no final das avaliações, em comparação à porcentagem inicial. No fim do experimento, todos os genótipos apresentaram um decréscimo significativo do número de folhas maduras em relação aos seus respectivos controles. Contudo, após o 3º dia de recuperação, observou-se uma tendência consistente de manutenção do número de folhas maduras em Catucaí IPR 102 e clone 153, mantendo o primeiro um número de folhas maduras superiores ao segundo (significativo no 3º e 10º dia) e ambos superiores ao clone 02 (Fig. 1A).

Nota-se que nos 1º e 3º dias de recuperação, a queda de folhas nos genótipos de Conilon foi, principalmente, de folhas maduras com ausência de necrose e visualmente com bom aspecto, contudo, apresentaram ruptura ao nível da base do pecíolo, desprendendo-se facilmente dos ramos. Posteriormente ao 3º dia de recuperação, esta forma de queda de folhas diminuiu, passando a ser caracterizada (principalmente no clone 02) pelo murchamento das folhas e morte de algumas plantas.

No que refere às folhas jovens, Catucaí registrou uma queda não-significativa após o tratamento de 4°C, permanecendo com porcentagem igual ou superior a 83% das folhas, em comparação ao início do experimento e mostrando uma certa tendência para recuperar aos 14 dias de recuperação. Por sua vez, o clone 153 mostrou um forte impacto do tratamento de baixa temperatura, com acentuada queda de folhas jovens até o 7º de recuperação. No entanto, após o 7º dia de recuperação, mostrou capacidade para desenvolver novas folhas, recuperando de 38,6% para 62,2% entre o 7º e o 14º dia de recuperação. Tal como para as folhas maduras, o clone 02 também foi o mais afetado em relação à perda de folhas em início de desenvolvimento. Apesar de apresentar uma perda mais lenta de folhas que o clone 153 até ao 3º dia de recuperação, acabou por atingir um valor mínimo de apenas 24,1% no 10º dia de recuperação, não revelando até, o 14º dia, capacidade de recuperação (Fig. 1B).

As lesões nas folhas novas nos 3 genótipos tornaram-se mais visíveis no fim do ciclo de baixas temperaturas e, no 1º dia de recuperação, caracterizando-se, principalmente, por apresentar lesões nas bordas foliares e nas pontas do limbo foliar, vindo, posteriormente, parte destas a senescer. No genótipo de Catucaí, as folhas necrosadas (parcial ou total) foram as que apresentaram queda.



**Figura 1.** Avaliação da porcentagem de folhas maduras (A) e novas (B) presentes nos genótipos de *Coffea* sp. submetidos a decréscimo gradual de temperatura (25/20°C até 13/8°C), durante 24 dias, 3 ciclos de temperatura de 13/4°C (3x13/4°C) e posterior período de recuperação (Rec) a 25/20°C até 14 dias. Cada valor médio é proveniente de 7 a 14 repetições. As barras representam o erro padrão da média.

**Nota:** DMS = Diferença mínima significativa. CV = Coeficiente de variação.



### Trocas gasosas

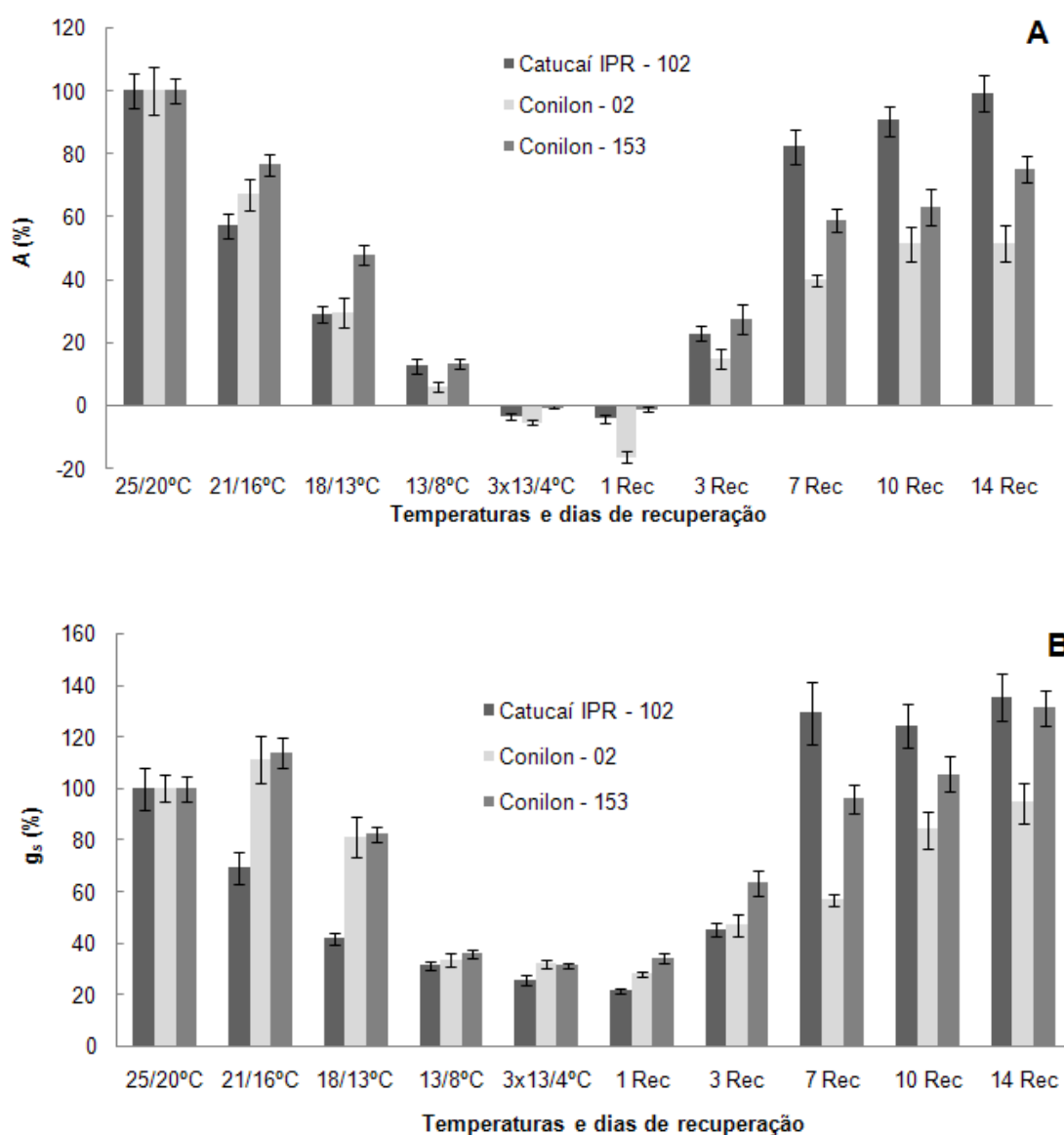
De um modo geral, as taxas de fotossíntese líquida ( $A$ ), de condutância estomática ( $g_s$ ) e de evapotranspiração ( $E$ ), tal como a concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) apresentaram variações com a exposição das plantas a baixas temperaturas, observando-se decréscimos em  $A$ ,  $g_s$  e  $E$  e aumento de  $C_i$  nos três genótipos (Fig. 2A,D). Após o fim da exposição a baixas temperaturas, observou-se uma recuperação gradual dos vários parâmetros, que foi diferente entre os genótipos em estudo.

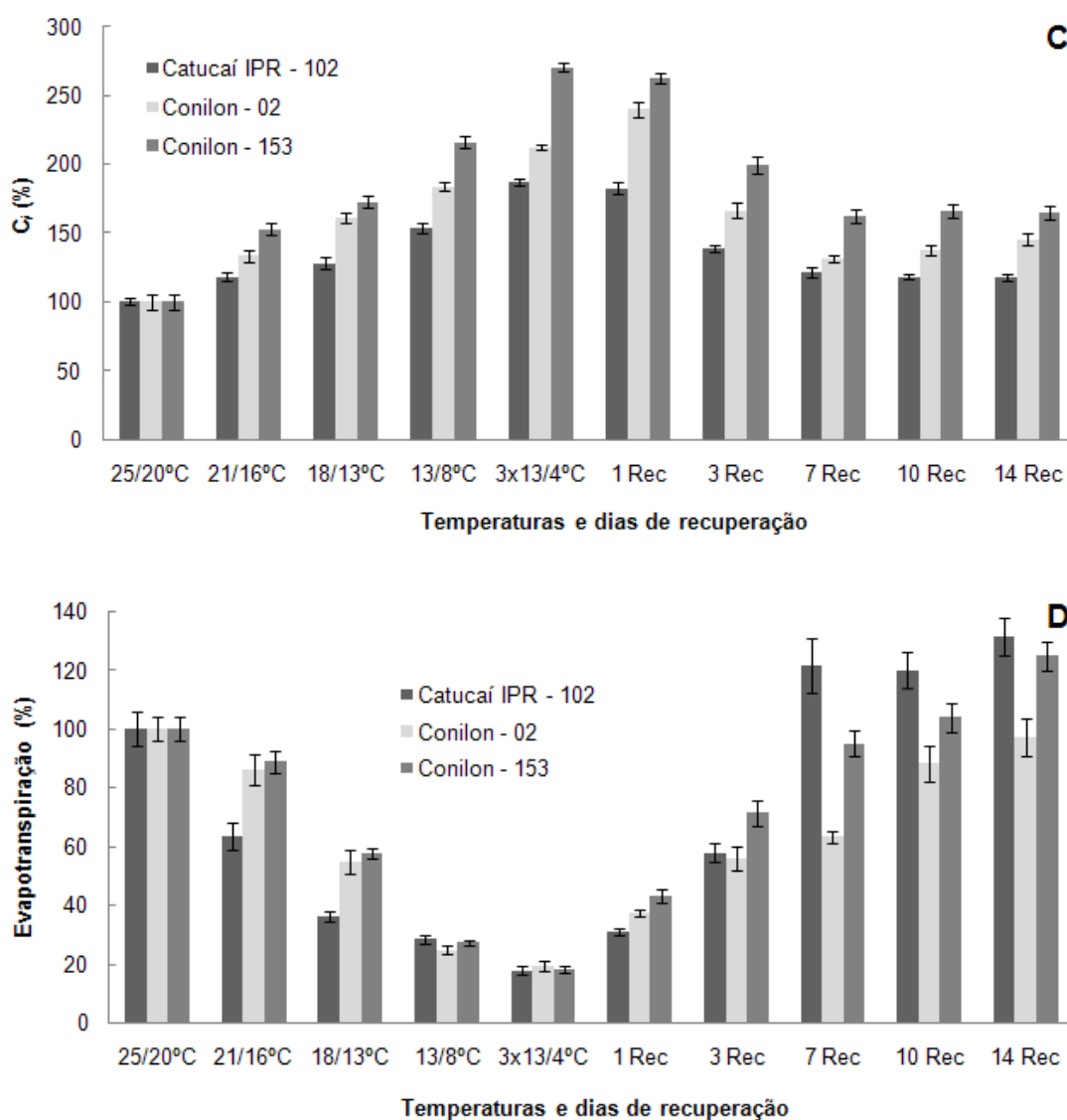
O valor de  $A$  foi aquele que mais rapidamente mostrou queda. De fato, em temperatura pouco abaixo do controle (21/16°C), já foi possível observar um decréscimo neste parâmetro, que a 18/13°C foi reduzido para 29,2, 29,8 e 48%, respectivamente, para Catucaí, clone 02 e clone 153 em relação aos respectivos controles. Ao ser atingida a temperatura de 13/8°C os valores observados foram inferiores a 13,2%, não diferindo significativamente entre os genótipos. Contudo, os valores mais baixos foram obtidos após a exposição a 4°C e durante o 1º dia de recuperação, quando se registraram apenas valores negativos de  $A$ , mesmo quando a temperatura já havia subido para 20/18°C.

Apenas com 3 dias de recuperação observou-se aumento significativo de  $A$ , que ainda assim não ultrapassou 28% do valor dos respectivos controles. Contudo, a partir do 7º dia de recuperação foram observadas diferenças significativas entre genótipos relativamente à recuperação de  $A$ . Nesta altura, o genótipo Catucaí apresentou 82,3% relativamente ao seu controle, continuando a recuperar até ao valor de 99,4% no término das avaliações. Apesar de o Conilon clone 153 não apresentar recuperação plena da fotossíntese líquida, essa foi de 58,8% no 7º dia de recuperação e de 75,2% no fim do experimento, enquanto o clone 02 apresentou apenas 51,7% de recuperação depois de 14 dias de recuperação, sendo, assim, o genótipo mais afetado pelas baixas temperaturas (Fig. 2A).

O padrão de variação de  $g_s$  e  $E$  foi semelhante (Fig. 2B,D). Ambos os parâmetros e  $C_i$  mostraram respostas semelhantes nos 3 genótipos com o decorrer da queda da temperatura e nos dias de recuperação. Contudo, com a implementação das baixas temperaturas,  $C_i$  aumentou significativamente a partir de 21/16°C para os genótipos de Conilon e de 13/8°C para Catucaí, mantendo-se essa significância até ao fim do experimento, apesar de alguma recuperação ter

sendo observada após o fim do estresse severo (3 x 13/4°C). Dos 3 genótipos, Catucaí apresentou sempre valores mais próximos do controle, nomeadamente no fim do experimento. Esse genótipo apresentou a queda mais acentuada de  $g_s$  e  $A$  nas temperaturas de 21/16°C e 18/13°C em comparação aos clones de Conilon, mas apresentou também as melhores recuperações nos vários parâmetros de trocas gasosas foliares estudados após o fim dos ciclos de 4°C. Os valores de  $g_s$  e  $E$  depois do 10º dia apresentaram recuperação nos três genótipos, atingindo, inclusive, valores superiores aos iniciais em Catucaí e clone 153, porém a  $C_i$  manteve-se com valores superiores aos registrados no controle (Fig. 2B,C).



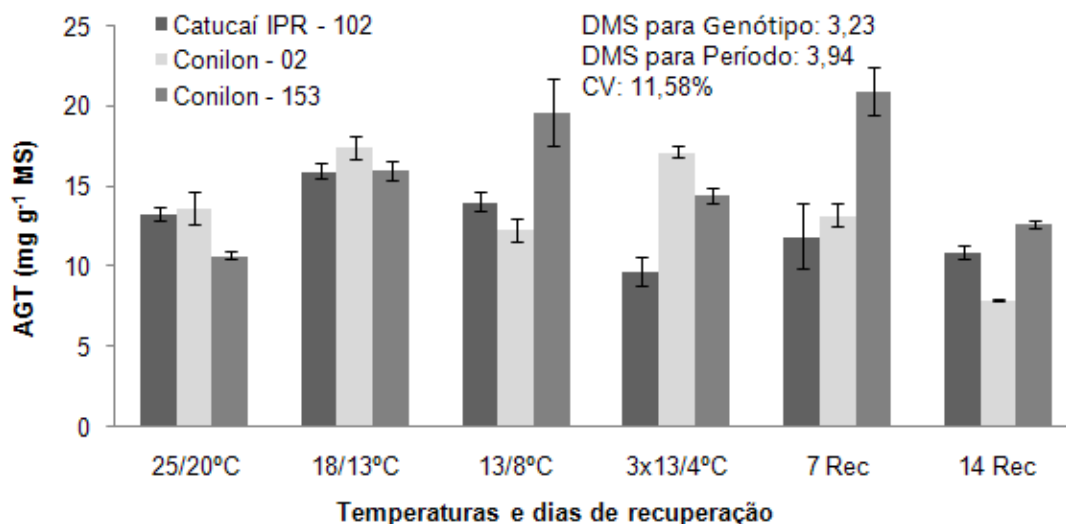


**Figura 2.** Taxas de fotossíntese líquida -  $A$  (A) e de condutância estomática -  $g_s$  (B), da concentração interna de  $\text{CO}_2$  -  $C_i$  (C) e da taxa de evapotranspiração -  $E$  (D), nos genótipos de *Coffea* sp. submetidos a decréscimo gradual de temperatura (25/20°C até 13/8°C), durante 24 dias, 3 ciclos de temperatura de 13/4°C (3x13/4°C) e posterior período de recuperação (Rec) a 25/20°C até 14 dias. Cada valor médio é proveniente de 25 repetições e os dados estão apresentados em porcentagem em comparação ao controle. As barras representam o erro padrão da média.

### Composição de ácidos graxos e classes lipídicas

Na condição de controle e na temperatura de 18/13°C a quantidade de ácidos graxos totais (AGT) foi semelhante nos 3 genótipos, todavia o clone 153 apresentou os maiores aumentos (significativos) a 18/13°C e 13/8°C e os maiores valores absolutos a 13/8°C e aos 7 dias de recuperação. Catucaí IPR 102 não

apresentou variações significativas ao longo do período experimental, enquanto o clone 02 apresentou valor inferior ao seu controle apenas aos 14 dias de recuperação (Fig. 3).



**Figura 3.** Avaliação da variação percentual de ácidos graxos totais (AGT) nas membranas cloroplastidiais de folhas, nos genótipos de *Coffea* sp. submetidos a decréscimo gradual de temperatura (25/20°C até 13/8°C), durante 24 dias, 3 ciclos de temperatura de 13/4°C (3x13/4°C) e posterior período de recuperação (Rec) a 25/20°C até 14 dias. Cada valor médio é proveniente de 3 repetições. As barras representam o erro padrão da média.

**Nota:** DMS = Diferença mínima significativa e CV = Coeficiente de variação.

No que respeita à composição porcentual de ácidos graxos, o conteúdo do ácido *trans*-hexadecenóico (C16:1*t*), característico do cloroplasto, foi igual entre os genótipos e entre os períodos estudados (Quadro 1), apesar de algumas variações, principalmente no Clone 02.

A quantidade de ácido linolênico (C18:3), que é o ácido mais insaturado e, também, o mais abundante nas membranas dos cloroplastos (com valores entre 48 e 65% do total), não variou entre os genótipos em cada temperatura analisada, mas mostrou algumas variações significativas em Catucaí, e no clone 153, apesar de se observar uma tendência para decrescer durante o período de recuperação no clone 02. Em contrapartida, o clone 153 apresentou um decréscimo porcentual de C18:3 apenas na temperatura de 13/8°C. Contudo, tal decréscimo não indicará menor quantidade deste ácido graxo, já que coincide com o máximo de AGT

neste genótipo (Fig. 3). Já Catucaí IPR 102 apresentou tendência de aumento no início de queda de temperatura (18/13°C), mas apresentou valores estáveis durante todo o experimento, exceto aos 14 dias de recuperação, seguindo uma tendência semelhante ao observado para os AGT.

**Quadro 1.** Avaliação da variação percentual da composição de ácidos graxos e grau de insaturação (DBI) dos lípidios das membranas cloroplastidiais de folhas nos genótipos de *Coffea* sp. submetidos a decréscimo gradual de temperatura (25/20°C até 13/8°C), durante 24 dias, 3 ciclos de temperatura de 13/4°C (3x13/4°C) e posterior período de recuperação (Rec) a 25/20°C até 14 dias. Cada valor médio é proveniente de 3 repetições.

-	Genótipo	Temperaturas e dias de recuperação					
		25/20°C	18/13°C	13/8°C	3x13/4°C	7 Rec	14 Rec
<b>C16:0 (%)</b>	Catucaí	16,90Aab	12,3Ab	22,49Bab	22,12Aab	25,93Aa	23,60Aa
CV: 18,86	Clone 02	17,39Aa	18,58Aa	23,93ABa	23,04Aa	26,03Aa	27,54Aa
-	Clone 153	16,82Abc	14,95Ac	31,52Aa	25,72Aab	23,09Aabc	24,77Aabc
<b>C16:1t (%)</b>	Catucaí	11,26Aa	9,44Aa	10,43Aa	11,35Aa	12,45Aa	12,08Aa
CV: 20,94	Clone 02	8,33Aa	10,47Aa	7,94Aa	11,39Aa	13,08Aa	10,17Aa
-	Clone 153	12,81Aa	13,48Aa	11,46Aa	9,51Aa	11,82Aa	11,21Aa
<b>C18:1 (%)</b>	Catucaí	1,38Bab	1,32Bab	0,81Bb	1,87Aa	1,90Aa	1,43Bab
CV: 16,52	Clone 02	1,66Ba	1,62ABa	2,13Aa	1,81Aa	0,64Bb	0,72Cb
-	Clone 153	2,44Aa	2,03Aa	1,24Bb	2,16Aa	2,43Aa	2,44Aa
<b>C18:2 (%)</b>	Catucaí	13,23Ba	11,82Aab	12,03Aab	6,52Bc	5,15Bc	9,66Bb
CV: 11,12	Clone 02	15,97Aa	12,46Ab	10,39Abc	8,29ABc	10,65Abc	13,19Aab
-	Clone 153	10,68Ca	9,38Bab	7,63Bb	9,44Bab	10,54Aa	10,67Ba
<b>C18:3 (%)</b>	Catucaí	57,22Aab	65,12Aa	54,24Aab	58,14Aab	54,56Aab	53,22Ab
CV: 8,31	Clone 02	56,65Aa	56,87Aa	55,62Aa	55,48Aa	49,60Aa	48,38Aa
-	Clone 153	57,25Aab	60,16Aa	48,15Ab	53,18Aab	52,12Aab	50,91Aab
<b>DBI (%)</b>	Catucaí	12,74Ab	18,88Aa	9,10Ab	9,37Ab	9,05Ab	8,36Ab
CV: 22,14	Clone 02	12,42Aa	11,49Bab	8,27Aab	8,52Aab	7,06Aab	6,64Ab
-	Clone 153	13,24Aab	14,44Ba	5,47Ac	7,40Ac	8,30Abc	7,58Ac

Médias seguidas por mesma letra maiúscula, na coluna (comparação entre genótipos), e por mesma letra minúscula, na linha (comparação entre temperaturas e dias de recuperação), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = Coeficiente de variação.

Nota: C16:0 = ácido palmítico; C16:1t = ácido *trans*-hexadecenóico ; C18:1 = ácido oleico; C18:2 = ácido linoléico e C18:3 = ácido linolênico.

A concentração do ácido linoléico (18:2) manteve-se inalterada no Catucaí até a temperatura de 13/8°C, sofrendo uma queda acentuada após a

exposição aos ciclos de temperaturas mais baixas ( $3 \times 13/4^{\circ}\text{C}$ ), havendo, assim, uma diminuição da insaturação dos lipídios membranares. Já o clone 02 apresentou queda gradual com a exposição a baixas temperaturas, que se mostrou significativa a partir da temperatura de  $18/13^{\circ}\text{C}$ . Contudo, durante o período de recuperação, os valores subiram, não diferindo do seu controle no fim do experimento. Por outro lado, o Conilon clone 153 apresentou valores significativamente inferiores aos encontrados no controle apenas na temperatura de  $13/8^{\circ}\text{C}$ , mantendo valores estáveis durante o resto do experimento.

No que diz respeito ao ácido palmítico (C16:0), o mais saturado de todos os ácidos graxos detectados, foram observadas as maiores diferenças percentuais, com aumentos significativos nos 3 genótipos estudados, levando assim, a um aumento do nível de saturação dos lipídios membranares durante a exposição a baixas temperaturas positivas. Em Catucaí, observou-se uma tendência para aumento da porcentagem de C16:0 com a exposição a  $13/8^{\circ}\text{C}$  e  $3 \times 13/4^{\circ}\text{C}$ , que se prolongou pelo período de recuperação. O clone 02 mostrou uma tendência semelhante ao observado no IPR 102, com aumento gradual durante a exposição de baixas temperaturas e durante o período de recuperação. No clone 153 o aumento com a exposição às baixas temperaturas foi também observado, tendo duplicado o valor a  $13/8^{\circ}\text{C}$ , onde atingiu o valor máximo (significativamente superior ao observado em Catucaí). Após esta temperatura, o valor de C16:0 decresceu, mas manteve-se sempre superior ao controle.

Assim, tendo em conta as alterações na porcentagem dos ácidos graxos individuais, o grau de insaturação dos ácidos graxos (DBI) sofreu alguma variação. Na temperatura de  $18/13^{\circ}\text{C}$  foi maior no Catucaí em relação aos clones de Conilon, que resultou do aumento de C18:3 e algum decréscimo dos ácidos graxos mais saturados. Contudo, a  $13/8^{\circ}\text{C}$  mostrou já um valor significativamente inferior ao controle (devido ao aumento de C16:0), que se manteve estável durante o resto do experimento. No clone 02 observou-se um decréscimo contínuo do DBI ao longo do período experimental. Já o clone 153 apresenta uma abrupta descida do valor de DBI a  $13/8^{\circ}\text{C}$ , devido, principalmente, à subida de C16:0 e descida de C18:3 observada nesta temperatura. No resto do experimento os valores mantiveram-se inferiores ao respectivo controle, mas próximos dos observados nos genótipos restantes (Quadro 1). De um modo geral, os 3

genótipos mostraram reduções (nem sempre significativas) do DBI desde 13/8°C até ao fim do experimento.

No que respeita às classes lipídicas, os galactolipídios agregam as 2 classes com maior representação nas membranas dos cloroplastos, o monogalactosildiacilglicerol (MGDG) e o digalactosildiacilglicerol (DGDG), que somados, representam, aproximadamente, entre 75 e 85% do total. MGDG e DGDG mostraram alterações com a exposição a baixas temperaturas, observando-se uma tendência de aumento dos galactolipídios na temperatura de 18/13°C nos três genótipos. Contudo, após essa temperatura, Catucaí mostra um decréscimo de MGDG e DGDG, que se verificam, ainda, ao fim de 14 dias de recuperação (significativo apenas no MGDG). O clone 02 mostra uma tendência semelhante ao Catucaí após 18/13°C, mas não registra diferenças significativas para o seu controle em nenhuma das classes de galactolipídios no fim do experimento. Observa-se que este genótipo apresenta o valor máximo de DGDG após os ciclos de baixas temperaturas. Quanto ao clone 153, os valores de MGDG e DGDG aumentaram significativamente até 13/8°C. Após o estresse mais forte houve um decréscimo, mas no 7º dia de recuperação os valores são significativamente superiores ao controle e o total de galactolipídios (soma de MGDG e DGDG) atinge o seu máximo.

As restantes classes lipídicas têm um peso muito inferior ao MGDG e DGDG e englobam a fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA) e fosfatiditanolamina (PE), tendo mostrado algumas alterações face à exposição às baixas temperaturas.

A fosfatidilcolina (PC) comportou-se de maneira inalterada no Catucaí. Contudo, nos clones de *C. canephora* observaram-se aumentos significativos a 3x13/4°C e no 7º dia de recuperação no clone 02 e entre 13/8°C e os 7 dias de recuperação no clone 153 (significativo desde 13/8°C) (Quadro 2).

A concentração de fosfatidilglicerol (PG) foi maior no Catucaí no controle, 13/8°C, e aos 14 dias de recuperação, mostrando decréscimos ao longo do experimento apenas após o estresse mais severo e no 7º dia de recuperação, apresentando um valor superior ao controle no fim do experimento. No clone 02, após um decréscimo a 13/8°C, observaram-se aumentos de PG até ao 14º dia de recuperação (significativos após 3x13/4°C). Por outro lado, o clone 153, tal como

para PC, mostra aumentos graduais desde 18/13°C até o 7º dia de recuperação (significativos a 3x13/4°C e no 7º dia de recuperação), baixando posteriormente.

**Quadro 2.** Distribuição das classes lipídicas, em mg g<sup>-1</sup> de massa seca, nas membranas cloroplastidiais de folhas dos genótipos de *Coffea* sp. submetidos a decréscimo gradual de temperatura (25/20°C até 13/8°C), durante 24 dias, 3 ciclos de temperatura de 13/4°C (3x13/4°C) e posterior período de recuperação (Rec) a 25/20°C até 14 dias. Cada valor médio é proveniente de 3 repetições.

	Genótipo	Temperaturas e dias de recuperação					
		25/20°C	18/13°C	13/8°C	3x13/4°C	7 Rec	14 Rec
<b>MGDG</b>	Catucaí	6,22Aab	7,01ABa	6,81Aa	3,88Bc	5,03Bbc	4,19Ac
CV: 11,62	Clone 02	5,81ABb	8,15Aa	4,59Bbc	5,57Abc	3,97Bc	4,56Abc
-	Clone 153	4,85Bc	6,65Bb	7,82Aab	4,03Bc	8,84Aa	3,27Ac
<b>DGDG</b>	Catucaí	10,45Ab	13,66ABa	9,95Bb	8,18Bb	9,31Bb	7,8Bb
CV: 11,31	Clone 02	10,80Ab	14,05Aa	10,58Bb	14,59Aa	10,64Bb	10,38Ab
-	Clone 153	9,22Ade	11,43Bcd	16,78Aa	13,29Abc	16,29Aab	8,06ABe
<b>PC</b>	Catucaí	0,77Ba	0,89Aa	0,81Ba	0,71Ca	0,72Ca	0,75Aa
CV: 11,69	Clone 02	1,01Ac	0,90Ac	1,00Bc	1,32Ab	2,01Aa	0,53Bb
-	Clone 153	0,47Cb	0,71Ab	1,22Aa	1,09Ba	1,25Ba	0,57ABb
<b>PG</b>	Catucaí	1,31Ab	1,23Ab	1,46Ab	0,89Bc	0,74Cc	1,84Aa
CV: 10,86	Clone 02	1,04Bb	1,10Aab	0,63Cc	1,35Aab	1,37Ba	1,38Ba
-	Clone 153	0,70Cc	0,98Abc	0,96Bbc	1,23Ab	2,75Aa	0,32Cd
<b>PI</b>	Catucaí	0,55ABab	0,47Bb	0,59Bab	0,47Cb	0,55Bab	0,65Aa
CV: 11,34	Clone 02	0,68Abc	0,89Aa	0,51Bc	1,02Aa	0,65ABcb	0,69Ab
-	Clone 153	0,41Bc	0,34Bc	0,92Aa	0,74Bb	0,78Aab	0,47Bc
<b>PA</b>	Catucaí	0,22Ab	0,28Aa	0,08Ac	0,07bc	0,04Ad	0,04Ad
CV: 10,53	Clone 02	0,15Bc	0,24Ba	0,04Bd	0,20Ab	0,04Ad	0,02Ad
-	Clone 153	0,06Cc	0,15Ca	0,06ABc	0,09Bb	0,05Ac	0,04Ac
<b>PE</b>	Catucaí	0,86Bc	1,13Bbc	1,60Ba	0,80Ca	1,21Aabc	1,34Aab
CV: 11,34	Clone 02	1,47Ab	1,42Bb	1,55Bb	2,30Aa	1,60Bb	1,63Ab
-	Clone 153	0,83Bd	3,14Aa	2,41Ab	1,88Bc	2,17Abc	0,89Bd

Médias seguidas por mesma letra maiúscula, na coluna (comparação entre genótipos), e por mesma letra minúscula, na linha (comparação entre temperaturas e dias de recuperação), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = Coeficiente de variação.

Nota: MGDG = monogalactosildiacilglicerol; DGDG = digalactosildiacilglicerol; PC = fosfatidilcolina; PG = fosfatidilglicerol; PI = fosfatidilinositol; PA = ácido fosfatídico; e PE = fosfatidiletanolamina.

Ao verificar a concentração de fosfatidilinositol (PI) observa-se que nos três genótipos a concentração aos 14 dias é igual a do controle. Catucaí torna a



mostrar pequenas variações, não havendo diferenças significativas em relação ao controle ao longo do experimento. Já os clones de Conilon mostram alguma subida do teor de PI. O clone 02 apresenta subidas significativas a 18/13°C e 3x13/4°C (valor máximo), enquanto o clone 153 mostrou subidas significativas entre o fim do período de aclimação e o 7º dia de recuperação (Quadro 2).

As variações de ácido fosfatídico (PA), a classe com menor representatividade, mostrou um decréscimo consistente em Catucaí após o meio do período de aclimação. No clone 02 não houve uma tendência de variação clara, enquanto no clone 153 os valores mantiveram-se sempre baixos. Contudo, pode-se constatar que os menores valores absolutos de PA foram observados durante o período de recuperação nos três genótipos.

No Catucaí as maiores concentrações de ácido fosfatidietanolamina (PE), em comparação ao controle, foram encontrados na temperatura de 13/8°C, mas registra-se uma tendência para apresentar valores superiores ao controle ao longo do experimento, exceto no estresse mais severo. No clone 02 destaca-se o aumento em estresse severo, enquanto que no clone 153, tal como para outras classes, se torna a observar um aumento com a imposição de baixas temperaturas (desde 18/13°C até 3x13/4°C), que permaneceu até ao 7º dia de recuperação, voltando depois aos valores de controle (Quadro 2).

Quanto à composição em ácidos graxos das diferentes classes lipídicas, os valores de C18:3 não apresentaram diferenças significativas entre os genótipos e nos distintos períodos avaliados nas classes MGDG e DGDG (Quadro 3). Contudo, a 3x13/4°C o clone 02 apresentou uma tendência para aumento de C18:3 no DGDG e para decréscimo no MGDG. Já para o C16:0 Catucaí apresentou quase sempre menores valores que os clones de *C. canephora* nas classes MGDG e DGDG até aos 7 dias de recuperação (Quadro 3).

Os 3 genótipos apresentam uma tendência geral para o aumento deste ácido graxo saturado no MGDG ao longo do experimento. No DGDG aumentos significativos de C16:0 foram observados apenas durante o período de recuperação e nos clones de *C. canephora*. Note-se, ainda, que no MGDG a importância relativa de C18:3 é superior à observada no DGDG, observando-se o oposto relativamente a C16:0. Desta forma essas 2 classes de galactolipídios apresentam diferentes níveis de insaturação, mostrando o MGDG maior

insaturação que no DGDG. Deve referir-se que o MGDG apresenta a maior importância relativa de C18:3 entre todas as classes estudadas, seguido pelo DGDG, fazendo dos galactolipídios os lipídios com maior nível de insaturação.

**Quadro 3.** Composição dos ácidos graxos (mol %) dos galactolipídios, monogalactosildiacilglicerol (MGDG) e digalactosildiacilglicerol (DGDG) nas membranas cloroplastidiais de folhas dos genótipos de *Coffea* sp. submetidos a decréscimo gradual de temperatura (25/20°C até 13/8°C), durante 24 dias, 3 ciclos de temperatura de 13/4°C (3x13/4°C) e posterior período de recuperação (Rec) a 25/20°C até 14 dias. Cada valor médio é proveniente de 3 repetições.

-	Genótipo	Temperaturas e dias de recuperação					
		25/20°C	18/13°C	13/8°C	3x13/4°C	7 Rec	14 Rec
<b>MGDG</b>	Catuaí	4,19Bcd	3,54Bd	5,60Bbc	6,66Bab	7,03Bab	8,27Ba
<b>C16:0</b>	Clone 02	6,01Acd	4,45Bd	7,69Ac	15,28Ab	13,44Ab	18,53Aa
CV: 10,05	Clone 153	5,32ABb	8,47Aa	6,59ABab	7,48Ba	6,96Bab	8,12Ba
<b>MGDG</b>	Catuaí	95,81Aa	96,46Aa	94,40Aa	93,34Aa	92,97Aa	91,73Aa
<b>C18:3</b>	Clone 02	93,99Aa	95,55Aa	92,31Aa	84,72Aa	85,45Aa	81,47Aa
CV: 11,07	Clone 153	94,68Aa	91,68Aa	93,41Aa	92,52Aa	93,04Aa	91,88Aa
<b>DGDG</b>	Catuaí	29,01Bab	24,60Bb	29,91ABab	26,50Bab	27,95Bab	34,28Aa
<b>C16:0</b>	Clone 02	30,77Bc	31,52Abc	35,79Aabc	30,27ABc	39,34Aab	40,46Aa
CV: 10,33	Clone 153	34,57Aab	31,27Ab	26,47Bb	34,68Aab	41,98Aa	34,29Aab
<b>DGDG</b>	Catuaí	8,95Ba	9,17Ba	4,77Bb	10,79Aa	10,27Aa	4,75Bb
<b>C18:2</b>	Clone 02	11,71Aa	13,07Aa	8,07Ab	5,61Bb	6,43Bb	7,35Ab
CV: 13,06	Clone 153	8,21Bab	10,44Ba	9,94Aa	5,13Bc	6,58Bbd	5,68ABbc
<b>DGDG</b>	Catuaí	62,04Aa	66,23Aa	65,32Aa	62,71Aa	61,78Aa	60,98Aa
<b>C18:3</b>	Clone 02	57,52Aa	55,40Aa	56,14Aa	64,13Aa	54,23Aa	52,19Aa
CV: 11,16	Clone 153	57,22Aa	58,29Aa	63,59Aa	60,19Aa	51,43Aa	60,03Aa

Médias seguidas por mesma letra maiúscula, na coluna (comparação entre genótipos), e por mesma letra minúscula, na linha (comparação entre temperaturas e dias de recuperação), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = Coeficiente de variação.

Nota: C16:0 = ácido palmítico; C18:2 = ácido linoléico e C18:3 = ácido linolênico.

Relativamente ao valor de C18:2 nos galactolipídios (detectado apenas em DGDG) mostrou decréscimos consistentes a 3x13/4°C e durante a recuperação nos clones 02 e 153, diminuindo, assim, o peso de ácidos graxos insaturados.

Na fosfatidilcolina (PC) a concentração de C16:0 tende a aumentar em todos os genótipos nas temperaturas mais baixas, fato mais evidente no clone

153, que apresenta uma subida contínua durante todo o experimento. Já C18:2 mostrou uma tendência de descida, com variações mais acentuadas em Catucaí e no clone 153. O C18:3 manteve-se quase inalterado em Catucaí e no clone 02 nos deferentes períodos amostrados, mas decresceu significativamente no clone 153, na submissão a  $3 \times 13/4^{\circ}\text{C}$  e no período de recuperação. (Quadro 4). Assim, a PC sofreu um aumento do nível de saturação dos seus ácidos graxos, nos genótipos clone 153 e Catucaí.

No fosfatidilglicerol (PG) observou-se um constante aumento na representatividade do C16:0 em todos os genótipos, atingindo-se subidas de 434% (Catucaí), 90% (clone 153) e 37% (clone 02) após o tratamento de baixas temperaturas. Essas alterações perduraram durante o período de recuperação e apenas retornaram a valores semelhantes ao controle no clone 153 ao fim de 14 dias. Por sua vez o C16:1t mostrou aumentos apenas nos clones de *C. Canephora*, com aumentos máximos de 47% ( $13/8^{\circ}\text{C}$ ) e 35% (7º dia de recuperação) nos clones 02 e 153, respectivamente. Nota-se, contudo, que os níveis (estáveis) observados em Catucaí nunca foram inferiores aos dos outros 2 genótipos (Quadro 4).

No que se refere aos ácidos graxos mais insaturados (C18:2 e C18:3) verificaram-se decréscimos significativos com a imposição gradual de baixas temperaturas, com particular destaque para os mínimos observados no clone 153 (C18:2 no 7º dia de recuperação) e Catucaí (C18:3, após os  $3 \times 13/4^{\circ}\text{C}$ ). Assim, tendo em conta o aumento de C16:0 e os decréscimos de C18:2 e C18:3, constata-se que o nível de insaturação do PG diminuiu, tal como já se observara no PC, mas agora nos 3 genótipos em estudo.

No fosfatidilinositol (PI) observaram-se menos variações na composição quantitativa dos ácidos graxos. O valores de C16:0 mostraram tendência (não-significativa) para aumentar nos 3 genótipos a  $13/8^{\circ}\text{C}$ , mas o clone 153 destaca-se dos restantes no período de recuperação. Os valores de C18:2 mostraram uma certa estabilidade em Catucaí, mas decresceram nos clones de *C. canephora* com a implementação das condições de baixas temperaturas, mantendo valores mais baixos em todo o período de recuperação apenas no clone 153. Por sua vez, o C18:3 não mostrou alterações significativas nos clones 02 e 153 durante a exposição de baixas temperaturas. Contudo, esses valores decresceram no clone

153 no período de recuperação, o mesmo sucedendo a Catucaí que mostrou apenas um máximo a 18/13°C (Quadro 5).

**Quadro 4.** Composição dos ácidos graxos (mol %) dos fosfolipídios fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilglicerol (PG) nas membranas cloroplastidiais de folhas dos genótipos de *Coffea* sp. submetidos a decréscimo gradual de temperatura (25/20°C até 13/8°C), durante 24 dias, 3 ciclos de temperatura de 13/4°C (3x13/4°C) e posterior período de recuperação (Rec) a 25/20°C até 14 dias. Cada valor médio é proveniente de 3 repetições.

-	Genótipo	Temperaturas e dias de recuperação					
		25/20°C	18/13°C	13/8°C	3x13/4°C	7 Rec	14 Rec
<b>PC</b>	Catucaí	54,43ABa	53,76Aa	60,48Aa	61,59Aa	57,24Ba	61,13Ba
<b>C16:0</b>	Clone 02	66,27Aa	64,98Aa	65,77Aa	70,07Aa	60,24ABa	64,83ABa
CV: 10,77	Clone 153	49,45Bc	55,99Abc	63,30Aabc	69,33Aab	71,11Aab	77,11Aa
<b>PC</b>	Catucaí	16,83Ba	16,47Aab	13,15Abc	11,08Ac	13,42Babc	12,43Bc
<b>C18:2</b>	Clone 02	13,84Cb	14,31Ab	12,50Ab	8,13Bc	20,31Aa	15,42Ab
CV: 10,60	Clone 153	21,13Aa	15,23Ab	12,48Abc	11,09Ac	11,76Bbc	11,07Bc
<b>PC</b>	Catucaí	28,74Aa	29,77Aa	26,38Aa	27,33Aa	29,34Aa	26,44Aa
<b>C18:3</b>	Clone 02	19,89Ba	20,70Ba	21,73Aa	21,80ABa	19,45Ba	19,76Ba
CV: 12,02	Clone 153	29,41Aa	28,78Aa	24,23Aab	19,59Bbc	17,12Bcd	11,82Cd
<b>PG</b>	Catucaí	6,57Cd	15,77Bc	34,38Aab	35,11Aab	26,96Bb	38,49Aa
<b>C16:0</b>	Clone 02	29,87Ab	30,34Ab	41,75Aa	41,00Aa	43,91Aa	43,91Aa
CV: 11,20	Clone 153	21,86Bd	31,91Abc	38,70Aab	41,65Aa	44,65Aa	27,66Bcd
<b>PG</b>	Catucaí	47,55Aa	44,40Aa	45,12Aa	44,31Aa	43,89Aa	41,11Aa
<b>C16:1t</b>	Clone 02	33,80Bb	42,17Aab	49,72Aa	41,97Aab	44,92Aab	45,34Aab
CV: 11,17	Clone 153	38,30ABb	39,59Ab	45,00Aab	43,80Aab	51,71Aa	38,37Ab
<b>PG</b>	Catucaí	15,20Bb	18,73Aa	9,71Ade	11,99Acd	13,40Abc	8,55Ae
<b>C18:2</b>	Clone 02	16,48Ba	12,65Bb	4,74Be	9,91Abc	8,00Bcd	5,02Bde
CV: 11,78	Clone 153	19,64Aa	14,18Bb	7,13Bc	7,28Bc	1,92Cd	11,12Ab
<b>PG</b>	Catucaí	25,73Aa	21,09Ab	10,79Acd	8,60Ad	12,48Ac	11,85Bc
<b>C18:3</b>	Clone 02	8,77Ca	9,78Ca	3,80Cc	7,12Aab	3,17Bc	5,73Cbc
CV: 10,59	Clone 153	11,93Bb	14,32Bb	6,22Bc	7,27Ac	1,73Bd	22,85Aa

Médias seguidas por mesma letra maiúscula, na coluna (comparação entre genótipos), e por mesma letra minúscula, na linha (comparação entre temperaturas e dias de recuperação), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = Coeficiente de variação.

Nota: C16:0 = ácido palmítico; C16:1t = *trans*-ácido hexadecenóico; C18:2 = ácido linoléico e C18:3 = ácido linolênico.

O ácido fosfatídico (PA), que é o que menor peso relativo apresenta no conjunto das classes lipídicas, apresenta, em geral, um aumento do nível de saturação. De fato, os valores de C16:0 aumentaram com as baixas temperaturas, mas também já no período de recuperação, onde foram observados os aumentos máximos de 190% (Catucaí), 112% (clone 02) e 86% (clone 153). No que respeita aos ácidos graxos C18:2 e C18:3 observam-se descidas (mais forte no último) em Catucaí.

Os clones de *C. canephora* apresentaram variações opostas quanto a estes ácidos graxos insaturados. Enquanto que no clone 02 se observou uma forte descida com a baixa temperatura no C18:2 e uma variação inversa no C18:3, o clone 153 apresenta subida do C18:2 e decréscimo no C18:3 (Quadro 5).

Por último, no ácido fosfatidiletanolamina (PE), o valor de C16:0 manteve-se praticamente inalterado no Catucaí e clone 02 nas avaliações realizadas em baixas temperaturas, subindo significativamente no último já no período de recuperação. Por sua vez, no clone 153 o valor sobe após 18/13°C, atingindo mesmo o seu máximo aumento (113%) no 14º dia de recuperação. O C18:2 apresentou decréscimos nos 3 genótipos (significativos a partir de 13/8°C), permanecendo com valores inferiores ao controle até o fim do experimento.

Já o C18:3 manteve-se inalterado no clone 153, mas mostrou aumentos em Catucaí (significativo apenas no 7º período de recuperação) e, no clone 02 (significativo apenas a 3x13/4°C), mostrando uma tendência inversa ao observado noutras classes lipídicas para este ácido graxo (Quadro 5).

**Quadro 5.** Composição dos ácidos graxos (mol %) dos fosfolipídios fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA) e fosfatidiletanolamina (PE) nas membranas cloroplastidiais de folhas dos genótipos de *Coffea* sp. submetidos a decréscimo gradual de temperatura (25/20°C até 13/8°C), durante 24 dias, 3 ciclos de temperatura de 13/4°C (3x13/4°C) e posterior período de recuperação (Rec) a 25/20°C até 14 dias. Cada valor médio é proveniente de 3 repetições.

-	Genótipo	Temperaturas e dias de recuperação					
		25/20°C	18/13°C	13/8°C	3x13/4°C	7 Rec	14 Rec
<b>PI</b>	Catuaí	51,55Ab	47,40Ab	61,94Aab	57,51Aab	60,08Bab	64,66Aa
<b>C16:0</b>	Clone 02	51,93Aa	57,78Aa	61,45Aa	60,64Aa	63,01ABa	51,18Ba
CV: 11,24	Clone 153	50,74Ab	56,97Ab	61,27Aab	53,75Ab	73,49Aa	74,17Aa
<b>PI</b>	Catuaí	18,77Ba	16,82Aa	15,67Aa	16,32Aa	14,74Aa	18,18Ba
<b>C18:2</b>	Clone 02	23,68Aa	17,29Ab	13,50Abc	10,50Bc	14,67Abc	21,83Aa
CV: 10,64	Clone 153	22,56Aa	15,68Ab	13,87Ab	14,80Ab	13,96Ab	12,02Cb
<b>PI</b>	Catuaí	29,68Aab	35,78Aa	22,39Acd	26,17Abc	25,19Abc	17,15Bd
<b>C18:3</b>	Clone 02	24,39Aa	24,94Ba	25,05Aa	28,86Aa	22,32Aa	26,98Aa
CV: 10,88	Clone 153	26,70Aa	27,35Ba	24,86Aa	31,45Aa	12,54Bb	13,81Bb
<b>PA</b>	Catuaí	17,58Ad	17,27Bd	39,67Abc	33,39Ac	50,91Aa	48,89Aab
<b>C16:0</b>	Clone 02	22,30Ab	27,32Ab	29,66Bb	24,08Bb	44,44Aa	47,30Aa
CV: 13,42	Clone 153	23,92Ab	24,93Abb	34,13ABb	30,61ABb	43,22Aa	41,66Aa
<b>PA</b>	Catuaí	43,14Aa	37,32Aab	38,04Aab	37,12Aab	14,55Bc	34,07Ab
<b>C18:2</b>	Clone 02	44,59Aa	33,33Ab	28,25Bbc	24,08Bc	22,22Ac	22,44Bc
CV: 10,00	Clone 153	23,92Bc	37,56Aa	28,67Bbc	35,61Aab	24,44Ac	23,34Bc
<b>PA</b>	Catuaí	39,28Bab	45,40Aa	22,29Bde	29,49Bcd	34,55Abc	17,04Be
<b>C18:3</b>	Clone 02	33,11Bbc	39,34Abbc	42,09Ab	51,85Aa	33,33Abc	30,17Ac
CV: 10,63	Clone 153	52,15Aa	37,51Bb	37,20Ab	33,78Bb	32,33Ab	35,01Ab
<b>PE</b>	Catuaí	30,81Aab	30,86Aab	31,48Ba	32,86Aa	22,72Bb	38,91Ba
<b>C16:0</b>	Clone 02	32,08Ab	32,91Ab	34,47ABab	33,72Ab	38,87Aab	42,96ABa
CV: 10,35	Clone 153	22,84Bc	16,07Bc	40,32Aab	35,52Ab	39,41Ab	48,61Aa
<b>PE</b>	Catuaí	33,98Aa	30,31Bab	21,69Ac	21,85Bc	23,59Bcd	21,05Ac
<b>C18:2</b>	Clone 02	36,78Aa	32,52Bab	26,44Abc	21,69Bc	22,89Bc	22,34Ac
CV: 10,42	Clone 153	38,59Ab	48,34Aa	21,77Ad	29,32Ac	30,22Ac	14,16Be
<b>PE</b>	Catuaí	35,21Ab	38,84Ab	46,84Aab	45,29Aab	53,69Aa	40,05Ab
<b>C18:3</b>	Clone 02	31,13Ab	34,57Aab	39,08Aab	44,59ABa	38,25Bab	34,70Aab
CV: 12,55	Clone 153	38,58Aa	35,59Aa	37,92Aa	35,16Ba	30,37Ba	37,23Aa

Médias seguidas por mesma letra maiúscula, na coluna (comparação entre genótipos), e por mesma letra minúscula, na linha (comparação entre temperaturas e dias de recuperação), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = Coeficiente de variação.

Nota: C16:0 = ácido palmítico; C18:1 = ácido oleico; C18:2 = ácido linoléico e C18:3 = ácido linolênico.

## DISCUSSÃO

### Presença de folhas e avaliações visuais

A queda de folhas com sintomas de necrose parcial ou total, principalmente em Catucaí, pode estar relacionada com danos severos provocados durante a exposição aos ciclos de baixas temperaturas, corroborando com Strauss et al. (2007). Baixas temperaturas provocam diminuição da condutividade hidráulica da água (Aroca et al., 2003), podendo ocasionar cristalização e dificultar o transporte da mesma até os tecidos foliares, vindo a surgir lesões e até mesmo a morte dos tecidos ou de toda a folha (Rena, 2000).

No 3º dia de recuperação dos clones de Conilon, principalmente o clone 02, apresentou plantas totalmente murchas, vindo algumas a morrer. Este fato pode estar relacionado com a morte das raízes, uma vez que o sistema radicular, em particular o ápice radicular de mudas de cafeeiro é sensível a baixas temperaturas, apresentando redução acentuada do crescimento, e danos ocasionados pela presença de peroxidase lipídica nas raízes, quando a temperatura é igual ou inferior a 10°C (Alonso et al., 1997; Queiroz et al., 2000). Além disso, Sakai e Larcher (1987) descreveram que em plantas jovens de cafeeiro as raízes são os tecidos mais sensíveis às baixas temperaturas.

Quando a temperatura atinge valores de 3 a 4°C, ou em condições de campo no inverno, as folhas podem sofrer descoloração não uniforme, com maior incidência na margem da lâmina foliar e necroses, podendo em seguida senescer, sendo essas características variáveis de acordo com a espécie e o genótipo do gênero *Coffea* (Bauer et al., 1990; Campos et al., 2003; Ramalho et al., 2003). Esses distúrbios são provocados pela defasagem entre a perda de água por transpiração e a sua absorção radicular e translocação pelo xilema, em consequência da alta viscosidade da água e da menor condutância hidráulica das raízes, ocasionada pela baixa temperatura (Rena, 2000).

A queda de folhas, principalmente por ruptura ao nível da base do pecíolo, logo após a volta de temperaturas adequadas, pode estar associada ao retorno de valores de evapotranspiração similares ao controle, (Fig. 2E) e absorção de água, o que pode ter proporcionado a subida do ácido abscísico até as folhas, hormônio que induz a senescência foliar. Além disso, as células voltaram a apresentar potencial osmótico normalizado, apresentando-se túrgidas,

promovendo a lise da parede e causando, conseqüentemente, senescência das folhas.

De um modo geral, Catucaí apresentou menor impacto das baixas temperaturas positivas no que se refere à queda de folhas, já que mostrou a menor perda de folhas maduras e jovens. Para além disso, mostrou uma tendência para se recuperar através do aumento de folhas novas que à prazo deverão compensar as folhas perdidas. Os genótipos de Conilon foram mais afetados que o Catucaí. O clone 02 foi claramente afetado em ambos os tipos de folhas, não registrando capacidade de recuperação até ao fim do período experimental. O Clone 153 foi afetado em ambos os tipos de folhas, mas mostrou alguma capacidade de produção de novas folhas após o 7º dia de recuperação.

### **Trocas gasosas**

A queda de  $A$  geralmente está associada com a limitação estomática (Tezara et al., 1999). Contudo, no presente trabalho, observou-se um aumento em  $C_i$  com a imposição do estresse (Fig. 2), o que não haverá limitação estomática no processo de assimilação do carbono, pelo que a redução de  $A$  deverá ser uma conseqüência de inibição do metabolismo fotossintético (Allen e Ort, 2001). Esse fato pode ser reforçado ao verificar valores negativos e próximos de zero de  $A$ , enquanto no mesmo período avaliado,  $g_s$  apresentou valores sempre superiores a 21% em relação ao controle e a  $C_i$  apresentou aumento superior a 82%. Dessa forma, a queda da  $A$  pode estar associada com limitações no transporte de elétrons, menor atividade da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) e/ou problemas de funcionamento das estruturas tilacoidais (Ramalho et al., 2003), sendo mais acentuada no clone 02.

De fato, sob condições de estresse, a absorção de energia fotoquímica pode exceder o seu consumo na assimilação do carbono, ocorrendo aumento da produção de moléculas altamente reativas de clorofila ( $^3chl$ ) e formas reativas de oxigênio ( $^1O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^*$ ), o que, por sua vez, pode afetar todos os componentes do aparelho fotossintético (Mittler, 2002; Hideg et al., 2007; Suzuki et al., 2008; Zhu et al., 2008). Tal pode ocorrer em presença de alta irradiância ou mesmo em condições de irradiância moderada quando em presença de fatores que diminuam a eficiência do uso de energia pelo processo fotossintético (Foyer et al., 1994; Demmig-Adams et al., 1995; Ramalho et al., 1998, 2003; Lima et al.,



2002; Campos et al., 2003). Este fato pode ter ocorrido nesse trabalho, pois ao submeter a plantas a condições de baixas temperaturas, resultou numa menor taxa fotossintética líquida e aumento da concentração interna de CO<sub>2</sub> em comparação às condições de controle (Figura 2).

Relativamente à comparação entre os 3 genótipos em estudo, pode-se ver que todos foram afetados durante a imposição das baixas temperaturas, com efeitos claros já a 21/16°C. Contudo, os efeitos foram mais severos e/ou a capacidade de recuperação foi menor nos genótipos Conilon, que ao fim de 14 dias de recuperação mostravam taxas a rondar os 50 (clone 02) e 75% (clone 153) dos seus controles. Por essa altura, Catucaí recuperou totalmente o valor de A, mas as diferenças face aos clones 02 e 153 foram visíveis já ao 7º dia de recuperação.

### **Alterações qualitativas e quantitativas dos ácidos graxos e classes lipídicas**

Concentrações de AGT da mesma ordem de grandeza aos apresentados na Fig. 4 para os 3 genótipos em estudo foram também encontrados por Campos et al. (2003) em *Coffea* sp. O Conilon clone 153 apresentou maiores valores de AGT em relação aos outros 2 genótipos na temperatura de 13/8°C e aos 7 dias de recuperação, quando apresentou aumentos de 84% e 96%, respectivamente, indicando aumento na síntese de lipídios. Essa resposta pode constituir uma vantagem na aclimação e manutenção das membranas quando sujeitas a baixas temperaturas, pois permitirá às plantas reparar estruturas danificadas e, eventualmente, promover alterações qualitativas ao nível da composição lipídica membranar (Campos et al., 2003). De fato, após os ciclos a 13/4°C observou-se uma redução do teor de lipídios cloroplastidiais (diminuição dos AGT), logo seguida de novo aumento aos 7 dias de recuperação, o que sugere que a degradação de lipídios foi reversível. Este genótipo apresentava os valores mais baixos no controle, situação que se inverteu no final da recuperação (14 dias).

No Conilon clone 02 também se observou um aumento de 25,3% de AGT, mas em condições de temperaturas mais baixas (3x13/4°C), o que poderá indicar alguma capacidade de adaptação do metabolismo lipídico a baixas temperaturas. Apesar deste fato, o clone 02 foi o que apresentou valores mais baixos após 14 dias de recuperação, ficando muito aquém do controle (57,6% do controle).

Já o IPR 102 mostrou variações não significativas ao longo de todo o experimento, o que, tendo em conta a rápida recuperação da taxa de fotossíntese após o final do estresse, sugere que este genótipo foi menos afetado ao nível dos componentes lipídicos membranares, não necessitando assim de aumentar a sua síntese lipídica.

O fato de o Catucaí IPR 102 apresentar maior grau de insaturação dos lipídios (DBI) na temperatura de 18/13°C em comparação aos outros genótipos e aos distintos períodos no mesmo genótipo, está relacionada, principalmente, com a tendência de aumento de ácido linolénico (C18:3) e de queda do ácido palmítico (C16:0) nessa temperatura, corroborando com Kodama et al. (1995) ao estudar *Nicotiana tabacum* sensível e tolerante a baixas temperaturas. Tal comportamento condiciona aumento da fluidez das membranas (Routaboul et al. 2000; Campos et al., 2003), o que permite preservar os processos fotossintéticos, conferindo uma maior tolerância a baixas temperaturas (Kodama et al., 1995; Campos et al., 2003). Este fato ocorre principalmente quando as plantas são submetidas a quedas graduais de temperatura, o que favorece a adaptação a baixas temperaturas (Zhang et al., 2006). No entanto, para as restantes temperaturas O DBI volta a mostrar valores que não diferem significativamente do controle, indicando uma estabilidade do grau de insaturação (Quadro 1), como já se havia observado para o valor de AGT.

Já os 2 genótipos de Conilon mostram maiores decréscimos percentuais ao longo do experimento, principalmente devido ao decréscimo de C18:2 e C18:3 e aumento de C16:0, revelando alterações qualitativas nas suas membranas cloroplastidiais, principalmente no clone 153. No clone 02, mas não no 153, observou-se que com a imposição de baixas temperaturas as folhas ficaram amarelas, havendo decréscimo do teor de pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores (dados não apresentados). Nesse caso, poderemos estar face a um processo de “*photobleaching*”, devido a um provável ataque de ROS. Tal poderá também ter sucedido relativamente às duplas ligações do C18:3. Este dano ao nível da estrutura membranares e do aparelho fotossintético poderia então contribuir para a baixa recuperação da taxa de fotossíntese neste genótipo, isso apesar do total de AGT no clone 02 só ser inferior ao controlo nos 14 dias.

Por sua vez, DaMatta et al. (2002) relataram que o cafeeiro possui habilidade de aumentar o mecanismo antioxidante quando submetido a estresse.

Contudo, Lima et al. (2002) descrevem que a tolerância pode estar relacionada à menor produção de moléculas reativas de oxigênio e comporta-se diferente conforme o genótipo de *C. canephora* estudado em condições de déficit hídrico. Desta forma, tanto o clone 153 como o IPR 102 poderão ter outros mecanismos de proteção (diminuindo a produção ou aumentando a capacidade de remoção) contra moléculas altamente reativas (de clorofila e oxigênio), já que os níveis de insaturação (e de C18:3) não diferem significativamente entre os 3 genótipos estudados. De fato, de acordo com Nouairi et al. (2006), ao estudar *Brassica napus* tratadas com cádmio, a perda dos lipídios na membrana pode estar relacionada ao reforço da taxa de catabolismo e/ou supressão de biossíntese de lipídios e também a oxidação de lipídios polinsaturados, sugerindo que a tolerância pode estar relacionada a mecanismos que retardam a degradação das membranas e reduzem a acumulação de moléculas reativas (Dewir et al., 2006).

O ácido *trans*-hexadecenóico (C16:1*t*), apesar de ter valores semelhantes aos outros genótipos quando se analisa a distribuição entre os vários ácidos graxos (Quadro 1), mostrou maior representatividade nos ácidos graxos apenas do fosfatidilglicerol (PG) em Catucaí em comparação ao clone 02 na condição de controle. Durante o experimento o valor de C16:1*t* acaba por ser algo reforçado em algumas das temperaturas baixas nos genótipos de Conilon, mantendo-se estável no Catucaí (Quadro 4). Esse ácido graxo encontra-se concentrado nas grana tilacoidais (Danielsson et al., 2004) e a sua quantidade no PG está correlacionada positivamente com a oligomerização do complexo captador de luz dos cloroplastos (Huner et al., 1989; Dubertret et al., 2002). Ele contribui para a estabilização dos complexos de captação de luz e manutenção da eficiência fotoquímica e bioquímica da fotossíntese (Gray et al., 2005; Tavares et al., 1998), nomeadamente quando as plantas são submetidas a baixas temperaturas (Harwood, 1997; Campos et al., 2003),

Conforme relatado por Sato et al. (2004) e Yang et al. (2005), existe interação entre o PG e o fotossistema (PS) I, uma vez que o PG contribui para a estabilização do complexo PSI e influência na organização molecular dos pigmentos e proteínas. De fato, apesar da sua pequena contribuição para o total dos lipídios membranares, o decréscimo do teor de PG leva à alteração da macroorganização dos complexos fotossintéticos, nomeadamente pela alteração da carga elétrica superficial das membranas, afetando a organização molecular e

a funcionalidade dos PS I e II (e dos centros de reação), levando à queda da eficiência fotoquímica (Apostolova et al., 2008).

Em Catucaí, a maior concentração de C18:3 no PG do controle até à temperatura de 13/8°C e em todo o período de recuperação, assim como de ácido linoléico (C18:2) em algumas das temperaturas estudadas, relativamente aos clones de Conilon, sugere maior fluidez em baixas temperaturas positivas neste importante lipídio cloroplastidial. O aumento de C18:3 e de C16:1 foi encontrado por Xu e Siegenthaler (1997) ao estudar *Cucurbita moschata* submetidas à queda de temperatura, e por Liao et al. (2004) ao trabalhar com *Dioscorea zingiberensis* submetidas à alta irradiância, sugerido que estes efeitos estariam associados com adaptação a condições adversas.

No que se refere à concentração de C18:2 (Quadro 1), observou-se a manutenção do seu valor no Catucaí até à temperatura de 13/8°C, enquanto, no clone 02 houve queda significativa já a 18/13°C e, no clone 153, na temperatura de 13/8°C, reforçando a indicação de que os clones de Conilon apresentaram maior variação no grau de insaturação e, por isso, uma maior variação na fluidez membranar (que assim desce). Por outro lado, a perda de certo grau de fluidez das membranas, inerente ao aumento da saturação lipídica, que se observou no Catucaí e clones de Conilon ao longo do tratamento de baixa temperatura, a partir dos 13/8°C, pode corresponder a uma maior estabilidade membranar e reduzir a susceptibilidade à peroxidação e ação de enzimas hidrolíticas, já que as duplas ligações dos ácidos graxos polinsaturados são o substrato preferencial para enzimas peroxidativas e hidrolíticas, assim como para o ataque de ROS (Ramalho et al., 1998; Sahseh et al., 1998; Campos et al., 2003). Desta forma, a planta terá que encontrar um ponto de equilíbrio entre as alterações que causam uma menor sensibilidade ao ataque por ROS (decréscimo da insaturação de ácidos graxos) e outras tendentes a manter a fluidez membranar a baixas temperaturas (aumento da insaturação dos ácidos graxos).

No que respeita à classe lipídica mais representada, os galactolípídios, o MGDG e DGDG são os principais componentes lipídicos (até cerca de 60%) dos tilacóides (Harwood, 1988), pelo que alterações nas suas proporções pode levar a alterações estruturais e funcionais nas membranas, com implicação na tolerância ao frio (Harwood, 1997; Xin e Browse, 2000). Nos génotipos em estudo, MGDG e DGDG representam entre 75 e 85% dos lipídios, o que mostra bem a sua

importância. Os valores de MGDG e DGDG apresentaram aumentos a 18/13°C (Quadro 2), à semelhança de *C. canephora* Aipoatã submetido a decréscimo de temperatura gradual de 25/20°C a 15/10°C (Campos et al., 2003). Contudo, o MGDG acaba por ser mais afetado (decrece) durante o estresse mais severo ou já no período de recuperação, enquanto o DGDG não registra decréscimos em Catucaí e apresenta alguns aumentos nos clones de Conilon. Esse aumento (preferencial) é também observado por Campos et al. (2003) em *C. arabica* Catuaí e Piatã.

De fato, em condições de baixas temperaturas, observou-se em diversas plantas que a relação (MGDG/DGDG) tende a decrescer, o que poderá estar relacionado com o fato de o DGDG tender a manter a estrutura membranar em bicamada, aumentando, assim, a estabilidade das membranas cloroplastidiais (Navari-Izzo et al., 1995). No entanto, o MGDG é também imprescindível, pois está mais implicado em domínios membranares relacionados com processos dinâmicos, mas relacionado igualmente com a formação não-lamelar de membranas (Hurry et al., 2000; Iba, 2002; Karpinsky et al., 2002), estando igualmente implicado na regulação supramolecular das estruturas do PSII e na eficiência de transferência de energia entre os complexos de captação de energia luminosa e os centros de reação, especialmente com níveis altos de insaturação (Horváth et al., 1987).

Contudo, se observamos algumas diferenças quantitativas nos teores de galactolipídios, já o seu grau de insaturação parece não ser afetado. De fato, o C18:3 no MGDG (onde representa sempre acima de 80 dos ácidos graxos) e no DGDG (onde representa entre 52 e 66% do total de ácidos graxos) não apresentou diferenças entre os genótipos e nos distintos períodos avaliados (Quadro 3), corroborando os resultados obtidos por Campos et al. (2003) nos resultados encontrados no *C. arabica* Icatu e *C. dewevrei*.

Como já foi referido, as restantes classes lipídicas têm um peso muito inferior ao MGDG e DGDG, mas não deixam de ter importante papel ao nível da estrutura e funcionalidade das membranas cloroplastidiais (como já se discutiu a propósito do PG). O aumento de PC com a queda de temperatura foi já referido em trabalhos com outras espécies (Harwood, 1997; Bohn et al., 2007), sendo observada no clone 153 entre 13/8°C e o 7º dia de recuperação e no clone 02 no estresse mais severo e no 7º dia de recuperação (Quadro 2). Contudo a ausência

de aumento foi já observada em genótipos de *Coffea* sp. (Campos et al., 2003) tal como sucede aqui para Catucaí. Segundo Rozentsvet et al. (2005), quando a planta apresenta oxidação, PE pode ser substituído por PC que é mais resistente a oxidação. O PC e PE são os principais fosfolipídios da plasmalema e de mitocôndrias (Simon, 1974). Valores mais elevados indicam certo grau de reparação na membrana (Harwood, 1997).

Também foi possível observar que o ácido fosfatídico (PA) subiu nos três genótipos na temperatura de 18/13°C, bem como o PE no clone 153 e o PI no clone 02 (Quadro 2), à semelhança do que foi observado por Uemura et al. (1995), ao trabalhar com *Arabidopsis thaliana* submetidas a temperaturas de 2°C. De acordo com Bohn et al. (2007), o aumento de PE em plantas de *Triticum aestivum* submetidas a baixas temperaturas pode proporcionar tolerância a baixas temperaturas positivas, o que sucede em Catucaí, que apresenta aumento significativo a 13/8°C e, excetuando o estresse mais severo, apresenta valores, conseqüentemente, superiores ao controle (entre 31 a 86%) ou no clone 153 com valores superiores ao controle entre 18/13°C e o 7º dia de recuperação.

Para o fosfatidilinositol (PI), a quantidade de C16:0 foi maior nos três genótipos, bem como o C18:3 foi maior no fosfatidiletanolamina (PE) (Quadro 5), corroborando com resultados apresentados por Bohn et al. (2007). Os ácidos graxos presentes em PE e PI apresentaram valores semelhantes entre os genótipos em vários períodos avaliados, fato também encontrado por Kodama et al. (1995) ao estudar plantas de *N. tabacum* sensível e tolerantes a baixas temperaturas, dificultando inferir o grau de tolerância entre os materiais estudados, baseado em PI e PE.

## CONCLUSÕES

O Conilon clone 02 foi o genótipo mais afetado, apresentando maior queda de folhas e menor recuperação da fotossíntese líquida, seguido pelo clone

153. A queda da fotossíntese líquida ocorreu em todos os genótipos estudados e não estará relacionada ao fechamento estomático, mas sim associada a problemas de funcionamento da estrutura membranar dos cloroplastos.

Apesar de os 3 genótipos serem significativamente afetados pelas baixas temperaturas positivas, o Catucaí IPR 102 mostrou uma maior capacidade de recuperação.

O Catucaí IPR 102 apresentou maior grau de insaturação de lípidios, na temperatura de 18/13°C, e maior concentração de ácido linolênico no fosfatidilglicerol no controle até a temperatura de 13/8°C, em comparação aos clones de Conilon, apresentando maior fluidez membranar em baixas temperaturas positivas.

Diferenças na quantidade e qualidade dos ácidos graxos cloroplastidiais, conjugados com a avaliação de queda de folhas e taxa fotossintética, contribuem no manejo e na escolha de genótipos mais adequados para áreas sujeitas a períodos de baixas temperaturas e podem ser ferramentas no processo de melhoramento do gênero *Coffea*.

## **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa “Sanduíche”. Ao Instituto de Investigação Científica Tropical - IICT e Instituto Nacional de Recursos Biológicos – INRB, pela estrutura de Laboratório. À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, pela oportunidade de realizar o doutorado. À Fundação para a Ciência e a Tecnologia – FCT, através dos projetos POCTI/AGG/43101/2001 e PTDC/AGR-AAM/64078/2006, co-financiados pelo fundo europeu FEDER, pelo financiamento da pesquisa.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Allen, C. F., Good, P., Davis, H. F., Crisum, P., Fowler, S. D. (1966) Methodology for the separation of plant lipids and application in spinach leaf and chloroplast lamellae. *Journal Am. Oil Chemist's Soc.*, 43: 223-231.
- Allen, D. J., Ort, D. R. (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science*, 6: 36-42.
- Alonso, A., Queiroz, C. S., Magalhães, A. C. (1997) Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1323: 75-84.
- Amaral, J. A. T., Rena, A. B., Amaral, J. F. T. (2006) Crescimento vegetativo sazonal do cafeeiro e sua relação com fotoperíodo, frutificação, resistência estomática e fotossíntese. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41: 377-384.
- Apostolova, E. L., Domonkos, I., Dobrikova, a. G., Sallai, A., Bogos, B., Wada, H., Gombos, Z., Taneva, S. G. (2008) Effect of phosphatidylglycerol depletion on the surface electric properties and the fluorescence emission of thylakoid membranes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 91: 51-57.
- Aroca, R., Vernieri, P., Irigoyen, J. J., Sánchez-Díaz, M., Tognoni, F., Pardossi, A. (2003) Involvement of abscisic acid in leaf and root of maize (*Zea mays* L.) in avoiding chilling-induced water stress. *Plant Science*, 165: 671-679.
- Barros, R. S., Maestri, M. (1974) Influência dos fatores climáticos sobre a periodicidade de crescimento vegetativo do café (*Coffea arabica* L.). *Revista Ceres*, 21: 268-279.
- Barros, R. S., Mota, J. W. S., DaMatta, F. M., Maestri, M. (1997) Decline of vegetative growth in *Coffea arabica* L. in relation to leaf temperature, water potential and stomatal conductance. *Field Crops Research*, 54: 65-72.
- Bauer, H., Comploj, A., Bodner, M. (1990) Susceptibility to chilling of some central-African cultivars of *Coffea arabica*. *Field Crops Research*, 24: 119-129.
- Bohn, M., Lüthje, S., Sperling, P., Heinz, E., Dörffling, K. (2007) Plasma membrane lipid alterations induced by cold acclimation and abscisic acid treatment of winter wheat seedlings differing in frost resistance. *Journal of Plant Physiology*, 164: 146-156.
- Bragança, S. M., Carvalho, C. H. S. de, Fonseca, A. F. A da, Ferrão, R. G. (2001) Variedades clonais de café Conilon para o Estado do Espírito Santo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36: 765-770.
- Campos, P., Pham-Thi, A.T. (1995) Effects of drought stress on enzymatic breakdown of galactolipids in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) leaves. *In: J. C.*



- Kader, P. Mazliak (Eds.), *Plant Lipid Metabolism*, Kluwer, Dordrecht, ISBN 0 7923 3250 4, p. 426-428.
- Campos, P. S., Quartin, V., Ramalho, J. C., Nunes, M. A. (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. *Plants. Journal of Plant Physiology*, 160: 283-292.
- Campos, P. S., Silva, J. V. da, Pham Thi, A. T. (1999) Effect of water stress on membrane integrity and enzymatic breakdown of galactolipids in *Vigna* sp. *Agronomia Lusitana*, 47: 185-196.
- Conab, Companhia Nacional de Abastecimento (2007) Primeiro levantamento de café 2007/2008. Acesso em: 15 de Fevereiro de 2007. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3BoletimCafe.pdf>.
- DaMatta, F. M., Loos, R. A., Silva, E. A., Loureiro, M. E. (2002) Limitation to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *Journal of Plant Physiology*, 159: 975-981.
- DaMatta, F. M., Maestri, M., Mosquim, P. R., Barros, R. S. (1997) Photosynthesis in coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) as affected by winter and summer conditions. *Plant Science*, 128: 43-50.
- Danielsson, R., Albertsson, P. A., Mamedov, F., Styring, S. (2004) Quantification of photosystem I and II in different parts of the thylakoid membrane from spinach. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1608: 53-61.
- Davis, A. P., Govaerts, R., Bridson, D. M., Stoffelen, P. (2006) An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (*Rubiaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.152: 465-512.
- Demmig-Adams, B., Adams, W. W., Barry, A. L., Verhoeven, A. S. (1995) Xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and flexible photosystem II efficiency in plants acclimated to light stress. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 249-260.
- Dewir, Y. H., Chakrabarty, D., Ali, M. B., Hahn, E. J., Paek, K. Y. (2006) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. *Environmental and Experimental Botany*, 58: 93-99.
- Dubertret, G., Gerard-Hirne, C., Trémolières, A. (2002) Importance of *trans*- $\Delta^3$ -hexadecenoic acid containing phosphatidylglycerol in the formation of the trimeric light-harvesting complex in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 829-836.
- Ferrari-Iliou, R., Pham-Thi, A.T., Mazliak, P., Vieira da Silva, J. (1992) Effets de la peroxydation des lipides membranaires sur la physiologie des végétaux, *Année Biologique*, 31: 1-23.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.J. (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiology Plantarum*, 92: 696-717.

- Gray, G. R., Ivanov, A. G., Krol, M., Williams, J. P., Kahn, M. U., Myscich, E. G., Huner, N. P. A. (2005). Temperature and light modulate the *trans*- $\Delta^3$ -hexadecenoic acid content of phosphatidylglycerol: light-harvesting complex II organization and non-photochemical quenching. *Plant and Cell Physiology*, 46: 1272-1282.
- Harwood, J. L. (1997) Plant lipid metabolism. In: Dey, P. M., Harborne, J. B. (eds) *Plant Biochemistry*. Academic Press, San Diego, p 237-271.
- Hideg, E., Kós, P. B., Vass, I. (2007) Photosystem II damage induced by chemically generated singlet oxygen in tobacco leaves. *Physiologia Plantarum*, 131: 33-40.
- Hund, A., Fracheboud, Y., Soldati, A., Stamp, P. (2008) Cold tolerance of maize seedlings as determined by root morphology and photosynthetic traits. *European Journal of Agronomy*, 28: 178-185.
- Huner, N., Williams, J. P., Maissan, E. E., Myscich, E. G., Krol, M., Laroche, A., Singh, J. (1989) Low temperature-induced decrease in *trans*- $\Delta^3$ -hexadecenoic acid content is correlated with freezing tolerance in cereals. *Plant Physiology*, 89: 144-150.
- Hurry, V., Huner, N., Selstam, E., Gardeström, P., Öquist, G. (2000) Photosynthesis at low growth temperatures. In: Raghavendra A.S. (Ed.) *Photosynthesis. A comprehensive treatise*. Cambridge, University Press, p. 238-249.
- Iba I. (2002) Acclimation response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 225-245.
- ICO, International Coffee Organization. *Trade statistics*. Disponível em: [http://www.ico.org/coffee\\_prices.asp](http://www.ico.org/coffee_prices.asp). Acesso em: 21 de fevereiro de 2008.
- Kaniuga, Z. (2007) Chilling response of plants: importance of galactolipase, free fatty acids and free radicals. *Plant Biology*, 10: 171-184.
- Karpinski, S., Wingsle, G., Karpinska, B., Hällgren J.-E. (2002) Low-temperature stress and antioxidant defense mechanisms in higher plants. In: Inzé D. & Van Montagu M. (eds), *Oxidative Stress in Plants*, Taylor & Francis, Londres, Inglaterra. pp. 69-103.
- Kodama, H., Horiguchi, G., Nishiuchi, T., Nishimura, M., Iba, K. (1995) Fatty acid desaturation during chilling acclimation is one of the factors involved in conferring low-temperature tolerance to young tobacco leaves. *Plant Physiology*, 107: 1177-1185.
- Lepage, M (1967) Identification and composition of turnip root lipids. *Lipids*, 2: 244-250.

- Libardi, V. C. M., Amaral, J. A. T., Amaral, J. F. T. (1998) Crescimento vegetativo sazonal do cafeeiro (*Coffea canephora* Pierre var. Conilon) no sul do Estado do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, 6: 23-28.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350-382.
- Liao, F. Y., Li, H. M., He, P. (2004) Effect of high irradiance and high temperature on chloroplast composition and structure of *Dioscorea zingiberensis*. *Photosynthetica*, 42: 487-492.
- Lima, A. L. S., DaMatta, F. M., Pinheiro, A. H., Totola, M. R., Loureiro, M. E. (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 47: 239-247.
- Mangold, H. K (1961) Thin layer chromatography of lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 38: 708-727.
- Mazliak, P. (1983) Plant membrane lipids: changes and alterations during aging and senescence. In: Lieberman, M. (ed.): *Postharvest Physiology and Crop Preservation*. New York: Plenum Press, pg. 123-140.
- Metcalfe, I. D., Schmitz, A. A., Pelka, J. R. (1966) Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis, *Analytical Chemistry*, 38: 514-515.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405-410.
- Mota, J. W. S., DaMata, F. M., Barros, R. S., Maestri, M. (1997) Vegetative growth in *Coffea arabica* L. as affected by irrigation, daylength and fruiting. *Tropical Ecology*, 38: 73-79.
- Navari-Izzo, F., Ricci, F., Vazzana, C., Quartacci, M. (1995) Unusual composition of thylakoid membranes of the resurrection plant *Boea hygroskopica*: changes in lipids upon dehydration and rehydration. *Plant Physiology*, 94: 135-142.
- Nazareno, R. B., Oliveira, C. A. S., Sanzonowicz, C., Sampaio, J. B. R., Silva, J. C. P., Guerra, A. F. (2003) Crescimento inicial do cafeeiro Rubi em respostas a doses de nitrogênio fósforo e potássio e a regime hídricos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 903-910.
- Nouairi, I., Ammar, W. B., Youssef, N. B., Daoud, D. B. M., Ghorbal, M. H., Zarrouk, M. (2006) Comparative study of cadmium effects on membrane lipid composition of *Brassica juncea* and *Brassica napus* leaves. *Plant Science*, 170: 511-519.
- Oliveira, J. G., Alves, P. L. C. A., Magalhães, A. C. (2002) The effect of chilling on the photosynthetic activity in coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. The proactive action of chloroplastid pigments. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14: 95-104.

- Queiroz, C. G. S., Mares-Guia, M. L., Magalhães, A. C. (2000) Microcalorimetric evaluation of metabolic heat rates in coffee (*Coffea arabica* L.) roots of seedlings subjected to chilling stress. *Thermochimica Acta*, 351: 33-37.
- Ramalho, J. C., Campos, P. S., Teixeira, M., Nunes, M. A. (1998) Nitrogen dependent changes in antioxidant system and in fatty acid composition of chloroplast membranes from *Coffea arabica* L. plants submitted to high irradiance. *Plant Science*, 135: 115-124.
- Ramalho, J. C., Marques, N. C., Semedo, J. N., Matos M. C., Quartin, V. L. (2002) Photosynthetic performance and pigment composition of leaves from two tropical species is determined by light quality. *Plant Biology*, 4: 112-120.
- Ramalho, J. C., Quartin, V. L., Leitão, E., Campos, P. S., Carelli, M. L. C., Fahl, J. I., Nunes, M. A. (2003) Cold acclimation ability and photosynthesis among species of the tropical *Coffea* genus. *Plant Biology*, 5: 631-641.
- Rena, A. B. (2000) *Conseqüências fisiológicas das baixas temperaturas no cafeeiro*. Circular Técnica. Lavras: EPAMIG/CRSM, 2000, n.99.
- Routaboul, J. M., Fischer, S., Browse, J. (2000) Trienoic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperature. *Plant Physiology*, 124: 1697-1705.
- Rozentsvet, O. A., Murzaeva, S. V., Gushchina, I. A. (2005) The role of membrane lipids in the resistance of clasping-leaved pondweed (*Potamogeton perfoliatus* L.) to excess of cadmium in water. *Biology Bulletin*, 32: 188-195.
- Sahsah, Y., Campos, P., Gareil, M., Zuily-Fodil, Y., Pham Thi, A. T. (1998) Enzymatic degradation of polar lipids in *Vigna unguiculata* leaves and influence of drought stress. *Plant Physiology*, 104: 577-586.
- Sakai, A., Larcher, W. (1987) *Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress*. Springer-Verlag, Berlin, 321p.
- Sato, N., Suda, K., Tsuzuki, M. (2004) Responsibility of phosphatidylglycerol for biogenesis of the PSI complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1658: 235- 243.
- Sera, G. H., Sera, S., Ito, D. S., Azevedo, J. A. de, Ribeiro Filho, C., Mata, J. S. da (2007) Partial resistance to fruit necrosis associated to *Colletotrichum* spp. among Arabic Coffee genotypes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50: 395-402.
- Silva, E. A., DaMatta, F. M., Ducatti, C., Regazzi, A. J., Barros, R. S. (2004) Seasonal changes in vegetative growth and photosynthesis of Arabica coffee trees. *Field Crops Research*, 89: 349-357.
- Simon, E. W. (1974) Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytologist*, 73: 377-420.

- Smirnoff, N. (1995) Antioxidant systems and plant response to the environment, In: N. Smirnoff (Ed.), *Environment and Plant Metabolism-Flexibility and Acclimation*, p. 217-243, Bios Scientific, Oxford, ISBN 1 872748 93 7.
- Strauss, A. j., Krüger, G. H. J., Strasser, R. J., van Heerden, P. D. R. (2007) The role of low soil temperature in the inhibition of growth and PSII function during dark chilling in soybean genotypes of contrasting tolerance. *Physiologia Plantarum*, 131: 89-105.
- Suzuki, K., Nagasuga, K., Okada, M. (2008) The chilling injury induced by high root temperature in the leaves of rice seedlings. *Plant Cell Physiology*, 49: 433-442.
- Tavares, R. M., Morais, F., Melo, N., Pais, M. S. S. (1998) Thylakoid membrane reorganization during *Zantedeschia aethiopica* spathe regreening: consequence of the absence of  $\Delta^3$ -trans-hexadecenoic acid in photochemical activity. *Phytochemistry*, 47: 979-984.
- Tezara, W., Mitchell, V. J., Driscoll, S. D., Lawlor, D. W. (1999) Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, 401: 914-917.
- Uemura, M., Joseph, R. A., Steponkus, P. L. (1995) Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. *Plant Physiology*, 108: 15-30.
- Wismer, W. V., Worthing, W. M., Yada, R. Y., Marangoni, A. G. (1998) Membrane lipids dynamics and lipid peroxidation in the early stages of low-temperature sweetening in tubers of *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum*, 102: 396-410.
- Xin, Z., Browse, J. (2000) Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell and Environment*, 23: 893-902.
- Xu, Y., Siegenthaler, P. A. (1997) Low temperature treatments induce an increase in the relative content of both linolenic and  $\Delta^3$ -trans-Hexadecenoic acids in thylakoid membrane phosphatidylglycerol of squash cotyledons. *Plant Cell Physiology*, 38: 611-618.
- Yang, Z., Su, X., Wu, F., Gong, Y., Kuang, T. (2005) Effect of phosphatidylglycerol on molecular organization of photosystem I. *Biophysical Chemistry*, 115: 19- 27.
- Zhang, J-H., Liu, Y-P., Pan, Q-H., Zhan, J-C., Wang, X-Q., Huang, W-D. (2006) Changes in membrane-associated H<sup>+</sup>-ATPase activities and amounts in young grape plants during the cross adaptation to temperature stresses. *Plant Science*, 170: 768-777.
- Zhu, S-Q., Zhao, H., Liang, J-S., Ji, B-H., Jiao, D-M. (2008) relationships between phosphatidylglycerol molecular species of thylakoid membrane lipids and sensitivities to chilling-induced photoinhibition in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50: 194-202.

# ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM GENÓTIPOS DE CAFEEIRO (*Coffea* sp.) SUBMETIDOS A BAIXAS TEMPERATURAS POSITIVAS

## RESUMO

Temperaturas baixas positivas afetam diversos componentes fisiológicos e bioquímicos da planta. Contudo, as espécies vegetais apresentam mecanismos de aclimação que conferem maior tolerância ao estresse e uma melhor capacidade de recuperação. O principal objetivo deste trabalho foi caracterizar respostas fisiológicas e bioquímicas de genótipos de *Coffea canephora* e *C. arabica*, submetidos a baixas temperaturas positivas, permitindo elucidar os mecanismos envolvidos na tolerância/sensibilidade ao frio. Plantas com cerca de 1 ano foram colocadas em câmaras de crescimento, onde permaneceram em condições controle a 25/20°C (dia/noite), irradiância 700-900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 380  $\mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ , 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 12h durante cerca de 10 dias. As plantas foram depois submetidas sucessivamente a um decréscimo gradual da temperatura (0,5°C diários), desde 25/20°C até 13/8°C, um ciclo de 3 dias a 13/4°C e 14 dias de recuperação. Durante o experimento foram avaliadas, ao nível foliar, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, algumas atividades

enzimáticas (relacionadas com as vias fotossintética e respiratória), assim como os teores de pigmentos fotossintéticos e de açúcares solúveis. Os genótipos estudados apresentam sensibilidade a baixas temperaturas, mas com tolerância e capacidade de recuperação diferente, o que, conjugado com a análise a outros parâmetros, pode contribuir para uma correta escolha de cultivares e no melhoramento do gênero *Coffea* no que diz respeito à tolerância a baixas temperaturas. Em relação aos genótipos estudados, observou-se que ocorre melhor recuperação do Catucaí IPR 102 em comparação ao Conilon clone 02, o que poderá estar associado, além de outros fatores, à maior taxa de atividade da ribulose-5P cinase (no período de recuperação), rubisco e malato desidrogenase (nos ciclos de baixas temperaturas e no início da recuperação), bem como a maiores concentrações de clorofilas e carotenóides totais (no período de recuperação), zeaxantina e luteína (em praticamente em todos os pontos avaliados). A manutenção de maior grau de funcionalidade poderá assim estar ligada à manutenção da concentração da sacarose, com a imposição de baixas temperaturas. Por razões similares, o Conilon clone 153 apresentou melhor recuperação em comparação ao clone 02, sugerindo que mesmo em diferentes genótipos selecionados a partir de uma mesma cultivar (*C. canephora* cv. Conilon) pode existir variabilidade genética relativamente aos mecanismos de proteção e aclimação a baixas temperaturas. Em termos gerais, o genótipo Catucaí IPR 102 foi o que melhor recuperou (relativamente a diversos parâmetros, mas em particular à taxa de fotossíntese líquida) após o fim do período de estresse mais severo, seguindo-se o clone 153.

**PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHANGES IN COFFEE GENOTYPES  
(*COFFEA* sp.) SUBMITTED TO POSITIVE LOW TEMPERATURES**

**ABSTRACT**

Low positive temperatures affect several plant physiological and biochemical components. However, plants possess acclimation mechanisms that confer increased stress tolerance and better recovery ability. The main objective of the present work was to characterize the physiological and biochemical responses of *Coffea canephora* and *C. arabica* genotypes submitted to low positive temperatures, allowing to elucidate the mechanisms involved in cold tolerance/sensitivity. One year old plants were placed under control conditions of 25/20°C (day/night), irradiance of 700-900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 380  $\mu\text{L de CO}_2 \text{ L}^{-1}$ , 70% relative humidity and a photoperiod of 12 h, for about 10 days. The plants were then and submitted successively to 1) a gradual temperature decrease (0.5°C per day) from 25/20°C to 13/8°C, 2) a 3 day chilling cycle (3 x 13/4°C) and to 3) a recovery period of 14 days. During the experiment were evaluated at leaf level the gas exchanges, fluorescence of chlorophyll a, some enzyme activities (relate to photosynthetic and respiratory pathways), as well as the contents of photosynthetic pigments and soluble sugars. The studied genotypes present cold sensitivity but display differential tolerance and recovery capabilities, what, together with the analysis of other parameters may contribute for a correct selection of genotypes and to the breeding of *Coffea* genus in what concerns cold tolerance. In what concerns the studied genotypes, it observed that Catucaí IPR 102 presents a better recovery in comparison to Conilon clone 02, what might be associated, namely, to the higher activities of ribulose-5P kinase (during the recovery period), rubisco and malate dehydrogenase (during the low temperature cycles and in the beginning of recovery), as well as, due to higher total chlorophyll and carotenoid contents (under recovery), zeaxanthin and lutein (in almost of the



evaluated data points). The maintenance of a higher functional status might be in turn related to the maintenance of sucrose contents during the cold imposition. By the same reasons clone 153 showed a better recovery in relation to clone 02, suggesting that even in genotypes selected from the same cultivar (*C. canephora* cv. Conilon) might exist genetic variability in relation to protection and acclimation mechanisms to low temperatures. In global terms the Catucaí IPR 102 genotype recovery better (concerning several parameters, in particular net photosynthetic rate) after the end of the stressful period, followed by the clone 153.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea* é representado por pelo menos 103 espécies, destacando-se comercialmente *C. arabica* e *C. canephora* (Davis et al., 2006). A produção mundial do café nos últimos anos tem sido superior a 110 milhões de sacas, produzido principalmente nos países considerados em desenvolvimento (ICO, 2008). O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café (*Coffea* sp.), que gera divisas, postos de trabalho e promove o desenvolvimento onde é produzido e/ou processado. Na safra de 2006/2007, a produção brasileira de *C. arabica* foi de 33 milhões de sacas e de *C. canephora* foi de 9,5 milhões, numa área de 2,15 milhões de hectares com 5,67 bilhões de cafeeiros (Conab, 2007), sendo exportados em 2007, 28 milhões de sacas, o que equivale a 65% da produção nacional e, aproximadamente, 29% das exportações mundiais do produto (ICO, 2008).

Para as plantas em geral, temperaturas baixas positivas afetam diversos componentes do processo fotossintético, pois reduzem a condutância estomática, fotossíntese líquida, eficiência fotoquímica do fotossistema II, transporte tilacóidal de elétrons, atividade enzimática e o metabolismo do carbono, alterando ainda a composição e a estrutura dos complexos de pigmentos fotossintéticos (Haldimann, 1998; Allen e Ort, 2001; Maroco et al., 2002; Wang et al., 2006;

Strauss et al., 2007; Hund et al., 2008; Suzuki et al., 2008; Zhu et al., 2008) e a composição lipídica das folhas (Campos et al., 2003; Bohn et al., 2007). Também no gênero *Coffea* estes efeitos foram observados (Oliveira et al., 2002; Silva et al., 2004), com intensidades distintas entre diferentes espécies (Campos et al., 2003; Ramalho et al., 2003; Silva et al., 2004), devido, provavelmente, a características morfo-fisiológicas distintas, como acontece entre as espécies *C. arabica* e *C. canephora* (DaMatta et al., 1997; Carvalho et al. 2001; Ramalho et al., 2003).

O cafeeiro, quando cultivado em latitudes superiores a 15° S, apresenta um decréscimo acentuado na taxa de crescimento nos meses com baixas temperaturas (Barros e Maestri, 1974; Bauer et al., 1990; Barros et al., 1997; Mota et al., 1997; Libardi et al., 1998; Amaral et al., 2001, 2006; Nazareno et al., 2003; Silva et al., 2004), ocasionando queda da produtividade. Para além disso, as baixas temperaturas podem danificar o sistema radicular (Allen e Ort, 2001; Alonso et al., 1997; Queiroz et al., 2000), dificultando também a condutividade hidráulica da água (Aroca et al., 2003), vindo a surgir lesões e até mesmo a morte dos tecidos ou de toda a folha (Rena, 2000).

O estresse oxidativo é um grave problema de ocorrência habitual quando as plantas permanecem em condições ambientais adversas, que provocam uma alteração do equilíbrio entre os processos de captação e utilização da energia luminosa, nomeadamente o défice hídrico, alta irradiância, alta ou baixa temperatura e toxicidade ou deficiência nutricional (Foyer et al., 1994; Demming-Adans et al., 1995; Ramalho et al., 1998, 2003; Lima et al., 2002; Campos et al., 2003; Pinheiro et al., 2004; Praxedes et al., 2006). Dessa forma, quando a absorção de energia fotoquímica pela maquinaria fotossintética excede o consumo exigido na assimilação do carbono, ocorrerá aumento da produção de moléculas altamente reativas de clorofila ( $^3chl$ ), formas reativas de oxigênio (ROS) como  $^1O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^*$ , podendo causar danos, por exemplo, nos fotossistemas, enzimas, estruturas lipídicas e DNA (Mittler, 2002; Hideg et al., 2007; Suzuki et al., 2008; Zhu et al., 2008).

Contudo, as plantas, nomeadamente os cafeeiros, possuem mecanismos de defesa/aclimatação que passam por alterações quantitativas e qualitativas dos lipídios membranares, aumento da atividade de enzimas antioxidantes e pelo aumento da capacidade de dissipação do excesso de energia, que conferem uma maior tolerância a baixas temperaturas e uma melhor recuperação após o fim do

estresse. Tal faz com que a presença desses mecanismos seja fundamental para a implantação e manutenção de uma espécie em uma determinada região, influenciando decisivamente o desempenho e práticas agrícolas, assim como a viabilidade econômica para dada cultura. Assim, essas informações são importantes ferramentas na seleção e no manejo do gênero *Coffea* (Lima et al., 2002; Campos et al., 2003; Ramalho et al., 2003; Pinheiro et al., 2004; Praxedes et al., 2006).

Recentemente, o cultivo de café Conilon em áreas de maior altitude (temperatura baixa positiva), tem crescido. Agricultores e pesquisadores acreditam que o cultivo do Conilon, pode ser mais uma alternativa de cultivo nestas condições, uma vez que a espécie apresenta maior tolerância a condições de estresse biótico e abiótico, apesar de ser mais susceptível a baixas temperaturas em comparação ao café Arábica (DaMatta et al., 1997; Ramalho et al., 2003), podendo, portanto, ser uma alternativa.

A compreensão dos mecanismos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos de resposta do gênero *Coffea*, especificamente as duas principais espécies (*C. arabica* e *C. canephora*), às baixas temperaturas, bem como da posterior recuperação, pode auxiliar no manejo e no processo de seleção de variedades tolerantes a baixas temperaturas. Assim, objetivou-se deste trabalho contribuir para a caracterização das respostas fisiológicas e bioquímicas de dois importantes genótipos de *C. canephora* e um genótipo de *C. arabica*, a baixas temperaturas positivas, permitindo elucidar os mecanismos envolvidos em diferentes suscetibilidade a baixas temperaturas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material Vegetal e Implementação dos Estudos**

Foram utilizados genótipos de plantas de *Coffea canephora* cv. Conilon, clone 02 (de maturação precoce) e clone 153 (de maturação tardia) (Bragança et

al., 2001), e *C. arabica* cv. Catucaí IPR-102 (Sera et al., 2007), com, aproximadamente, 15 meses de idade, desenvolvidas em vasos contendo 3 L de substrato (solo:areia, 4:1 e nutrientes orgânicos e químicos), em casa de vegetação no Centro de Ecofisiologia, Bioquímica e Biotecnologia Vegetal, do Instituto de Investigação Tropical, Oeiras, Portugal.

As plantas foram transferidas para câmaras de crescimento (tipo *walkin*, Fitoclima 10000 EHHF, ARALAB, Portugal), onde permaneceram com irradiância de 700-900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , proporcionada por uma combinação otimizada de lâmpadas fluorescentes de alta frequência, de vapor de sódio e de halogênio (Ramalho et al., 2002), concentração ambiente de  $\text{CO}_2$  (cerca de 380  $\mu\text{L de CO}_2 \text{L}^{-1}$ ), umidade relativa de 70%, fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25/20°C (dia/noite), durante 15-20 dias para aclimação nestas condições consideradas de controle.

As plantas foram então submetidas a um decréscimo gradual da temperatura (0,5°C diários) desde 25/20°C até 13/8°C, durante 24 dias, para permitir a expressão gradual do potencial de aclimação das plantas à baixas temperaturas. Seguidamente, foram submetidas a 3 ciclos consecutivos de 4°C durante a noite e as 4 primeiras horas do dia seguinte, permanecendo a 13°C durante o restante do dia (3 x 13/4°C), sendo elevada posteriormente para 20/15°C no 1º dia e 25/20°C nos seguintes, acompanhando-se a recuperação das plantas até aos 14 dias.

Todas as análises (não destrutivas e destrutivas) foram realizadas em folhas recém maduras em pelo menos seis ocasiões distintas: 25/20°C (controle), 18/13°C (meio do período de aclimação), 13/8°C (final do período de aclimação a baixas temperaturas), 3 x 13/4°C (após os três ciclos de baixa temperatura positiva) e durante o período de recuperação a 25/20°C (em duas ocasiões, 7 e 14 dias após os ciclos de temperaturas mínimas). As análises não destrutivas de trocas gasosas foliares, fluorescência da clorofila *a* e contagem de folhas foram também realizadas nas temperaturas de 21/16°C, durante o período de aclimação e a 25/20°C nos dias 1, 3 e 10 do período de recuperação.

A coleta das folhas para as análises destrutivas foi efetuada no final do período noturno (cerca de 30 min antes das lâmpadas acenderem) e após 2-2:30 min de iluminação (por volta das 9:30 horas). As folhas de 6-8 plantas de cada genótipo foram colhidas, formando amostras compostas, as quais foram utilizadas

em várias determinações efetuadas de imediato (em material fresco) ou, posteriormente, sendo no último caso, congeladas em N<sub>2</sub> líquido e guardadas a -80°C.

### **Trocas gasosas foliares**

As taxas de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A$ ), concentração interna de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ), condutância estomática a vapor de água ( $g_s$ ) e a taxa de transpiração ( $E$ ) foram medidas utilizando um analisador portátil de gás por infravermelho (IRGA), de sistema aberto (CIRAS 1, PP Systems, Inglaterra), sob irradiância de, aproximadamente, 700-800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e cerca de 380  $\mu\text{L de CO}_2 \text{ L}^{-1}$ . Para cada dia de avaliação, ao longo do ensaio, foram feitas medições em 5 plantas por genótipo em cada hora (9:00, 11:00, 13:00, 15:00 e 17:00 h), totalizando 25 medições diárias.

### **Parâmetros de fluorescência da clorofila *a***

Os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* foram determinados simultaneamente com medidas de trocas gasosas foliares e, ainda, no final do período noturno (medidas com as folhas adaptadas à escuridão), utilizando um fluorímetro portátil de amplitude modulada PAM-2000 (H. Walz, Eifeltrich, Alemanha). Nas determinações na escuridão as folhas foram iluminadas com um feixe de luz de baixa irradiância ( $\leq 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), de maneira a assegurar que o aceitador primário do fotossistema II (PSII), a quinona *A* ( $Q_A$ ), se mantivesse oxidada, obtendo-se apenas a fluorescência da clorofila das antenas designada fluorescência basal ou mínima ( $F_o$ ). Em seguida aplicou-se um pulso de luz branca saturante (de aproximadamente 6.000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), durante 0,8 s para obter a emissão de fluorescência máxima ( $F_m$ ), correspondente ao valor da fluorescência emitida quando todos os centros de reação se encontram reduzidos (fechados).

Nas medições realizadas durante o dia, em condições de equilíbrio dinâmico da fotossíntese, as folhas amostradas foram iluminadas com cerca de 540  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz branca, para obter rendimento de fluorescência estável ( $F_s$ ), sobrepondo-se seguidamente pulsos saturantes para obter a fluorescência máxima em condições de iluminação ( $F_m'$ ). Posteriormente, a luz actínica foi

desligada e a iluminação vermelho-distante foi aplicada para medir a fluorescência inicial com os centros de reação abertos ( $F_o$ ).

Cada planta foi analisada 2 vezes, sendo utilizada na análise estatística a média das duas mensurações, que assim usa 5 plantas por genótipo e por horário. A partir das medições descritas, foram calculados a fluorescência variável às escuras ( $F_v = F_m - F_o$ ) e à luz ( $F_v' = F_{m'} - F_o'$ ), a eficiência fotoquímica potencial do PSII [ $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ ] e a eficiência fotoquímica em condições de equilíbrio dinâmico da fotossíntese [ $F_v'/F_{m'} = (F_{m'} - F_o')/F_{m'}$ ] os fatores de amortecimento (*quenching*) fotoquímico [ $q_P = (F_{m'} - F_s)/(F_{m'} - F_o')$ ], e não-fotoquímico [ $q_{NP} = (F_{m'} - F_o')/(F_m - F_o)$ ] e a estimativa da eficiência quântica do transporte linear de elétrons [ $\phi_e = (F_{m'} - F_s)/F_{m'}$ ] (Krupa et al., 1993; Ruban e Horton, 1995; Demmig-Adams et al., 1996; White e Critchley, 1999).

### **Atividade das enzimas do ciclo de Calvin e do metabolismo respiratório**

Na determinação da atividade enzimática foram analisados 4 discos de 0,5 cm<sup>2</sup>, em cada uma das 4 repetições. Os discos foliares foram retirados de 6-8 plantas por genótipo, sendo as amostras prontamente congeladas em N<sub>2</sub> líquido e conservadas à temperatura de -80°C.

Foi efetuada a maceração e homogeneização da amostra num almofariz em ambiente com baixa temperatura (em gelo) e utilizando 100 mg PVPP (antioxidante) e 1 mL de tampão de extração 100 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM β-mercaptoetanol, 2 mM DTT, 1% (v/v) Triton X-100 “complete-protease inhibitor cocktail” 2 (v/v) e 10% (v/v) glicerol. Os estratos foram centrifugados (16.000 g, 20 min, 4°C) e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade de enzimas chaves da fotossíntese e respiração a partir de oxidação do NADH a 340 nm a 21°C, num espectrofotômetro UV-Vis (Bio-Rad Smart – 3.000) (Maroco et al., 1999). As atividades foram calculadas conformes fórmula:

Atividade = [ $\mu\text{mol NADH m}^{-2} \text{ s}^{-1} = \text{OD/segundo} \times (1/6,22) \times (\text{volume total na cuvette/volume de amostra na cuvette})/\text{peso fresco}$ ]. Sendo OD corresponde à densidade ótica obtida e 6,22 é o valor do coeficiente de absorvidade ( $\epsilon_{\text{NADH}}$ ).

### **Enzimas do ciclo de Calvin**

Para a determinação da atividade total da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (rubisco) foi coletado 30  $\mu\text{L}$  do sobrenadante do estrato, sendo acondicionado em cuvetes contendo tampão de medida, tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 15 mM ATP, 0,1 mM NADH, 10 mM fosfo-creatina-cinase, 8 U  $\text{mL}^{-1}$  gliceraldeido-3-fosfato hidrogenase, 10 U  $\text{mL}^{-1}$  fosfogliceraldeido cinase, 12 U  $\text{mL}^{-1}$  creatina fosfocinase. A reação passou por um período de incubação de 20 minutos para depois adicionar 0,6 mM de ribulose bifosfato num volume final de 1 mL (Maroco et al., 1999).

Já na determinação da atividade da Ru5P Kinase utilizou-se tampão água deionizada tampão 100 mM Tris-HCl (pH 8), 8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 40 mM KCl, 20 mM DL-Dithiothreitol (DTT), 5 mM fosfoenolpiruvato cinase (K-PEP), 2 mM NADH, 1 mM ATP, 8 U  $\text{mL}^{-1}$  piruvato cinase, 10 U  $\text{mL}^{-1}$  D-Lactic dehydrogenase (LDH) e 5 U  $\text{mL}^{-1}$  Ru5 fosfoisomerase. Adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  de amostra e a reação foi iniciada com adição de 5 mM ribulose-fosfato num volume total de 1 mL. Para medir a atividade deixou-se a amostra, a incubar por 60 segundos (Maroco et al., 1999).

Os cálculos da atividade da Rubisco e Ru5P cinase foram calculadas conforme a fórmula:

$$\text{Atividade} = [\mu\text{mol NADH m}^{-2} \text{ s}^{-1} = \{\text{OD/segundo} \times (1/6,22) \times \text{volume total na cuvette}\} / (\text{volume de amostra na cuvette} \times 10.000/\text{área})].$$

O método analítico foi realizado conforme o método de Brooks (1986), com algumas modificações específicas para o cafeeiro (Ramalho et al., 1999 e Maroco et al., 1999).

### **Enzimas do metabolismo respiratório**

Na determinação da atividade da enzima piruvato cinase (PK) utilizou-se água desionizada, tampão constituído por 100 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM NADH, 1 mM frutose-1,6-fosfato, 45 mM ADP, 6,3 U  $\text{mL}^{-1}$  de lactato desidrogenase e 40  $\mu\text{L}$  do sobrenadante. A reação foi iniciada com a adição de 1 mM fosfoenolpiruvato (PEP), num volume final de 1 mL.

Para a determinação da atividade da malato desidrogenase (MDH) utilizou-se tampão de medida com 50 mM Tris-HCl (pH 8), 0,1 mM NADH e 20  $\mu\text{L}$  de extrato, sendo a reação iniciada com a adição de 0,4 mM de oxalacetato, completando o volume total de 1 mL (López-Millán et al., 2000).

### **Pigmentos fotossintéticos**

Para determinação dos pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides) foram coletados 4 discos foliares (0,5 cm<sup>2</sup>) para cada uma das 8 repetições. A coleta do material vegetal foi realizada no final da noite e depois de 2-2:30 min de iluminação, sendo imediatamente congelado em nitrogênio líquido e guardado a -80°C. Os discos foliares foram macerados em 2 mL de acetona (85%) a 4°C, após as amostras permanecerem 30 min em gelo, de forma a completar a extração dos pigmentos, sendo então centrifugadas (12.000 g, 10 min, 4°C) e filtradas (filtros de nylon, 0,45 µm).

A quantidade de clorofilas e carotenóides totais foi estimada por espectrofotometria em acetona a 80%, utilizando os coeficientes de Lichtenthaler (1987).

Para a separação, identificação e quantificação dos carotenóides por HPLC (Beckman, System Gold, EUA, com detector de fotodiodos) utilizou-se uma análise de fase reserva, com uma coluna C<sub>18</sub>, 5 µm Spherisorb ODS (250 x 4,6 mm), acoplada a uma pré-coluna do mesmo material. A determinação foi efetuada a 440 nm e a eluição dos pigmentos decorreu a 23-24°C, durante 23 min, com uma taxa de fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>, usando um gradiente otimizado não-linear de 25-100% de acetato de etilo numa solução de acetonitrilo/água (9:1, v/v), contendo 0,1% trietilamina, conforme otimizado para cafeeiro (Ramalho et al., 1997). A seqüência do procedimento foi a seguinte: 0-10,5 min, gradiente linear 25-41% de acetato de etilo; 10,5-20 min, gradiente linear 41-100% de acetato de etilo; 20-23 min, isocrático com 100% de acetato de etilo. A coluna foi então reequilibrada durante 5 min na mistura inicial.

Os carotenóides foram quantificados através do uso de padrões. O estado de deepoxidação [DEPS = (0,5A + Z)/(V + A + Z)] foi calculado envolvendo os componentes do ciclo das xantofilas, anteraxantina (A), violaxantina (V) e zeaxantina (Z), conforme descrito por Schindler et al. (1994).

### **Análise de açúcares solúveis**

O procedimento de análise baseou-se no método de Damesin e Lelarge (2003), com pequenas alterações de otimização para o cafeeiro. Homogeneizou-se, aproximadamente, 100 mg de folha em 2 mL de água pura e fria com PVPP (antioxidante), permanecendo os homogenatos em tubos Eppendorf durante 20



min, a 4°C, com agitação. Em seguida, foi realizada centrifugação (12000 *g*, 5 min, 4°C), transferindo-se o sobrenadante para outro tubo Eppendorf, que foi colocado seqüencialmente num “banho maria” a 100°C por 3 min e no gelo durante 6 min. As amostras foram de novo centrifugadas (12000 *g*, 15 min, 4°C), aproveitando-se o sobrenadante que foi filtrado (filtro de nylon, 0,45 µm) para o *vial* do HPLC (Cromatografia líquida de alta performance), sendo conservadas a -20°C até o processamento em HPLC.

As amostras foram injetadas em HPLC (Waters, EUA), equipado com detector refratométrico (Waters, 2414) e coluna Sugar-Park1 (Waters, 300 x 6,5 mm) em forno a 90°C. Utilizou-se como eluente H<sub>2</sub>O ultrapura, contendo EDTA-Ca a 50 mg L<sup>-1</sup>, com fluxo de 0,5 mL minuto<sup>-1</sup>, isocrático. O volume de injeção foi de 80 µL, com 22 minutos de tempo de corrida por amostra. A identificação de cada açúcar foi feita com padrões de concentração conhecida, usando para quantificação as áreas dos picos no cromatograma. Foram realizadas 4 repetições por tratamento.

### **Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância num esquema fatorial (genótipo vs. temperatura, incluindo o período de recuperação) (*P* = 0,05). Utilizou-se o teste Tukey para comparação entre as médias, para um nível de confiança de 95%.

## **RESULTADOS**

### **Trocas Gasosas**

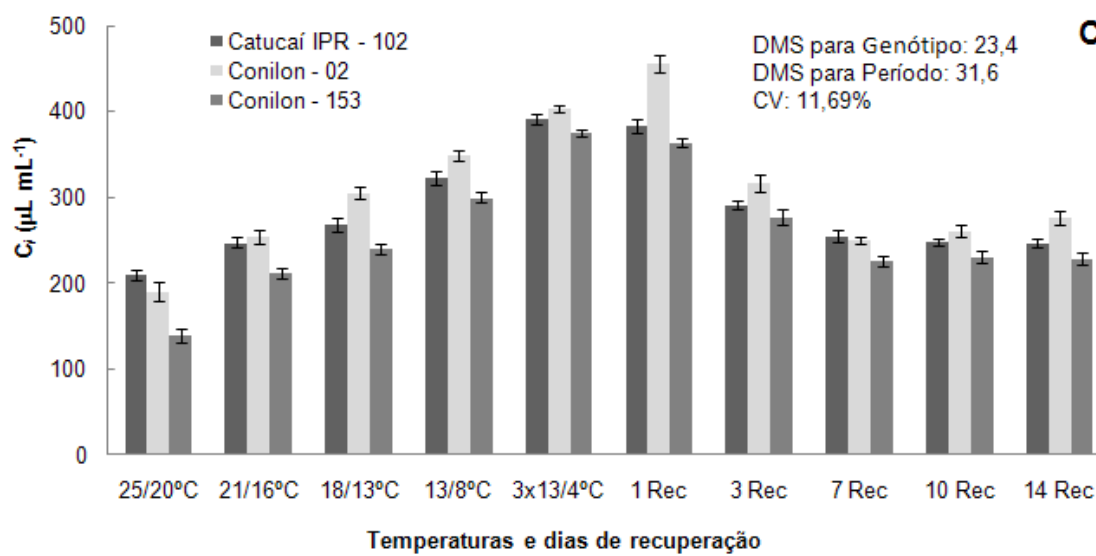
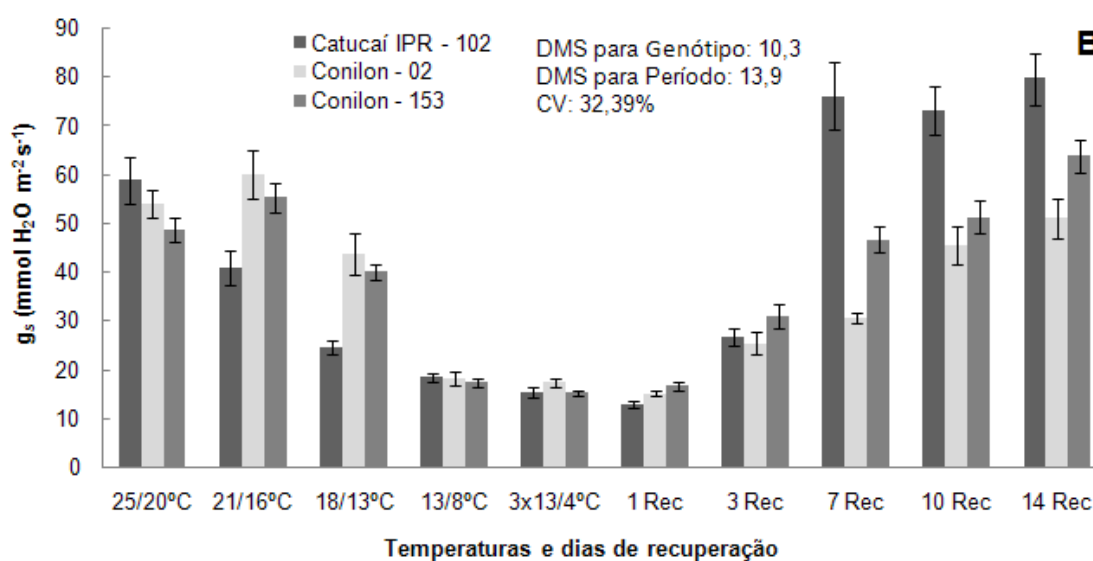
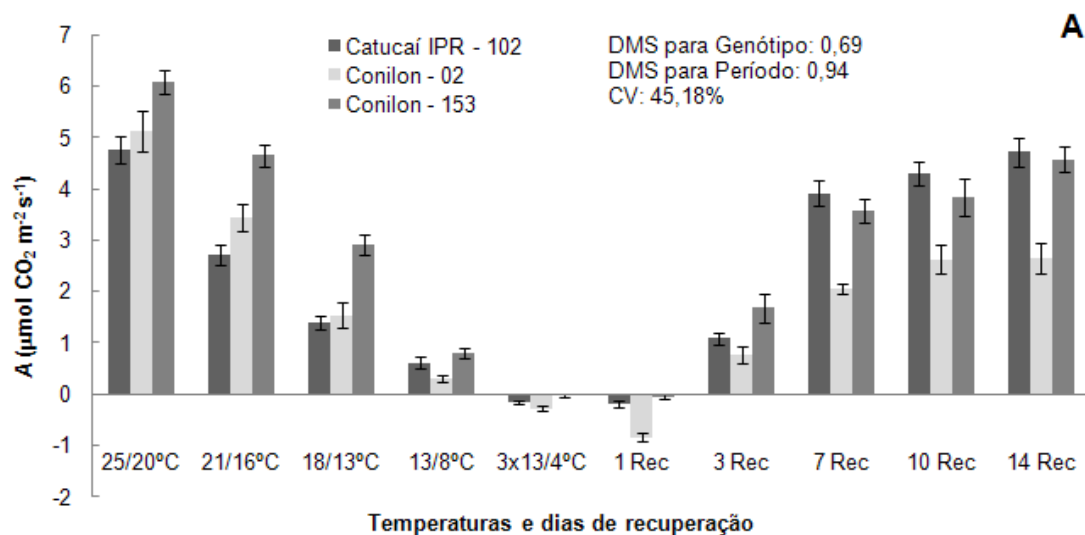
De maneira generalizada, nos três genótipos houve decréscimos nas taxas de fotossíntese líquida (Figura 1A) e condutância estomática (Figura 1B) e aumento da concentração interna de CO<sub>2</sub> (Figura 1C), com a imposição de baixas temperaturas positivas. Contudo, esses valores apresentaram tendência de voltar

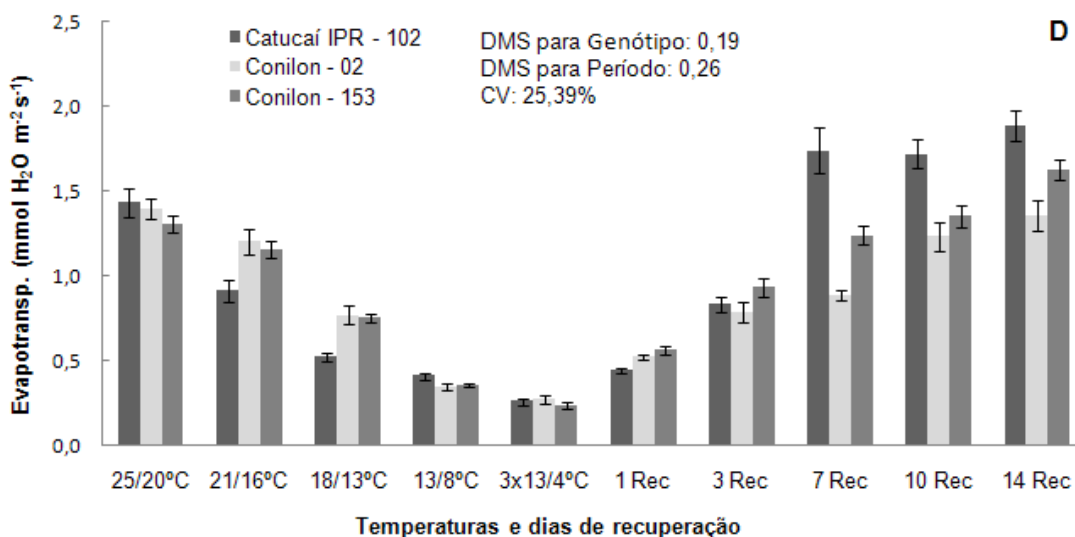
aos resultados iniciais, com o passar dos dias de recuperação, à temperatura de 25/20°C.

Maiores valores de fotossíntese líquida ( $A$ ) foram encontrados no Conilon clone 153 na ocasião do controle e até a temperatura de 18/13°C. Na temperatura de 13/8°C e no cilho de 13/4°C as taxas foram iguais para todos os genótipos, apresentando valores negativos no final do ciclo de baixas temperaturas e no 1º dia de recuperação. Do 7º ao 14º dia de recuperação as taxas foram iguais entre o Catucaí IPR 102 e o clone 153, entretanto, ambos os genótipos apresentaram taxas superiores ao clone 02 (Figura 1A).

Os três genótipos apresentaram queda similar da  $A$ , com a queda da temperatura, contudo o Catucaí apresentou rápida recuperação (valores similares ao de controle) já no 7º dia após o estresse rigoroso. Apesar de o clone 153 não apresentar recuperação plena, a  $A$  foi de 75,2% no 14º dia em relação ao controle, enquanto o clone 02 apresentou apenas 51,7% de recuperação, portanto, fortemente atingido pelas baixas temperaturas.

O comportamento da condutância estomática ( $g_s$ ) foi similar ao da evapotranspiração ( $E$ ) (Figura 1BD). Ambas as características e a concentração interna de  $CO_2$  ( $C_i$ ) foram similares entre os três genótipos com decorrer da queda da temperatura e dias de recuperação. Entretanto, no Catucaí ocorreu queda mais acentuada de  $g_s$  na temperatura de 21/16°C e 18/13°C em comparação aos clones do Conilon, contudo a  $C_i$  apresentou menor aumento. Os valores de  $g_s$  e  $E$  depois do 10º dia apresentaram recuperação nos três genótipos, atingindo, inclusive, valores superiores aos iniciais no Catucaí e clone 153, porém a  $C_i$  não retornou aos valores iniciais (Figura 1BC).





**Figura 1.** Fotossíntese líquida - *A* (A), condutância estomática -  $g_s$  (B), concentração interna de  $CO_2$  -  $C_i$  (C) e evapotranspiração - *E* (D) em diferentes genótipos de *Coffea* sp. submetidos a decréscimo gradual de temperatura (25/20°C até 13/8°C), durante 24 dias, 3 ciclos de temperatura de 13/4°C (3x13/4°C) e posterior períodos de recuperação (Rec) a 25/20°C (ao fim de 7 e 14 dias). Cada valor médio é proveniente de 25 repetições. As barras representam o erro padrão da média.

**Nota:** DMS = Diferença mínima significativa. CV = Coeficiente de variação.

### Enzimas da carboxilação e da respiração

As enzimas do ciclo de Calvin, ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (rubisco) e ribulose-5-fosfato cinase (Ru5PK), envolvidas, respectivamente, na fase de carboxilação e de regeneração de Ciclo de Calvin-Benson apresentaram, em geral, diminuição de atividade com a queda da temperatura nos 3 genótipos (Tabela 1). No que diz respeito à rubisco, o Catucaí e o clone 153 mostram a mesma tendência de descida até 13/8°C. Contudo, o clone 153 apresentou recuperação total ao 7º dia após as baixas temperaturas, enquanto o Catucaí mostrou um mínimo (para 57% da atividade do controle) a 3x13/4°C, mas recupera totalmente no período de recuperação. Já o clone 102 apenas foi significativamente afetado a 3x13/4°C, mas apresentou apenas 53% da atividade do controle.

A Ru5PK foi significativamente afetada a 13/4°C e 3x13/4°C em Catucaí, recuperando totalmente ao 7º dia de recuperação. O clone 153 também apresentou decréscimos significativos nessas temperaturas, mas a afetação

permaneceu ainda no 7º dia de recuperação e, no final do experimento, apresentou uma recuperação incompleta (85% do controle). O clone 02 torna a indicar um padrão distinto, sendo significativamente afetado apenas no 7º dia de recuperação onde registrou 57% da atividade do controle (Tabela 1).

**Tabela 1.** Atividade enzimática ( $\mu\text{mol s}^{-1} \text{g}^{-1}$  de massa seca) em folhas coletadas depois de 2 horas de iluminação, em diferentes genótipos de *Coffea* sp. submetidos a decréscimo gradual de temperatura (25/20°C até 13/8°C), durante 24 dias, 3 ciclos de temperatura de 13/4°C (3x13/4°C) e posterior períodos de recuperação (Rec) a 25/20°C (ao fim de 7 e 14 dias). Cada valor médio é proveniente de 4 repetições.

Genótipo		Temperaturas e dias de recuperação					
		25/20°C	18/13°C	13/8°C	3x13/4°C	7 Rec	14 Rec
<b>Rubisco</b> CV: 19,25	Catuaí	0,186Aab	0,121Ac	0,135ABbc	0,107ABc	0,238Aa	0,191Aab
	Clone 02	0,147Aa	0,124Aab	0,156Aa	0,078Bb	0,151Ba	0,154ABa
	Clone 153	0,155Aab	0,095Ac	0,102Bbc	0,138Aabc	0,159Ba	0,109Babc
<b>Ru5PK</b> CV: 14,53	Catuaí	0,816Ab	0,877Ab	0,604Ac	0,510Bc	0,824Ab	1,096Aa
	Clone 02	0,790Aab	0,601Bbc	0,775Aab	0,726Aab	0,450Bc	0,862Ba
	Clone 153	0,844Aa	0,694Bab	0,402Bc	0,492Bbc	0,455Bc	0,715Ba
<b>MDH</b> CV: 19,79	Catuaí	1,002Ab	0,757Ab	1,925Aa	1,955Aa	2,291Aa	1,868Aa
	Clone 02	0,906Abc	0,449Ac	0,979Bbc	1,353Bb	1,036Bb	1,929Aa
	Clone 153	0,853Acd	0,639Ad	1,026Bbcd	1,252Bbc	2,099Aa	1,400Bb
<b>PK</b> CV: 23,76	Catuaí	0,269Abcd	0,251Acd	0,360Abc	0,394Bb	0,540Aa	0,199Ad
	Clone 02	0,158Bc	0,166Ac	0,211Bbc	0,509Aa	0,336Bb	0,238Abc
	Clone 153	0,216ABa	0,178Aa	0,236Ba	0,176Ca	0,284Ba	0,202Aa

Médias seguidas por mesma letra maiúscula, na coluna, e por mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Nota:** CV = Coeficiente de variação, Rubisco = Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase, Ru5PK = Ribulose-5-fosfato cinase, MDH = Malato desidrogenase e PK = Piruvato cinase.

Deve-se destacar, ainda, que ao 7º dia de recuperação o Catuaí apresentou uma atividade da rubisco e da Ru5PK significativamente mais elevada que os 2 clones de Conilon, fato que se verificou ainda para a Ru5PK a 18/13°C e no fim do experimento.

Com a queda da temperatura, as enzimas malato desidrogenase (MDH) e piruvato cinase (PK), envolvidas na glicólise do processo respiratório

apresentaram um padrão de afetação distinto do observado nas enzimas do ciclo de Calvi-Benson (Tabela 1). A MDH mostrou redução a 18/13°C (entre 25 e 50%) para os 3 genótipos, mas se recuperou totalmente nas temperaturas seguintes para valores superiores ao do controle. O Catucaí destacou-se, pois apresentou valores de atividade próximos do dobro do controle de 13/8°C até ao fim do experimento, mesmo durante a fase de estresse mais severo. Por isso apresentou também valores significativamente superiores aos dos genótipos de Conilon a 13/8°C e 3x13/4°C.

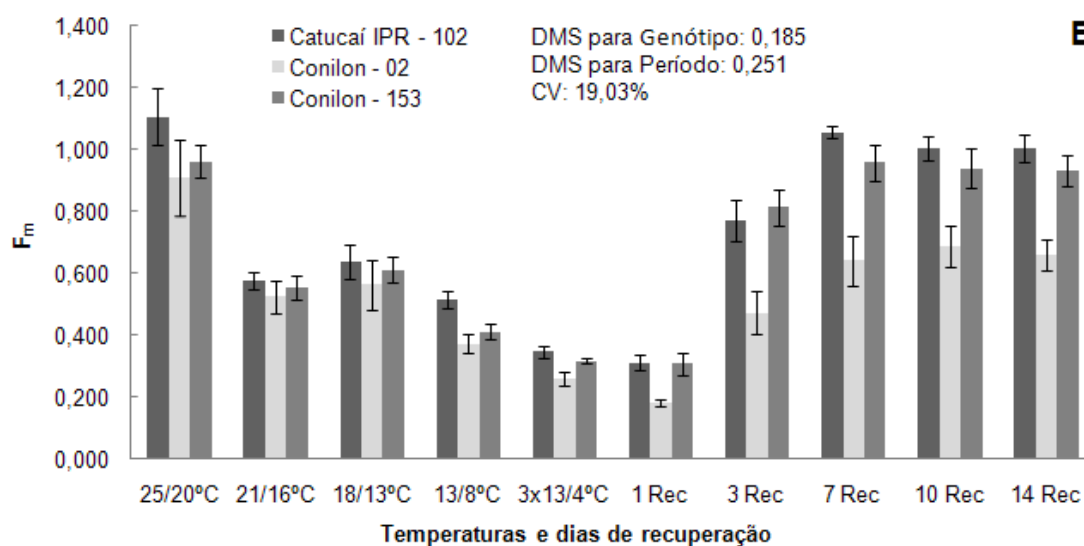
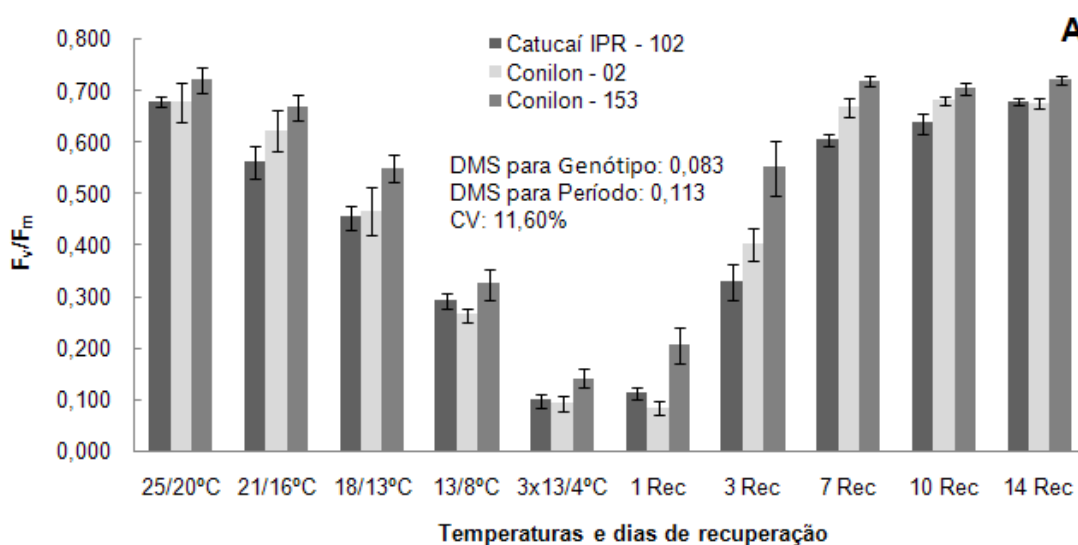
A piruvato cinase (PK) apresentou valores estatisticamente similares entre os genótipos na temperatura de 18/13°C e ao fim da recuperação. Contudo, enquanto no clone 153 apenas se registraram flutuações não significativas ao longo do experimento, nos outros 2 genótipos foram observadas grandes variações. O Catucaí apresentou subidas moderadas a 13/8°C (34%) e 3x13/4°C (46%), mas duplicou o valor de atividade ao 7º dia de recuperação. Ressalta-se, ainda que durante a imposição de condições de baixas temperaturas o Catucaí apresentou os maiores valores de atividade, exceto após os ciclos a 13/4°C. Já o clone 02 apresentou os maiores aumentos a 3x13/4°C (222%) e no 7º dia de recuperação (113%), mantendo ainda uma atividade cerca de 50% superior ao controle no fim do experimento (Tabela 1).

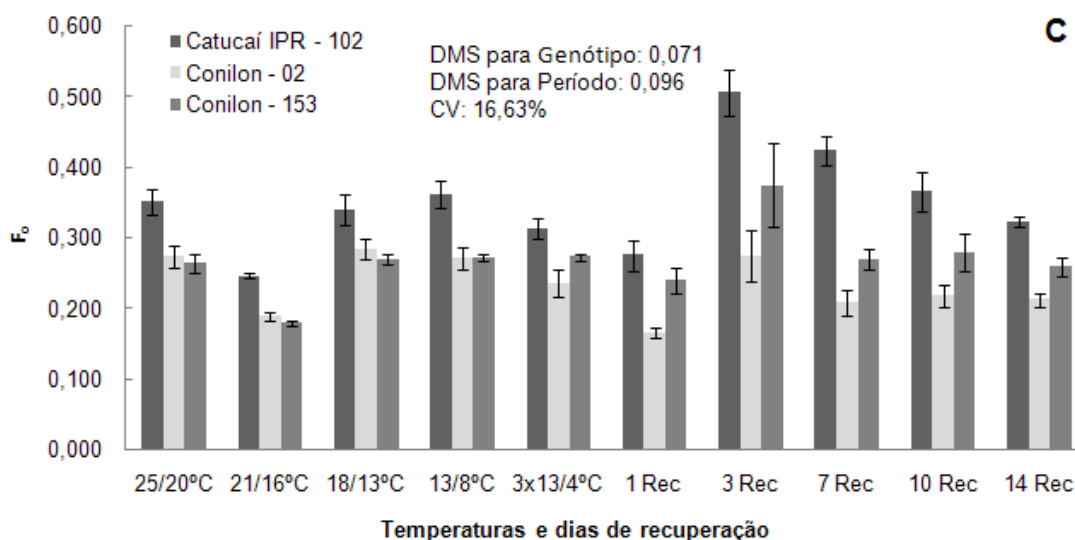
### **Fluorescência da clorofila *a***

A eficiência máxima fotossintética do PSII ( $F_v/F_m$ ) e fluorescência máxima da clorofila *a* ( $F_m$ ) apresentaram fortíssimas reduções com o abaixamento da temperatura, atingindo mínimos após os ciclos de 13/4°C e no 1º dia de recuperação, que representavam cerca de 14% (Conilon) e 20% (Catucaí) dos respectivos valores controle. Apenas a partir do 3º dia de recuperação se observa um aumento dos valores, obtendo-se uma recuperação plena a partir do 10º dia nos 3 genótipos que se comportaram de forma similar (Figura 2AB). No clone 02, apesar da recuperação do  $F_v/F_m$ , observa-se que os valores de  $F_m$  (e  $F_o$ ) estabilizaram a partir do 7º dia de recuperação, mas sem nunca alcançarem o valor igual ao controle, contrariamente ao que se observa nos outros genótipos.

Excetuando a temperatura de 21/16°C para os 3 genótipos e o 1º dia de recuperação para o clone 02, os valores de  $F_o$  não apresentaram queda significativa com a imposição de baixas temperaturas (Figura 2C). Durante a

submissão a baixas temperaturas  $F_o$  não apresentou variações significativas, mas apresentou tendência para aumentar no 3º (Catucaí e clone 153) e 7º (Catucaí) dias de recuperação.  $F_o$  apresentou valores superiores em Catucaí entre a temperatura de 18/13°C e fim do ciclo de 13/4°C e a partir do 3º dia de recuperação em comparação aos dois clones do Conilon. No clone 02 verifica-se que o  $F_o$  acabou por estabilizar os valores cerca de 25-30% inferiores ao controle.





**Figura 2.** Fluorescência mínima -  $F_o$  (A), eficiência máxima fotossintética do PSII -  $F_v/F_m$  (B) e fluorescência máxima de clorofila *a* -  $F_m$  (C) em diferentes genótipos de *Coffea* sp. submetidos a decréscimo gradual de temperatura (25/20°C até 13/8°C), durante 24 dias, 3 ciclos de temperatura de 13/4°C (3x13/4°C) e posterior períodos de recuperação (Rec) a 25/20°C (ao fim de 7 e 14 dias). Cada valor médio é proveniente de 5 repetições. As barras representam o erro padrão da média.

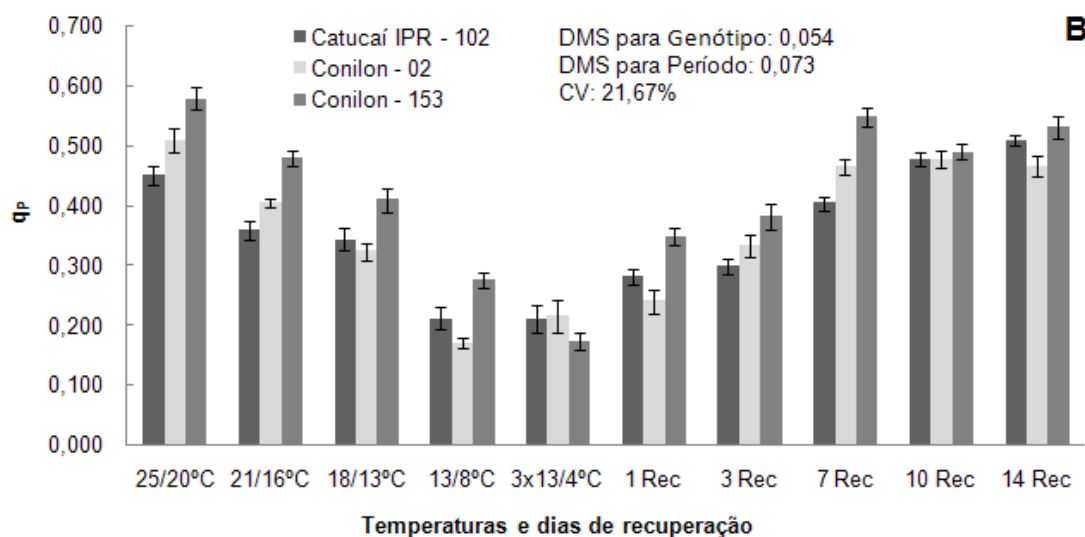
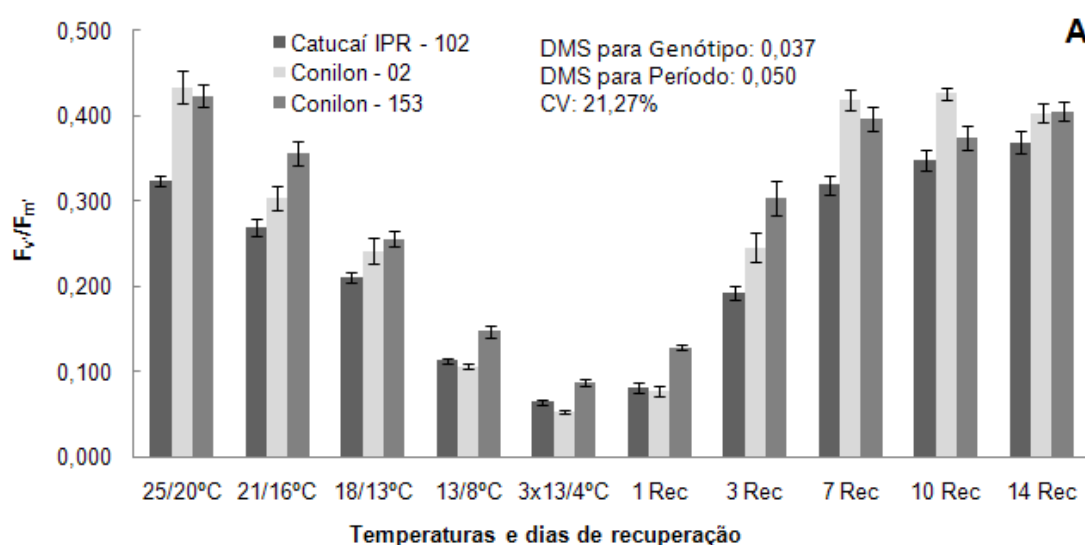
**Nota:** DMS = Diferença mínima significativa. CV = Coeficiente de variação.

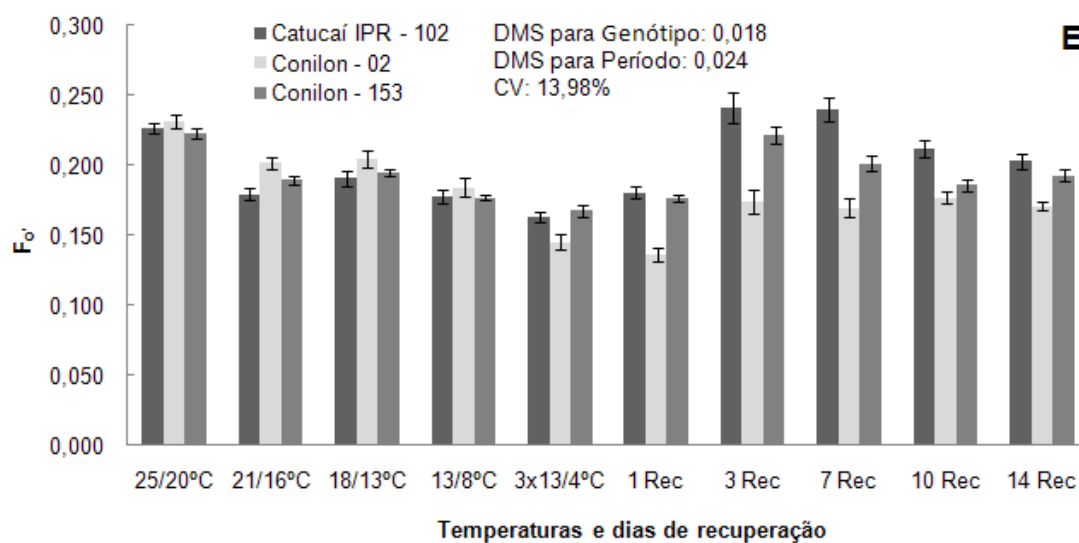
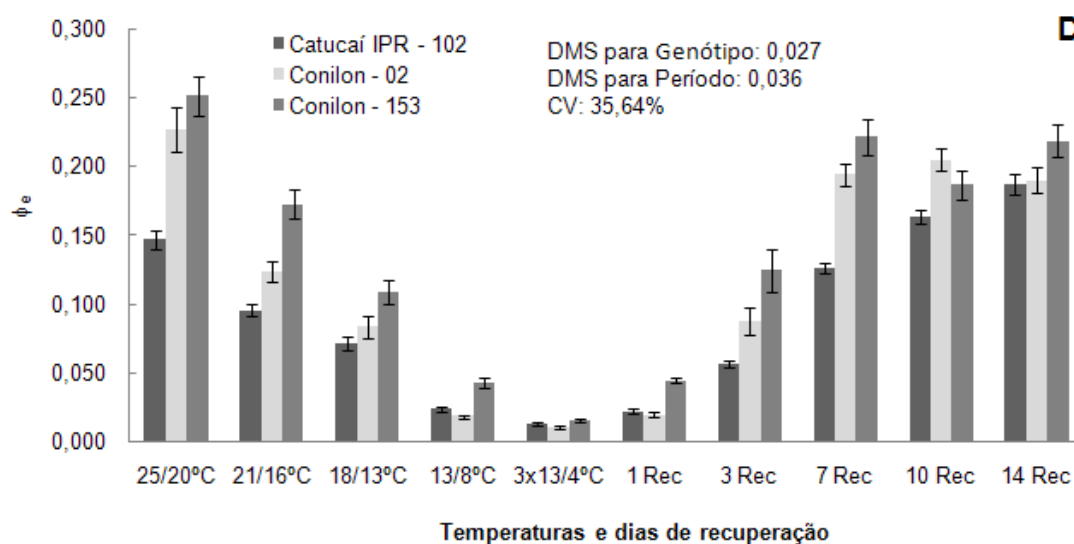
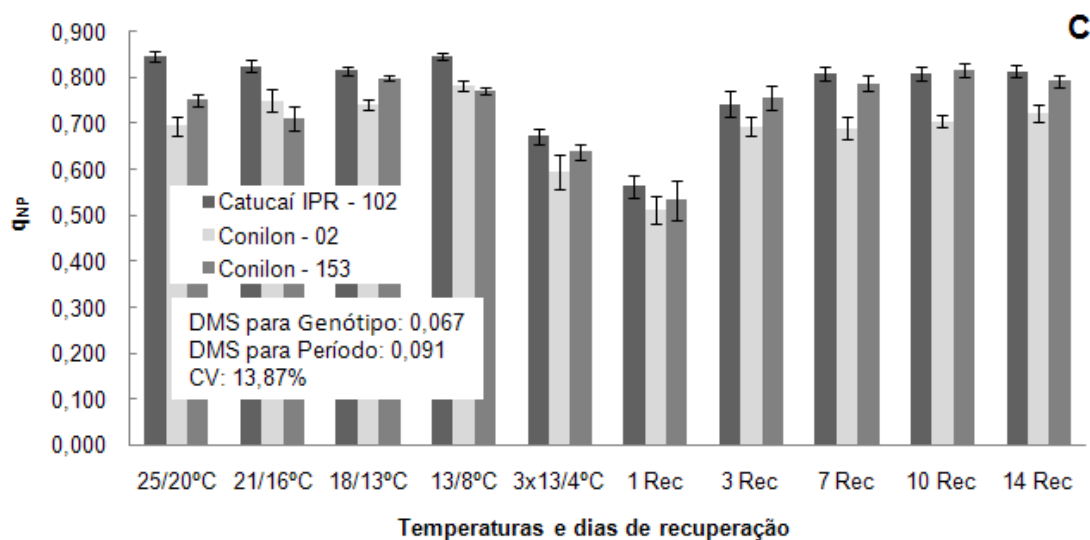
Nos 3 genótipos, a eficiência fotoquímica do PSII em condições de equilíbrio dinâmico da fotossíntese ( $F_v/F_m'$ ) e *quenching* fotoquímico ( $q_p$ ) diminuíram com a queda da temperatura, vindo o  $F_v/F_m'$  atingir valores similares ao controle no 7º dia de recuperação (Figura 3AB). Os valores do coeficiente de amortecimento não-fotoquímico ( $q_{NP}$ ) diferiram significativamente dos observados no controle apenas no fim do ciclo de temperaturas de 13/4°C e no 1º dia de recuperação nos três genótipos (Figura 3C).

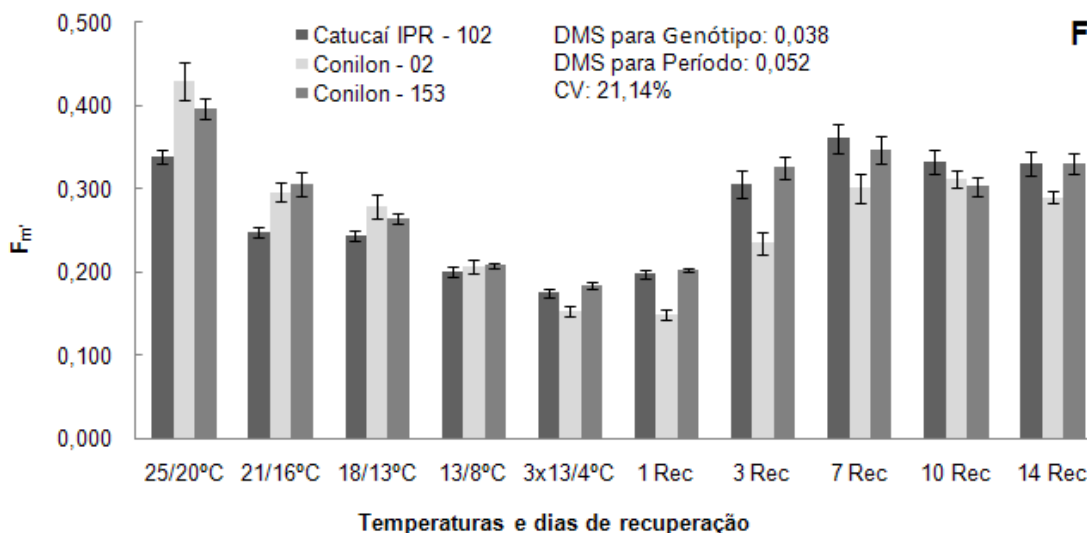
Por outro lado, foi possível observar uma queda significativa da estimativa da eficiência quântica do transporte linear de elétrons ( $\phi_e$ ) em todos os genótipos, logo a 21/16°C, que se acentuou até aos ciclos de 13/4°C. Após o tratamento de estresse mais severo, observou-se uma recuperação gradual deste parâmetro. Desta forma, o Conilon clone 153 apresentou valores de  $\phi_e$  sem diferença estatística para o controle no 7º e 14º dias de recuperação e o clone 02, no 7º e 10º dias de recuperação, enquanto Catucaí apenas atinge esse nível de recuperação ao 10º dia (Figura 3D).



O comportamento da fluorescência inicial com centros de reação abertos ( $F_o'$ ), bem como a fluorescência máxima com sítios abertos ( $F_m'$ ) foi semelhante, apresentando queda com a imposição do estresse. Entretanto, tais características atingiram valores similares ao controle já no 3º dia de recuperação no Catucaí. Porém, ao término da recuperação, valores similares ao controle não foram atingidos nos dois clones de Conilon (Figura 3EF). No Catucaí, o valor de  $F_o'$  foi maior que os outros dois genótipos no 3º, 7º e 10º dia de recuperação.







**Figura 3.** Eficiência fotoquímica do PSII -  $F_v/F_{m'}$  (A), coeficientes de amortecimento fotoquímico -  $q_P$  (B) e não-fotoquímico -  $q_{NP}$  (C), estimativa da eficiência quântica do transporte linear de elétrons -  $\phi_e$  (D), fluorescência inicial com os centros de reação abertos -  $F_o'$  (E), fluorescência máxima com sítios abertos -  $F_{m'}$  (F) em diferentes genótipos de *Coffea* sp. submetidos a decréscimo gradual de temperatura (25/20°C até 13/8°C), durante 24 dias, 3 ciclos de temperatura de 13/4°C (3x13/4°C) e posterior períodos de recuperação (Rec) a 25/20°C (ao fim de 7 e 14 dias). Cada valor médio é proveniente de 25 repetições.

**Nota:** DMS = Diferença mínima significativa e CV = Coeficiente de variação.

### Pigmentos fotossintéticos

A clorofila *a* e *b*, bem como o somatório das duas clorofilas apresentaram redução com a queda acentuada da temperatura nos três genótipos estudados (Tabela 2). Contudo, nos genótipos de Conilon, a relação Clorofila (*a/b*) foi igualmente afetada, indicando que a clorofila *a* foi mais afetada. No final do período de recuperação, a clorofila *a* e o somatório da clorofila *a* e *b* foram inferiores no Conilon clone 02, em comparação aos outros dois genótipos estudados, registrando-se esse genótipo apenas 38% do valor do controle. Houve aumento significativo da relação Clorofila (*a/b*), indicando uma degradação preferencial da clorofila *b* nessa fase do experimento (Tabela 2).

O Catucaí manteve a concentração de clorofila (rondando os 70% do controle) após 13/8°C, enquanto o clone 153 apresentou uma situação intermédia de afetação. Já no que respeita aos carotenoides totais, Catucaí manteve um valor relativamente estável (entre 85-90% do controle) após 13/8°C, enquanto os

outros dois genótipos apresentam queda, mesmo após o ciclo de baixas temperaturas (Tabela 2). A relação (clorofilas totais/carotenóides totais) diminui com a queda da temperatura, porém essa relação recuperou para valores iniciais já no 7º dia no Conilon 153, devido a síntese de clorofila (já que os carotenóides não se alteraram após os 3 ciclos de 13/4°C). Catucaí mantém esta relação devido à manutenção dos teores de clorofila e carotenóides, enquanto os clones de café Conilon mantêm essa relação, mas apenas porque a degradação de clorofilas e carotenóides é proporcional (Tabela 2).

**Tabela 2.** Concentração de clorofilas e caratenoides totais e razão entre clorofila *a* e *b* e entre clorofilas totais e caratenóides totais em folhas em diferentes genótipos de *Coffea* sp. submetidos a decréscimo gradual de temperatura (25/20°C até 13/8°C), durante 24 dias, 3 ciclos de temperatura de 13/4°C (3x13/4°C) e posterior períodos de recuperação (Rec) a 25/20°C (ao fim de 7 e 14 dias). Cada valor médio é proveniente de 8 repetições.

	Genótipo	Temperaturas e dias de recuperação					
		25/20°C	18/13°C	13/8°C	3x13/4°C	7 Rec	14 Rec
<b>Clorofila a</b>	Catucaí	3,40Ba	3,33Aa	2,40Bb	2,38Ab	2,31Bb	2,53Ab
CV: 17,85	Clone 02	3,70Ba	3,39Aa	2,37Bb	2,02Abc	1,47Cc	1,49Bc
-	Clone 153	4,45Aa	3,36Ab	3,37Ab	2,40Ac	2,96Abc	2,81Abc
<b>Clorofila b</b>	Catucaí	1,34ABa	1,37Aa	0,96ABb	0,98Ab	0,91Ab	0,90Ab
CV: 19,86	Clone 02	1,21Ba	1,16Aa	0,84Bb	0,73Bb	0,44Bc	0,39Bc
-	Clone 153	1,49Aa	1,14Ab	1,16Ab	0,88ABb	0,97Ab	0,96Ab
<b>Clorofila a+b</b>	Catucaí	4,74Ba	4,70Aa	3,37Bb	3,36Ab	3,22Ab	3,43Ab
CV: 18,18	Clone 02	4,91Ba	4,55Aa	3,21Bb	2,75Abc	1,91Bc	1,88Bc
-	Clone 153	5,94Aa	4,50Ab	4,53Ab	3,27Ac	3,93Abc	3,77Abc
<b>Clorofila a/b</b>	Catucaí	2,53Bb	2,44Bb	2,51Bb	2,43Bb	2,63Cab	2,84Ba
CV: 6,59	Clone 02	3,05Ac	2,94Ac	2,83Ac	2,80Ac	3,44Ab	3,89Aa
-	Clone 153	3,01Aab	2,95Aab	2,91Aab	2,76Ab	3,08Ba	2,93Bab
<b>Caratenóides Totais</b>	Catucaí	1,42ABab	1,44Aa	1,14Bc	1,28Aabc	1,19Abc	1,18Abc
CV: 14,28	Clone 02	1,29Ba	1,24Aa	1,12Ba	1,19Aa	0,81Bb	0,77Bb
-	Clone 153	1,55Aa	1,24Abc	1,37Aab	1,14Abc	1,09Ac	1,02Ac
<b>Clorofilas/Caratenóides</b>	Catucaí	3,35Ba	3,26Bab	2,94Bbc	2,61Ac	2,68Bc	2,90Bbc
CV: 8,17	Clone 02	3,79Aa	3,63Aa	2,87Bb	2,27Bc	2,35Cc	2,43Cc
-	Clone 153	3,84Aa	3,62Aab	3,32Ab	2,83Ac	3,58Aab	3,68Aab

Médias seguidas por mesma letra maiúscula, na coluna (comparação entre genótipos), e por mesma letra minúscula, na linha (comparação entre temperaturas e dias de recuperação), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = Coeficiente de variação.

Tendo em conta as alterações nos níveis de carotenóides totais, levou-se a cabo uma análise mais profunda (por HPLC) sobre possíveis variações de carotenos e xantofilas considerados individualmente. Assim, no que diz respeito à análise de amostras foliares recolhidas em condições de iluminação verifica-se queda da neoxantina e da luteína após 3x13/4°C, não havendo recuperação para os valores iniciais durante o período de recuperação. De fato, no caso da luteína (um importante pigmento fotoprotetor), observa-se um decréscimo após o fim do estresse, com os valores mínimos a serem registrados no fim do experimento. Os valores de luteína no Conilon clone 02 foram inferiores em todos os períodos avaliados em relação ao Catucaí IPR 102.

No clone 02 os valores de neoxantina foram inferiores ao Catucaí em cinco períodos avaliados e ao clone 153 em quatro períodos (Tabela 3), observando-se uma forte redução no clone 02 durante o período de recuperação, onde foi atingido um mínimo de 21% do controle.

A quantidade de  $\alpha$  e  $\beta$  - caroteno, bem como o somatório de ambas as concentrações apresentaram queda significativa com a imposição do estresse, em todos os genótipos. Contudo o  $\alpha$  - caroteno foi preferencialmente afetado atingido mínimos de 14% (Catucaí), 6% (clone 02) e 24% (clone 153) após os ciclos de 13/4°C, enquanto o  $\beta$  - caroteno mostrava os mínimos de 43% (Catucaí), 40% (clone 02) e 50% (clone 153) na mesma altura. Tal afetação diferencial levou a uma significativa descida da relação ( $\alpha/\beta$ ) caroteno. Após o fim de estresse, foram observadas recuperações significativas das concentrações de carotenos (e da sua relação) no clone 153 (a partir do 7º dia de recuperação) e Catucaí (apenas no 14º dia), vindo apenas o Conilon clone 153 a atingir valor de  $\alpha$  - caroteno igual ao controle no fim do período de recuperação. O valor de  $\beta$  - caroteno no clone 153 foi sempre maior que os outros dois genótipos avaliados (Tabela 3).

Com a queda da temperatura houve aumento da zeaxantina e da DEPS e queda da anteraxantina e violaxantina. Contudo, o valor conjunto dos pigmentos envolvidos no ciclo das xantofilas (violaxantina + anteraxantina + zeaxantina) apenas aumentou a 13/8°C no clone 153, mostrando decréscimos significativos em Catucaí desde 18/13°C até ao fim do experimento e a 18/13°C, 13/8°C a aos 14 dias de recuperação para o clone 02. Em Catucaí, o decréscimo da soma de (violaxantina + anteraxantina + zeaxantina) terá sido compensado com um teor mais elevado do conjunto destes pigmentos (e da sua conversão em zeaxantina

com correspondente subida de DEPS), ocasionando em aumento dos valores da zeaxantina tenham sido maiores em comparação ao clone 02 durante quase todo o experimento e superiores aos do clone 153 até 13/8°C (Tabela 3).

**Tabela 3.** Pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca) em folhas coletadas depois de 2 horas de iluminação, em diferentes genótipos de *Coffea* sp. submetidos a decréscimo gradual de temperatura (25/20°C até 13/8°C), durante 24 dias, 3 ciclos de temperatura de 13/4°C (3x13/4°C) e posterior períodos de recuperação (Rec) a 25/20°C (ao fim de 7 e 14 dias). Cada valor médio é proveniente de 8 repetições.

	Genótipo	Temperaturas e dias de recuperação					
		25/20°C	18/13°C	13/8°C	3x13/4°C	7 Rec	14 Rec
<b>Neoxantina</b>	Catuaí	170,6Aa	118,9Ab	86,7Ac	87,0Ac	112,8Ab	82,8Ac
CV: 19,31	Clone 02	121,9Ba	107,8Aa	67,4Bb	47,9Bbc	43,8Cc	25,8Bc
-	Clone 153	91,7Ca	69,5Babc	75,1ABabc	60,0Bc	86,9Bab	67,6Abc
<b>Violaxantina</b>	Catuaí	58,3Bb	17,8ABd	8,8Ad	8,1Ad	73,4Aa	37,4Ac
CV: 28,25	Clone 02	95,1Aa	25,1Ac	6,8Ade	5,0Ae	43,7Bb	19,4Bcd
-	Clone 153	55,6Ba	13,1bc	9,4Ac	6,5Ac	63,5Aa	34,0Ab
<b>Anteraxantina</b>	Catuaí	118,8Aa	66,3Ab	40,2Ac	42,4Ac	77,8Ab	74,6Ab
CV: 15,57	Clone 02	88,0Ba	49,7Bb	32,2Ac	35,4ABc	44,5Bbc	41,4Cbc
-	Clone 153	81,4Ba	41,8Bbc	34,9Acd	26,3Bd	53,0Bb	53,1Bb
<b>Luteína</b>	Catuaí	718,4Aa	558,1Ab	444,5Acd	486,6Abcd	517,3Abc	409,2Ad
CV: 15,00	Clone 02	473,8Ba	447,0Bab	358,2Bbc	375,9Bbc	294,7Ccd	234,0Bd
-	Clone 153	516,1Ba	421,7Bab	509,9Aa	413,8ABb	398,5Bb	339,5Ab
<b>Zeaxantina</b>	Catuaí	235,5Ab	268,6Aab	238,3Bb	284,5Aa	109,3Ad	163,0Ac
CV: 15,86	Clone 02	93,4Cd	151,0Cbc	189,9Cb	236,9Ba	80,2Ad	117,2Bcd
-	Clone 153	180,3Bc	223,3Bbc	301,3Aa	255,9ABb	111,0Ad	183,5Ac
<b>DEPS</b>	Catuaí	0,71Ab	0,85Aa	0,90Aa	0,91Aa	0,56Ac	0,73Ab
CV: 6,29	Clone 02	0,50Bd	0,78Bb	0,90Aa	0,92Aa	0,61Ac	0,78Ab
-	Clone 153	0,69Ac	0,88Aa	0,92Aa	0,93Aa	0,60Ad	0,77Ab
<b>V+A+Z</b>	Catuaí	412,7Aa	352,8Ab	287,3Bc	335,0Ab	260,4Ac	275,1Ac
CV: 11,85	Clone 02	276,5Ca	225,7Cb	228,9Cb	277,2Ba	268,4Bc	177,9Bc
-	Clone 153	317,2Bab	278,2Bb	345,6Aa	288,7Bb	227,5Ac	270,6Abc
<b><math>\alpha</math>-Caroteno</b>	Catuaí	59,6Ba	34,2Bb	13,5Bc	8,2Ac	11,6Bc	26,8Bb
CV: 23,18	Clone 02	88,2Aa	61,9Ab	22,5Ac	5,5Ad	10,4Bd	14,0Ccd
-	Clone 153	48,3Ca	35,9Bb	22,1Ac	11,8Ad	36,5Ab	40,9Aab
<b><math>\beta</math>-Caroteno</b>	Catuaí	157,0Ba	110,4Bb	73,9Bb	68,4Bd	86,4Bcd	103,3Bbc
CV: 14,09	Clone 02	165,2Ba	123,0ABb	70,3Bcd	65,6Bd	78,2Bcd	89,1Bc
-	Clone 153	201,4Aa	138,4Ab	134,2Ab	100,9Ac	141,5Ab	133,6Ab
<b><math>\alpha</math>+<math>\beta</math> Caroteno</b>	Catuaí	216,6Ba	144,6Bb	87,4Bc	76,6Bc	98,0Bc	130,1Bb
CV: 14,37	Clone 02	253,4Aa	184,8Ab	92,8Bcd	71,1Bd	88,5Bcd	103,1Cc
-	Clone 153	249,7Aa	174,3Ab	156,3Ab	112,6Ac	178,0Ab	174,5Ab
<b><math>\alpha</math>/<math>\beta</math> Caroteno</b>	Catuaí	0,38Ba	0,31Bab	0,18Bcd	0,12Ad	0,13Bd	0,26Abc
CV: 22,51	Clone 02	0,54Aa	0,53Aa	0,32Ab	0,08Ac	0,13Bc	0,16Bc
-	Clone 153	0,24Aab	0,26ba	0,16Bbc	0,11Ac	0,26Aa	0,31Aa

Médias seguidas por mesma letra maiúscula, na coluna (comparação entre genótipos), e por mesma letra minúscula, na linha (comparação entre temperaturas e dias de recuperação), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = Coeficiente de variação e DEPS = Estado de deepoxidação envolvendo os componentes do cilho da zeaxantina.

A fim de complementar os dados sobre pigmentos fotoprotetores foram também recolhidas amostras foliares no final do período noturno, isto é, com as folhas adaptadas à escuridão. Observou-se um aumento da concentração de zeaxantina e do valor de DEPS com a queda da temperatura, nos 3 genótipos estudados (Tabela 4). Paralelamente, os valores seguem os encontrados durante o dia, contudo, em menores quantidades, vindo, portanto, o Catucaí apresentar maiores valores de zeaxantina em comparação ao clone 02 em 50% dos períodos amostrados e em relação ao clone 153 nas temperaturas de 13/8°C e 3x13/4°C. No período de recuperação deixa de haver retenção noturna de zeaxantina (com conseqüente decréscimo do DEPS), sendo os valores observados neste período significativamente inferiores aos dos respectivos controles.

**Tabela 4.** Zeaxantina ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca) e DEPS em folhas coletadas no final do período noturno, em diferentes genótipos de *Coffea* sp. submetidos a decréscimo gradual de temperatura (25/20°C até 13/8°C), durante 24 dias, 3 ciclos de temperatura de 13/4°C (3x13/4°C) e posterior períodos de recuperação (Rec) a 25/20°C (ao fim de 7 e 14 dias).

-		Genótipo		Temperaturas e dias de recuperação				
				25/20°C	18/13°C	13/8°C	3x13/4°C	7 Rec
<b>Zeaxantina</b>	Catucaí	65,1Bd	111,8Ac	148,5Ab	193,3Aa	35,7Ae	37,1ABe	
	CV: 14,84	Clone 02	46,8Cd	81,9Bc	137,8Ab	177,1Ba	38,8Ad	28,2Bd
	-	Clone 153	89,8Ac	116,2Ab	105,9Bbc	170,8Ba	32,9Ad	45,4Ad
<b>DEPS</b>	Catucaí	0,44Bd	0,62Bc	0,74ABb	0,80Ba	0,33Be	0,32Be	
	CV: 7,21	Clone 02	0,44Bd	0,62Bc	0,76Ab	0,85Aa	0,45Ad	0,40Ad
	-	Clone 153	0,49Ac	0,67Ab	0,70Bb	0,87Aa	0,31Be	0,40Ad

Médias seguidas por mesma letra maiúscula, na coluna (comparação entre genótipos), e por mesma letra minúscula, na linha (comparação entre temperaturas e dias de recuperação), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = Coeficiente de variação. DEPS = Estado de deepoxidação envolvendo os componentes do cilho da zeaxantina.

#### Quantificação de açúcares solúveis

De modo geral, observaram-se alterações significativas nas concentrações de diversos açúcares ao longo da imposição das condições de baixas temperaturas, mas também no período de recuperação (Tabela 5).

**Tabela 5.** Concentração de açúcares solúveis ( $\text{mg g}^{-1}$  de massa seca) em folhas coletadas depois de 2 horas de iluminação, em diferentes genótipos de *Coffea* sp. submetidos a decréscimo gradual de temperatura ( $25/20^{\circ}\text{C}$  até  $13/8^{\circ}\text{C}$ ), durante 24 dias, 3 ciclos de temperatura de  $13/4^{\circ}\text{C}$  ( $3 \times 13/4^{\circ}\text{C}$ ) e posterior períodos de recuperação (Rec) a  $25/20^{\circ}\text{C}$  (ao fim de 7 e 14 dias). Cada valor médio é proveniente de 4 repetições.

	Genótipo	Temperaturas e dias de recuperação					
		25/20°C	18/13°C	13/8°C	3x13/4°C	7 Rec	14 Rec
<b>Estaquiase</b> CV: 14,97	Catuaí	25,8Ac	37,6Ab	51,8Aa	34,5Bbc	32,4Bbc	26,4Bc
	Clone 02	15,1Bc	20,6Bbc	28,6Bab	26,6Bab	25,9Bab	33,3Ba
	Clone 153	14,9Bd	37,8Ac	44,5Abc	50,2Aab	58,4Aa	52,8Aab
<b>Rafinose</b> CV: 15,19	Catuaí	23,2Ac	27,8Aabc	36,1Aa	33,2Aab	31,2Babc	26,2ABbc
	Clone 02	28,4Abc	28,1Abc	30,2Abc	23,8Bc	41,8Aa	32,7Ab
	Clone 153	14,4Bb	13,0Bb	14,6Bb	16,8Cab	24,4Ba	24,4Ba
<b>Sacarose</b> CV: 8,63	Catuaí	47,9Bbc	48,2Bbc	40,5Acd	54,2Aab	36,6Bd	61,2Aa
	Clone 02	71,9Aa	59,1Ab	42,4Ad	43,4Bd	54,4Abc	49,0Bcd
	Clone 153	74,3Aa	51,8ABb	42,0Ac	47,3ABbc	51,4Ab	53,5Bb
<b>Glicose</b> CV: 10,54	Catuaí	14,7Ac	16,2Ac	21,9Aa	20,1Aab	17,4Bbc	17,6Bbc
	Clone 02	13,8Ac	16,8Abc	18,2Bab	18,0Aab	21,0Aa	21,1Aa
	Clone 153	6,03Bc	6,70Bc	6,38Cc	8,63Bbc	13,7Ca	10,3Cb
<b>Frutose</b> CV: 6,87	Catuaí	12,9Ad	17,3Ac	25,4Ab	31,9Aa	18,7Bc	19,1Ac
	Clone 02	12,9Ac	15,9Ab	17,3Bb	20,7Ba	21,6Aa	20,2Aa
	Clone 153	8,89Bc	8,61Bc	8,51Cc	10,7Cbc	13,4Ca	12,4Bab
<b>Arabinose</b> CV: 10,75	Catuaí	5,39ABc	7,46Ab	7,88Ab	11,3Aa	10,9Aa	8,13Ab
	Clone 02	4,62Bd	5,73Bcd	7,19Abc	9,61Ba	8,40Bab	6,85Abc
	Clone 153	5,94Aab	4,53Bb	4,95Bab	6,31Ca	6,47Ca	5,16Bab
<b>Manitol</b> CV: 9,06	Catuaí	5,52Bd	14,1Ac	23,9Ab	38,0Aa	12,8Bc	8,33Cd
	Clone 02	7,83Be	9,81Bde	12,6Ccd	20,1Bb	23,1Aa	13,5Bc
	Clone 153	10,6Ac	14,3Ab	15,0Bb	18,0Ba	10,5Bc	16,1Aab

Médias seguidas por mesma letra maiúscula, na coluna, e por mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = Coeficiente de variação.

A concentração de estaquiase alterou significativamente, de forma gradual, com a queda da temperatura nos 3 genótipos, com aumentos máximos de 100% para Catuaí, 89% para o clone 02 (ambos a  $13/8^{\circ}\text{C}$ ) e 237% no clone 153 ( $3 \times 13/4^{\circ}\text{C}$ ). Contudo, enquanto Catuaí mostrou uma recuperação total ao fim de 14 dias os clones de Conilon mantiveram (ou aumentaram ainda mais) os níveis de estaquiase observados durante o período de baixa temperatura.



A rafinose apresentou aumento com a queda da temperatura apenas em Catucaí (aumento máximo de 55% a 13/8°C), observando-se um decréscimo após o fim do estresse para valores que não diferem estatisticamente do controle ao fim de 14 dias de recuperação. Nos clones de Conilon a rafinose aumenta apenas no período de recuperação (Tabela 5).

As concentrações de sacarose em Catucaí mostraram uma certa estabilidade, pois apresentaram variações não significativas durante a imposição de baixas temperaturas, até ao 7º dia de recuperação, apenas aumentando (28%) no fim do experimento. Por outro lado, os clones de Conilon apresentaram quedas significativas da concentração da sacarose logo a partir de 18/13°C, com mínimos de 59% (clone 02) e 56% (clone 153) a 13/8°C. Posteriormente, registram-se algum aumento desses valores, sem nunca se atingir os valores de controle (Tabela 5).

Os valores de glicose e frutose apresentam variações semelhantes em cada um dos genótipos. No Catucaí, registraram-se aumentos significativos durante a imposição das condições de baixas temperaturas, com aumentos máximos de 49% a 13/8°C para a glicose e 147% para a frutose a 3x13/4°C. Durante o período de recuperação os valores decresceram, mas apenas os de glicose se assemelharam ao controle no fim do experimento. No clone 02 também se observaram aumentos com a baixa temperatura de cerca de 32% para a glicose (13/8°C) e de 60% para a frutose (3x13/4°C). Contudo, durante o período de recuperação este genótipo manteve (frutose) ou aumentou ainda mais (glicose) esses valores. O clone 153 também apresentou aumentos destes açúcares no período de recuperação, mas não mostrou alterações significativas com a baixa temperatura. Nota-se, ainda, que este genótipo apresentou sempre concentrações de glicose e frutose inferiores aos outros dois genótipos (Tabela 5).

A arabinose apresentou aumento da concentração com a queda da temperatura em Catucaí e no clone 02, atingindo em ambos cerca do dobro do valor de controle a 3x13/4°C. Estes valores apresentaram uma recuperação parcial apenas ao 14º dia de recuperação. Já no clone 153 não houve alterações significativas ao longo de todo o experimento (Tabela 5). Observa-se maiores valores no Catucaí na temperatura de 18/13°C, 3x13/4°C e aos 7 dias de

recuperação em comparação aos outros dois genótipos e, exceto no controle, o clone 153 mostrou os menores valores de arabinose.

O manitol apresentou variações significativas ao longo do experimento nos 3 genótipos, com a imposição de baixas temperaturas. Este foi o açúcar solúvel com maior alteração percentual em Catucaí, registrando-se aumentos significativos de 125% a 588% entre 18/13°C e 3x13/4°C. Nesta última temperatura Catucaí apresentou cerca do dobro do valor observado nos clones de Conilon, quando no controle apresentava o menor valor de manitol. Ainda em Catucaí, no período de recuperação os valores decresceram gradualmente até ao nível dos observados no controle. Também nos clones de Conilon se observou forte aumento de manitol com a queda da temperatura, registrando-se aumentos de 157% (clone 02) e 70% (clone 153) após os ciclos de 13/4°C. Contudo, nestes genótipos, apesar de acentuada queda no período de recuperação, não foram atingidos os valores similares aos iniciais no final do experimento (Tabela 5).

## DISCUSSÃO

### Trocas Gasosas

O fechamento estomático é freqüentemente referido como um dos efeitos iniciais em plantas submetidas a baixas temperaturas (Ramalho et al., 2003). Mesmo havendo correlação positiva ( $r = 0,7956$ ) e significativa entre  $A$  e  $g_s$ , a queda da  $A$  pode não estar relacionada com a limitação estomática, uma vez que  $C_i$  aumentou com a imposição do estresse (Figura 1C), e apresentou correlação negativa ( $r: -0,8570$ ) e significativa com  $A$ . Esse fato pode ser reforçado pelo fato de encontrar valores iguais de  $C_i$  entre o clone 02 e Catucaí no 7º, 10º dias de recuperação, sendo  $A$  bem superior no Catucaí (Figura 1AC) Silva et al. (2004) verificaram o crescimento sazonal do cafeeiro em condições de campo e apontam que ocorre queda de  $A$  na ocasião de crescimento reduzido, época de baixa temperatura (mínimas de até 8°C). No entanto, fotossíntese máxima e  $g_s$  não

apresentaram queda, permitindo sugerir que não ocorreu dano no aparelho fotossintético naquelas condições.

Segundo Sage e Sharkey (1987) a queda da fotossíntese em plantas submetidas a baixas temperaturas pode estar relacionada à limitação da disponibilidade de fosfato no cloroplasto, uma vez que pode haver redução da atividade das enzimas que metabolizam a sacarose, diminuindo, conseqüentemente, a concentração de sacarose, como encontrado, principalmente nos dois clones de Conilon (Tabela 5). Sage (1994), também relatou que  $A$  pode ser limitada sob elevada  $C_i$  pela taxa de utilização de triose-fosfato.

De forma similar ao encontrado sob baixas temperaturas, o cafeeiro quando submetido a déficit hídrico, bem como toxicidade de alumínio, restrição do sistema radicular apresentam queda de  $A$ ,  $E$  e  $g_s$  (DaMatta et al., 1997; Korad et al., 2005; Ronchi et al., 2006; Dias et al., 2007; Sena et al., 2007).

### **Enzimas da carboxilação e da respiração**

Com a imposição de baixas temperaturas (18/13°C e 13/8°C), a atividade da Rubisco apresentou queda significativa no Catucaí e no clone 153, tal como já foi observado em *C. canephora* Apoatã e *C. dewevrei* (Ramalho et al., 2003). Também o clone 02 foi afetado, mas apenas a 3x13/4°C (Tabela 1). Danos em enzimas ligadas à fotossíntese também foram observados em outras plantas sujeitas a baixas temperaturas (Allen e Ort, 2001; Rodrigues, (2005).

Na fase de decréscimo de temperatura, a queda de atividade das enzimas envolvidas no processo de carboxilação pode estar relacionada com diversos fatores, nomeadamente, a ação de moléculas altamente reativas, falta de substrato ou com a acumulação de frutose e glicose (Tabela 5), como descrito para diversas plantas (Paul e Foyer, 2001; Parry et al., 2002; Maroco et al., 2002). A acumulação de açúcares solúveis no período de recuperação poderá também ter contribuído para a recuperação incompleta de  $A$  nos clones de Conilon. Outra possível causa da queda na atividade da Rubisco é o acréscimo na concentração de íons, particularmente fosfato (Rolland et al., 2002). Não obstante, Salvucci e Crafts-Brandner (2004) relataram que a atividade da Rubisco e a taxa fotossintética são inferiores em plantas submetidas à baixas temperaturas devido

à menor disponibilidade de substrato e energia específica, uma vez que também verificaram redução de ATPases.

Quedas pontuais da Ru5PK também foram quantificadas neste trabalho, corroborando com Rodrigues (2005). Ocorre também que a baixa disponibilidade de Ru5P pode afetar a atividade de algumas enzimas do ciclo de Calvin, em particular da Ru5PK (Fredeen et al., 1990). Referindo-se a plantas submetidas a déficit hídrico, Flexas e Medrano (2002) relataram que ocorrem decréscimos de RuBP, ATP e atividade da Rubisco. A síntese de RuBP é dependente de ATP e NADPH pelo que a diminuição da disponibilidade da ATP nas folhas pode proporcionar menor regeneração no ciclo de Calvin e, conseqüentemente, queda da taxa fotossintética (Tezara et al., 1999).

Sabe-se que a manutenção do metabolismo respiratório é de grande importância, pois permite a manutenção da produção de energia, poder redutor e intermediários metabólicos que tornam possível o metabolismo em geral e os processos de reparação em particular, em condições de baixas temperaturas. Em plantas sensíveis a baixas temperaturas a respiração é fortemente afetada devido à inibição de várias enzimas, o que provoca o declínio exponencial das taxas de respiração com o decréscimo da temperatura (Larcher, 1981).

A regulação da respiração celular ocorre sob a atuação de enzimas, as quais são influenciadas pela disponibilidade de ATP e de substrato (Millar et al., 1998; Devaux et al., 2003). Sabe-se que o aumento da necessidade de ATP para processos celulares induz o aumento da taxa respiratória (Day e Lambers, 1983), fato que pode ter ocorrido nos 3 genótipos, uma vez que a atividade das enzimas MDH e PK aumentou após a temperatura de 18/13°C (Tabela 1), excetuando o clone 153 para a PK. Ao estudar a planta de *Zea mays* submetida a 5°C, Ribas-Carbo et al. (2000) verificaram aumento da respiração, entretanto sugerem que esse fato não está diretamente relacionado à tolerância a baixas temperaturas.

Em suas considerações, Kihara et al. (2003) relataram que as atividades de PK e MDH diminuíram em raízes de *Lupinus albus* com deficiência de fósforo, devido à falta de energia específica e substrato, contrariamente ao que é sugerido pelos nossos resultados.

Assim, tendo em conta que as as enzimas MDH e PK, envolvidas na glicólise do processo respiratório, mostraram aumentos significativos particularmente em Catucaí (MDH) e no clone 02 (PK), que se mantiveram para

além do período de exposição das plantas a baixas temperaturas, tal poderia ter impacto positivo na obtenção de energia para processos metabólicos celulares. Contudo, ao contrário do registrado para Catucaí, tal impacto positivo não teve correspondência numa maior tolerância do clone 02 conforme se pode observar pelo impacto ao nível de *A* e, ainda, por exemplo, na forte perda de pigmentos fotossintéticos.

Estudos realizados por Covey-Crump et al. (2007), em *Solanum tuberosum*, indicaram que a atividade respiratória ampliou-se com o aumento da temperatura, contudo a disponibilidade de ADP permaneceu em quantidades inferiores nas temperaturas baixas (5°C) e altas (30°C).

### **Fluorescência da clorofila *a***

Houve queda da eficiência máxima fotossintética do PSII ( $F_v/F_m$ ) e fluorescência máxima da clorofila *a* ( $F_m$ ) com o abaixamento da temperatura, como já observado por Ribas-Carbo et al. (2000) em plantas de *Zea mays* submetidas a 5°C. Entretanto, no 3º dia de recuperação teve início de aumento desses valores, tendo uma recuperação plena a partir do 10º dia, nos três genótipos, os quais responderam de forma aparentemente similar (Figura 2AB). Contudo, no clone 02 os valores de  $F_m$  (e parcialmente de  $F_o$ ) estabilizaram a partir do 7º dia de recuperação, sem atingirem o valor controle. O decréscimo de  $F_m$  poderá ser explicado pelo aumento de dissipação não-fotoquímica, devido à presença de concentrações crescentes de zeaxantina (Demmig- Adams e Adams, 1992), já que se observou significativa retenção noturna deste pigmento (Tabela 4). Igualmente o decréscimo de  $F_m'$  e  $F_v'/F_m'$  poderá estar ligado ao aumento de zeaxantina (Tabela 3) durante o dia, como observado por Ramalho et al. (2003), ou ainda com a presença de centros de reação do PSII fotoquimicamente inativos que dissipam energia na forma de calor (Krause, 1994). Estes mecanismos competem com a parte fotoquímica pela energia de excitação, o que pode baixar a eficiência fotoquímica do PSII em condições de luminosidade e baixas temperaturas (Adams e Demmig-Adams, 1995; Adams et al., 1995; Ramalho et al., 2003; Wang et al., 2006). Portanto, nesse caso não deve ser considerado como dano (fotoinibição), mas sim como uma estratégia/mecanismo de proteção (Adams e Demmig-Adams, 1995). Em seus trabalhos de pesquisa, Praxedes et al.

(2006) e Cai et al. (2007) não encontraram diferenças em  $F_v/F_m'$  em cafeeiro submetido a déficit hídrico.

Contudo, não será de descartar a possibilidade de dano ao nível dos fotossistemas. De fato, os decréscimos de  $F_m$ ,  $F_m'$ ,  $F_v/F_m$  e  $F_v'/F_m'$  estarão também ligados à diminuição do teor de clorofila observada nos 3 genótipos. Tal fato se justifica porque durante o período de recuperação os valores de  $F_m$  se mantêm mais baixos, uma vez que a fluorescência obtida é proporcional à densidade de moléculas de clorofila. A perda da atividade do PSII com a queda da temperatura também pode estar associada com a diminuição da capacidade de reoxidação das quinonas, resultando na menor eficiência no transporte de elétrons para o PSI (De Las Rivas e Barber, 1997; Suzuki et al., 2008)

Segundo Krause e Weiss (1991), o  $F_o$  está associado à emissão de fluorescência pelas moléculas de clorofila *a* do complexo coletor de luz do PSII, quando todos os centros de reação estão “abertos” (oxidados). Os dados de  $F_o$  não apresentaram tendência de queda com a imposição de baixas temperaturas, com exceção do Catucaí na temperatura de 21/16°C e do Conilon clone 02 no 1º dia de recuperação (Figura 2C). Contudo, neste clone a estabilização de  $F_o$  a valores inferiores ao seu controle poderá estar igualmente associado à diminuição do teor de clorofilas. Decréscimos em  $F_o$  podem estar associados a danos na proteína D1 e nas subunidades do complexo de liberação do oxigênio (Bertamini et al., 2004).

Por outro lado, no início da fase de recuperação  $F_o$  aumentou nos 3 genótipos, principalmente em Catucaí e no clone 153. De acordo com Dias e Marengo (2006) esse aumento pode ser atribuído à inibição da transferência de elétrons da plastoquinona A para a plastoquinona B, o que pode indicar que houve dano na proteína D1 do centro de reação do PSII. De fato, o aumento de  $F_o$  e concomitante decréscimo de  $F_v/F_m$ , em *C. arabica*, pode ser atribuído a fotoinativação não facilmente reversível dos centros de reação, provavelmente devido a danos ao nível da proteína D1 (Ramalho et al., 2000). Desta forma, a recuperação desse tipo de fotoinativação concorda com a recuperação gradual de  $F_o$  em Catucaí e no clone 153 após o 3º dia de recuperação, período durante o qual também as taxas de *A* e do teor de clorofilas também mostraram recuperação.

O aumento de  $F_o$  também pode ser atribuído à redução não-fotoquímica da plastoquinona A no escuro pelo NAD(P)H disponível no cloroplasto, processo conhecido como clororrespiração, a qual também pode desempenhar papel de regulação da fotossíntese, modulando a atividade cíclica do fluxo de elétrons do PSI, (Peltier e Cournac, 2002). Korad et al. (2005), ao submeter 6 genótipos de *C. arabica* sob altas concentrações de alumínio, também verificaram queda de  $A$ ,  $g_s$  e  $F_v/F_m$ , ao mesmo tempo em que houve aumento da  $C_i$  e  $F_o$ , sugerindo a ocorrência de danos na estrutura dos tilacóides. Entretanto, DaMatta et al. (1997) não encontraram diferenças em  $F_v/F_m$  em cafeeiro Catucaí e Conilon submetido a déficit hídrico, mas verificaram aumento de  $F_o$  e  $F_m$ .

Nas temperaturas de 13/8°C e 3x13/4°C os valores de  $\phi_e$  são fortemente afetados nos 3 genótipos (Figura 3), o que sugere a presença de danos mais acentuados no transporte de energia, como observado por DaMatta et al. (1997) em cafeeiros submetidos a déficit hídrico. Na temperatura de 3x13/4°C os valores de  $\phi_e$  representaram apenas cerca de 4-6% dos observados nos controles, o que ajudará a justificar os valores negativos de  $A$  observados nessa temperatura (Figura 1), o mesmo se verificando para o 1º dia de recuperação. Como ocorre uma queda similar do  $F_v/F_m$  e do  $\phi_e$ , então o problema parece estar na eficiência de captura de luz que pode ser devido à presença de pigmentos dissipadores e na funcionalidade, prejudicada pelos danos celulares.

A queda do coeficiente de amortecimento fotoquímico ( $q_p$ ) reflete o estado reduzido do 1º aceptor de elétrons estáveis no PSII, a plastoquinona A, o que fornece uma estimativa da capacidade do PSII em utilizar a energia luminosa para a redução de  $NADP^+$ . O  $q_p$  diminuiu significativamente com a queda da temperatura, com o menor decréscimo a ser observado em Catucaí (55%), enquanto em Conilon esses valores atingiram cerca de 60% (clone 02) e 70% (clone 153). Contudo, alguma recuperação foi claramente visível já no 1º dia de recuperação, vindo-se a atingir valores similares ao controle no 7º dia de recuperação (Figura 3B). Deve referir-se que a magnitude da queda de  $q_p$  foi bem inferior ao da  $A$  e  $\phi_e$ , apresentando ainda uma melhor recuperação, o que sugere a presença de drenos alternativos ao transporte linear de elétrons, como a fotorrespiração (Ribeiro et al., 2004).

O coeficiente não fotoquímico ( $q_{NP}$ ) indica a eficiência na dissipação de calor, em razão do aumento no gradiente de prótons entre o lúmen e o estroma

do cloroplasto (Maxwell e Johnson, 2000). Os valores de  $q_{NP}$  apresentaram quedas apenas no ciclo de baixas temperaturas e no 1º dia de recuperação (Figura 3), o que pode estar relacionado à presença de pigmentos fotoprotetores. O  $q_{NP}$  pode ser regulado pelo ciclo das xantofilas e também parece estar associado ao complexo antena periférico do PSII e com a proteína PsbS (Li et al., 2000; Müller et al., 2001), o qual regula a distribuição de energia de excitação dos centros de reação, atuando como defesa do complexo fotossintético (Ma et al., 2003), entretanto, com a queda acentuada da temperatura, essa adaptação não pareceu ser suficiente para evitar os danos. Contudo, sabe-se que este coeficiente mede a alteração em relação ao estado de adaptação a condições de escuridão, da eficiência dos mecanismos fotoprotetores que atuam através de dissipação térmica. Assim, tal como sugerido em Ramalho et al. (2003), os valores de  $F_m$  e  $F_v/F_m$  estarão a ser diminuídos devido à retenção noturna de zeaxantina (Tabela 4) pelo que o valor de  $q_{NP}$  estará “incorreto” e apenas avaliará os aumentos de capacidade de dissipação térmica à luz, mas não a capacidade de dissipação térmica sustentada (Adams et al., 1995; Maxwell Johnson, 2000; Ramalho et al., 2003).

### **Pigmentos fotossintéticos**

Parâmetros da clorofila *a* traduzem alterações na fluorescência da clorofila, o que permite determinar a eficiência fotoquímica do PSII e do transporte de elétrons (Demmig-Adams et al., 1996). Por sua vez, a análise dos pigmentos de proteção, nomeadamente a zeaxantina, anteraxantina, luteína e carotenos, que originam mudanças na fluorescência, permite avaliar mais detalhadamente os processos de fotoproteção e de funcionalidade do aparelho fotossintético, pois esses pigmentos contribuem para a agregação e estabilidade dos complexos antena captadores de luz, para a dissipação do excesso de energia de excitação da clorofila *a* e para remoção de espécies reativas de oxigênio (Demmig-Adams et al., 1995).

Com a imposição das plantas a baixa temperatura ocorreu redução das clorofilas (*a* e *b*) nos 3 genótipos, cujas concentrações não vieram mais a atingir valores similares aos valores encontrados no controle (Tabela 2). Contudo, nos genótipos de Conilon a relação Clorofila (*a/b*) foi igualmente afetada, indicando que a clorofila *a* foi mais afetada. Para além disso, a redução mais acentuada do



total de clorofilas com a baixa temperatura no clone 02, mas, ao contrário dos outros genótipos o decréscimo de pigmentos, prolongou-se até ao fim do experimento, quando apresentava apenas 38% do teor de clorofila total e 60% de carotenóides. Estas fortes perdas de pigmentos, mais que ajustes de aclimação, sugerem perda de funcionalidade das estruturas fotossintéticas no clone 02, ajudando a explicar a recuperação incompleta de *A*. Pelo contrário, Catucaí mostrou os menores intactos percentuais no total de clorofilas, na relação clorofila *a/b* e no teor total de carotenóides com o estresse mais severo (3x13/4°C), mostrando assim alguma estabilidade da composição de pigmentos cloroplastidiais. O clone 153, apesar de maiores variações nesses valores que Catucaí após os ciclos de 13/4°C, apresetou alguma capacidade de recuperação.

A concentração de carotenóides apresentou pouca mudança, entretanto a relação (clorofilas totais/caratenóides totais) diminui significadamente com a queda da temperatura, fato também relatado por Holá et al. (2007), vindo a recuperar os valores iniciais apenas no clone 153, devido a alguma recuperação do teor de clorofilas. A queda desta relação foi função, principalmente, da queda de pigmentos de captação (clorofilas), o que poderia ser considerado uma característica de aclimação, visando a diminuição da captura de energia luminosa quando em presença de condições de estresse que diminuem a utilização dessa energia pelos processos fotoquímicos (Horton et al., 1996; Ramalho et al., 2000), como é o caso das temperaturas baixas. Contudo, como referido anteriormente, pelo menos no clone 02, que apresenta decréscimos muito acentuados, tal variação indicará provavelmente processos de *photobleaching*.

Os valores da zeaxantina e DEPS aumentaram em todos os genótipos com a imposição de baixas temperaturas, como encontrado por Ramalho et al. (2003) em outros genótipos de cafeeiro. Contudo, apesar de DEPS semelhantes durante a exposição a baixas temperaturas, os maiores valores de zeaxantina foram observados em Catucaí ou no clone 153, em comparação ao clone 02 (Tabela 3), o que indica maior adaptação deste clone ao estresse fotooxidativo, o que está de acordo com a extensa perda de clorofilas. Ao estudar a expressão dos genes de *C. arabica* e *C. canephora*, envolvidos na formação de carotenóides, Simkin et al. (2008) relataram aumento de expressão em genes envolvidos na produção de zeaxantina (PTOX, CRTB-B, NCED3, CCD1 e FIB1), o que indica fluxo metabólico no sentido de biosíntese de componentes do ciclo das xantofilas

quando as plantas foram induzidas ao déficit hídrico. Também relataram que a atividade da enzima ccCRTR-B sobre o  $\beta$  - caroteno, gera  $\beta$  - criptoxantina, que, ao receber a ação da ccCRTR-B, gera zeaxantina. Esta molécula é particularmente importante em condições que geram excitação dos fotossistemas, pois possui a capacidade de dissipar energia sob a forma de calor, por meio da de-excitação do estado singlete da clorofila e, de forma indireta, pelo aumento do estado de agregação do complexo coletor de luz dos cloroplastos (Horton et al., 1996). Assim, elevadas concentrações de zeaxantina e/ou o aumento do estado de de-epoxidação envolvendo os componentes do ciclo das xantofilas podem ter contribuído para reduzir e/ou regular a atividade do PSII, tendo em conta o decréscimo de utilização de energia no processo de carboxilação, podendo assim correlacionar-se negativamente com *A* (Müller et al., 2006) ao funcionar como mecanismo de fotoproteção (Adams e Demmig-Adams, 1995; Adams et al., 1995; Adams e Barker, 1998; Allen e Ort, 2001; Adams et al., 2002).

As folhas das plantas, ao retornarem a temperaturas iguais a do controle, apresentaram valores de zeaxantina iguais (no clones de Conilon), ou até mesmo valores inferiores (no Catucaí), ao encontrado no controle (Tabela 3), confirmando que em cafeeiro o ciclo das xantofilas é um importante mecanismo de aclimatação das plantas em condições de estresse que induzem sobra de excitação ao nível dos fotossistemas como a baixa temperatura (Ramalho et al., 2003), alta irradiância (Ramalho et al., 2000) ou o déficit hídrico (Cai et al., 2007).

Por outro lado, a luteína que também tem um importante papel de fotoproteção dos fotossistemas e na manutenção da estabilidade dos complexos de captação de energia (Haldimann, 1998; Pogson et al., 1998; Niyogi, 1999) foi quase sempre maior em Catucaí e menor no clone 02 (Tabela 3). Tal fato sugere que estes genótipos de *C. canephora* podem apresentar menor capacidade de fotoproteção que *C. arabica* conferida por este pigmento, tal como já observado por Ramalho et al. (2003), que comparou *C. arabica* cv Icatu com *C. canephora* cv Apoatã. Por sua vez, DaMatta et al. (2002) e Gomes Júnior (2006), relataram que o cafeeiro possui habilidade de aumentar o mecanismo antioxidante, quando submetido à estresse, contudo, Lima et al. (2002) descrevem que a tolerância pode estar relacionada a menor produção de moléculas reativas de oxigênio e comporta-se diferente conforme o genótipo de *C. canephora* estudado em condições de déficit hídrico.

Houve queda significativa de  $\alpha$  e  $\beta$  - caroteno com a imposição de baixas temperaturas, bem como na relação ( $\alpha/\beta$ ) caroteno, vindo a recuperar os valores iniciais no Catucaí e no clone 153 (Tabela 3). O decréscimo de  $\alpha$  - caroteno, já a partir de 18/13°C também foi relatado por Ramalho et al. (2003), e este fato pode indicar dano nos fotossistemas. A queda da concentração de  $\beta$  - caroteno pode também levar a uma menor fotoproteção nos centros de reação e no complexo coletor de luz, já que este pigmento é essencial para a agregação e fotoproteção dos fotossistemas (De Las Rivas et al., 1993; Adams e Barker, 1998; Pogson et al., 1998). De fato, esse pigmento inativa o oxigênio singleto e o estado tripleto da clorofila, formando-se um estado tripleto de carotenóide, que depois dissipa a energia de excitação através da liberação de calor (Demmig-Adams, 1990; De Las Rivas et al., 1993; Adams e Barker, 1998; Niyogi, 1999).

Entretanto, o declínio da relação ( $\alpha/\beta$ ) caroteno pode ser considerada como um processo de aclimação foliar a baixas temperaturas (Adams e Demmig-Adams, 1995; Ramalho et al., 2003), ou a excesso de radiação em plantas de café (Ramalho et al., 2002). Contudo, esse fato baseia-se no pressuposto de que a redução dessa relação será devida ao aumento de  $\beta$  - caroteno que confere essa proteção, como sucedido em *C. arabica* cv. Icatu (Ramalho et al., 2003), o que não sucede em nenhum dos 3 genótipos em estudo que registram decréscimos de 50% ou mais deste pigmento a 18/13°C e uma recuperação apenas parcial do seu teor ao fim de 14 dias de recuperação.

Ainda no que se refere ao ciclo das xantofilas, será importante notar que em condições de iluminação, a violaxantina é convertida em zeaxantina, via anteraxantina, por meio de mudança de pH entre as membranas, onde ocorre a ativação de enzimas de prótons (ATPases), sendo o processo invertido quando a luminosidade decresce (Demmig-Adams et al., 1995; Horton et al., 1996). Contudo, ao comparar a zeaxantina e a DEPS no final do período noturno na situação de controle com as baixas temperaturas (Tabela 4), percebe-se que a zeaxantina e a DEPS, a partir de 18/13°C aumenta, vindo a apresentar maiores valores no fim dos ciclos de 18/13°C, que não são muito diferentes dos registrados durante o período diurno, principalmente nos clones Conilon. Esse fato indica ocorrência de retenção da zeaxantina durante a noite, quando o cafeeiro é submetido a baixas temperaturas positivas, o que, tal como já foi referido, terá como consequência o decréscimo da eficiência fotoquímica do PSII ( $F_v/F_m$ ), não

porque haja dano, mas sim porque parte da energia que chega aos fotossistemas será dissipada termicamente pela zeaxantina, não sendo, assim, detectada como fluorescência da clorofila. Os valores de zeaxantina seguem os encontrados durante o dia, contudo em menores quantidades, vindo, portanto o Catucaí apresentar maiores valores de zeaxantina em comparação ao clone 02, em 50% dos períodos amostrados.

### **Açúcares solúveis**

A capacidade de resposta às alterações ambientais são requisitos para a sobrevivência das plantas, sabendo-se que as alterações enzimáticas e da composição de açúcares nos tecidos das plantas são importantes indicadores da capacidade da aclimatação das espécies (López-Millán et al., 2000). De fato, entre outras respostas, a capacidade de manutenção da produção e consumo, assim como a estabilização dos seus níveis são de grande importância para a tolerância ao frio (Byrd et al., 1995; Leegood, 1995; Allen e Ort, 2001; Ramalho et al., 2003). Assim, apesar da existência de alterações e desequilíbrios de curto-prazo, a restauração do equilíbrio entre fotossíntese, metabolismo do carbono e translocação é essencial para uma menor sensibilidade ao frio quando considerada a longo-prazo (Hurry et al., 1998).

Nos genótipos em estudo, observaram-se variações significativas do teor dos vários açúcares solúveis detectados por HPLC, quer durante a imposição das baixas temperaturas positivas quer no período após o fim da submissão às condições de estresse. Houve aumento na concentração de glicose e frutose nas temperaturas de 13/8°C e 3x13/4°C em Catucaí e no clone 02 (Tabela 5), como em *C. dewevrei* (Ramalho et al., 2003) ou em *Arabidopsis thaliana* (Klotke et al. (2004), mas não no clone 153, como também já observado em *C. canephora* cv. Apoatã e *C. arabica* cv. Icatu (Ramalho et al., 2003), mostrando haver diferentes impactos em diferentes genótipos. O aumento destes monossacáridos poder dever-se ao seu menor uso pelo metabolismo celular. No caso do clone 02, esse aumento parece decorrer igualmente da inibição da síntese de sacarose (por eventual inibição da enzima sacarose-P sintetase - SPS), já que este açúcar diminui fortemente. O aumento de glicose e frutose em folhas fotossinteticamente ativas poderá também resultar de um declínio a translocação e uso destes açúcares (Morcuende et al., 1996). Já em Catucaí o nível de sacarose não sofreu

variações significativas (exceto no fim do experimento) pelo que os aumentos de glicose e frutose se deverão apenas a uma menor utilização destes açúcares. Já no clone 153, cujas concentrações de glicose e frutose foram sempre inferiores as dos outros dois genótipos, a manutenção dos níveis de glicose e frutose com concomitante decréscimo de sacarose poderá indiciar também que alguma translocação deste açúcar se manteve para outras partes da planta ou mesmo que terá ocorrido degradação de sacarose para utilização de monosacáridos para a respiração, visualizado com o aumento da atividade enzimática da MDH e PK (Tabela 1).

Contudo, a afetação da síntese da sacarose nos clones de Conilon com a imposição de condições de baixas temperaturas foi também observada em clones de *C. canephora* cv. Conilon sensíveis a déficit hídrico (Praxedes et al., 2006) e em *Cucumis sativus* submetida a baixas temperaturas (Miao et al (2007). Nesses estudos, sugere-se que tal decréscimo se terá dado por redução da disponibilidade da ATP. Por outro lado, será provável que a síntese de sacarose tenha sido afetada já que a SPS é sensível a baixas temperaturas (Morcuende et al., 1996; Allen e Ort, 2001) e ao déficit hídrico (Praxedes et al., 2006).

A concentração de sacarose no Catucaí manteve-se inalterada, em comparação ao controle, quando submetido a baixas temperaturas, podendo indicar uma maior tolerância, uma vez que a manutenção ou aumento da concentração de sacarose proporciona maior tolerância às plantas submetidas a esse tipo de estresse (Palonen et al., 2000; Bascuñán-Godoy et al., 2006), fato também relatado por Praxedes et al. (2006), ao avaliar cultivares de café Conilon tolerantes a déficit hídrico.

A concentração de rafinose aumenta significativamente com a queda da temperatura apenas em Catucaí (Tabela 5), tendendo para valores próximos do controle durante o período de recuperação. Este açúcar pode estar associado à estabilização de membranas (Morsy et al., 2007), podendo, assim, auxiliar na tolerância a baixas temperaturas, já que ocorre o seu aumento em plantas tolerantes a baixas temperaturas em comparação às sensíveis de *Arabidopsis thaliana* (Klotke et al. (2004) e de *Oryza sativa* (Morsy et al., 2007) e durante o processo de aclimatação a baixas temperaturas em *Rubus idaeus* (Palonen et al., 2000) e *Olea europea* (Rejsková et al., 2007). A estaquiose aumentou de forma gradual nos três genótipos, corroborando com dados apresentados por

Tapernoux-Lüthi et al. (2004), ao submeterem plantas a baixas temperaturas. Foi igualmente sugerido que o aumento de estaquiose e rafinose está envolvido no processo de aclimação a baixas temperaturas em *Lonicera caerulea* L. (Imanishi et al., 1998).

No que refere à arabinose observa-se um aumento da sua concentração nos 3 genótipos com a implementação de baixas temperaturas com particular destaque para Catucaí, que apresenta sistematicamente valores mais altos durante todo o período experimental (exceto no controle). Neste açúcar, o clone 02 apresentou aumentos percentuais semelhantes e os valores absolutos mais próximos a Catucaí, rondando ambos os genótipos um aumento de 100% a 3x13/4°C. Entre outras possíveis funções, a arabinose é (tal como a hidroxiprolina) um importante componente da glicoproteína extensina, que tem um importante papel estrutural da parede celular, sendo particularmente necessária em condições de aclimação a temperaturas negativas de forma a manter a extensibilidade da parede. Assim, um aumento de arabinose pode indicar um aumento de extensina, tal como sugerido por Weiser et al. (1990).

Verificou-se igualmente aumento da concentração do açúcar álcool manitol nos 3 genótipos, com a queda da temperatura (Tabela 5), com Catucaí apresentando as maiores variações percentuais e também os maiores valores absolutos a 13/8°C e 3x13/4°C. Este fato pode estar associado à fotorrespiração ocorrida nas baixas temperaturas, pois, segundo Lu e Scharkey (2006), nestas condições ocorre aumento de maltose, por meio da repartição de amido. Contudo, o aumento deste (e outros) açúcar pode contribuir para o mecanismo de ajustamento osmótico (Jiang e Huang, 2001), podendo também apresentar função de proteção (Halford et al., 1999; Jiang e Huang, 2001), o que contribuirá para uma melhor tolerância de Catucaí a baixas temperaturas positivas.

Assim, e como conclusão geral relativo aos açúcares, o genótipo Catucaí apresentou os maiores valores absolutos dos açúcares solúveis relacionados com osmosegulação e estabilização de membranas (Morsy et al., 2007; Rejsková et al., 2007) após os 3 ciclos de 13/4°C (exceto para a estaquiose), podendo essas alterações serem consideradas como estando intimamente relacionadas com a capacidade de aclimação a baixas temperaturas (Palonen et al., 2000).

## CONCLUSÕES

Os genótipos estudados apresentam sensibilidade a baixas temperaturas, mas com tolerância e habilidades de recuperação diferente, o que conjugado a outros parâmetros, pode contribuir na escolha de cultivares e no melhoramento do gênero *Coffea* no que diz respeito à utilização de genótipos mais adequados a áreas sujeitas a períodos de baixas temperaturas.

Há maior recuperação do Catucaí IPR 102 em comparação ao Conilon clone 02, podendo estar associada, além de outros fatores, à maior taxa de atividade da ribulose nos períodos de recuperação, maior taxa da atividade da rubisco e MDH no ciclo de baixas temperaturas e no início da recuperação, bem como, maiores concentrações de clorofilas e caratenóides nos períodos de recuperação e zeaxantina e luteína em praticamente em todos os períodos avaliados e, a manutenção da concentração da sacarose com a imposição de baixas temperaturas.

O comportamento do ciclo da zeaxantina, bem como as alterações da composição de açúcares é fundamental para a proteção e adaptação do cafeeiro submetido a baixas temperaturas positivas.

O clone 153 apresentou melhor recuperação em comparação ao clone 02, o que pode estar associado a maiores concentrações de clorofilas, caratenóides, luteína e carotenos nos períodos de recuperação e zeaxantina aos 18/13°C, 13/8°C e ao término da recuperação, sugerindo que numa mesma espécie ocorrem particularidades de proteção e adaptação a baixas temperaturas.

Ocorre retenção da zeaxantina durante a noite, quando o cafeeiro é submetido a baixas temperaturas positivas.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa “Sanduíche”. Ao Instituto de Investigação Científica Tropical - IICT, Instituto Nacional de Recursos Biológicos - INRB e Instituto de Tecnologia Química e Biologia – ITQB, pela estrutura para realização do trabalho. À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, pela oportunidade de realizar o doutorado. À Fundação para a Ciência e a Tecnologia – FCT, através dos projetos POCTI/AGG/43101/2001 e PTDC/AGR-AAM/64078/2006, co-financiados pelo fundo europeu FEDER, pelo financiamento da pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams III, W. W., Barker, D. H. (1998) Seasonal changes in xanthophylls cycle-dependent energy dissipation in *Yucca glauca* Nuttall. *Plant, Cell and Environment*, 21: 501-511.
- Adams III, W. W., Demmig-Adams, B. (1995) The xanthophylls cycle and sustained thermal energy dissipation in *Vinca minor* and *Euonymus kiautschovicus* in winter. *Plant, Cell and Environment*, 18: 117-127.
- Adams III, W. W., Demmig-Adams, B., Rosenstiel, T. N., Brightwell, A. K., Ebbert, V. (2002) Photosynthesis and photoprotection in overwintering plants. *Plant Biology*, 4: 545-557.
- Adams III, W. W., Demmig-Adams, B., Verhoeven, A. S., Barker, D. H. (1995) “Photoinhibition” during winter stress: Involvement of sustained xanthophylls cycle-dependent energy dissipation. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 261-276.
- Allen, D. J., Ort, D. R. (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science*, 6: 36-42.



- Alonso, A., Queiroz, C. S., Magalhães, A. C. (1997) Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1323: 75-84.
- Amaral, J. A. T., DaMatta, F. M., Rena, A. B. (2001) Effects of fruiting on the growth of Arabica coffee trees as related to carbohydrate and nitrogen status and to nitrate reductase activity. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13: 66-74.
- Amaral, J. A. T., Rena, A. B., Amaral, J. F. T. (2006) Crescimento vegetativo sazonal do cafeeiro e sua relação com fotoperíodo, frutificação, resistência estomática e fotossíntese. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41: 377-384.
- Aroca, R., Vernieri, P., Irigoyen, J. J., Sánchez-Díaz, M., Tognoni, F., Pardossi, A. (2003) Involvement of abscisic acid in leaf and root of maize (*Zea mays* L.) in avoiding chilling-induced water stress. *Plant Science*, 165: 671-679.
- Barros, R. S., Maestri, M. (1974) Influência dos fatores climáticos sobre a periodicidade de crescimento vegetativo do café (*Coffea arabica* L.). *Revista Ceres*, 21: 268-279.
- Barros, R. S., Mota, J. W. S., DaMatta, F. M., Maestri, M. (1997) Decline of vegetative growth in *Coffea arabica* L. in relation to leaf temperature, water potential and stomatal conductance. *Field Crops Research*, 54: 65-72.
- Bascuñán-Godoy, L., Uribe., E., Zúñiga-Feest, A., Corcuera, L. J., Bravo, L. A. (2006) Low temperature regulates sucrose-phosphate synthase activity in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. By decreasing its sensitivity to Pi and increased activation by glucose-6-phosphate. *Polar Biology*, 29: 1011-1017.
- Bauer, H., Comploj, A., Bodner, M. (1990) Susceptibility to chilling of some central-African cultivars of *Coffea arabica*. *Field Crops Research*, 24: 119-129.
- Bertamini, M., Muthuchelian, K., Nedunchezian, N. (2004) Photoinhibition of photosynthesis in sun and shade grown leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Photosynthetica*, 42: 7-14.
- Bohn, M., Lüthje, S., Sperling, P., Heinz, E., Dörffling, K. (2007) Plasma membrane lipid alterations induced by cold acclimation and abscisic acid treatment of winter wheat seedlings differing in frost resistance. *Journal of Plant Physiology*, 164: 146-156.
- Bragança, S. M., Carvalho, C. H. S. de, Fonseca, A. F. A da, Ferrão, R. G. (2001) Variedades clonais de café Conilon para o Estado do Espírito Santo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36: 765-770.
- Brooks, A. (1986) Effects of phosphorus nutrition on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activation, photosynthetic quantum yield and amounts of some calvin-cycle metabolites in spinach leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13: 221-237.

- Byrd, G. T., Ort, D. R., Ôgren, W. L. (1995) The effects of chilling in the light on the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Physiology*, 107: 585-591.
- Cai, C-T., Cai, Z-Q., Yao, T-Q., Qi, X. (2007) Vegetative growth and photosynthesis in coffee plants under different watering and fertilization managements in Yunnan, SW China. *Photosynthetica*, 45: 455-461.
- Campos, P. S., Quartin, V., Ramalho, J. C., Nunes, M. A. (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. Plants. *Journal of Plant Physiology*, 160: 283-292.
- Carvalho, L. M., Silva, E. A. M., Azevedo, A. A., Mosquim, P. R., Cecon, P. R. (2001) Aspectos morfofisiológicos das cultivares de cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conilon. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36: 411-416.
- Conab, Companhia Nacional de Abastecimento (2007) Primeiro levantamento de café 2007/2008. Acesso em: 15 de Fevereiro de 2007. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3BoletimCafe.pdf>.
- Covey-Crump, E. M., Bykova, N. V., Affourtit, C., Hoefnagel, M. H. N., Gardeström, P., Atkin, O. K., (2007). Temperature-dependent changes in respiration rates and redox poise of the ubiquinone pool in protoplasts and isolated mitochondria of potato leaves. *Physiologia Plantarum*, 129: 175-184.
- DaMatta, F. M., Loos, R. A., Silva, E. A., Loureiro, M. E. (2002) Limitation to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *Journal of Plant Physiology*, 159: 975-981.
- DaMatta, F. M., Maestri, M., Mosquim, P. R., Barros, R. S. (1997) Photosynthesis in coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) as affected by winter and summer conditions. *Plant Science*, 128: 43-50.
- Damesin, C., Lelarge, C. (2003) Carbon isotope composition of current-year shoots from *Fagus sylvatica* in relation to growth, respiration and use of reserves. *Plant, Cell and Environment*, 26: 207-219.
- Davis, A. P., Govaerts, R., Bridson, D. M., Stoffelen, P. (2006) An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (*Rubiaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.152: 465-512.
- Day, D. A., Lambers, H. (1983) Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Physiologia Plantarum*, 58: 155-160.
- De Las Rivas, J., Barber, J. (1997) Structure and thermal stability of photo system II reaction centers studied by infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 36: 8897-8903.
- De Las Rivas, J., Telfer, A., Barber, J. (1993) Two coupled beta-carotene molecules protect P<sub>680</sub> from photodamage in isolated photosystem two reaction centres. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1142: 155-164.

- Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1020: 1-24.
- Demmig-Adams, B., Adams III, W. W. (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 599-626.
- Demmig-Adams, B., Adams III, W. W., Barry, A. L., Verhoeven, A. S. (1995) Xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and flexible photosystem II efficiency in plants acclimated to light stress. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 249-260.
- Demmig-Adams, B., Adams III, W. W., Baker, D.H., Logan, B. A., Bowling, D. R., Verhoeven, A. S. (1996) Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum*, 98: 253-264.
- Dias, D. P., Marenco, R. A. (2006) Photoinhibition of photosynthesis in *Minquartia guianensis* and *Swietenia macrophylla* inferred by monitoring the initial fluorescence. *Photosynthetica*, 44: 235-240.
- Dias, P. C., Araújo, W. L., Moraes, G. A. B. K., Barros, R. S., DaMatta, F. M. (2007) Morphological and physiological responses of two coffee progenies to soil water availability. *Journal of Plant Physiology*, 164: 1639-1647.
- Devaux, C., Baldet, P., Joubés, J., Dieuaide-Noubhni, M., Just, D., Chevalier, C., Raymond, P. (2003) Physiological, biochemical and molecular analysis of sugar-starvation responses in tomato roots. *Journal of Experimental Botany*, 54: 1143-1151.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.J. (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 92: 696-717.
- Fredeen, A. L., Raab, T. K., Rao, I. M., Norman, Terry, N. (1990) Effects of phosphorus nutrition on photosynthesis in *Glycine max* (L.) Merr. *Planta*, 181: 399-405.
- Flexas, J., Medrano, H. (2002) Drought-inhibition of photosynthesis in C<sub>3</sub> plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of botany*, 89: 183-189.
- Gomes Júnior, R. A., Moldes, C. A., Delite, F. S., Pompeu, G. B., Gratão, P. L., Mazzafera, P., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2006). Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere*, 65: 1330-1337.
- Haldimann, P. (1998) Low growth temperature-induced changes to pigment composition and photosynthesis in *Zea mays* genotypes differing in chilling sensitivity. *Plant, Cell and Environment*, 21: 200-208.

- Halford, N., Purcell, P., Hardie, D. (1999) Is hexokinase really a sugar sensor in plants? *Trends in Plant Science*, 4: 117-120.
- Hideg, E., Kós, P. B., Vass, I. (2007) Photosystem II damage induced by chemically generated singlet oxygen in tobacco leaves. *Physiologia Plantarum*, 131: 33-40.
- Holá, D., Kočová, M., Rothová, O., Wilhelmová, N., Benešová, M. (2007) Recovery of maize (*Zea mays* L.) inbreds and hybrids from chilling stress of various duration: Photosynthesis and antioxidant enzymes. *Journal of Plant Physiology*, 164: 868-877
- Horton, P., Ruban, A. V., Walters, R. G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 655-684.
- Hund, A., Fracheboud, Y., Soldati, A., Stamp, P. (2008) Cold tolerance of maize seedlings as determined by root morphology and photosynthetic traits. *European Journal of Agronomy*, 28: 178-185.
- Hurry, V., Huner, N., Selstam, E., Gardeström, P., Öquist, G. (1998) Photosynthesis at low growth temperatures. In: Raghavendra, A. S. (Ed.) *Photosynthesis. A comprehensive treatise*. Cambridge: University Press, p. 238-249.
- ICO, International Coffee Organization. *Trade statistics*. Disponível em: [http://www.ico.org/coffee\\_prices.asp](http://www.ico.org/coffee_prices.asp). Acesso em: 21 de fevereiro de 2008.
- Imanishi, H., Suzuki, T., Masuda, K., Harada, T. (1998) Accumulation of raffinose and stachyose in shoot apices of *Lonicera caerulea* L. during cold acclimation. *Scientia Horticulturae*, 72: 255-263.
- Jiang, Y., Huang, B. (2001) Osmotic adjustment and root growth associated with drought preconditioning-enhanced heat tolerance in Kentucky bluegrass. *Crop Science*, 41: 1168-1173.
- Kihara, T., Wada, T., Suzuki, Y., Hara, T., Koyama, H. (2003) Alteration of citrate metabolism in cluster roots of white lupin. *Plant, Cell and Environment*, 49: 901-908
- Klotke, J., Kopka, J., Gatzke, N., Heyer, A. G. (2004) Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation - evidence for a role of raffinose in cold acclimation. *Plant, Cell and Environment*, 27: 1395-1404.
- Konrad, M. L. F., Silva, J. A. B. da, Furlani, P. R., Machado, E. C. (2005) Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. *Bragantia*, 64: 339-347.
- Krause, G. H. (1994) Photoinhibition induced by low temperature. In: Baker, N. R., Bowyer, J. R. (Eds.) *Photoinhibition of photosynthesis – from molecular*

*mechanisms to the field*. Environmental plant biology series, Oxford: bios scientific Publishers, p. 331-348.

- Krause, G. H., Weis, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology*, 42: 313-349.
- Krupa, Z., Öquist, G., Huner, N. P. (1993) The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* – a fluorescence analysis. *Physiologia Plantarum*, 88: 626-630.
- Larcher, W. (1981) Effects of low temperature stress and frost injury on plant productivity. In: Johnson CB (Ed.), *Physiological Processes Limiting Plant Productivity*, London, Butterworths, p. 253-269.
- Leegood, R.C. (1995) Effects of temperature on photosynthesis and photorespiration. In Smirnov N. (Ed.), *Environment and Plant Metabolism – Flexibility and Acclimation*. Oxford Bios Scientific Publishers, p. 45-62.
- Libardi, V. C. M., Amaral, J. A. T., Amaral, J. F. T. (1998) Crescimento vegetativo sazonal do cafeeiro (*Coffea canephora* Pierre var. Conilon) no sul do Estado do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, 6: 23-28.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350-382.
- Lima, A. L. S., DaMatta, F. M., Pinheiro, A. H., Totola, M. R., Loureiro, M. E. (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 47: 239-247.
- Li, X. P., Bjorkman, O., Shih, C., Grossman, A. R., Rosenquist, M., Jansson, S., Niyogi, K. K. (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature*, 403: 391-395.
- López-Millán, A. Morales, F., Andaluz, S., Gogorcena, Y., Abadía, A., De Las Rivas, J., Abadía, J. (2000) Responses of sugar beet roots to iron deficiency. Changes in carbon assimilation and oxygen use. *Plant Physiology*, 124: 885-897.
- Lu, Y., Sharkey, T. D. (2006) The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant, Cell and Environment*, 29: 353-366.
- Maroco, J. P., Edwards, G. E., Ku, M. S. B. (1999) Photosynthetic acclimation of maize to growth under elevated carbon dioxide. *Planta*, 210: 115-125.
- Maroco, J. P., Rodrigues, M. L., Lopes, C., Chaves, M. M. (2002) Limitations to leaf photosynthesis in Field-grown grapevine under drought – metabolic and modelling approaches. *Functional Plant Biology*, 29: 451-459.
- Maxwell, K., Johnson, G. N. (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51: 659-668.

- Ma, Y-Z., Holt, N. F., Li, X-P., Niyogi, K. K., Fleming, G. R. (2003) Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100: 4377-4382.
- Miao, M., Xu, x., Chen, X., Xue, L., Cao, B. (2007) Cucumber carbohydrate metabolism and translocation under chilling night temperature. *Journal of Plant Physiology*, 164: 621-628.
- Millar, A. H., Atkin, O. K., Menz, R. I., Henry, B., Farquhar, G., Day, D. A. (1998) Analysis of respiratory chain regulation in roots of soybean seedlings. *Plant Physiology*, 117: 1083-1093.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405-410.
- Morcuende, R., Pérez, P., Martínez-Carrasco, R., Molino, I. M., Puente, L. S. (1996) Long- and short-term responses of leaf carbohydrate levels and photosynthesis to decreased sink demand in soybean. *Plant, Cell and Environment*, 19: 976-982.
- Morsy, M., Jouve, L., Hausman, J.-F., Hoffmann, L., Stewart J (2007) Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 164: 157-167.
- Mota, J. W. S., DaMata, F. M., Barros, R. S., Maestri, M. (1997) Vegetative growth in *Coffea arabica* L. as affected by irrigation, daylength and fruiting. *Tropical Ecology*, 38: 73-79.
- Müller, M., Hernández, I., Alegre, L., Munné-Bosch, S. (2006) Enhanced  $\alpha$ -tocopherol quinone levels and xanthophyll cycle de-epoxidation in rosemary plants exposed to water deficit during a Mediterranean winter. *Journal of Plant Physiology*, 163: 601-606.
- Müller, P., Li, X-P., Niyogi, K. K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 155: 1558-1566.
- Nazareno, R. B., Oliveira, C. A. S., Sanzonowicz, C., Sampaio, J. B. R., Silva, J. C. P., Guerra, A. F. (2003) Crescimento inicial do cafeeiro Rubi em respostas a doses de nitrogênio fósforo e potássio e a regime hídricos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 903-910.
- Niyogi, K. K. (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 333-359.
- Oliveira, J. G., Alves, P. L. C. A., Magalhães, A. C. (2002) The effect of chilling on the photosynthetic activity in coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. The proactive action of chloroplastid pigments. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14: 95-104.

- Palonen, P., Buszard, D., Donnelly, D. (2002) Changes in carbohydrates and freezing tolerance during cold acclimation of red raspberry cultivars grown in vitro and in vivo. *Physiologia Plantarum*, 110: 393-401.
- Parry, M. A. J., Andralojc, P. J., Khan, S. Lea, P. J., Keys, A. J. (2002) Rubisco activity: effects of drought stress. *Annals of Botany*, 89: 833-839.
- Paul, M. J., Foyer, C. H. (2001) Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1383-1400.
- Peltier, G., Cournac, L. (2002) Chlororespiration. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 523-550.
- Pinheiro, A. H., DaMatta, F. M., Chaves, A. R. M., Fontes, E. P. B., Loureiro, M. E. (2004) Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Science*, 167: 1307-1314.
- Pogson, B. J., Niyogi, K. K., Björkman, O., Dellapenna, D. (1998) Altered xanthophylls compositions adversely affected chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in *Arabidopsis* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95: 13324-13329.
- Praxedes, S. C., DaMatta, F. M., Loureiro, M. E., Ferrão, M. A. G., Cordeiro, A. T. (2006) Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 56: 263-273.
- Queiroz, C. G. S., Mares-Guia, M. L., Magalhães, A. C. (2000) Microcalorimetric evaluation of metabolic heat rates in coffee (*Coffea arabica* L.) roots of seedlings subjected to chilling stress. *Thermochimica Acta*, 351: 33-37.
- Ramalho, J. C., Pons, T., Groeneveld, H., Azinheira, H. G., Nunes, M. A. (2000) Photosynthetic acclimation to high light conditions in mature leaves of *Coffea arabica* L.: role of xanthophylls, quenching mechanisms and nitrogen nutrition. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27: 43-51.
- Ramalho, J. C., Pons, T. L., Groeneveld, H. W., Nunes, M. (1997) Photosynthetic response of *Coffea arabica* leaves to a short-term high exposure in relation to N availability. *Physiologia Plantarum*, 101: 229-239.
- Ramalho, J. C., Campos, P. S., Teixeira, M., Nunes, M. A. (1998) Nitrogen dependent changes in antioxidant system and in fatty acid composition of chloroplast membranes from *Coffea arabica* L. plants submitted to high irradiance. *Plant Science*, 135: 115-124.
- Ramalho, J. C., Campos, P. S., Quartin, V. L., Silva, M. J., Nunes, M. A. (1999) High irradiance impairments on photosynthetic electron transport, rubulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and N assimilation as a function of N

- availability in *Coffea arabica* L plants. *Journal of Plant Physiology*, 154: 319-326.
- Ramalho, J. C., Marques, N. C., Smedo, J. N., Matos M. C., Quartin, V. L. (2002) Photosynthetic performance and pigment composition of leaves from two tropical species is determined by light quality. *Plant Biology*, 4: 112-120.
- Ramalho, J. C., Quartin, V. L., Leitão, E., Campos, P. S., Carelli, M. L. C., Fahl, J. I., Nunes, M. A. (2003) Cold acclimation ability and photosynthesis among species of the tropical *Coffea* genus. *Plant Biology*, 5: 631-641.
- Rena, A. B. (2000) *Conseqüências fisiológicas das baixas temperaturas no cafeeiro*. Circular Técnica. Lavras: EPAMIG/CRSM, 2000, n. 99.
- Ribas-Carbo, M., Aroca, R., González-Meler, M. A. Irigoyen, J. J., Sánchez-Díaz, M. (2000) The electron partitioning between the cytochrome and alternative respiratory pathways during chilling recovery in two cultivars of maize differing in chilling sensitivity. *Plant Physiology*, 122: 199-204.
- Ribeiro, R. V., Machado, E. C., Oliveira, R. F. (2004) Growth and leaf temperature effects on photosynthesis of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Plant Pathology*, 53: 334-340.
- Rejsková, A., Patková, L., Stodulková E., Lipavska, H. (2007) The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under in vitro conditions. *Journal of Plant Physiology*, 164: 174-184
- Rodrigues, A. P. D. (2005) *Adaptação do Lupinus albus L. ao déficit hídrico caracterização fisiológica e bioquímica*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Lisboa, Universidade Técnica de Lisboa, 58p.
- Rolland, F. Moore, B., Sheen, J. (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell*, (Supplement, 2002) 14: 185-205.
- Ronchi, C. P., DaMatta, F. M., Batista, k. D., Moraes, G. A. B. K., Loureiro, M. E., Ducatti, C. (2006) Growth and photosynthetic down-regulation in *Coffea arabica* in response to restricted root volume. *Functional Plant Biology*, 33: 1013-1023.
- Ruban, A. V., Horton, P. (1995) Regulation of Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 221-230.
- Sage, R. F. (1994) Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO<sub>2</sub>: the gas exchange perspective. *Photosynthesis Research*, 39: 351-368.
- Sage, R. F., Sharkey, T. D. (1987) The effect of temperature on the occurrence of OZ and COZ insensitive photosynthesis in field grown plants. *Plant Physiology*, 84: 658-664.
- Salvucci, M. E., Crafts-Brandner, S. J. (2004) Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of rubisco activase in



- plants from contrasting thermal environments. *Plant Physiology*, 134: 1460-1470.
- Schindler, C., Reith, P., Lichtenthaler, H. K. (1994) Differential levels of carotenoids and decrease of zeaxanthin cycle performance during leaf development in a green and an aurea variety of tobacco. *Journal of Plant Physiology*, 143: 500-507.
- Sena, J. O. A. de, Zaidan, H. A., Castro, P. R. de e C. (2007) Transpiration and stomatal resistance variations of perennial tropical crops under soil water availability conditions and water deficit. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50: 225-230.
- Sera, G. H., Sera, S., Ito, D. S., Azevedo, J. A. de, Ribeiro Filho, C., Mata, J. S. da (2007) Partial resistance to fruit necrosis associated to *Colletotrichum* spp. among Arabic Coffee genotypes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50: 395-402.
- Silva, E. A., DaMatta, F. M., Ducatti, C., Regazzi, A. J., Barros, R. S. (2004) Seasonal changes in vegetative growth and photosynthesis of Arabica coffee trees. *Field Crops Research*, 89: 349-357.
- Simkin, A. J., Moreau, H., Kuntz, M., Pagny, G., Lin, C., Tanksley, S., McCarthy, J. (2008) An investigation of carotenoid biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. *Journal of Plant Physiology*, 165: 1087-1106.
- Strauss, A. j., Krüger, G. H. J., Strasser, R. J., van Heerden, P. D. R. (2007) The role of low soil temperature in the inhibition of growth and PSII function during dark chilling in soybean genotypes of contrasting tolerance. *Physiologia Plantarum*, 131: 89-105.
- Suzuki, K., Nagasuga, K., Okada, M. (2008) The chilling injury induced by high root temperature in the leaves of rice seedlings. *Plant, Cell Physiology*, 49: 433-442.
- Tapernoux-Lüthi, E. M., Böhm, A., Keller, F. (2004) Cloning, functional expression, and characterization of the raffinose oligosaccharide chain elongation enzyme, galactan:galactan galactosyltransferase, from common bugle leaves. *Plant Physiology*, 134: 1377-1387.
- Tezara, W., Mitchell, V. J., Driscoll, S. D., Lawlor, D. W. (1999) Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, 401: 914-917.
- Wang, P., Duan, W., Takabayashi, A., Endo, T. Shikanai, T. Ye, J-Y., Mi, H. (2006) Chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco leaves functions in alleviation of oxidative damage caused by temperature stress. *Plant Physiology*, 141: 465-474.

- Weiser, R.L., Wallner, S.J., Waddell J.W. (1990) Cell wall and extensin mRNA changes during cold acclimation of pea seedlings. *Plant Physiology*, 93: 1021-1026.
- White, A. J., Critchley, C. (1999) Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynthesis Research*, 59: 63-72.
- Zhu, S-Q., Zhao, H., Liang, J-S., Ji, B-H., Jiao, D-M. (2008) relationships between phosphatidylglycerol molecular species of thylakoid membrane lipids and sensitivities to chilling-induced photoinhibition in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50: 194-202.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Os objetivos neste trabalho foram: No **primeiro Capítulo**, avaliar, em condições de campo, a interferência que as plantas de cobertura cultivadas nas entrelinhas de *Coffea canephora* cv. Conilon impõem sobre as plantas espontâneas, bem como verificar seu comportamento fitossociológico e avaliar a ciclagem de nutrientes, a fixação biológica de nitrogênio e o efeito que as plantas de cobertura podem causar em lavoura de *C. canephora* cv. Conilon, sob manejo orgânico; avaliar as características químicas e microbiológicas do solo sob cafeeiros Conilon (*C. canephora*) em manejo orgânico e convencional. No **segundo capítulo**, foi avaliar o impacto de baixas temperaturas positivas na maquinaria fotossintética, através da análise da composição lipídica das membranas dos cloroplastos e na taxa fotossintética, em dois genótipos de *Coffea* sp. submetidos a baixas temperaturas positivas; e contribuir para a caracterização das respostas fisiológicas e bioquímicas de dois importantes genótipos de *C. canephora* e um genótipo de *C. arábica*, a baixas temperaturas positivas e ao período de recuperação subsequente, permitindo elucidar os mecanismos envolvidos em diferentes suscetibilidade a baixas temperaturas.

Os resultados encontrados sugerem as seguintes conclusões:

##### **Capítulo 1:**

As plantas de cobertura promovem modificações na dinâmica de sucessão de plantas espontâneas e não prejudicam o desenvolvimento do cafeeiro.

Feijão-de-porco, mucuna-anã e milho auxiliam no controle de plantas espontâneas.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) contribuiu com cerca de 80% do N acumulado pelas leguminosas, sendo que em função da produção de biomassa seca a contribuição foi equivalente a 27 - 35 kg N ha<sup>-1</sup>.

As leguminosas podem suprir parte da necessidade de nitrogênio do cafeeiro Conilon.

A inoculação com rizóbio não influenciou a ciclagem de nutrientes e FBN.

O carbono da biomassa microbiana foi o atributo microbiológico do solo que mais contribuiu para agrupar as diferentes formas de cultivo.

O solo do fragmento de mata Atlântica, seguido pelo solo de café Conilon sob manejo orgânico, apresentaram melhor qualidade de solo.

Os atributos microbiológicos variaram conforme a época do ano e profundidade do solo, apresentando maiores valores de carbono e nitrogênio da biomassa microbiana na camada superficial, no mês de janeiro.

Do ponto de vista nutricional, os sistemas de manejo estudados (café orgânico e convencional) apresentaram comportamento similar.

## **Capítulo 2:**

O Conilon clone 02 foi o genótipo mais afetado, apresentando maior queda de folhas e menor recuperação da fotossíntese líquida, seguido pelo clone 153.

A queda da fotossíntese líquida ocorreu em todos os genótipos estudados e não esteve relacionada ao fechamento estomático, mas sim associada a problemas de funcionamento da estrutura membranar dos cloroplastos.

Apesar de os 3 genótipos serem significativamente afetados pelas baixas temperaturas positivas, o Catucaí IPR 102 mostrou uma maior capacidade de recuperação.

O Catucaí IPR 102 apresentou maior grau de insaturação de lipídios, na temperatura de 18/13°C e maior ácido linolênico no fosfatidilglicerol no controle até a temperatura de 13/8°C, em comparação aos clones de Conilon, apresentando maior fluidez membranar em baixas temperaturas positivas.

A melhor recuperação do Catucaí IPR 102, em comparação ao Conilon clone 02, pode estar associada, além de outros fatores, à maior taxa de atividade

da ribulose-5P cinase, rubisco e malato desidrogenase (nos ciclos de baixas temperaturas e no início da recuperação), bem como a maiores concentrações de clorofilas e carotenóides totais (no período de recuperação), zeaxantina e luteína (em praticamente em todos os pontos avaliados).

A manutenção de maior grau de funcionalidade pode estar ligada à manutenção da concentração da sacarose, com a imposição de baixas temperaturas.

O Conilon clone 153 apresentou melhor recuperação em comparação ao clone 02, sugerindo que, mesmo em diferentes genótipos selecionados a partir de uma mesma cultivar (*C. canephora* cv. Conilon), pode existir variabilidade genética relativamente aos mecanismos de proteção e aclimatação a baixas temperaturas.

Avaliações de características fisiológicas e bioquímicas contribuem no manejo e na escolha de genótipos mais adequados para áreas sujeitas a períodos de baixas temperaturas e pode ser uma ferramentas no processo de melhoramento do gênero *Coffea*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, G., Duncan, H. (2001) Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 943-951.
- Adams III, W. W., Barker, D. H. (1998) Seasonal changes in xanthophylls cycle-dependent energy dissipation in *Yucca glauca* Nuttall. *Plant, Cell and Environment*, 21: 501-511.
- Adams III, W. W., Demmig-Adams, B. (1995) The xanthophylls cycle and sustained thermal energy dissipation in *Vinca minor* and *Euonymus kiautschovicus* in winter. *Plant, Cell and Environment*, 18: 117-127.
- Adams III, W. W., Demmig-Adams, B., Rosenstiel, T. N., Brightwell, A. K., Ebbert, V. (2002) Photosynthesis and photoprotection in overwintering plants. *Plant Biology*, 4: 545-557.
- Adams III, W. W., Demmig-Adams, B., Verhoeven, A. S., Barker, D. H. (1995) "Photoinhibition" during winter stress: Involvement of sustained xanthophylls cycle-dependent energy dissipation. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 261-276.
- Agnelli, A., Ascherb, J., Ceccherinib, G. C. M. T., Nannipieri, P., Pietramellara, G. (2004) Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. *Soil Biology & Biochemistry*, 36: 859-868.
- Alègre, C. (1959) Climats et caféiers d'Arabie. *Agronomie Tropicale*, 14: 23-58.
- Allen, C. F., Good, P., Davis, H. F., Crisum, P., Fowler, S. D. (1966) Methodology for the separation of plant lipids and application in spinach leaf and chloroplast lamellae. *Journal Am. Oil Chemist's Soc.*, 43: 223-231.
- Allen, D. J., Ort, D. R. (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science*, 6: 36-42.

- Alonso, A., Queiroz, C. S., Magalhães, A. C. (1997) Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1323: 75-84.
- Altieri, M. A. (1999) The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74: 19-31.
- Alvarenga, M.I.N., Martins, M., Paula, M. B. de (2002) Manejo ecológico da propriedade cafeeira orgânica: Café orgânico. *Informe Agropecuário*, 23: 21-31.
- Alves, B. J. R., Zotarelli, L., Fernandes, F. M., Heckler, J. C., Macedo, R. A. T., Boddey, R. M., Jantalia, C. P., Urquiaga, S. (2006) Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41: 449-456.
- Alves, S. M. C., Abboud, A. C., Ribeiro, R. L. D., Almeida, D. L. (2004) Balanço do nitrogênio e fósforo em solo com cultivo orgânico de horaliças após a incorporação de biomassa de guandu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 1111-1117.
- Amaral, J. A. T., DaMatta, F. M., Rena, A. B. (2001) Effects of fruiting on the growth of Arabica coffee trees as related to carbohydrate and nitrogen status and to nitrate reductase activity. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13: 66-74.
- Amaral, J. A. T., Rena, A. B., Amaral, J. F. T. (2006) Crescimento vegetativo sazonal do cafeeiro e sua relação com fotoperíodo, frutificação, resistência estomática e fotossíntese. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41: 377-384.
- Ambrosano, E. J., Trivelin, P. C. O., Cantarella, H., Ambrosano, G. M. B., Schammas, E. A., Guirado, N., Rossi, F., Mendes, P. C. D., Muraoka, T. (2005) Utilization of nitrogen from green manure and mineral fertilizer by sugarcane. *Scientia Agrícola*, 62: 534-542.
- Anderson, T. H. (2003) Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture Ecosystems Environment*, 98: 285-293.
- Anderson, T. H., Domsch, K. H. (1993) The metabolic quotient ( $qCO_2$ ) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology Biochemistry*, 25: 393-395.
- Andrade, C. A. de, Oliveira, C. de, Cerri, C. C. (2005) Qualidade da matéria orgânica e estoques de carbono e nitrogênio em latossolo tratado com bio-sólido e cultivado com eucalipto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29: 803-816.
- Anthofer, J., Kroschel, J. (2005) Above-ground biomass, nutrients, and persistence of an early and a late maturing *Mucuna* variety in the Forest-

- Savannah Transitional Zone of Ghana. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 110: 59-77.
- Apostolova, E. L., Domonkos, I., Dobrikova, a. G., Sallai, A., Bogos, B., Wada, H., Gombos, Z., Taneva, S. G. (2008) Effect of phosphatidylglycerol depletion on the surface electric properties and the fluorescence emission of thylakoid membranes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 91: 51-57.
- Aroca, R., Vernieri, P., Irigoyen, J. J., Sánchez-Díaz, M., Tognoni, F., Pardossi, A. (2003) Involvement of abscisic acid in leaf and root of maize (*Zea mays* L.) in avoiding chilling-induced water stress. *Plant Science*, 165: 671-679.
- Araújo, J. B. S. (2001) Manejo de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp na cultura do café, em sistema de cultivo orgânico. *Anais do Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, 26, Marília: MAA-SARQ/PROCAFÉ, p. 109-110.
- Araujo, J. C., Moura, E. G., Aguiar, A. C. F., Mendonça, V. C. M. (2007) Supressão de plantas daninhas por leguminosas anuais em sistema agroecológico na Pré-Amazônia. *Planta Daninha*, 25: 267-275.
- Assis Júnior, S. L., Zanuncio, J. C., Kasuya, M. C. M., Couto, L., Melido, R. C. N. (2003) Atividade microbiana do solo em sistemas agroflorestais, monoculturas, mata natural e áreas desmatada. *Revista Árvore*, 27: 35-41.
- Balesdent, J., Chenu, C., Balabane, M. (2000) Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil and Tillage Research*, 53: 215-230.
- Baligar, V. C., Fageria, N. K., Paiva, A. Q., Silveira, A., Pomella, A. W. V., Machado, R. C. R. (2006) Light intensity effects on growth and micronutrient uptake by tropical legume cover crops. *Journal of Plant Nutrition*, 29: 1959-1974.
- Balota, E. L., Colozzi Filho, A., Andrade, D. S., Dick, R. P. (2004) Long-term tillage and crop rotation effects on microbial biomass and C and N mineralization in a Brazilian Oxisol. *Soil & Tillage Research*, 77: 137-145.
- Balota, E. L., Colozzi Filho, A., Andrade, D. S., Hungria, M. (1998) Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 22:641-649.
- Barbosa, J. P. R. A. D., Soares, A. M., Alvarenga, M. I. N., Alves, J. D., Gardin, J. P. P. (2005) Crescimento de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) associado à deposição no solo da fitomassa de leguminosas arbóreas no sul de Minas Gerais. *Anais do Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, 4, CD-ROM, Londrina: EMBRAPA CAFÉ, sp.
- Barros, R. S., Maestri, M. (1974) Influência dos fatores climáticos sobre a periodicidade de crescimento vegetativo do café (*Coffea arabica* L.). *Revista Ceres*, 21: 268-279.



- Barros, R. S., Mota, J. W. S., DaMatta, F. M., Maestri, M. (1997) Decline of vegetative growth in *Coffea arabica* L. in relation to leaf temperature, water potential and stomatal conductance. *Field Crops Research*, 54: 65-72.
- Bascuñán-Godoy, L., Uribe., E., Zúñiga-Feest, A., Corcuera, L. J., Bravo, L. A. (2006) Low temperature regulates sucrose-phosphate synthase activity in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. By decreasing its sensitivity to Pi and increased activation by glucose-6-phosphate. *Polar Biology*, 29: 1011-1017.
- Baudoin, E., Benizri, E., Guckert, A. (2003) Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 1183-1192.
- Bauer, H., Comploj, A., Bodner, M. (1990) Susceptibility to chilling of some central-African cultivars of *Coffea arabica*. *Field Crops Research*, 24: 119-129.
- Bayer, C., Mielniczuk, J. (1997) Características químicas do solo afetadas por métodos de preparo sistemas de cultura. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 21: 105-112.
- Bayer, C., Mielniczuck, J., Amado, T. J. C., Martin-Neto, L., Fernandes, S. V. (2000) Organic matter storage in a Sandy Clay loam Acrisoleffected tillage and cropping systems in southern Brazil. *Soil & Tillage Research*, 54: 101-109.
- Bebé, F. V., Matsumoto, S. N., Araújo, G. S., Rebouças, A. C. M. N., Silva, S. O., Silva, G. B. (2005) Associação entre cafezais e grevéleas no município de Barra do Choça, Bahia, Brasil. *Anais do Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, 4, CD-ROM, Londrina: EMBRAPA CAFÉ, sp.
- Bergo, C. L., Pacheco, E. P., Mendonça, H. A., Marinho, J. T. S. (2006) Avaliação de espécies leguminosas na formação de cafezais no segmento da agricultura familiar no Acre. *Acta Amazônica*, 36: 19-24.
- Bertamini, M., Muthuchelian, K., Nedunchezian, N. (2004) Photoinhibition of photosynthesis in sun and shade grown leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Photosynthetica*, 42: 7-14.
- Boddey, R. M., Peoples, M. B., Palmer, B., Dart, P. J. (2000) Use of <sup>15</sup>N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 57: 235-270.
- Boer, C. A., Assis, R. L. de, Silva, g. P., Braz, A. J. B. P., Barroso, A. L. de L., Cargnelutti Filho, A., Pires, F. R. (2007) Ciclagem de nutrientes por plantas de cobertura na entressafra em um solo de cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42: 1269-1276.
- Bohn, M., Lüthje, S., Sperling, P., Heinz, E., Dörffling, K. (2007) Plasma membrane lipid alterations induced by cold acclimation and abscisic acid treatment of winter wheat seedlings differing in frost resistance. *Journal of Plant Physiology*, 164: 146-156.

- Bragança, S. M., Carvalho, C. H. S., Fonseca, A. F. A., Ferrão, R. V. (2001) Variedades clonais de café Conilon para o Estado do Espírito Santo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36: 765-770.
- Brasil. (2003) Precidência da República. Casa Civil Subchefia de Assuntos Jurídicos. Lei nº 10831 de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de dezembro de 2003.
- Brooks, A. (1986) Effects of phosphorus nutrition on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activation, photosynthetic quantum yield and amounts of some calvin-cycle metabolites in spinach leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13: 221-237.
- Byrd, G. T., Ort, D. R., Ôgren, W. L. (1995) The effects of chilling in the light on the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Physiology*, 107: 585-591.
- Caetano, R. S. X., Christoffoleti, P. J., Victoria Filho, R. (2001) “Banco” de sementes de plantas daninhas em pomar de laranja ‘Pera’. *Scientia Agricola*, 58: 509-517.
- Cai, C-T., Cai, Z-Q., Yao, T-Q., Qi, X. (2007) Vegetative growth and photosynthesis in coffee plants under different watering and fertilization managements in Yunnan, SW China. *Photosynthetica*, 45: 455-461.
- Caixeta, I. F., Pedini, S. (2002) Comercialização de café orgânico: Café orgânico. *Informe Agropecuário*, 23: 149-152.
- Calegari, A. (1998) *Espécie para cobertura do solo*. In: Plantio direto: pequena propriedade sustentável. Londrina: Iapar, 255p.
- Calegari, A., Mondardo, A., Bulazini, E. A., Costa, M. B. B. da, Miyasaka, S., Amado, T. J. C. (1993) Aspectos gerais da adubação verde. In: Costa, M. B. B. da (Coord.) *Adubação verde no sul do Brasil*. Rio de Janeiro: AS-PTA, p. 01-55.
- Camargo, A. P. de, Camargo, M. B. P. de. (2001) Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. *Bragantia*, 60: 65-68.
- Campos, P., Pham-Thi, A.T. (1995) Effects of drought stress on enzymatic breakdown of galactolipids in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) leaves. In: J. C. Kader, P. Mazliak (Eds.), *Plant Lipid Metabolism*, Kluwer, Dordrecht, ISBN 0 7923 3250 4, p. 426-428.
- Campos, P. S., Quantin, V., Ramalho, J. C., Nunes, M. A. (2003) Eletrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. Plants. *Journal of Plant Physiology*, 160: 283-292.

- Campos, P. S., Silva, J. V. da, Pham Thi, A. T. (1999) Effect of water stress on membrane integrity and enzymatic breakdown of galactolipids in *Vigna* sp. *Agronomia Lusitana*, 47: 185-196.
- Canellas, L. P., Espindola, J. A. A., Guerra, J. G. M., Teixeira, M. G., Velloso, A. C. X., Rumjanek, V. M. (2004) Phosphorus analysis in soil under herbaceous perennial leguminous cover by nuclear magnetic spectroscopy. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 589-596.
- Canellas, L. P., Espindola, J. A. A., Rezende, C. E., Camargo, P. B., Zandonadi, D. B., Rumjanek, V. M. Guerra, J. G. M., Teixeira, M. G., Braz-Filho, R. (2004b) Organic matter quality in a soil cultivated with perennial herbaceous legumes. *Scientia Agrícola*, 61: 53-61.
- Canellas, L. P., Velloso, A. C. X., Marciano, C. R., Ramalho, J. F. G. P., Rumjanek, V. M., Rezende, C. E., Santos, G. A. (2003) Propriedades químicas de um Cambissolo cultivado com cana-de-açúcar, com preservação do palhicho e adição de vinhaça por longo tempo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 27: 935-944.
- Caramori, P. H., Gorreta, R. H., Chaves, J. C. D., Morais, H. (1998) Proteção de cafezais contra geadas através do plantio intercalar de guandu (*Cajanus cajan*). *Anais do Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, 24, Poços de Caldas: MAA-SDR/PROCAFÉ, p. 146-147.
- Caramori, P. H., Morais, H. (1999) Proteção de cafezais recém plantados contra geadas através do plantio intercalar de espécies anuais. *Anais do Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, 25, Franca: MAA-SDR/PROCAFÉ, p. 111-112.
- Carneiro, R. G., Mendes, I. De C., Lovato, P. E., Carvalho, A. M. de, Vivaldi, L. J. (2004) Indicadores biológicos associados ao ciclo de fósforo em solos de Cerrado sob plantio direto e plantio convencional. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39:661-669.
- Carvalho, L. M., Silva, E. A. M., Azevedo, A. A., Mosquim, P. R., Cecon, P. R. (2001) Aspectos morfofisiológicos das cultivares de cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conilon. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36: 411-416.
- Carvalho, M. A. C. de, Athayde, L. F., Soratto, R. P., Alves, M. C., Sá, M. E. de (2004) Adubação verde e sistemas de manejo do solo na produtividade do algodoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39:1205-1211.
- Castellazzi, M. S., Brookes, P. C., Jenkinson, D. S. (2004) Distribution of microbial biomass down soil profiles under regeneration woodland. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1485-1489.
- Castellini, C., Bastianoni, S., Granai, C., Dal Bosco, A., Brunetti, M. (2006) Sustainability of poultry production using the emergy approach: Comparison of conventional and organic rearing systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 114: 343-350.

- Castro, C. M. de, Alves, B. J. R., Almeida, D. L. de, Ribeiro, R. de L. D. (2004) Adubação verde como fonte de nitrogênio para a cultura da berinjela em sistema orgânico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39:779-785.
- Castro Neto, P., Fraga, A. C., Monteiro, J. V., Schmidt, P. A. Ferreira, J. B., Castro, H. P., Avelar, R. C., Araújo, J. C. (2004) Produção da mamona com diferentes arranjos populacionais em lavouras de café recepado. *Anais do Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, 30, São Lourenço: MAPA-SDR/PROCAFÉ, p. 208-209.
- Chalk, P. M., Souza, R. de F., Urquiaga, S., Alves, B. J. R., Boddey, R. M. (2006) The role of arbuscular mycorrhiza in legume symbiotic performance. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 2944-2951.
- Chaves, J. C. D. (1999) Efeito de adubações mineral, orgânica e verde sobre a fertilidade do solo, nutrição e produção do cafeeiro. *Anais do Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, 1, CD-ROM, Poços de Caldas: EMBRAPA CAFÉ, p. 1389-1392.
- Chinthapalli, B., Murmu, L., Raghavendra, A. S. (2003) Dramatic difference in the responses of phosphoenolpyruvate carboxylase to temperature in leaves of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Journal of Experimental Botany*, 54: 707-714.
- Chu, G. X., Shen, Q. R., Cao, J. L. (2004) Nitrogen fixation and N transfer from peanut to rice cultivated in aerobic soil in an intercropping system and its affect on soil N fertility. *Plant and Soil*, 263: 17-27.
- Coelho, M. J. H. (Ed.) (2002) *Café do Brasil: o sabor amargo da crise*. Florianópolis: Contag, 55p.
- Coelho, R. A., Ricci, M. S. F., Espindola, J. A. A., Costa, J. R. (2005) Influência do sombreamento com leguminosas arbóreas sobre a população de plantas espontâneas em área cultivada com cafeeiro (*Coffea canephora*). *Anais do Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, 4, CD-ROM, Londrina: EMBRAPA CAFÉ, sp.
- Colozzi Filho, A., Cardoso, E. J. B. N. (2000) Detecção de fungos micorrízicos arbusculares em raízes de cafeeiro e de crotalária cultivada na entrelinha. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35: 2033-2042.
- Conab, Companhia Nacional de Abastecimento (2007) *Primeiro levantamento de café 2007/2008*. Acesso em: 15 de Fevereiro de 2007. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3BoletimCafe.pdf>.
- Conte, E., Anghinoni, I., Rheinheimer, D. S. (2002) Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatase ácida após a aplicação de fosfato em solo no sistema de plantio direto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 26: 925-930.

- Coser, T. R., Ramos, M. L. G., Amabile, R. F., Ribeiro Júnior, W. K. (2007) Nitrogênio da biomassa microbiana em solo de Cerrado com aplicação de fertilizante nitrogenado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42: 399-406.
- Costa, M. B. B. (1993) *Adubação verde no sul do Brasil*. Rio de Janeiro: AS-PTA, 346p.
- Covey-Crump, E. M., Bykova, N. V., Affourtit, C., Hoefnagel, M. H. N., Gardeström, P., Atkin, O. K., (2007). Temperature-dependent changes in respiration rates and redox poise of the ubiquinone pool in protoplasts and isolated mitochondria of potato leaves. *Physiologia Plantarum*, 129: 175-184.
- Cruz, C.D. (2001) *Programa genes (Versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística*. Viçosa: UFV, 648p.
- DaMatta, F. M. (2004) Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. *Field Crops Research*, 86: 99-114.
- DaMatta, F. M., Amaral, J. A. T., Rena, A. B. (1999) Growth periodicity in trees of *Coffea arabica* L. in relation to nitrogen supply and nitrate reductase activity. *Field Crops Research*, 60: 223-229.
- DaMatta, F. M., Loos, R. A., Silva, E. A., Loureiro, M. E. (2002) Limitation to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *Journal of Plant Physiology*, 159: 975-981.
- DaMatta, F. M., Maestri, M., Mosquim, P. R., Barros, R. S. (1997) Photosynthesis in coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) as affected by winter and summer conditions. *Plant Science*, 128: 43-50.
- Damatto Júnior, E. F., Leonel, S., Pedroso, C. J. (2005) Adubação orgânica na produção e qualidade de frutos de maracujá-doce. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 27: 188-190.
- Damesin, C., Lelarge, C. (2003) Carbon isotope composition of current-year shoots from *Fagus sylvatica* in relation to growth, respiration and use of reserves. *Plant, Cell and Environment*, 26: 207-219.
- D'Andréa, A. F., Silva, M. L. N., Curi, N., Siqueira, J. O., Carneiro, M. A. C. (2002) Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em sistemas de manejo na região do cerrado no Sul do Estado de Goiás. *Revista Brasileira de Ciência do solo*, 26:913-923.
- Danielsson, R., Albertsson, P. A., Mamedov, F., Styring, S. (2004) Quantification of photosystem I and II in different parts of the thylakoid membrane from spinach. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1608: 53-61.
- Darolt, M. R. (2003) *Cenário Internacional: situação da agricultura orgânica em 2003*. Disponível em: <<http://www.planetaorganico.com.br/Daroltmundo3.htm>>. Acesso em: 7 de abr. 2003.

- Das, P., Pal, R., Chowdhury, A. (2007) Effect of novaluron on microbial biomass, respiration, and fluorescein diacetate-hydrolyzing activity in tropical soils. *Biology and Fertility of Soils*, 44: 387-391.
- Davis, A. P., Govaerts, R., Bridson, D. M., Stoffelen, P. (2006) An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152: 465-512.
- Day, D. A., Lambers, H. (1983) Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Physiologia Plantarum*, 58: 155-160.
- Deffune, G. (2001) Potenciais, perspectivas e metodologia de pesquisa para a cafeicultura orgânica no Brasil. *Anais do Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, 27, Uberaba. PROCAFÉ, p. 182-185.
- De Las Rivas, J., Barber, J. (1997) Structure and thermal stability of photo system II reaction centers studied by infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 36: 8897-8903.
- De Las Rivas, J., Telfer, A., Barber, J. (1993) Two coupled beta-carotene molecules protect P<sub>680</sub> from photodamage in isolated photosystem two reaction centres. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1142: 155-164.
- Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1020: 1-24.
- Demmig-Adams, B., Adams III, W. W. (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 599-626.
- Demmig-Adams, B., Adams III, W. W., Barry, A. L., Verhoeven, A. S. (1995) Xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and flexible photosystem II efficiency in plants acclimated to light stress. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 249-260.
- Demmig-Adams, B., Adams III, W. W., Baker, D.H., Logan, B. A., Bowling, D. R., Verhoeven, A. S. (1996) Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum*, 98: 253-264.
- De-Polli, H.; Guerra, J. G. M. C. (1999) N e P na biomassa microbiana do solo. In: Santos, G. A., Camargo, F. A. O. (Eds.). *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre: Gênese, p. 389-411.
- Dewir, Y. H., Chakrabarty, D., Ali, M. B., Hahn, E. J., Paek, K. Y. (2006) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. *Environmental and Experimental Botany*, 58: 93-99.
- Dias, G. F. da S., Alves, P. L. da C. A., Souza, T. C. de. (2004) *Brachiaria decumbens* supresses the initial growth of *Coffea arabica*. *Scientia Agrícola*, 61: 579-583.

- Dias, D. P., Marenco, R. A. (2006) Photoinhibition of photosynthesis in *Minquartia guianensis* and *Swietenia macrophylla* inferred by monitoring the initial fluorescence. *Photosynthetica*, 44: 235-240.
- Dias, P. C., Araújo, W. L., Moraes, G. A. B. K., Barros, R. S., DaMatta, F. M. (2007) Morphological and physiological responses of two coffee progenies to soil water availability. *Journal of Plant Physiology*, 164: 1639-1647.
- Dias, P. F., Souto, S. M., Resende, A. S., Urquiaga, S., Rocha, G. P., Moreira, J. F., Franco, A. A. (2007) Transferência do N fixado por leguminosas arbóreas para o capim Survenola crescido em consórcio. *Ciência Rural*, 37: 352-356.
- Devaux, C., Baldet, P., Joubés, J., Dieuaide-Noubhni, M., Just, D., Chevalier, C., Raymond, P. (2003) Physiological, biochemical and molecular analysis of sugar-starvation responses in tomato roots. *Journal of Experimental Botany*, 54: 1143-1151.
- Doran, J. W., Parkin, T. B. (1994) Defining and assessing soil quality. In: Doran, J. W., Coleman, D. C., Bezdicek, D. F., Stewart, B. A. *Defining soil quality for a sustainable environment*. Madison, Soil Science Society of America. p.3-21. (SSSA Special Publication, 35).
- Doran, J. W., Parkin, T. B. (1996) Quantitative indicators of soil quality: a minimum data set. In: Doran, J. W., Jones, A. J. *Methods for assessing soil quality*. Madison, Soil Science Society of America. p.25-37. (SSSA Special Publication, 39).
- Drinnan, J. E., Menzel, C. M. (1995) Temperature affects vegetative growth and flowering of coffee (*Coffea arabica* L.). *Journal of Horticulture Science*, 70: 25-34.
- Dubertret, G., Gerard-Hirne, C., Trémolières, A. (2002) Importance of *trans*- $\Delta^3$ -hexadecenoic acid containing phosphatidylglycerol in the formation of the trimeric light-harvesting complex in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 829-836.
- Dufranc, G., Dechen, C. F., Freitas, S. S., Camargo, O. A. (2004) Atributos físicos, químicos e biológicos relacionados com a estabilidade de agregados de dois Latossolos em plantio direto no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 28: 505-517.
- Embrapa, Café (2004) *Consórcio Brasileiro de Pesquisas e desenvolvimento do café*. 147p
- Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Solos (1999). *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPS, 412p.
- Encarnação, R. de O., Lima, D. R. (2003) *Café & saúde humana*. Brasília: MAPA/CBPDC/ Embrapa, 64p. (Documentos, 01) ISSN. 1678-1694.

- Epstein, E., Bloom, A. J. (2006) *Nutrição Mineral de Plantas*. Trad. Nunes, M. E. T. Londrina, Editora Planta, 401p.
- Epstein, H. E., Lauenroth, W. K., Burke, I. C., Coffin, D. P. (1997) Productivity patterns of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> functional types in the US Great Plains. *Ecology*, 78: 722-731.
- Espindola, J. A. A., Guerra, J. G. M., Almeida, D. L., Teixeira, M. G., Urquiaga, S. (2006a) Decomposição e liberação de nutrientes acumulados em leguminosas herbáceas perenes consorciadas com bananeira. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30: 321-328.
- Espindola, J. A. A., Guerra, J. G. M., Perin, A., Teixeira, M. G., Almeida, D. L., Urquiaga, S., Busquet, E. N. B. (2006b) Bananeiras consorciadas com leguminosas herbáceas perenes utilizadas como coberturas vivas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41: 415-420.
- Faria, G. O., Carneiro, S. L., Matsumoto, S. N., Viana, A. E. S., Santos, P. R. P. (1999) Efeito do sombreamento da copa de grevilea em plantas de café (*Coffea arabica* L.). *Anais do Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, 25, Franca: MAA-SDR/PROCAFÉ, p. 122-122.
- Fávero, C., Jucksch, I., Alvarenga, R. C., Costa, L. M. da. (2001) Modificações na população de plantas espontâneas na presença de adubos verdes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36: 1355-1362.
- Feio, M. (1991) *Clima e Agricultura*. Ministério da Agricultura, pescas e Alimentação, Lisboa, 266p.
- Fernandes, A. L. T., Santinato, R., Dromond, L. C. D., Silva, R. P., Oliveira, C. B. (2000) Estudos de fontes e doses de matéria orgânica para adubação de cafeeiros cultivados no cerrado. In: *Simpósio De Pesquisa Dos Cafés Do Brasil*, 1., Poços de Caldas, 2000. Resumos expandidos. Brasília, EMBRAPA Café, 2000. p. 1024-1027.
- Fernandes, M. F., Barreto, A. C., Emídio Filho, J. (1999) Fitomassa de adubos verdes e controle de plantas daninhas em diferentes densidades populacionais de leguminosas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34: 1593-1600.
- Ferrari-Iliou, R., Pham-Thi, A.T., Mazliak, P., Vieira da Silva, J. (1992) Effets de la peroxydation des lipides membranaires sur la physiologie des végétaux, *Année Biologique*, 31: 1-23.
- Ferreira, A. S., Camargo, F. A. O., Vidor, C. (1999) Utilização de microondas na avaliação da biomassa microbiana do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 23: 991-996.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.J. (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiology Plantarum*, 92: 696-717.



- Fredeen, A. L., Raab, T. K., Rao, I. M., Norman, Terry, N. (1990) Effects of phosphorus nutrition on photosynthesis in *Glycyne max* (L.) Merr. *Planta*, 181: 399-405.
- Flexas, J., Medrano, H. (2002) Drought-inhibition of photosynthesis in C<sub>3</sub> plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of botany*, 89: 183-189.
- Gama-Rodrigues, E. F., Gama-Rodrigues, A. C., Barros, N. F. (1997) Biomassa microbiana de carbono e de nitrogênio de solos sob diferentes coberturas florestais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 21:361-365.
- Garcia, M. R. L., Nahas, E. (2007) Biomassa e atividades microbianas em solo sob pastagem com diferentes lotações de ovinos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 31: 269-276.
- Glover, J. D.; Reganold, J. P.; Andrews, P. K. (2000) Systematic method for rating soil quality of conventional, organic, and integrated apple orchards in Washington State. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 80: 29-45.
- Gomes Júnior, R. A., Moldes, C. A., Delite, F. S., Pompeu, G. B., Gratão, P. L., Mazzafera, P., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2006). Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere*, 65: 1330-1337.
- Gorreta, R. H. (1998) Plantio de feijão guandu (*Cajanus cajan*) intercalar aos cafeeiros para proteção na fase de formação da lavoura. *Anais do Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, 24, Poços de Caldas: MAA-SDR/PROCAFÉ, p. 145-146.
- Graham, M. H.; Haynes, R. J.; Meyer, J. H. (2002) Soil organic matter content and quality: effects of fertilizer applications, burning and trash retention on a long-term sugarcane experiment in South Africa. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 93-102.
- Gray, G. R., Ivanov, A. G., Krol, M., Williams, J. P., Kahn, M. U., Myscich, E. G., Huner, N. P. A. (2005). Temperature and light modulate the *trans*- $\Delta^3$ -hexadecenoic acid content of phosphatidylglycerol: light-harvesting complex II organization and non-photochemical quenching. *Plant and Cell Physiology*, 46: 1272-1282.
- Green, V. S., Stott, D. E., Diack, M. (2005) Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 693-701.
- Gündoğmuş, E. (2006) Energy use on organic farming: A comparative analysis on organic versus conventional apricot production on small holdings in Turkey. *Energy Conversion and Management*, 47: 3351-3359.
- Haldimann, P. (1998) Low growth temperature-induced changes to pigment composition and photosynthesis in *Zea mays* genotypes differing in chilling sensitivity. *Plant Cell Environmental*, 21: 200-208.

- Halford, N., Purcell, P., Hardie, D. (1999) Is hexokinase really a sugar sensor in plants? *Trends in Plant Science*, 4: 117-120.
- Harwood, J. L. (1997) Plant lipid metabolism. In: Dey, P. M., Harborne, J. B. (eds) *Plant Biochemistry*. Academic Press, San Diego, p 237-271.
- Hatch, D. J., Lovell, R. D., Antil, R. S., Jarvis, S. C., Owen, P. M. (2000) Nitrogen mineralization and microbial activity in permanent pastures amended with nitrogen fertilizer or dung. *Biology and Fertility of Soils*, 30:288-293.
- Heidstra, R., Bisseling, T. (1996) Nod factor-induced host responses and mechanisms of Nod factor perception. *New Phytologist*, 133: 25-43.
- Heinrichs, R., Vitti, G. C., Moreira, A., Fancelli, A. L. (2002) Produção e estado nutricional do milho em cultivo intercalar com adubos verdes. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 26: 225-230.
- Hideg, E., Kós, P. B., Vass, I. (2007) Photosystem II damage induced by chemically generated singlet oxygen in tobacco leaves. *Physiologia Plantarum*, 131: 33-40.
- Holá, D., Kočová, M., Rothová, O., Wilhelmová, N., Benešová, M. (2007) Recovery of maize (*Zea mays* L.) inbreds and hybrids from chilling stress of various duration: Photosynthesis and antioxidant enzymes. *Journal of Plant Physiology*, 164: 868-877
- Horton, P., Ruban, A. V., Walters, R. G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 655-684.
- Howard, J. B., Rees, D. C. (1996) Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chemistry*, 96: 2965-2982.
- Hund, A., Fracheboud, Y., Soldati, A., Stamp, P. (2008) Cold tolerance of maize seedlings as determined by root morphology and photosynthetic traits. *European Journal of Agronomy*, 28: 178-185.
- Huner, N., Williams, J. P., Maissan, E. E., Myscich, E. G., Krol, M., Laroche, A., Singh, J. (1989) Low temperature-induced decrease in *trans*- $\Delta^3$ -hexadecenoic acid content is correlated with freezing tolerance in cereals. *Plant Physiology*, 89: 144-150.
- Hungria, M., Vargas, M. A. T. (2000) Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65: 151-164.
- Hurry, V., Huner, N., Selstam, E., Gardeström, P., Öquist, G. (1998) Photosynthesis at low growth temperatures. In: Raghavendra, A. S. (Ed.) *Photosynthesis. A comprehensive treatise*. Cambridge: University Press, p. 238-249.

- Hurry, V., Huner, N., Selstam, E., Gardeström, P., Öquist, G. (2000) Photosynthesis at low growth temperatures. In: Raghavendra A.S. (Ed.) Photosynthesis. A comprehensive treatise. Cambridge, University Press, p. 238-249.
- Iba I. (2002) Acclimation response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 225-245.
- ICO, International Coffee Organization. *Trade statistics*. Disponível em: [http://www.ico.org/coffee\\_prices.asp](http://www.ico.org/coffee_prices.asp). Acesso em: 21 de fevereiro de 2008.
- Imanishi, H., Suzuki, T., Masuda, K., Harada, T. (1998) Accumulation of raffinose and stachyose in shoot apices of *Lonicera caerulea* L. during cold acclimation. *Scientia Horticulturae*, 72: 255-263.
- INCAPER – Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. (2007) *Caraterização climática do município de Jaguaré*. Disponível em: [http://siag.incaper.es.gov.br/jaguare\\_carac.htm](http://siag.incaper.es.gov.br/jaguare_carac.htm). Acesso em: 16 de fevereiro de 2007.
- Jenkinson, D. S., Brookes, P. C., Powlson, D. S. (2000) Measuring soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 5-7.
- Jiang, Y., Huang, B. (2001) Osmotic adjustment and root growth associated with drought preconditioning-enhanced heat tolerance in kentucky bluegras. *Crop Science*, 41: 1168-1173.
- Joos, F., Plattner, G. K., Stocker, T. F., Marchal, O., Schmittner, A. (1999) Global Warming and Marine Carbon Cycle Feedbacks on Future Atmospheric CO<sub>2</sub>. *Science*, 16: 464-467.
- Kaizzi, C. K., Ssali, H., Vlek, P. L., G. (2006) Differential use and benefits of Velvet bean (*Mucuna pruriens* var. utilis) and N fertilizers in maize production in contrasting agro-ecological zones of E. Uganda. *Agricultural Systems*, 88, 44-60.
- Kaltsas, A. M., Mamolos, A. P., Tsatsarelis, C. A., Nanos, G. d., Kalburtji, k. L. (2007) Energy budget in organic and conventional olive groves. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 122: 243-251.
- Kaniuga, Z. (2007) Chilling response of plants: importance of galactolipase, free fatty acids and free radicals. *Plant Biology*, 10: 171-184.
- Karpinski, S., Wingsle, G., Karpinska, B., Hällgren J.-E. (2002) Low-temperature stress and antioxidant defense mechanisms in higher plants. In: Inzé D. & Van Montagu M. (eds), *Oxidative Stress in Plants*, Taylor & Francis, Londres, Inglaterra. pp. 69-103.

- Kihara, T., Wada, T., Suzuki, Y., Hara, T., Koyama, H. (2003) Alteration of citrate metabolism in cluster roots of white Lupin. *Plant, Cell and Environment*, 49: 901-908
- Klink, C. A., Joly, C. A. (1989) Identification and distribution of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> grasses in open and shaded habitats in São Paulo state, Brazil. *Biotropica*, 21: 30-34.
- Klotke, J., Kopka, J., Gatzke, N., Heyer, A. G. (2004) Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation - evidence for a role of raffinose in cold acclimation. *Plant, Cell and Environment*, 27: 1395-1404.
- Kodama, H., Horiguchi, G., Nishiuchi, T., Nishimura, M., Iba, K. (1995) Fatty acid desaturation during chilling acclimation is one of the factors involved in conferring low-temperature tolerance to young tobacco leaves. *Plant Physiology*, 107: 1177-1185.
- Kong, C-H., Wang, P., Xu, X-H. (2007) Allelopathic interference of *Ambrosia trifida* with wheat (*Triticum aestivum*). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 119: 416-420.
- Konrad, M. L. F., Silva, J. A. B. da, Furlani, P. R., Machado, E. C. (2005) Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. *Bragantia*, 64: 339-347.
- Krause, G. H. (1994) Photoinhibition induced by low temperature. In: Baker, N. R., Bowyer, J. R (Eds.) *Photoinhibition of photosynthesis – from molecular mechanisms to the field*. Environmental plant biology series, Oxford: bios scientific Publishers, p. 331-348.
- Krause, G. H., Weis, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology*, 42: 313-349.
- Krupa, Z., Öquist, G., Huner, N. P. (1993) The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* – a fluorescence analysis. *Physiologia Plantarum*, 88: 626-630.
- Larcher, W. (1981) Effects of low temperature stress and frost injury on plant productivity. In: Johnson CB (Ed.), *Physiological Processes Limiting Plant Productivity*, London, Butterworths, p. 253-269.
- Larcher, W. (2000) *Ecofisiologia Vegetal*. Tradução: Prado, C. H. B. A. São Carlos, RiMa Artes e Textos, 531p.
- Laviola, B. G. (2004) *Dinâmica de macronutrientes em folhas, flores e frutos de cafeeiro Árabe em três níveis de adubação*. Tese (Mestrado em Fitotecnia) - Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 100p.
- Lawlor, D. W., Cornic, G. (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*, 25: 275-294.

- Leegood, R.C. (1995) Effects of temperature on photosynthesis and photorespiration. In Smirnoff N. (Ed.), Environment and Plant Metabolism – Flexibility and Acclimation. Oxford Bios Scientific Publishers, p. 45-62.
- Leite, C. A., Silva, O. M. da (2000) A demanda de cafés especiais. In: Zambolim, L. (Ed.) *Café: produtividade, qualidade e sustentabilidade*. Viçosa: UFV, p. 51-74.
- Leônidas, F. C., Santos, J. C. F., Costa, R. S. C. (2000) Consorciação de leguminosas em cafezal adulto em Rondônia, Brasil. *Anais do Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, 26, Marília: MA/PROCAFÉ, p. 319-320.
- Lepage, M (1967) Identification and composition of turnip root lipids. *Lipids*, 2: 244-250.
- Libardi, V. C. M., Amaral, J. A. T., Amaral, J. F. T. (1998) Crescimento vegetativo sazonal do cafeeiro (*Coffea canephora* Pierre var. Conilon) no sul do Estado do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, 6: 23-28.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzimology*, 148: 350-382.
- Liao, F. Y., Li, H. M., He, P. (2004) Effect of high irradiance and high temperature on chloroplast composition and structure of *Dioscorea zingiberensis*. *Photosynthetica*, 42: 487-492.
- Lima, D. R. (1991) *QI, café, sono e memória*. Rio de Janeiro: Científica Nacional, 121p.
- Lima, A. L. S., DaMatta, F. M., Pinheiro, A. H., Totola, M. R., Loureiro, M. E. (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 47: 239-247.
- Lima, L. C., Lima, W. A. A. Moura, W. M., HIZUMI, S., Matos, E. S., Penna, B. A. S., Lisboa, J. M. M. (2005) Decomposição de leguminosas utilizadas como adubos verdes em cafezais orgânicos na zona da mata de Minas Gerais. *Anais do Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, 4, CD-ROM, Londrina: EMBRAPA CAFÉ, sp.
- Li, X. P., Bjorkman, O., Shih, C., Grossman, A. R., Rosenquist, M., Jansson, S., Niyogi, K. K. (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature*, 403: 391-395.
- López-Millám, A. Morales, F., Andaluz, S., Gogorcena, Y., Abadía, A., De Las Rivas, J., Abadía, J. (2000) Responses of sugar beet roots to iron deficiency. Changes in carbon assimilation and oxygen use. *Plant Physiology*, 124: 885-897.

- Lu, Y., Sharkey, T. D. (2006) The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant, Cell and Environment*, 29: 353-366.
- Mac Donald, R. M. (1986) Extraction of microorganisms from soil. *Biological Agriculture and Horticulture*, 3: 361-365.
- Malavolta. E., Favarin, J. L., Malavolta, M., Cabral, C. P., Heinrichs, R., Silveira, J. S. M. (2002) Repartição de nutrientes nos ramos, folhas e flores do cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37: 1017-1022.
- Maluche-Baretta, C. R. D., Amarante, C. V. T. do, Klauberg Filho, O. (2006) Análise multivariada de atributos do solo em sistemas convencional e orgânico de produção de maçãs. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41: 1531-1539.
- Maluche-Baretta, C. R. D., Klauberg Filho, O., Amarante, C. V. T. do, Ribeiro, G. M., Almeida, D. (2007) Atributos microbianos e químicos do solo em sistemas de produção convencional e orgânico de maçãs no Estado de Santa Catarina. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 31: 655-665.
- Mangold, H. K (1961) Thin layer chromatography of lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 38: 708-727.
- Maroco, J. P., Edwards, G. E., Ku, M. S. B. (1999) Photosynthetic acclimation of maize to growth under elevated carbon dioxide. *Planta*, 210: 115-125.
- Maroco, J. P., Rodrigues, M. L., Lopes, C., Chaves, M. M. (2002) Limitations to leaf photosynthesis in Field-grown grapevine under drought – metabolic and modelling approaches. *Functional Plant Biology*, 29: 451-459.
- Marschner, H. (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. London: Academic Press. 889p.
- Marschner, H., Dell, B. (1994) Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*, 159: 89-102.
- Marschner, H., Romheld, V. (1983) In vivo measurement of root-induced pH changes at the soil-root interface: effect of plant species and nitrogen source. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 111: 241-251.
- Martins, M. A., Cruz, A. F. (1998) The role of the external mycelial network of arbuscular mycorrhizal fungi. III. A study of nitrogen transfer between plants interconnected by a common mycelium, *Revista de Microbiologia*, 29: 289-294.
- Martins, M. A., Read, D. J. (1996) The role of the external mycelial network of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. II. A study of phosphorus transfer between plants interconnected by a common mycelium, *Revista de Microbiologia*, 27: 100-105.
- Matiello, J. B., Santinato, R., Garcia, A. W. R., Almeida, S. R., Fernendes, D. R. (2005) *Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendações*. Rio de Janeiro: MAPA, 434p.

- Matsumoto, S. N., Viana, E. A. S., Faria, G. O., Grisi, F. A., Martins, I. S. B. (2001) Efeitos do sombreamento de grevílea na umidade do solo de cafezais no sudeste da Bahia Brasil. *Anais do Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, 2, CD-ROM, Vitória: EMBRAPA CAFÉ, p. 1771-1775.
- Matsuoka, M., Mendes, I. C., Loureiro, M. F. (2003) Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de primavera do leste (MT). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 27: 425-433.
- Mazliak, P. (1983) Plant membrane lipids: changes and alterations during aging and senescence. In: Lieberman, M. (ed.): *Postharvest Physiology and Crop Preservation*. New York: Plenum Press, pg. 123-140.
- Maxwell, K., Johnson, G. N. (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51: 659-668.
- Ma, Y-Z., Holt, N. F., Li, X-P., Niyogi, K. K., Fleming, G. R. (2003) Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100: 4377-4382.
- Meda, A. R., Pavan, M. A., Miyazawa, M., Cassiolato, M. E. (2002) Plantas invasoras para melhorar a eficiência da calagem na correção da acidez subsuperficial do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 26: 647-654.
- Mendes, I. C., Souza, L. V., Rexch, D. V. S., Gomes, A. C. (2003) Propriedades biológicas em agregados de um Latossolo vermelho-escuro sob plantio convencional e direto no serrado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 27: 435-443.
- Mendonça, E. S., Leite, L. F. C., Ferreira Neto, P. S. (2001) Cultivo do café em sistema agroflorestral: uma opção para recuperação de solos degradados. *Revista Arvore*, 25: 375-383.
- Metcalfe, I. D., Schmitz, A. A., Pelka, J. R. (1966) Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis, *Analytical Chemistry*, 38: 514-515.
- Matetzky, S., Freimark, D., Ben-Ami, S., Goldenberg, I., Leor, J., Doolman, R., Novikov, I., Eldar, M., Hod, H. (2003) Association of elevated homocysteine levels with a higher risk of recurrent coronary events and mortality in patients with acute myocardial infarction. *Archives of Internal Medicine*, 163:1933-1937.
- Miao, M., Xu, x., Chen, X., Xue, L., Cao, B. (2007) Cucumber carbohydrate metabolism and translocation under chilling night temperature. *Journal of Plant Physiology*, 164: 621-628.

- Millar, A. H., Atkin, O. K., Menz, R. I., Henry, B., Farquhar, G., Day, D. A. (1998) Analysis of respiratory chain regulation in roots of soybean seedlings. *Plant Physiology*, 117: 1083-1093.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405-410.
- Moore, J. M., Klose, S., Tabatabai, M. A. (2000) Soil microbial biomass carbon and nitrogen as affected by cropping systems. *Biology and Fertility of Soils*, 31: 200-210.
- Morcuende, R., Pérez, P., Martínez-Carrasco, R., Molino, I. M., Puente, L. S. (1996) Long- and short-term responses of leaf carbohydrate levels and photosynthesis to decreased sink demand in soybean. *Plant, Cell and Environment*, 19: 976-982.
- Moreira, A., Malavolta, E. (2004) Dinâmica da matéria orgânica e da biomassa microbiana em solos submetidos a diferentes sistemas de manejo na Amazônia Ocidental. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 1103-1110.
- Moreira, C. F., Manoel, R. M., Segges, J. H., Fernandes, E. A. N. (2002) Avaliação da qualidade do café orgânico produzido sob sombra frente a café orgânico produzido a pleno sol. *Anais do Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, 28, Caxambu: MAPA-SPC/PROCAFÉ, p. 303-304.
- Moreira, F. M. S., Siqueira, J. O. (2002) *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 625p.
- Morsy, M., Jouve, L., Hausman, J.-F., Hoffmann, L., Stewart J (2007) Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 164: 157-167.
- Mota, J. W. S., DaMatta, F. M., Barros, R. S., Maestri, M. (1997) Vegetative growth in *Coffea arabica* L. as affected by irrigation, daylength and fruiting. *Tropical Ecology*, 38: 73-79.
- Moyer-Henry, K. A., Burton, J. W., Israel, D. W., Rufty, T. W. (2006) Nitrogen transfer between plants: A <sup>15</sup>N natural abundance study with crop and weed species. *Plant and Soil*, 282: 7-20.
- Müller, M., Hernández, I., Alegre, L., Munné-Bosch, S. (2006) Enhanced  $\alpha$ -tocopherol quinone levels and xanthophyll cycle de-epoxidation in rosemary plants exposed to water deficit during a Mediterranean winter. *Journal of Plant Physiology*, 163: 601-606.
- Müller, P., Li, X-P., Niyogi, K. K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 155: 1558-1566.



- Nardi, S., Morari, F., Berti, A., Tosoni, M., Giardini, L. (2004) Soil organic matter properties after 40 years of different use of organic and mineral fertilisers. *European Journal of Agronomy*, 21: 357-367.
- Navari-Izzo, F., Ricci, F., Vazzana, C., Quartacci, M. (1995) Unusual composition of thylakoid membranes of the resurrection plant *Boea hygroskopica*: changes in lipids upon dehydration and rehydration. *Plant Physiology*, 94: 135-142.
- Nazareno, R. B., Oliveira, C. A. S., Sanzonowicz, C., Sampaio, J. B. R., Silva, J. C. P., Guerra, A. F. (2003) Crescimento inicial do cafeeiro Rubi em respostas a doses de nitrogênio fósforo e potássio e a regime hídricos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 903-910.
- Nascimento, E. A., Oliveira, L. E. M., Castro, E. M., Delú Filho, N. (2006) Mesquita, A. C., Vieira, C. V. Alterações morfofisiológicas em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) consorciado com seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Ciência Rural*, 36: 852-857.
- Nascimento, J. T., Silva, I. F., Santiago, R. D., Silva Neto, L. F. (2005) Efeito de leguminosas nos atributos físicos e carbono orgânico de um Luvissole. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29: 825-831.
- Nayyar, H., Gupta, D. (2006) Differential sensitivity of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. *Environmental and Experimental Botany*, 58: 106-113.
- Nazareno, R. B., Oliveira, C. A. S., Sanzonowicz, C., Sampaio, J. B. R., Silva, J. C. P., Guerra, A. F. (2003) Crescimento inicial do cafeeiro Rubi em respostas a doses de nitrogênio fósforo e potássio e a regime hídricos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 903-910.
- Niyogi, K. K. (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 333-359.
- Novais, R. F., Smyth, T. J. (1999) *Fósforo em solo e planta em condições tropicais*. Viçosa, DPS, 399p.
- Nouairi, I., Ammar, W. B., Youssef, N. B., Daoud, D. B. M., Ghorbal, M. H., Zarrouk, M. (2006) Comparative study of cadmium effects on membrane lipid composition of *Brassica juncea* and *Brassica napus* leaves. *Plant Science*, 170: 511-519.
- Nsabimana, D., Haynes, R. J., Wallis, F. M. (2004) Size, activity and catabolic diversity of the soil microbial biomass as affected by land use. *Applied Soil Ecology*, 26: 81-92.
- Nyatsanga, T., Pierre, W. H. (1973) Effect on nitrogen fixation by legumes on soil acidity. *Agronomy Journal*, 65: 936-940.
- Oberson, A., Nanzer, S., Bosshard, C., Dubois, D., Mader, P., Frossard, E. (2007) Symbiotic N<sub>2</sub> fixation by soybean in organic and conventional cropping systems

- estimated by  $^{15}\text{N}$  dilution and  $^{15}\text{N}$  natural abundance. *Plant and Soil*, 290: 69-83.
- Oliveira, A. L. M., Urquiaga, S., Dobereiner, J., Baldani, J. I. (2002a) The effect of inoculating endophytic  $\text{N}_2$ -fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, 242: 205-215.
- Oliveira, C. R. M., Barbosa, J. P. R. A. D., Soares, A. M., Oliveira, L. E. M., Macedo, R. G. (2006) Trocas gasosas de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) e seringueiras (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) em diferentes sistemas de cultivo na região de lavras, MG. *Revista Árvore*, 30: 197-206.
- Oliveira, G. C. de, Dias Júnior, M. de S., Resck, D. V. S., Curi, N. (2003) Alterações estruturais e comportamento compressivo de um Latossolo Vermelho distrófico argiloso sob diferentes sistemas de uso e manejo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 291-299.
- Oliveira, J. G., Alves, P. L. C. A., Magalhães, A. C. (2002b) The effect of chilling on the photosynthetic activity in coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. The proactive action of chloroplastid pigments. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14: 95-104.
- Ovalle, C., Urquiaga, S., Del Pozo, A., Zagal, E., (2006) Arredondo, S. Nitrogen fixation in six forage legumes in Mediterranean central Chile. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 56: 277-283.
- Palonen, P., Buszard, D., Donnelly, D. (2002) Changes in carbohydrates and freezing tolerance during cold acclimation of red raspberry cultivars grown in vitro and in vivo. *Physiologia Plantarum*, 110: 393-401.
- Parry, M. A. J., Andralojc, P. J., Khan, S. Lea, P. J., Keys, A. J. (2002) Rubisco activity: effects of drought stress. *Annals of Botany*, 89: 833-839.
- Partelli, F. L., Posse, R. P., Amaral, J. A. T., Martins Filho, S., Reis, E. F. (2001) Ciclo de crescimento vegetativo do cafeeiro Conilon irrigados e não irrigados no município de Vila Valério, região norte do estado do Espírito Santo. *Anais do Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, 27, 2001, Uberaba. Rio de Janeiro: MAA/SARC/PROCAFÉ, 2001, p. 92-94.
- Partelli, F. L., Vieira, H. D., Carvalho, V. B. de, Mourão Filho, F. de A. A. (2007) Diagnosis and recommendation integrated system norms, sufficiency range, and nutritional evaluation of *Arabian coffee* in two sampling periods. *Journal of Plant Nutrition*, 30: 1651-1667.
- Partelli, F. L., Vieira, H. D., Monnerat, P. H., Viana, A. P. (2006a) Estabelecimento de normas DRIS em cafeeiro Conilon orgânico e convencional no Estado do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30: 443-451.
- Partelli, F. L., Vieira, H. D., Souza, P. M., Golynski, A., Ponciano, N. J. (2006b) Perfil socioeconômico dos produtores de café orgânico do norte do Estado do

- Espírito Santo – satisfação com a atividade e razões de adesão à certificação. *Revista Ceres*, 53: 55-64.
- Parro, V., Moreno-Paz, M. (2004) Nitrogen fixation in acidophile iron-oxidizing bacteria: The *nif* regulon of *Leptospirillum ferrooxidans*. *Research in Microbiology*, 155, 703-709.
- Paschoal, A. D. (1995) *Modelos sustentáveis de agricultura. Agricultura sustentável*, 2: 11-16.
- Patra, A. K., Le Roux, X., Abbadie, L., Clays-Josserand, A., Poly, F., Loiseau, P., Louault, F. (2007) Effect of microbial activity and nitrogen mineralization on free-living nitrogen fixation in permanent grassland soils. *Journal Agronomy & Crop Science*, 193: 153-156.
- Paul, M. J., Foyer, C. H. (2001) Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1383-1400.
- Paulo, E. M., Berton, R. S., Cavichioli, J. C., Bulisani, E. A., Kasai, F. S. (2001) Produtividade do café apotã em consórcio com leguminosas na região da Alta Paulista. *Bragantia*, 38:291-299.
- Paulo, E. M., Berton, R. S., Cavichioli, J. C., Bulisani, E. A., Kasai, F. S. (2006) Produtividade do cafeeiro Mundo Novo enxertado e submetido à adubação verde antes e após recepa da lavoura. *Bragantia*, 65: 115-120.
- Paulucio, V. de O. (2007) *Qualidade química e biológica de áreas degradadas pela extração de argila revegetada com eucalipto e leguminosas inoculadas com micorrizas*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Campos dos Goytacazes - RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 106p.
- Pedini, S. (2000) Produção e certificação de café orgânico. In: Zambolim, L. (Ed.) *Café: Produtividade, qualidade e sustentabilidade*, Viçosa: UFV, p. 333-360.
- Peltier, G., Cournac, L. (2002) Chlororespiration. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 523-550.
- Penteado, S. R. (2000) *Introdução à agricultura orgânica*. Campinas: Editora Grafimagem. 110p.
- Pereira, S. V., Martinez, C. R., Porto, E. R., Oliveira, B. R. B., Maia, L. C. (2004) Atividade microbiana em solo do Semi-Árido sob cultivo de *Atriplex nummularia*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 757-762.
- Perez, K. S. S., Ramos, M. L. G., McManus, C. (2004) Carbono da biomassa microbiana em solo cultivado com soja sob diferentes sistemas de manejo nos cerrados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 567-573.

- Perez, K. S. S., Ramos, M. L. G., McManus, C. (2005) Nitrogênio da biomassa microbiana em solo cultivado com soja, sob diferentes sistemas de manejo, nos Cerrados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40: 137-144.
- Perin, A., Guerra, J. G. M., Teixeira, M. G. (2003) Cobertura do solo e acumulação de nutrientes pelo amendoim forrageiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 791-796.
- Perin, A., Santos, R. H. S., Urguiaga, S., Guerra, J. G. M., Cecon, P. R. (2004) Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 35-40.
- Perucci, P., Dumontet, S., Bufo, S.A., Mazzatura, A., Casucci, C. (2000) Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils*, 32: 17-23.
- Pietsch, G., Friedel, J. K., Freyer, B. (2007) Lucerne management in an organic farming system under dry site conditions. *Field Crops Research*, 102: 104-118.
- Pimentel, M. S., Aquino, A. M. de, Correia, M. E. F., Costa, J. R., Ricci, M. dos S. F., De-Polli, H. (2006) Atributos biológicos do solo sob manejo orgânico de cafeeiro, pastagem e floresta em região do médio Paraíba Fluminense-RJ. *Coffee Science*, 1: 85-93.
- Pinheiro, A. H., DaMatta, F. M., Chaves, A. R. M., Fontes, E. P. B., Loureiro, M. E. (2004) Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Science*, 167: 1307-1314.
- Pogson, B. J., Niyogi, K. K., Björkman, O., Dellapenna, D. (1998) Altered xanthophylls compositions adversely affected chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in *Arabidopsis* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95: 13324-13329.
- Pons, T. L., Perreijn, K., van Kessel, C., Werger, M. J. A. (2007) Symbiotic nitrogen fixation in a tropical rainforest: <sup>15</sup>N natural abundance measurements supported by experimental isotopic enrichment. *New Phytologist*, 173: 154-167.
- Praxedes, S. C., DaMatta, F. M., Loureiro, M. E., Ferrão, M. A. G., Cordeiro, A. T. (2006) Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 56: 263-273.
- Prezotti, L. C., Rocha, A. C. (2005) Produtividade de café arábica em função da adubação mineral e orgânica em consórcio com calopogônio. *Anais do Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, 4, CD-ROM, Londrina: EMBRAPA CAFÉ, sp.

- Ouédraogo, E., Brussaard, L., Stroosnijder, L. (2007) Soil fauna and organic amendment interactions affect soil carbon and crop performance in semi-arid West Africa. *Biology and Fertility of Soils*, 44: 343-351.
- Queiroz, C. G. S., Mares-Guia, M. L., Magalhães, A. C. (2000) Microcalorimetric evaluation of metabolic heat rates in coffee (*Coffea arabica* L.) roots of seedlings subjected to chilling stress. *Thermochimica*, 351: 33-37.
- Ramalho, J. C., Pons, T., Groeneveld, H., Azinheira, H. G., Nunes, M. A. (2000) Photosynthetic acclimation to high light conditions in mature leaves of *Coffea arabica* L.: role of xanthophylls, quenching mechanisms and nitrogen nutrition. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27: 43-51.
- Ramalho, J. C., Campos, P. S., Teixeira, M., Nunes, M. A. (1998) Nitrogen dependent changes in antioxidant system and in fatty acid composition of chloroplast membranes from *Coffea arabica* L. plants submitted to high irradiance. *Plant Science*, 135: 115-124.
- Ramalho, J. C., Campos, P. S., Quartin, V. L., Silva, M. J., Nunes, M. A. (1999) High irradiance impairments on photosynthetic electron transport, rubulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and N assimilation as a function of N availability in *Coffea arabica* L plants. *Journal of Plant Physiology*, 154: 319-326.
- Ramalho, J. C., Marques, N. C., Semedo, J. N., Matos M. C., Quartin, V. L. (2002) Photosynthetic performance and pigment composition of leaves from two tropical species is determined by light quality. *Plant Biology*, 4: 112-120.
- Ramalho, J. C., Pons, T. L., Groeneveld, H. W., Nunes, M. (1997) Photosynthetic response of *Coffea arabica* leaves to a short-term high exposure in relation to N availability. *Physiologia Plantarum*, 101: 229-239.
- Ramalho, J. C., Quartin, V. L., Leitão, E., Campos, P. S., Carelli, M. L. C., Fahl, J. I., Nunes, M. A. (2003) Cold Acclimation Ability and Photosynthesis among Species of the Tropical *Coffea* Genus. *Plant Biology*, 5: 631-641.
- Ramos, M. G., Villatoro, M. a. A., Urquiaga, S., Alves, B, J. R., Boddey, R. M. (2001) Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to tropical green manure crops and the residual benefit to a subsequent maize crop using <sup>15</sup>N-isotope techniques. *Journal of Biotechnology*, 91: 105-115.
- Rees, D. C., Howard, J. B. (2000) Nitrogenase: standing at the crossroads. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4: 559-566.
- Reich, P. B., Knops, J., Tilman, D., Craine, J., Ellsworth, D., Tjoelker, M., Lee, T., Wedink, D., Naeem, S., Bahauddin, D., George, D., Hendrey, G., Jose, S., Wrage, K., Goth, J., Bengston, W. (2001) Plant diversity enhances ecosystem responses to elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen deposition. *Nature*, 410: 809-812.
- Reining, E. (2005) Assessment tool for biological nitrogen fixation of *Vicia faba* cultivated as spring main crop. *European Journal of Agronomy*, 23: 392-400.

- Reis, T. C., Rodella, A. A. (2002) Cinética de degradação da matéria orgânica e variação do pH do solo sob diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 26: 619-626.
- Rena, A. B. (2000) Conseqüências fisiológicas das baixas temperaturas no cafeeiro. *Circular Técnica*. Lavras: EPAMIG/CRSM, 2000, n.99, 2p.
- Rena, A. B., Maestri, M. (1986) Fisiologia do Cafeeiro. In: Rena, A. B., Malavolta, E., Rocha, M., Yamada, T. (Eds) *Cultura do Cafeeiro: fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba: Patafos, p. 13-85.
- Reuvas, E., Pinto, M. da C., Monteiro, C. da R. (1997). *Café expresso*. Brasília: SEBRAE, 24p. (Série Agronegócio)
- Ribas-Carbo, M., Aroca, R., González-Meler, M. A. Irigoyen, J. J., Sánchez-Díaz, M. (2000) The electron partitioning between the cytochrome and alternative respiratory pathways during chilling recovery in two cultivars of maize differing in chilling sensitivity. *Plant Physiology*, 122: 199-204.
- Ribeiro, R. V., Machado, E. C., Oliveira, R. F. (2004) Growth and leaf temperature effects on photosynthesis of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Plant Pathology*, 53: 334-340.
- Ricci, M. S. F., Alves, B. J. R., Miranda, S. C., Oliveira, F. F. (2005) Growth rate and nutritional status of an organic coffee cropping system. *Scientia Agricola*, 62: 138-144.
- Ricci, M. dos S. F., Araújo, M. dos C. F., Franch, C. M. de C. (2002) *Cultivo orgânico do café: recomendações técnicas*. Brasília: EMBRAPA. 101p.
- Rochette, P., Angers, D. A. (1999) Soil surface carbon dioxide fluxes induced by spring, summer, and fall moldboard plowing in a sandy loam. *Soil Science Society of American Journal*, 63: 621-628.
- Rolland, F. Moore, B., Sheen, J. (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell*, (Supplement, 2002) 14: 185-205.
- Rejsková, A., Patková, L., Stodulková E., Lipavska, H. (2007) The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under in vitro conditions. *Journal of Plant Physiology*, 164: 174-184
- Rodrigues, A. P. D. (2005) *Adaptação do Lupinus albus L. ao déficit hídrico caracterização fisiológica e bioquímica*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Lisboa, Universidade Técnica de Lisboa, 58p.
- Ronchi, C. P., Silva, A. A. (2006) Effects of weed species competition on the growth of young coffee plants. *Planta Daninha*, 24: 415-423.
- Ross, G. W., Abbott, R. D., Petrovitch, H., Morens, D. M., Grandinetti, a., Tung, K., Tanner, C. M., Masaki, K. H., Blanchette, P. L., Curb, J. D., Popper, J. S.,

- White, L. R. (2000) Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. *The Journal of the American Medical Association*, 283: 2674-2679.
- Routaboul, J. M., Fischer, S., Browse, J. (2000) Trienoic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperature. *Plant Physiology*, 124: 1697-1705.
- Rozentsvet, O. A., Murzaeva, S. V., Gushchina, I. A. (2005) The role of membrane lipids in the resistance of clapsing-leaved pondweed (*Potamogeton perfoliatus* L.) to excess of cadmium in water. *Biology Bulletin*, 32: 188-195.
- Ruban, A. V., Horton, P. (1995) Regulation of Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 221-230.
- Sage, R. F. (1994) Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO<sub>2</sub>: the gas exchange perspective. *Photosynthesis Research*, 39: 351-368.
- Sage, R. F., Kubien, D. S. (2003) *Quo vadis C<sub>4</sub>*? An ecophysiological perspective on global change and the future of C<sub>4</sub> plants. *Photosynthesis Research*, 77: 209-225.
- Sage, R. F., Sharkey, T. D. (1987) The effect of temperature on the occurrence of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> insensitive photosynthesis in field grown plants. *Plant Physiology*, 84: 658-664.
- Sahsah, Y., Campos, P., Gareil, M., Zuily-Fodil, Y., Pham Thi, A. T. (1998) Enzymatic degradation of polar lipids in *Vigna unguiculata* leaves and influence of drought stress. *Plant Physiology*, 104: 577-586.
- Sakai, A., Larcher, W. (1987) *Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress*. Springer-Verlag, Berlin, 321p.
- Salmi, S. P., Salmi, A. P., Abboud, A. C. de S. (2006) Dinâmica de decomposição e liberação de nutrientes de genótipos de guandu sob cultivo em aléias. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41: 673-678.
- Salonen, M., Aro, E. M., Rintimäki, E. (1998) Reversible phosphorylation and turnover of the D1 protein under various redox states of photosystem II induced by low temperature photoinhibition. *Photosynthesis Research*, 58: 143-151.
- Salvucci, M. E., Crafts-Brandner, S. J. (2004) Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. *Plant Physiology*, 134: 1460-1470.
- Santinato, R., Santo, J. E., Aguiar, S., Fernandes, A. L. T., Alvarenga, M. A., Figueiredo, E. (2003) Estudo de arborização com grevilea na cafeicultura do oeste da Bahia. *Anais do Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, 29, Araxá: MAPA-SDR/PROCAFÉ, p. 306-306.

- Santos, G. A., Camargo, F. A. O. (1999) *Fundamentos da matéria orgânica do solo*. Ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre, 508p.
- Santos, J. B., Jakelaitis, A., Silva, A. A., Vivian, R., Costa, M. D., Silva, A. F. (2005) Atividade Microbiana do solo após aplicação de herbicidas em sistemas de plantio direto e convencional. *Planta Daninha*, 23: 683-691.
- Santos, M. A., Ruano, O. (1987) Reação de plantas usadas como adubos verdes a *Meloidogyne incognita*; Raça 3 e *M. javanica*. *Nematologia Brasileira*, 11: 184-197.
- Santos, P. C. dos, Mayer, S. M., Barney, B. M., Seefeldt, L. C., Dean, D. R. (2007) Alkyne substrate interaction within the nitrogenase MoFe protein. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101: 1642-1648.
- Sato, N., Suda, K., Tsuzuki, M. (2004) Responsibility of phosphatidylglycerol for biogenesis of the PSI complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1658: 235- 243.
- Schiavo, J. A. (2005) *Revegetação de áreas degradadas pela extração de argila, com espécies micorrizadas de Acácia mangium, Sesbania virgata e Eucalyptus camaldulensis*. Tese (Doutorado em produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF.
- Schindler, C., Reith, P., Lichtenthaler, H. K. (1994) Differential levels of carotenoids and decrease of zeaxanthin cycle performance during leaf development in a green and an aurea variety of tobacco. *Journal of Plant Physiology*, 143: 500-507.
- Schlesinger, W. H. (1997) *Biogeochemistry: an analysis of global change*. 2<sup>nd</sup> Edition. Academic Press, San Diego, 443p.
- Schloter, M., Dilly, O., Munch, J. C. (2003) Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 98: 255-262.
- Scivittaro, W. B., Muraoka, T., Boaretto, A. E., Trivelin, P. C. O. (2003) Transformação do nitrogênio proveniente de mucuna-preta e uréia utilizando como adubo na cultura do milho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 26: 225-230.
- Seigler, D. S. (1996) Chemistry and mechanisms of allelopathic interactions. *Agronomy Journal*, 88: 876-885.
- Sena, J. O. A. de, Zaidan, H. A., Castro, P. R. de e C. (2007) Transpiration and stomatal resistance variations of perennial tropical crops under soil water availability conditions and water deficit. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50: 225-230.
- Sera, G. H., Sera, S., Ito, D. S., Azevedo, J. A. de, Ribeiro Filho, C., Mata, J. S. da (2007) Partial resistance to fruit necrosis associated to *Colletotrichum* spp.



- among Arabic Coffee genotypes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50: 395-402.
- Shearer, G.; Kohl, D. H. (1996) N<sub>2</sub>-fixation in field settings: estimations based on natural <sup>15</sup>N abundance. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13: 699-756.
- Sierra, J., Nygren, P. (2006) Transfer of N fixed by a legume tree to the associated grass in a tropical silvopastoral system. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 1893-1903.
- Silva, A. E. S. da, Costa, E. B. da. (1995) Importância econômica e social. In: SEAG-ES (org.) *Manual técnico para a cultura do café no Estado do Espírito Santo*. Vitória: SEAG-ES, p. 9-10.
- Silva, E. A., DaMatta, F. M., Ducatti, C., Regazzi, A. J., Barros, R. S. (2004) Seasonal changes in vegetative growth and photosynthesis of Arabica coffee trees. *Field Crops Research*, 89: 349-357.
- Silva, E. C. da, Muraoka, T., Buzetti, S., Veloso, m. E. da C., Trivelin, P. C. O. (2006a) Aproveitamento do nitrogênio (<sup>15</sup>N) da crotalária e do milho pelo milho sob plantio direto em Latossolo Vermelho de Cerrado. *Ciência Rural*, 36: 739-746.
- Silva, F. C. da (org) (1999). *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Brasília: EMBRAPA, 370p.
- Silva, O. M. da, Leite, C. A. (2000) Competitividade e custos do café no Brasil e no exterior. In: Zambolim, L. (Ed.) *Café: produtividade, qualidade e sustentabilidade*. Viçosa: UFV, p. 27-50.
- Silva, S. de O., Matsumoto, S. N., Bebé, F. V., José, A. R. S. (2006b) Diversidade e frequência de plantas daninhas em associações entre cafeeiros e Grevileas. *Coffee Science*, 1: 126-134.
- Simon, E. W. (1974) Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytologist*, 73: 377-420.
- Simkin, A. J., Moreau, H., Kuntz, M., Pagny, G., Lin, C., Tanksley, S., McCarthy, J. (2008) An investigation of carotenoid biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. *Journal of Plant Physiology*, 165: 1087-1106.
- Singh, D. (1981) The relative importance of characters affecting genetic divergence. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 14: 237-245.
- Singh, K. P., Suman, S., Singh, P. N., Srivastava, T. K. (2007) Improving quality of sugarcane-growing soils by organic amendments under subtropical climatic conditions of India. *Biology and Fertility of Soils*, 44: 367-376.
- Smirnoff, N. (1995) Antioxidant systems and plant response to the environment, In: N. Smirnoff (Ed.), *Environment and Plant Metabolism-Flexibility and Acclimation*, p. 217-243, Bios Scientific, Oxford, ISBN 1 872748 93 7.

- Smith, J. L., Paul, E. A. (1990) The significance of soil microbial biomass estimations. In.: Bollag, J. M., Stotsky, G. *Soil biochemistry*. New York, Marcel Dekker. p. 357-398.
- Somado, E. A., Sahrawat, K. L., Kuehne, R. F. (2006) Rock phosphate-P enhances biomass and nitrogen accumulation by legumes in upland crop production systems in humid West Africa. *Biology and Fertility Soils*, 43: 124-130.
- Souza, C. M. de, Pires, F. R. (2002) *Adubação verde e rotação de culturas*. Viçosa: UFV, 71p. (Caderno didático).
- Souza Filho, A. P. S., Rodrigues, L. R. A., Rodrigues, T. J. D. (1997) Efeitos do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sob três invasoras de pastagens. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 32: 165-170.
- Souza Filho, A. P. S., Pereira, A. A. G., Bayma, J. C. (2005) Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. *Planta Daninha*, 23: 25-32.
- Souza, R. F. de, Faquin, V., Torres, P. R. F., Baliza, D. P. (2006) Calagem e adubação orgânica: influência na adsorção de fósforo em solos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30: 975-983.
- Souza, W. J. O., Melo, W. J. (2003) Matéria orgânica em um latossolo submetido a diferentes sistemas de produção de milho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 27: 1113-1122.
- Spagnollo, E., Bayer, C., Wildner, L. P., Ernani, P. R., Albuquerque, J. A., Proença, M. M. (2002) Leguminosas estivais intercalares como fonte de nitrogênio para o milho, no sul do Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 417-423.
- Sparling, G. P. (1992) Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Australian Journal of Soil Research*, 30: 195-207.
- Strandhagen, E., Thelle, D.S. (2003) Filtered coffee raises serum cholesterol: results from a controlled study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57: 1164-1168.
- Strauss, A. j., Krüger, G. H. J., Strasser, R. J., van Heerden, P. D. R. (2007) The role of low soil temperature in the inhibition of growth and PSII function during dark chilling in soybean genotypes of contrasting tolerance. *Physiologia Plantarum*, 131: 89-105.
- Suzuki, A., Kagawa, D., Ochiai, R., Tokimitsu, I., Saito, I. (2002) Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research*, 25: 99-107.

- Suzuki, K., Nagasuga, K., Okada, M. (2008) The Chilling injury induced by high root temperature in the leaves of rice seedlings. *Plant Cell Physiology*, 49: 433-442.
- Svilaas, A., Sakhi, A. K., Andersen, L. F., Svilaas, T., Ström, E. C., Jacobs Junior, D. R., Ose, L., Blomhoff, R. (2003) Intakes of Antioxidants in Coffee, Wine and Vegetables are Correlated with Plasma Carotenoids in Humans. *The Journal of Nutrition: Human Nutrition and Metabolism*, 134: 562-567.
- Szilagyi, R. K., Musaev, D. G., Morokuma, K. (2000) Theoretical studies of biological nitrogen fixation. Part II. Hydrogen bonded networks as possible reactant and product channels. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 506: 131-146.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2002) *Plant Physiology*. 3.ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers, 2002. 690p.
- Tapernoux-Lüthi, E. M., Böhm, A., Keller, F. (2004) Cloning, functional expression, and characterization of the raffinose oligosaccharide chain elongation enzyme, galactan:galactan galactosyltransferase, from common bugle leaves. *Plant Physiology*, 134: 1377-1387.
- Tavares, R. M., Morais, F., Melo, N., Pais, M. S. S. (1998) Thylakoid membrane reorganization during *Zantedeschia aethiopica* spathe regreening: consequence of the absence of  $\Delta^3$ -trans-hexadecenoic acid in photochemical activity. *Phytochemistry*, 47: 979-984.
- Teixeira, F. C. P., Reinert, F., Rumjanek, N. G., Boddey, R. M. (2006) Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to *Cratylia mollis* using the  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique in the semi-arid Caatinga region of Brazil. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 1989-1993.
- Tezara, W., Mitchell, V. J., Driscoll, S. D., Lawlor, D. W. (1999) Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, 401: 914-917.
- Theodoro, V. C. de A. (2001) *Caracterização de sistemas de produção de café orgânico, em conversão e convencional*. Tese (Mestrado em Fitotecnia) - Lavras - MG, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 214p.
- Theodoro, V. C. de A., Alvarenga, M. I. N., Guimarães, R. J., Mourão Júnior, M. (2003a) Carbono da biomassa microbiana e micorriza em solos sob mata nativa e agroecossistemas cafeeiros. *Acta Scientiarum Agronomy*, 25: 147-153.
- Theodoro, V. C. de A., Alvarenga, M. I. N., Guimarães, R. J., Souza, C. A. S. (2003b) Carbono da biomassa microbiana e micorriza em solos sob mata nativa e agroecossistemas cafeeiros. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 27: 1039-1047.

- Tuffi Santos, L. D., Santos, I. C., Oliveira, C. H., Santos, M. V., Ferreira, F. A., Queiroz, D. S. (2004) Levantamento fitossociológico em pastagens degradadas sob condições de várzea. *Planta Daninha*, 22: 343-349.
- Uemura, M., Joseph, R. A., Steponkus, P. L. (1995) Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. *Plant Physiology*, 108: 15-30.
- Urquiaga, S. Cruz, K. H. S., Boddey, R. M. (1992) Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. *Soil Science Society of American Journal*, 56: 105-114.
- Vance, E. D., Brookes, P. C., Jenkinson, D. S. (1987) An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 19: 703-707.
- Van Rhijn, P., Goldberg, R. B., Hirsch, A. M. (1998) *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *Plant Cell*, 10: 1233-1249.
- Vargas, L. K., Scholles, D. (1998) Nitrogênio da biomassa microbiana em solo sob diferentes sistemas de manejo, estimado por método de fumigação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 22: 157-167.
- Vargas, L. K., Scholles, D. (2000) Biomassa microbiana e produção de C-CO<sub>2</sub> e N mineral de um Podzólico Vermelho-Escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 23:35-42.
- Vargas, L. K., Selbach, P. A., Sá, E. L. S. (2004) Alterações microbianas no solo durante o ciclo do milho nos sistemas plantio direto e convencional. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 749-755.
- Viani, R. (1986) *Coffee*. In Ullmann's Encyclopedia of industrial Chemistry, V. A7. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, p. 315-339.
- Vitti, C. G., Tavares Júnior, J., Luz, P. H. C., Favarin, J. L., Costa, M. C. G. (2002) Influência da mistura de sulfato de amônio com uréia sobre a volatilização de nitrogênio amoniacal. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 26: 663-667.
- Wang, Q. R., Li, Y. C., Klassen, W. (2007) Changes of soil microbial biomass carbon and nitrogen with cover crops and irrigation in a tomato field. *Journal of Plant Nutrition*, 30: 623-639.
- Weiser, R.L., Wallner, S.J., Waddell J.W. (1990) Cell wall and extensin mRNA changes during cold acclimation of pea seedlings. *Plant Physiology*, 93: 1021-1026.
- White, A. J., Critchley, C. (1999) Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynthesis Research*, 59: 63-72.

- Willson, K. C. (1985) Climate and Soil. *In*: Clifford, M. N., Willson, K. C. (Eds) *Coffee – botany, biochemistry and Production of Beans and Beverage*. Crom Helm, Londres, p. 48-96.
- Wismer, W. V., Worthing, W. M., Yada, R. Y., Marangoni, A. G. (1998) Membrane lipids dynamics and lipid peroxidation in the early stages of low-temperature sweetening in tubers of *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum*, 102: 396-410.
- Wrigley, G. (1988) *Coffee. Tropical agriculture Series. Longman Scientific & Technical*, Singapura, 693p.
- Xavier, F. A. da S., Maia, S. M. F., Oliveira, T. S. de, Mendonça, E. de S. (2006) Biomassa microbiana e matéria orgânica leve em solos sob sistemas agrícolas orgânico e convencional na Chapada da Ibiapaba - CE. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30: 247-258.
- Xin, Z., Browse, J. (2000) Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell and Environment*, 23: 893-902.
- Xu, Y., Siegenthaler, P. A. (1997) Low temperature treatments induce an increase in the relative content of both linolenic and  $\Delta^3$ -*trans*-Hexadecenoic acids in thylakoid membrane phosphatidylglycerol of squash cotyledons. *Plant Cell Physiology*, 38: 611-618.
- Xuan, T. D., Shinkichi, T., Khanh, T. D., Min, C. I. (2005) Biological control of weeds and plant pathogens in paddy rice by exploiting plant allelopathy: an overview. *Crop Protection*, 24: 197-206.
- Yang, Z., Su, X., Wu, F., Gong, Y., Kuang, T. (2005) Effect of phosphatidylglycerol on molecular organization of photosystem I. *Biophysical Chemistry*, 115: 19-27.
- Yussefi, M. (2003) Development and state of organic agriculture world - wide. *In*: Yussefi, M., Willer, H. (Org.) *The world of organic agriculture 2003*. Statistics and future prospects. IFOAM Publication. 130p. ISBN. 3-934055-22-2.
- Zhang, J-H., Liu, Y-P., Pan, Q-H., Zhan, J-C., Wang, X-Q., Huang, W-D. (2006) Changes in membrane-associated H<sup>+</sup>-ATPase activities and amounts in young grape plants during the cross adaptation to temperature stresses. *Plant Science*, 170: 768-777.
- Zhu, S-Q., Zhao, H., Liang, J-S., Ji, B-H., Jiao, D-M. (2008) relationships between phosphatidylglycerol molecular species of thylakoid membrane lipids and sensitivities to chilling-induced photoinhibition in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50: 194-202.
- Zilli, J. L., Smiderle, O. J., Neves, M. C. P., Rumjanek, N. G. (2007) População microbiana em solo cultivado com soja e tratado com diferentes herbicidas em área de cerrado no Estado de Roraima. *Acta Amazônica*, 37: 201-212.