

KARINE DIAS BATISTA

**VARIAÇÕES DIURNAS DA FOTOSSÍNTESE E EFEITOS DO
ANELAMENTO DE RAMOS SOBRE A FOTOSSÍNTESE E O
METABOLISMO DO CARBONO EM CAFÉ ARÁBICA**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia
Vegetal, para obtenção do título de Magister
Scientiae

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B333v
2008

Batista, Karine Dias, 1981-

Variações diurnas da fotossíntese e efeitos do anelamento de ramos sobre a fotossíntese e o metabolismo do carbono em café arábica / Karine Dias Batista.

– Viçosa, MG, 2008.

x, 31f.: il. ; 29cm.

Orientador: Fábio Murilo DaMatta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 25-31.

1. Café - Fisiologia. 2. Fotossíntese. 3. Carboidratos - Metabolismo. 4. Coffea arabica. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 633.73

KARINE DIAS BATISTA

**VARIAÇÕES DIURNAS DA FOTOSSÍNTESE E EFEITOS DO
ANELAMENTO DE RAMOS SOBRE A FOTOSSÍNTESE E O
METABOLISMO DO CARBONO EM CAFÉ ARÁBICA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal,
para obtenção do título de Magister
Scientiae

APROVADA: 26 de fevereiro de 2008

Prof^o Marcelo Ehlers Loureiro
(Co-orientador)

Prof^o Raimundo Santos Barros

Prof^o Cláudio Pagotto Ronchi

Prof^o Hugo Alves Pinheiro

Prof^o Fábio Murilo DaMatta
(Orientador)

DEDICO

Ao meu pai, Francisco (sempre presente), pelo amor e pela presença...

À minha mãe, Maristela, pelo amor e confiança...

Aos meus irmãos, Breno e Renata, pelo apoio e carinho...

Ao Zelvânio, pelo companheirismo, paciência e amor...

OFEREÇO

A Deus

AGRADECIMENTOS

A Deus; todo caminho percorrido, toda vitória alcançada e todos os obstáculos superados foram iluminados pelo Senhor.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal (Departamento de Biologia Vegetal); toda a minha formação como Engenheira Agrônoma e como Mestre em Fisiologia Vegetal foi adquirida mediante a oportunidade e apoio encontrados nesta instituição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); o suporte financeiro concedido por este órgão foi de grande importância.

Ao meu pai; a sua presença é cada vez mais forte, o seu exemplo de vida será sempre seguido e o seu orgulho perante minhas vitórias será sempre um incentivo.

A minha mãe; todas as suas palavras de conforto ao telefone me tranquilizaram e me deram mais força para sempre seguir em frente.

Aos meus irmãos; o carinho recebido de vocês foi essencial. Estaremos sempre juntos.

Ao Zelvanio; o seu amor, o seu companheirismo, a sua confiança e a sua enorme paciência foram essenciais para conclusão deste curso.

Ao Prof. Fábio DaMatta; o seu profissionalismo, a sua orientação e a sua confiança nestes cinco anos de convivência fizeram-me crescer e foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal; de maneiras diferentes, vocês contribuíram com seus conhecimentos.

Aos Professores Marcelo E. Loureiro (co-orientador), Raimundo S. Barros, Cláudio P. Ronchi e Hugo A. Pinheiro; gentilmente participaram da minha banca de defesa e as suas sugestões engrandeceram este trabalho. Pagotto, fiquei imensamente orgulhosa com a sua participação na defesa.

À Profª. Marília C. Ventrella (co-orientadora); o seu enorme carisma e a sua sensatez fazem de você uma grande profissional.

Ao Professor Jorge Abdala Dergam (Dep. de Biologia Animal); o seu

carisma e o empréstimo do freezer serão sempre lembrados.

Ao Newton; você não imagina o quanto aquele espaço cedido na casa de vegetação do Bioagro foi decisivo para o desenvolvimento deste trabalho! Serei sempre muito agradecida à sua presteza e grande paciência.

Aos funcionários: José Maria, Geraldo, Carlos Raimundo, Oswaldo, Reginaldo, José Antônio, Mercês, Cássia (Fisiologia Vegetal), Mauro (Silvicultura); de uma maneira muito descontraída e harmoniosa, vocês me ajudaram muito.

Ao Grupo Café: Baianóvisky, Gustavo, Alfredo, Marcelo, Agnaldo, Kelly, Samuel, Ricardo, RU, Elaine, Waguinho, PC I, Mãozinha, Ângela; aprendi muito com vocês e a enorme colaboração de vocês neste trabalho será sempre lembrada com muito carinho.

Ao PC II, Werner e Diego; vocês foram mais que companheiros e amigos e a nossa harmoniosa convivência terá sempre o meu respeito.

Aos amigos, Luciana, Paulo, Teresa, Josi, Clarice, Ana Maria, Daniel Nolasco, Cris, Adriano, Franciscleudo, Vânia, Dani; nossa convivência tornou o curso de mestrado mais divertido e possível. Ao Zé e ao Breno; como me fizeram bem as nossas conversas, Zé! E o seu tempero, Brenóvisky, será inesquecível! À Isabella; como pode me entender tanto! Fico tranqüila em saber que a nossa amizade é pra sempre!

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

BIOGRAFIA

KARINE DIAS BATISTA, filha de Francisco Batista Ferreira e Maristela Dias Batista, nasceu em Sete Lagoas, MG, em 6 de outubro de 1981. Nesta mesma cidade, em 1999, concluiu o ensino básico. Iniciou o curso de agronomia em 2001, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, concluindo-o em 2006. Ingressou, em 2006, no curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal (UFV), recebendo o título de mestre em 2008. Neste mesmo ano, iniciou o curso de doutorado em Solos e Nutrição Mineral de Plantas, na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

CONTEÚDO

Resumo	vii
Abstract	ix
1- Introdução	1
2- Material e Métodos	4
Experimento I	5
2.1- Trocas gasosas.....	5
2.2- Glicose, frutose, sacarose, amido e aminoácidos	5
2.3- Ensaio enzimáticos.....	6
2.4- Assimilação de ¹⁴ C e fluxos metabólicos.....	6
2.5- Análise estatística.....	7
Experimento II	8
3- Resultados	9
Experimento I	9
Experimento II	15
4- Discussão	22
5- Conclusões	25
6- Referências Bibliográficas	25

RESUMO

BATISTA, Karine Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Variações diurnas da fotossíntese e efeitos do anelamento de ramos sobre a fotossíntese e o metabolismo do carbono em café arábica.** Orientador: Fábio Murilo DaMatta. Co-orientadores: Marcelo Ehlers Loureiro e Marília Contim Ventrella

O presente estudo foi conduzido procurando-se analisar (i) as variações diurnas da fotossíntese numa condição de baixa demanda evaporativa e (ii) as relações entre A e o metabolismo do carbono em ramos experimentalmente manipulados, via anelamento. Foram conduzidos dois experimentos isoladamente e analisados como tal. Em ambos, plantas de café arábica (*Coffea arabica* L.) foram cultivadas em vasos de doze litros, por aproximadamente oito meses, quando, então, foram avaliadas as trocas gasosas (usando-se de um analisador de gases a infravermelho), a taxa de fixação de $^{14}\text{CO}_2$ e a partição de [^{14}C]-assimilados entre as principais rotas biossintéticas associadas à fotossíntese; adicionalmente, foi coletado material foliar para análises bioquímicas posteriores. No primeiro experimento, as plantas foram cultivadas em uma casa de vegetação sob condições semi-controladas, com valores diurnos do déficit de pressão de vapor (DPV) variando de 1,0 a 1,6 kPa. Houve uma redução (20%) da taxa de fotossíntese líquida (A) em paralelo a um decréscimo (35%) na condutância estomática (g_s), às 16:00 h, em comparação com os valores dessas variáveis obtidos às 08:00 e 12:00 h. As pequenas flutuações diurnas de A parecem ter sido resultantes da manutenção artificial do DPV em níveis relativamente baixos. As correlações simples e canônicas sugeriram que não houve retroinibição da fotossíntese, fato suportado pela ausência de variações diurnas nas concentrações de carboidratos e aminoácidos e pela constância da taxa de absorção de $^{14}\text{CO}_2$ e da partição de [^{14}C]-assimilados, ao longo do dia. Em adição, não se observou aumento na atividade da AGPase, tampouco decréscimo nas atividades inicial e total e no estado de ativação da Rubisco ao final da tarde. Com efeito, as variações diurnas em A foram largamente explicáveis por limitações difusivas à fotossíntese. No segundo experimento, as trocas gasosas foram analisadas ao longo de onze dias após o anelamento dos ramos, às 08:00 h, observando-se um acentuado decréscimo em A e, principalmente, em g_s . Nos ramos anelados, os

teores de amido aumentaram 271% e 203%, respectivamente, no quarto e no décimo dias após o anelamento, enquanto a razão hexoses:aminoácidos aumentou no décimo dia após a implantação dos tratamentos, em relação aos ramos-controle. Os teores dos demais carboidratos e dos aminoácidos mantiveram-se inalterados. As atividades inicial e total e o estado de ativação da Rubisco, bem como a atividade da AGPase, não foram alteradas com o anelamento. Adicionalmente, a capacidade fotossintética potencial não variou, em resposta ao anelamento, provendo, por conseguinte, forte evidência de que as variações em A foram pouco afetadas por limitações bioquímicas à maquinaria fotossintética. Os decréscimos em A foram explicados principalmente por alterações em g_s e não por alterações no metabolismo do carbono, conforme sugere a análise de correlações canônicas. Conclui-se, pois, que as variações nas trocas gasosas ao longo do dia, bem como as variações entre folhas de ramos anelados e não anelados, em café, foram decorrentes meramente de limitações difusivas, e não de possíveis alterações no metabolismo do carbono.

ABSTRACT

BATISTA, Karine Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2006.

Diurnal changes in photosynthesis and effects of branch girdling on photosynthesis and carbon metabolism in arabica coffee Adviser: Fábio Murilo DaMatta. Co-Advisers: Marcelo Ehlers Loureiro and Marília Contim Ventrella

This study was carried out in order to examine (i) the diurnal changes in photosynthesis rates under low atmospheric evaporative demand, and (ii) the relationship between the rate of net photosynthesis (A) and carbon (C) metabolism in experimentally-manipulated branches through girdling. Two experiments were separately conducted and so analyzed. In both experiments, plants of arabica coffee (*Coffea arabica* L.) were grown in 12-L pots during approximately eight months. Then, gas exchanges (measured using an infrared gas analyzer), the rate of uptake of $^{14}\text{CO}_2$ and the partitioning of the recently fixed ^{14}C through the major photosynthetic routes were analyzed; leaf material was also harvested for biochemical assays. In Experiment I, plants were grown in a greenhouse under semi-controlled conditions (diurnal values of vapor pressure deficit, VPD, ranging from 1.0 to 1.6 kPa). There was a decrease (20%) in A paralleling a reduction (35%) in stomatal conductance (g_s) at 16:00 h as compared with the values of these traits obtained at 08:00 and 12:00 h. The narrow diurnal fluctuations in A were apparently coupled with the maintenance of low VPD throughout the day. Simple and canonical correlations evidenced a lack of feedback inhibition to photosynthesis, a fact further supported by the (i) lack of diurnal changes in carbohydrate and amino acid levels and (ii) unchanging rate of $^{14}\text{CO}_2$ uptake and the partitioning of the recently fixed ^{14}C during the day. In addition, the activity of ADP-glucose pyrophosphorylase and the initial and total activities of Rubisco (as well as its activation state) did not change during the day. In fact, diurnal variations in A were largely explained by diffusive limitations. In Experiment II, gas exchange was measured at 08:00 h during 11 days in girdled and non-girdled (control) branches. There was a remarkable decrease in A and especially in g_s . In girdled branches, starch levels increased by 271% and 203%, respectively at the 4th and 10th days after applying the treatments. The hexose-to-amino acid ratio

increased in girdled branches at the 10th day of girdling, but the concentrations of other soluble sugars and amino acids did no change in response to the treatments, as also did the activity of ADP-glucose pyrophosphorylase and the initial and total activities of Rubisco. Moreover, the potential photosynthetic capacity also remained unchanged after girdling, suggesting that changes in A were marginally affected, if so, by biochemical constraints to the photosynthetic machinery. As in Experiment I, changes in A were largely explained by diffusive limitations. In summary, it is proposed that diurnal oscillations in A during the day, as well as between leaves from girdled and non-girdled branches were merely a consequence from diffusive, rather than from biochemical, limitations to photosynthesis.

1- INTRODUÇÃO

Inibições não difusivas da fotossíntese, durante o dia, têm sido atribuídas à retroinibição associada ao acúmulo de carboidratos (Stitt, 1994). A regulação da fotossíntese por meio desse processo pode ocorrer, principalmente, via diversas rotas de síntese dos produtos finais em plantas, sendo as rotas da biossíntese da sacarose, do amido e dos aminoácidos as principais (Paul & Pellny, 2003). A aclimação direta da fotossíntese, em resposta ao acúmulo de produtos finais é uma resposta de curto prazo, que ocorre por meio da alteração do conteúdo de vários metabólitos (ribulose-1,5-bisfosfato - RuBP, 3-fosfoglicerato - 3-PGA, ATP, ADP) e/ou da regulação e da atividade de enzimas-chave (sintase da sacarose fosfato - SPS, fosfatase da frutose-1,6-bisfosfato - FBPase, pirofosforilase da ADP-glicose - AGPase) do metabolismo do carbono (Stitt, 1991). Resumidamente, a baixa taxa da síntese dos produtos finais é tida como uma consequência da redução das atividades da SPS, FBPase e Rubisco, da concentração de Pi, da razão ATP/ADP e do aumento no conteúdo de 3-PGA (Stitt, 1991; Stitt & Krapp, 1999).

A relação entre a taxa de assimilação líquida do carbono (A) e o acúmulo de carboidratos tem sido freqüentemente avaliada valendo-se de experimentos em que a razão fonte:dreno é manipulada. A influência da atividade do dreno sobre a fotossíntese e a partição do carbono tem sido relatada em diferentes espécies, como citrus (Iglesias et al., 2002; Rivas et al., 2007), manga (Urban et al., 2004), café (Franck et al., 2006) e pêsego (Li et al., 2007; Duan et al., 2008). Com uma menor atividade do dreno, o acúmulo de produtos finais nas folhas-fonte é tido como a principal causa para o decréscimo de A (Paul & Pellny, 2003). Sugere-se que um acúmulo de amido poderia formar grandes grãos que, por sua vez, danificariam os cloroplastos ou dificultariam a difusão do CO₂ para os sítios de carboxilação (Nafziger & Koller, 1976), enquanto um acúmulo de açúcares solúveis poderia inibir a expressão de genes ligados à fotossíntese (Sheen, 1990). Entretanto, se de fato A decresce por meio do mecanismo de retroinibição, as atividades das principais enzimas do metabolismo do carbono, mencionadas anteriormente, e A, deveriam diminuir em paralelo a um acúmulo de carboidratos, quando a força do dreno diminui. Porém, isso nem sempre é observado (Li et al.,

2007). Como alternativa à retroinibição, é possível que, quando A decresce em função de uma menor força do dreno, ocorra um fechamento estomático em resposta a mudança na concentração interna de CO_2 (Wünsche et al., 2005). Como consequência, a temperatura foliar pode exceder a temperatura ótima para a fotossíntese e, em última instância, isso pode se traduzir em danos potenciais ao fotossistema II e decréscimos adicionais à taxa fotossintética (Li et al., 2007; Duan et al., 2008).

O café é a mercadoria mais importante do comércio mundial de produtos agropecuários, representando uma fonte de renda importante para vários países da América Latina, África e Ásia (DaMatta, 2004a). Dentre cerca de 100 espécies do gênero *Coffea*, *C. arabica* L. (café arábica) e *C. canephora* Pierre (café robusta) são as únicas espécies de valor econômico no mundo. Hoje, o café arábica responde por, aproximadamente, 65% do café produzido em todo mundo, e o café Robusta, por 35%. O Brasil é o maior produtor mundial de café, e contribuiu com 32% da produção global desse produto em 2005/2006. Semelhantemente à maioria das espécies lenhosas tropicais cultivadas originárias de ambientes sombreados, o café exibe baixas taxas de A (DaMatta, 2003), mesmo sob condições ótimas de cultivo (Silva et al., 2004). Os valores máximos de A registrados em *C. arabica* situam-se na faixa de 7 a 12 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Entretanto, esses valores, mais frequentemente, concentram-se em torno de 4 a 5 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Rena et al., 1994), conforme observado por vários autores (Ronchi et al., 2006; Araújo et al., 2008; Chaves et al., 2008; DaMatta et al., 2008;). A eficiência fotossintética do cafeeiro é muito baixa, mesmo em relação à da maioria das plantas lenhosas (Cannell, 1985). Por outro lado, a capacidade fotossintética máxima, determinada sob luz e CO_2 saturantes, alcança valores da ordem de 30 a 40 $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (DaMatta et al., 2001). Pouco se sabe sobre os mecanismos que explicariam a magnitude de A do cafeeiro; em adição aos baixos valores intrínsecos de g_s , sugere-se também que uma baixa condutância mesofílica (g_m) ao CO_2 na fase gasosa (desde a câmara subestomática até a parede celular das células do mesofilo), ou mesmo na fase líquida (desde a parede celular das células do mesofilo até os sítios de carboxilação no estroma dos cloroplastos), teria papel preponderante nessa resposta (DaMatta et al., 2001; Patakas et al., 2003; Silva et al., 2004).

Em vários estudos conduzidos em Viçosa, com café, (Araújo et al., 2008; Chaves et al., 2008; DaMatta et al., 2008), os decréscimos em A , à tarde, ocorreram em paralelo a reduções substanciais em g_s . Nesses estudos, os valores de g_s foram negligenciáveis à tarde, fato provavelmente associado ao incremento, ao longo do dia, do déficit de pressão de vapor (DPV) e da temperatura foliar que, em condições de campo, atinge facilmente valores da ordem de 40°C, ou mesmo superiores. Observações similares têm sido relatadas em outros experimentos com café (e.g., Barros et al., 1997; Gutiérrez et al., 1994; Gutiérrez & Meinzer, 1994; DaMatta, 2004 b,c). Em função da alta sensibilidade do estômato do café ao DPV, tem-se proposto, pois, que os decréscimos de g_s , à tarde, largamente explicaram as flutuações diurnas de A (DaMatta 2004 b, c). Registre-se que, nos estudos realizados em Viçosa, os decréscimos em A , à tarde, não foram associados à fotoinibição da fotossíntese e tampouco à retroinibição metabólica derivada do acúmulo de produtos finais desse processo (Araújo et al., 2008; Chaves et al., 2008; DaMatta et al., 2008). Por outro lado, em outros estudos conduzidos em regiões cafeeiras distintas, como em São Paulo (sudeste do Brasil) e na Costa Rica, tem-se atribuído à fotoinibição (Frank et al., 2006; Ronquim et al., 2006) ou à retroinibição associada a um acúmulo de carboidratos (Franck et al., 2006) como sendo as possíveis causas diretas envolvidas nas oscilações diurnas de A .

Em café arábica, a atividade do dreno e a capacidade da fonte parecem ser intimamente relacionadas. Cannell (1971) observou, em cafeeiros cujas flores foram totalmente removidas (queda na atividade do dreno), um decréscimo de 30% em A , enquanto Vaast et al. (2005) mostraram que A foi 60% menor em folhas de ramos anelados e desfrutificados, em relação a ramos anelados com alta carga de frutos. A redução de A com o aumento da razão fonte:dreno tem sido circunstancialmente explicada pela retroinibição da fotossíntese associada ao acúmulo de produtos finais. Todavia, diferentes respostas têm sido relatadas, nesse contexto. Por exemplo, DaMatta et al. (1997) verificaram uma associação negativa entre o acúmulo de amido e A , em folhas de cafeeiros cultivados em vasos, enquanto Franck et al. (2006) observaram uma correlação negativa entre A e a concentração de açúcares solúveis. Em adição, esses autores, baseando-se em experimentos com suplementação de sacarose, concluíram que a queda em A foi decorrente do acúmulo de sacarose no floema das folhas-fonte. Por outro lado, Ronchi et al. (2006), trabalhando com plantas de café com diferentes razões

fonte:dreno, demonstraram que A não se correlacionou com as concentrações de amido, sacarose ou hexoses, mas correlacionou-se negativamente com a razão hexoses:aminoácidos. Por sua vez, DaMatta et al. (2008) evidenciaram que o decréscimo de A, com o aumento da razão área foliar:fruto (aumento da razão fonte:dreno), foi largamente dissociado de retroinibição da fotossíntese, uma vez que não houve acúmulo de carboidratos e tampouco alterações nas atividades de enzimas-chave associadas ao metabolismo do carbono. Contudo, as variações em A foram largamente explicadas pelas variações em g_s .

O presente estudo foi conduzido tendo-se em mente dois objetivos principais: (i) analisar as variações diurnas da fotossíntese numa condição de baixa demanda evaporativa – nesse caso, as variações diurnas de g_s devem ser minimizadas, e a retroinibição da fotossíntese, se ocorrente, deve ser potencializada, em função das maiores taxas de A associadas a menores limitações difusivas; e (ii) avaliar as relações entre A e o metabolismo do carbono em ramos experimentalmente manipulados, via anelamento; condição em que se espera uma elevação dos níveis de carboidratos nas folhas-fonte e, por extensão, retroinibição do processo fotossintético.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos, isoladamente, e analisados como tal. Em ambos, mudas de *Coffea arabica* L. cv ‘Catuaí Vermelho IAC 44’ foram transplantadas com três pares de folhas para vasos contendo uma mistura de 12 litros, composta por solo:areia:esterco bovino (3:1:1, v:v:v) e adubada com 10,0 kg de super fosfato simples, 240 g de KCl e 2,0 kg de calcário dolomítico por metro cúbico de substrato. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em Viçosa (20°45’S, 42°54’W, 650 m altitude), Minas Gerais, sendo irrigadas sempre que necessário, e fertilizadas na forma de adubação de cobertura com 3 g de sulfato de amônio por planta, a intervalos de 45 dias.

Experimento I

O experimento foi conduzido em casa de vegetação sob condições semi-controladas, de modo que o déficit de pressão de vapor da atmosfera fosse mantido em níveis relativamente baixos e com flutuações diurnas reduzidas (1,0 a 1,6 kPa). A casa de vegetação, cuja transmitância era 60% da radiação externa, era dotada de um sistema de refrigeração/aquecimento, acionado sempre que necessário, a fim de manter a temperatura do ar em torno de 28°C, ao longo do dia.

As plantas foram cultivadas por cerca de oito meses, quando procederam-se às avaliações de trocas gasosas e coletas de material foliar para análises bioquímicas posteriores, em folhas completamente expandidas, do terceiro ou quarto par, a partir do ápice de ramos plagiotrópicos medianos das plantas, às 08:00, 12:00 e 16:00 h. O material vegetal foi coletado na forma de discos foliares, envolvido em papel alumínio, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80°C.

2.1- Trocas gasosas

A taxa de assimilação líquida do carbono (A), a condutância estomática (g_s) e a razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) foram medidas em sistema aberto, nos horários mencionados anteriormente, sob luz saturante artificial ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração de CO_2 ambiente, com um analisador de gás a infravermelho portátil (LI 6400, Licor, Lincoln, NE, EUA).

2.2- Glicose, frutose, sacarose, amido e aminoácidos totais

Carboidratos e aminoácidos foram extraídos de tecidos foliares (aproximadamente 0,120 g de massa fresca), em etanol 80% (v/v) com 2% (p/v) de ácido ascórbico, incubados a 70°C, por 90 min, e centrifugados uma vez a 15000 g, por 10 min. Na fração solúvel, foram determinados os teores de glicose, frutose, sacarose (Praxedes et al., 2006) e aminoácidos (Moore & Stein, 1948) e, na fração insolúvel, o teor de amido (Praxedes et al., 2006).

2.3- Ensaios enzimáticos

As amostras foliares (aproximadamente 0,120 g de massa fresca) foram homogeneizadas, em almofariz, com tampão de extração (Geigenberger & Stitt, 1993) em pH 7,4, contendo HEPES-KOH 50 mol m^{-3} , MgCl_2 5 mol m^{-3} , EDTA 1 mol m^{-3} , EGTA 1 mol m^{-3} , DTT 5 mol m^{-3} , benzamidina 2 mol m^{-3} , ácido amino-n-capróico 2 mol m^{-3} , PMSF 5 mol m^{-3} , BSA 0,1% (p/v), glicerol 10% (v/v) e Triton X-100 0,1% (v/v). Em seguida, o extrato foi centrifugado a 15000 g, por 3 min. Os sobrenadantes foram quantificados e 500 μL foram dessalinizados através de colunas Sephadex G-25M, 3 x 1 cm de gel. O volume de extrato após a eluição nas colunas também foi quantificado. Todo o procedimento foi realizado a 4°C e os ensaios enzimáticos foram previamente otimizados para tempo de reação e volume de extrato. O extrato dessalinizado fresco foi imediatamente utilizado para o ensaio da Rubisco (EC 4.1.1.39). As atividades inicial (V_{inicial}) e total (V_{total}) da Rubisco foram avaliadas como Sharkey et al. (1991) e o seu estado de ativação foi calculado como a razão entre as atividades inicial e total (%). O restante do extrato foi armazenado a -20°C e utilizado posteriormente para o ensaio da atividade da pirofosforilase da ADP glicose – AGPase (EC 2.2.7.27), como descrito em Praxedes et al. (2006).

Os ensaios supracitados foram executados em um leitor de placa “Elisa” (Asys – UVM 340, Eugendorf, Áustria). A concentração de proteína total nos extratos foi determinada conforme Bradford (1976), utilizando-se de uma curva de calibração com BSA.

2.4- Assimilação de ^{14}C e fluxos metabólicos

Folhas completamente expandidas, do terceiro ou quarto par a partir do ápice de ramos plagiotrópicos medianos das plantas, foram coletadas e imediatamente tiveram seus pecíolos imersos em água, sendo, então, transportadas para o laboratório. As folhas foram mantidas no escuro por 30 min. A partir de então, cinco discos, com diâmetro de 14 mm cada, foram retirados do limbo foliar e postos em contato com ^{14}C . A 400 μL de solução $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ($100 \text{ Bq } \mu\text{L}^{-1}$) foram adicionados 10 μL de anidrase carbônica ($0,5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$), em uma câmara de

Clarck de fase gasosa (Hansatech, Kings Lynn, Norfolk, Reino Unido), na qual estavam acondicionados os discos foliares. A câmara foi imediatamente vedada e os discos foliares foram mantidos sob $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa, a 35°C , por 30 min. Após, os discos foram imediatamente congelados em N_2 líquido e mantidos em freezer a -80°C . Posteriormente, o tecido foliar foi fracionado, para determinar-se o destino metabólico do $^{14}\text{CO}_2$ assimilado. Foi separada a fração insolúvel em etanol (amido, celulose e proteínas) da fração solúvel, a qual, então, foi fracionada em resinas catiônica (DOWEX 50WX2-200 100-200 mesh) e aniônica (Amberlite CG-400 100-200 mesh), sucessivamente, para separação das frações ácida (ácidos orgânicos), básica (aminoácidos) e neutra (açúcares). A extração dos compostos solúveis em etanol se deu por incubações em série etanólica (80, 50, 20, 0, 80% - álcool/água, v/v), por 10 min, em banho-maria, a 100°C , em microtubos vedados. Todas as amostras foram combinadas e concentradas por liofilização. A radioatividade incorporada nas diferentes frações foi determinada num leitor de cintilação (Beckman LS 6500, Beckman Instruments, Fullerton, Califórnia, EUA), usando-se líquido de cintilação (Ready SafeTM Cocktail) na proporção sugerida pelo fabricante.

2.5- Análise estatística

O experimento foi analisado em delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos (medições às 08:00, 12:00 e 16:00 h), e seis repetições. A unidade experimental foi composta por uma planta por vaso. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de significância.

Com o objetivo de analisar a relação entre dois conjuntos de variáveis, grupo 1 (A e radioatividade total incorporada, que expressa a capacidade fotossintética potencial) e grupo 2 (g_s , razão hexoses:aminoácidos, sacarose e amido), procedeu-se à análise de correlações canônicas, que estima a máxima correlação entre as combinações lineares das variáveis. O grupo 1 representa as variáveis-resposta, enquanto o grupo 2 representa as variáveis explicativas. O número de correlações canônicas é igual ao menor número de variáveis que constituir um dos grupos e sua magnitude sempre decresce com a ordem em que

são estimadas. Inicialmente, são calculadas duas combinações lineares, uma sobre cada grupo de variáveis, de forma que o coeficiente de correlação de Pearson entre eles seja máximo. As combinações lineares são denominadas variáveis canônicas e os pares são denominados pares canônicos. Para cada par canônico, o coeficiente de correlação canônico mede a intensidade da correlação, enquanto a composição das variáveis canônicas exprime a natureza da associação. Cada variável canônica é composta pelos coeficientes canônicos (cc) correspondentes a cada característica em estudo. O coeficiente canônico representa a contribuição conjunta da variável para a função, que é linear, mostrando não o efeito que a variável poderia ter individualmente, mas a sua influência na presença de outras (Rencher, 1992). Para os cálculos das correlações canônicas, os dados foram normalizados para média igual a zero e variância igual a um. A hipótese de nulidade para as correlações canônicas foi testada por meio do teste do Qui-quadrado.

Realizou-se também correlação simples de Pearson entre A e g_s . Todas as análises foram feitas utilizando-se do Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG-UFV, 1997).

Experimento II

Neste experimento, as plantas foram cultivadas em uma casa de vegetação sem controle de temperatura, com transmitância de 52% da radiação externa.

Por volta do oitavo mês de cultivo, foram selecionadas seis plantas; um ramo plagiotrópico mediano de cada uma dessas plantas foi anelado na base, próximo de sua inserção ao ramo ortotrópico. O anelamento consistiu na retirada do floema, via remoção de 2 cm de comprimento da casca do ramo. O local foi envolvido por um filme de PVC de modo a evitar-se a desidratação do tecido exposto, bem como o ataque de patógenos e pragas. Nesse mesmo ramo foram retiradas todas as folhas em expansão (próximas ao ápice), consideradas como dreno. Um ramo não anelado, oposto ao anelado, em cada planta, foi utilizado como controle do experimento. As avaliações do experimento (trocas gasosas e coleta de material foliar para análises bioquímicas posteriores) foram realizadas em folhas completamente expandidas, do terceiro ou quarto par a partir do ápice dos ramos plagiotrópicos estudados, em torno das 8:00 h, quando as taxas de

fotossíntese foram máximas nas condições de cultivo deste experimento. O material vegetal foi coletado na forma de discos foliares, envolvidos em papel alumínio, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C .

As medições de trocas gasosas foram realizadas ao longo de 11 dias após o anelamento. Os ensaios enzimáticos, as quantificações de glicose, frutose, sacarose, amido e aminoácidos totais e a assimilação de ^{14}C e a partição de [^{14}C]-assimilados foram analisados no quarto e no décimo dias após o anelamento, conforme descrito para o “Experimento I”.

O experimento foi constituído, pois, em um fatorial 2^2 (duas épocas de avaliação; ramos anelados e ramos não anelados), com seis repetições. O delineamento experimental foi em blocos casualizados. A unidade experimental foi composta por um ramo anelado ou não anelado, em cada planta. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Newman-Keuls, a 5% de significância. As correlações canônicas foram realizadas conforme mencionado no “Experimento I”. Correlações de Pearson entre concentração de amido e radioatividade incorporada na fração insolúvel foram também examinadas. Todas as análises foram feitas utilizando-se o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG-UFV, 1997).

3- RESULTADOS

Experimento I

Neste experimento, as taxas máximas de assimilação líquida do carbono (A) situaram-se em torno de $10 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, medidas às 08:00 e às 12:00 h, observando-se, contudo, uma ligeira queda ($P \leq 0,05$), em torno de 20%, para os valores de A, às 16:00 h, em relação àqueles obtidos às 08:00 e 12:00 h. Os valores de condutância estomática (g_s) não diferiram significativamente quando obtidos às 08:00 h e 12:00 h, porém decresceram cerca de 35% às 16:00 h (Figura 1). Embora g_s tenha sido reduzida, alterações significativas em C_i/C_a não foram observadas.

Com exceção da concentração de sacarose, que foi ligeiramente menor (~23%) às 08:00 h em relação às 12:00 ou 16:00 h, as concentrações de glicose,

frutose, amido, aminoácidos e a razão hexoses:aminoácidos, nas folhas, mantiveram-se constantes ao longo do dia (Figura 2). Com efeito, nos experimentos de fluxos metabólicos (Tabela 1), também não se verificou variação diurna na magnitude de ^{14}C fixado e particionado nas diferentes frações, quais sejam, insolúvel (amido, principalmente, e proteínas e componentes da parede celular), neutra (açúcares solúveis), ácida (ácidos orgânicos) e básica (aminoácidos). Cerca de 4 a 5% da radioatividade total incorporada aos tecidos foliares foram distribuídas em amido e componentes de parede celular, 5 a 6% em ácidos orgânicos, aproximadamente 80% em açúcares solúveis, e cerca de 10 a 13% em aminoácidos. Registre-se, ainda, que a radioatividade total incorporada também não foi alterada ao longo do dia, sugerindo que a capacidade fotossintética potencial se tenha mantido constante ao longo do dia.

Apesar de os valores absolutos de A e da capacidade fotossintética potencial (expressa pela radioatividade total incorporada) terem sido máximos às 08:00 h, observou-se uma menor atividade da Rubisco nesse horário, em relação à atividade determinada às 12:00 e 16:00 h. Em todo o caso, não se observou variação diurna no estado de ativação da enzima. Em contraste, a atividade da AGPase foi significativamente maior no início da manhã, sem diferenças entre os materiais coletados às 12:00 e 16:00 h (Figura 3).

As correlações canônicas entre as variáveis-resposta (A e a radioatividade total incorporada) e as variáveis explicativas (g_s , razão hexoses:aminoácidos, sacarose e amido) foram significativas ($P = 0,001$) somente para um par canônico, com elevado valor do coeficiente de correlação ($r = 0,88$) (Tabela 2). Os grupos considerados não são, pois, independentes. A análise das variáveis que compõem o primeiro par canônico sugere, entre as variáveis que expressam a assimilação de carbono, que A (mas não a capacidade fotossintética potencial, como era de se esperar) foi fortemente associada ao conjunto das variáveis explicativas, porém apenas g_s foi a variável com alta correlação com A, enquanto as outras variáveis explicativas tiveram uma contribuição desprezível para determinar as flutuações em A. Assim, o primeiro par canônico sugere que A ($cc = 0,9842$) foi maior quanto maior g_s ($cc = 0,9921$) e que as outras variáveis explicativas pouco explicaram as variações de A. O baixo valor do coeficiente canônico apresentado pela radioatividade total incorporada demonstra que essa variável não descreveu a variação máxima entre os tratamentos.

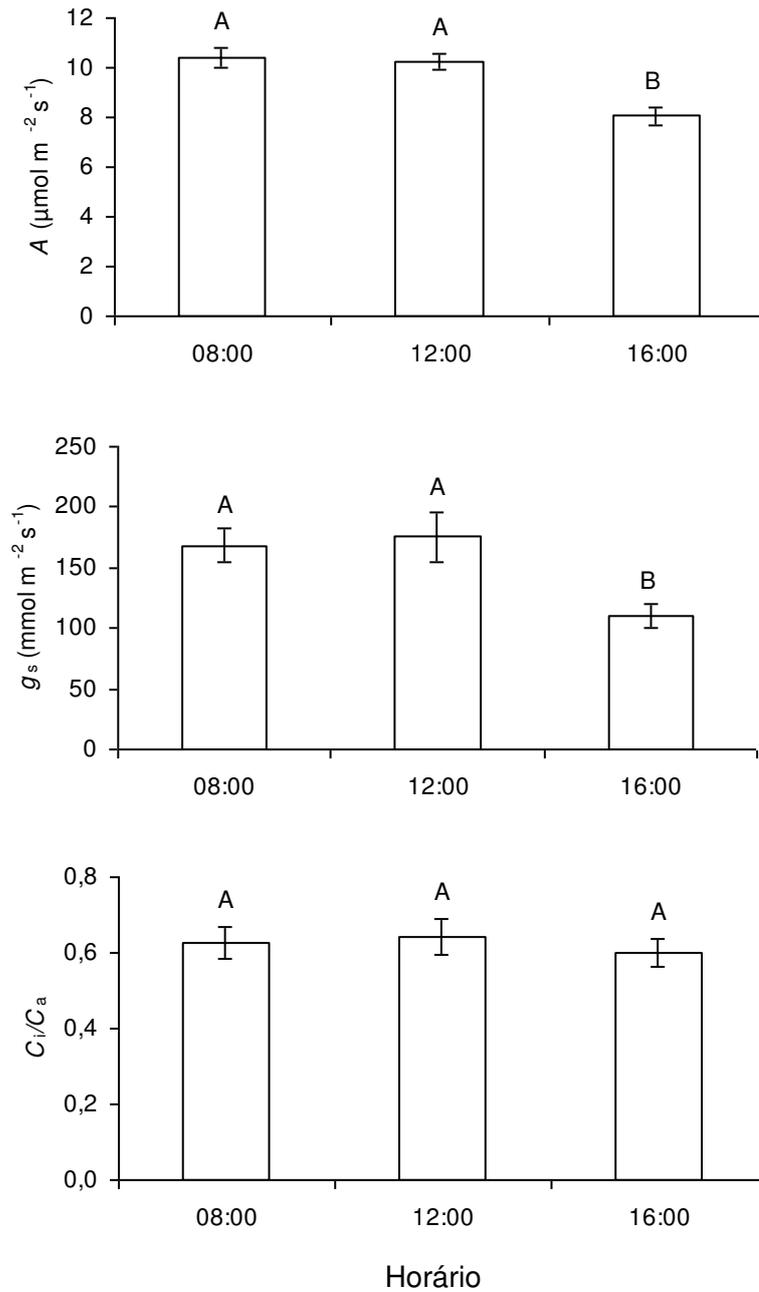


Figura 1: Taxa de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática (g_s) e razão entre as concentrações interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a), medidas às 08:00, 12:00 e 16:00 h, em plantas de *Coffea arabica* cultivadas em vasos. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os horários ($P < 0,05$; Teste de Newman-Keuls). Cada coluna representa a média \pm erro padrão ($n = 6$; cada repetição é a média de duas determinações).

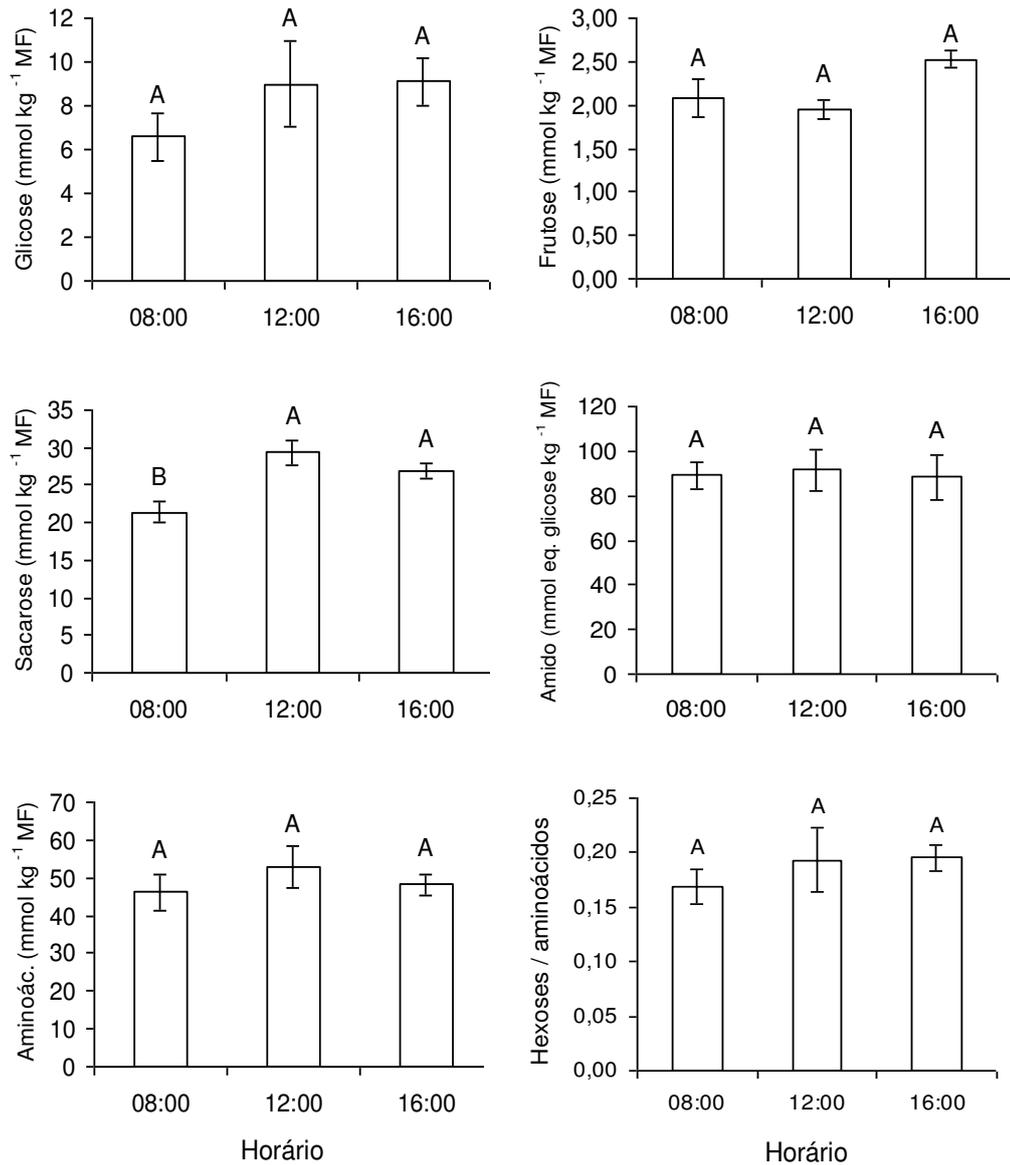


Figura 2: Teores foliares de glicose, frutose, sacarose, amido e aminoácidos e razão hexoses:aminoácidos, quantificados às 08:00, 12:00 e 16:00 h, em plantas de *Coffea arabica* cultivadas em vasos. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os horários (P < 0,05; Teste de Newman-Keuls). Cada coluna representa a média \pm erro padrão (n = 6).

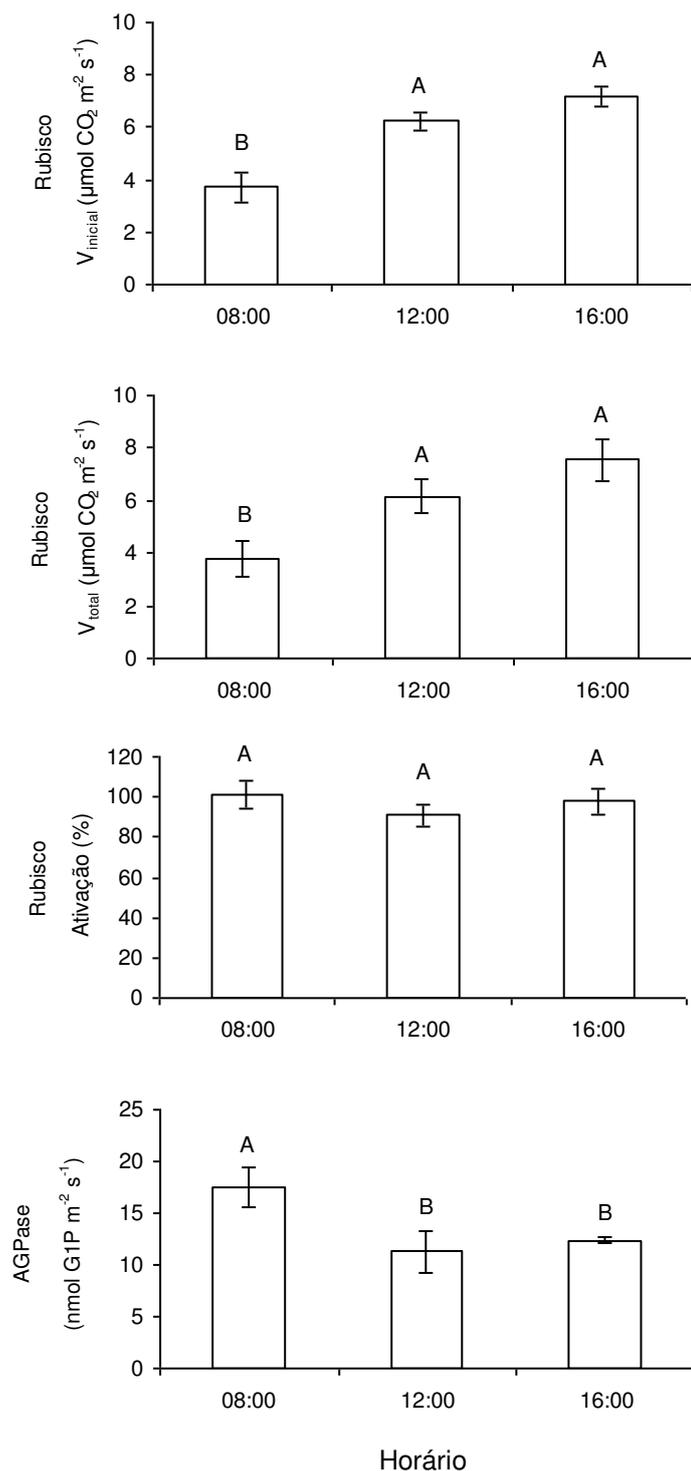


Figura 3: Atividades foliares ($V_{inicial}$ e V_{total}) e estado de ativação da carboxilase da ribulose-1,5-bisfosfato (Rubisco) e atividade da pirofosforilase da ADP-glicose (AGPase), quantificadas às 08:00, 12:00 e 16:00 h, em plantas de *Coffea arabica* cultivadas em vasos. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os horários ($P < 0,05$; Teste de Newman-Keuls). Cada coluna representa a média \pm erro padrão ($n=6$).

Tabela 1: Partição do ^{14}C incorporado nos tecidos foliares, às 8:00, 12:00 e 16:00 h, em plantas de *Coffea arabica* cultivadas em vasos. A radioatividade total incorporada foi particionada nas diferentes frações (insolúvel = amido, componentes de parede celular e proteínas; neutra = açúcares solúveis; ácida = ácidos orgânicos; e básica = aminoácidos). Os valores de radioatividade incorporada foram expressos em kBq m^{-2} e como porcentagem, em cada fração, do ^{14}C total fixado. Letras distintas indicam diferenças significativas entre os horários ($P \leq 0,05$; Teste de Newman-Keuls). Cada valor representa a média \pm erro padrão ($n = 6$).

Frações	8:00 h		12:00 h		16:00 h	
	kBq m^{-2}	%	kBq m^{-2}	%	kBq m^{-2}	%
Insolúvel	88 ± 5 A	4	85 ± 2 A	4	94 ± 10 A	5
Neutra	1769 ± 167 A	81	1553 ± 106 A	77	1482 ± 157 A	78
Ácida	107 ± 14 A	5	114 ± 10 A	6	95 ± 10 A	5
Básica	237 ± 28 A	10	258 ± 23 A	13	229 ± 28 A	12
Total	2328 ± 137 A	100	2010 ± 136 A	100	1899 ± 182 A	100

Tabela 2: Correlações canônicas entre variáveis-resposta (Grupo 1; taxa de assimilação líquida do carbono, A, e radioatividade total incorporada) e explicativas (Grupo 2; condutância estomática, g_s , sacarose, amido e razão hexoses:aminoácidos). As variáveis foram estimadas em plantas de *Coffea arabica* às 8:00, 12:00 e 16:00 h. Os pares canônicos foram comparados pelo teste de Qui-quadrado.

Coeficientes Canônicos		
Características	Par Canônico 1	Par Canônico 2
Grupo 1		
A	0,9842	0,0399
Radioatividade total incorporada	- 0,2182	1,0204
Grupo 2		
g_s	0,9921	- 0,0688
Sacarose	0,0271	- 0,5267
Amido	- 0,0062	- 0,5653
Razão hexoses:aminoácidos	0,1227	- 0,6310
Correlação	0,8757	0,5182
Significância	0,0013	0,2076

Experimento II

Neste experimento, o comportamento de A e g_s foi acompanhado durante 11 dias após o anelamento dos ramos, observando-se decréscimos expressivos em A e, mais particularmente, em g_s (Figura 4, A e B). Conforme se deduz da Figura 4 (C e D), a relação de dependência entre A e g_s é muito mais marcante nos ramos anelados que nos não anelados. Ao fim do experimento, os valores de A e de g_s foram, respectivamente, 56% e 80% inferiores aos dos ramos não anelados (Figura 5).

No quarto e no décimo dias após a implantação dos tratamentos, além das trocas gasosas, foram quantificadas as concentrações foliares de carboidratos e aminoácidos, a partição do ^{14}C incorporado pelos tecidos e as atividades da Rubisco e da AGPase, com o intuito de analisarem-se as contribuições relativas de g_s e do metabolismo do carbono sobre as flutuações de A . Observou-se uma clara tendência, porém não significativa, de maiores concentrações de glicose e frutose nos ramos anelados, em relação aos ramos não anelados, enquanto as concentrações de sacarose e de aminoácidos não responderam aos tratamentos (Figura 6). Notou-se, também, que a razão hexoses:aminoácidos foi significativamente maior nos ramos anelados, aos 10 dias após o anelamento, enquanto os teores de amido foram substancialmente maiores (respectivamente 271% e 203% no quarto e décimo dias após o anelamento) nos ramos anelados. Apesar dessas diferenças, contudo, não foram observadas variações entre ramos anelados e não anelados no que diz respeito à incorporação total de $^{14}\text{CO}_2$, tampouco na partição de ^{14}C para a síntese de açúcares solúveis, aminoácidos e ácidos orgânicos, conforme mostram os dados da Tabela 3. Registre-se que, nos ramos anelados, a partição de ^{14}C para a síntese de compostos insolúveis (principalmente amido, em folhas expandidas) foi significativamente menor nos ramos anelados, porém não houve qualquer correlação significativa entre as concentrações atuais de amido e a partição de ^{14}C para a sua síntese ($r = -0,18$; $P = 0,200$). Ademais, as maiores concentrações de amido encontradas neste experimento ($76 \text{ mmol eq. glicose kg}^{-1} \text{ MF}$) (Figura 2) foram, em termos absolutos, inferiores àquelas medidas em folhas de plantas em condições normais de cultivo (vide experimento I, Figura 2). De modo geral, houve poucas variações nas concentrações de carboidratos como também na partição de ^{14}C entre os dois

dias de avaliação. Finalmente, tanto a atividade como o estado de ativação da Rubisco, assim como a atividade da AGPase, pouco ou nada responderam aos tratamentos aplicados (Figura 7).

Semelhantemente ao experimento I, as correlações canônicas entre as variáveis-resposta (A e a radioatividade total incorporada) e as variáveis explicativas (g_s , razão hexoses:aminoácidos, sacarose e amido) foram significativas ($P = 0,0001$) somente para um par canônico, com elevado valor do coeficiente de correlação ($r = 0,99$) (Tabela 4). Portanto, esse par canônico indica que A ($cc = 1,0871$) e a radioatividade total incorporada ($cc = -0,1984$) podem ser explicadas, em diferentes magnitudes, por aquelas variáveis independentes. Mais uma vez, entretanto, as variáveis com maior grau de associação foram A e g_s , sugerindo que as flutuações em A foram largamente governadas por variações em g_s .

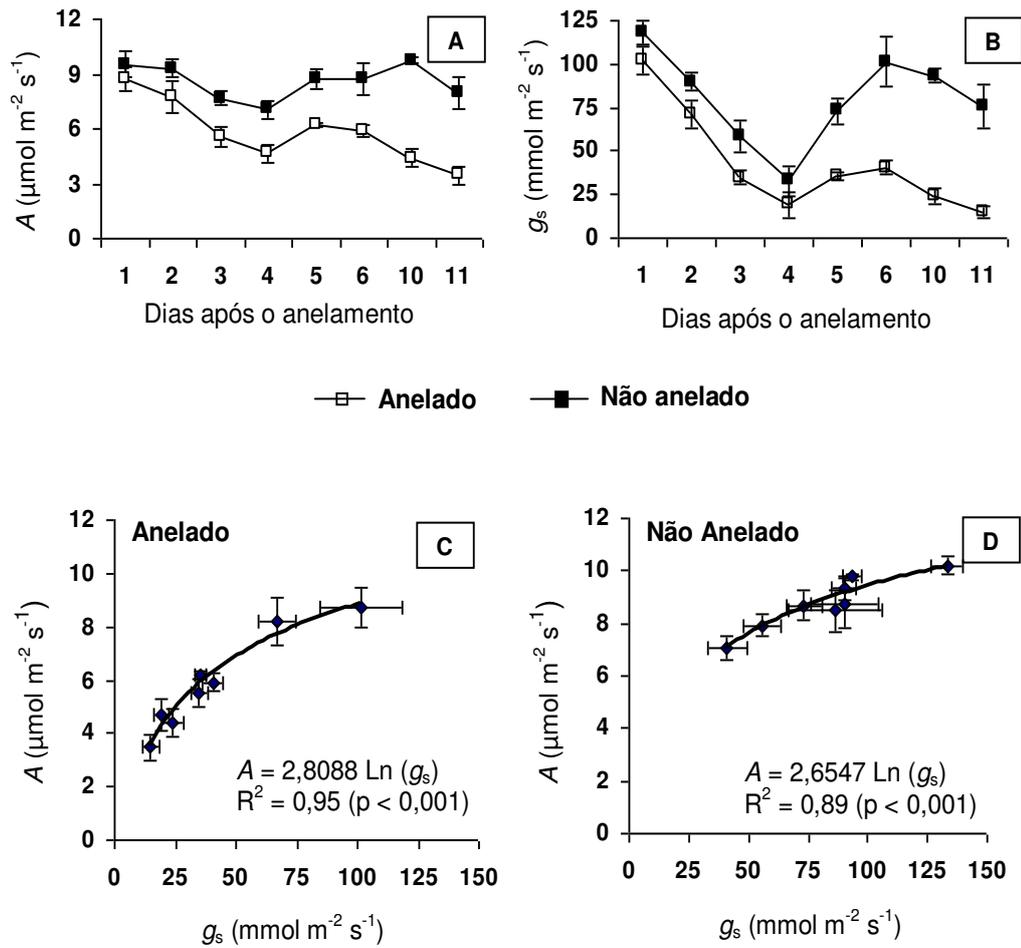


Figura 4: Taxa de assimilação líquida de carbono (A) (A), condutância estomática (g_s) (B) e relação entre A e g_s em ramos anelados (C) e ramos não anelados (D), às 08:00 h, em plantas de *Coffea arabica*, ao longo de 11 dias de experimento. Cada símbolo representa a média \pm erro padrão ($n = 6$).

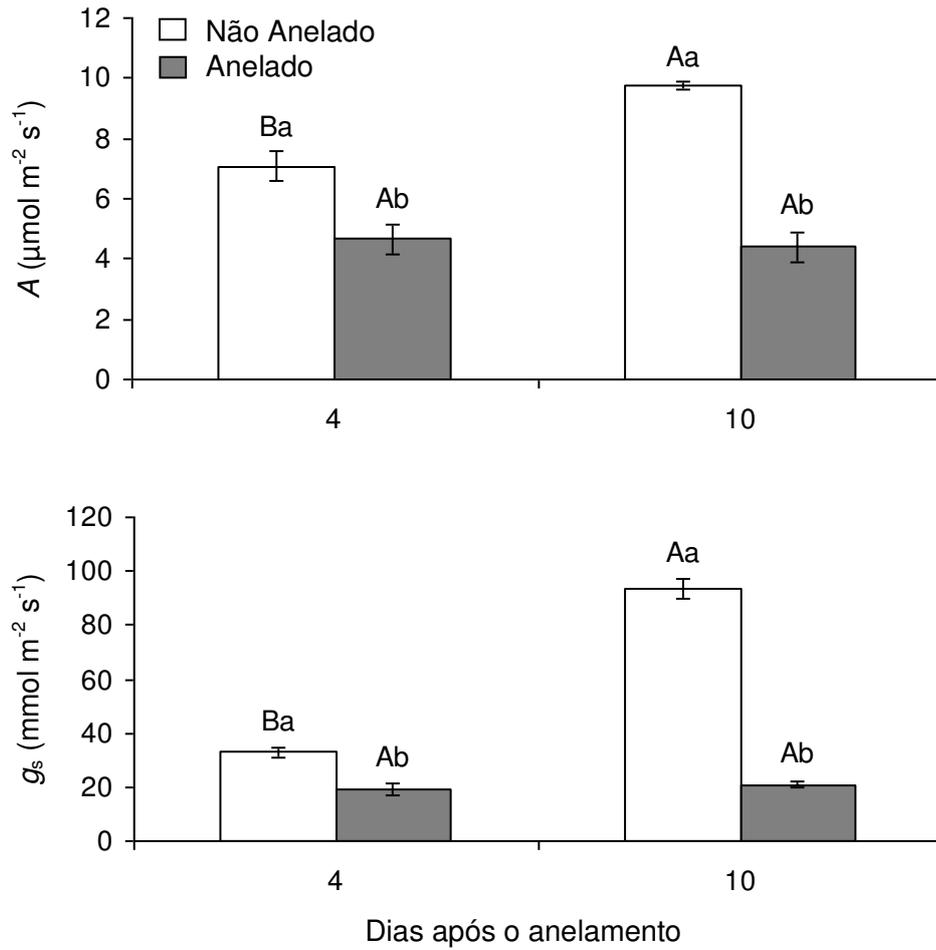


Figura 5: Taxa de assimilação líquida de carbono (A) e condutância estomática (g_s), às 08:00 h, em plantas de *Coffea arabica* cultivadas em vasos. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre dias e letras minúsculas, entre ramos anelados e ramos não anelados ($P < 0,05$; Teste de Newman-Keuls). Cada coluna representa a média \pm erro padrão ($n = 6$).

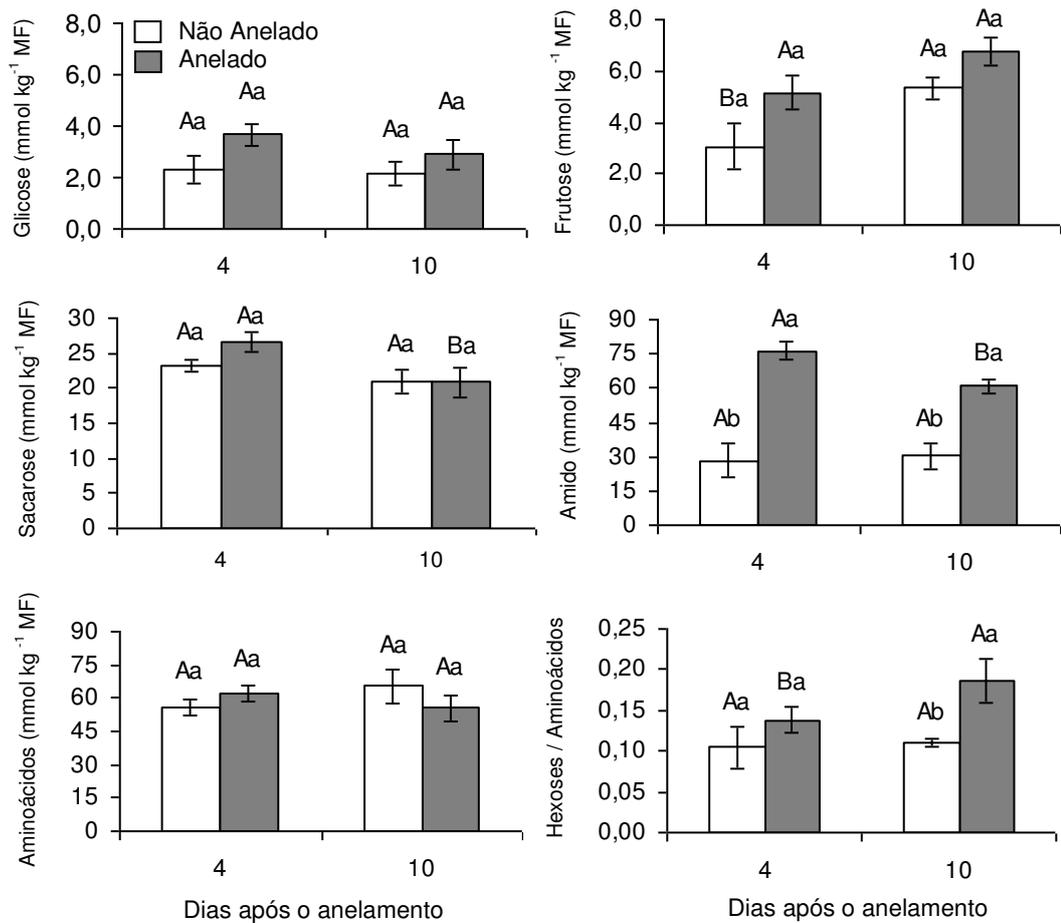


Figura 6: Teores foliares de glicose, frutose, sacarose, amido e aminoácidos e razão hexoses:aminoácidos, às 08:00 h, em plantas de *Coffea arabica* cultivadas em vasos. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os dias e letras minúsculas distintas, entre ramos anelados e ramos não anelados ($P < 0,05$; Teste de Newman-Keuls). Cada coluna representa a média \pm erro padrão ($n = 6$).

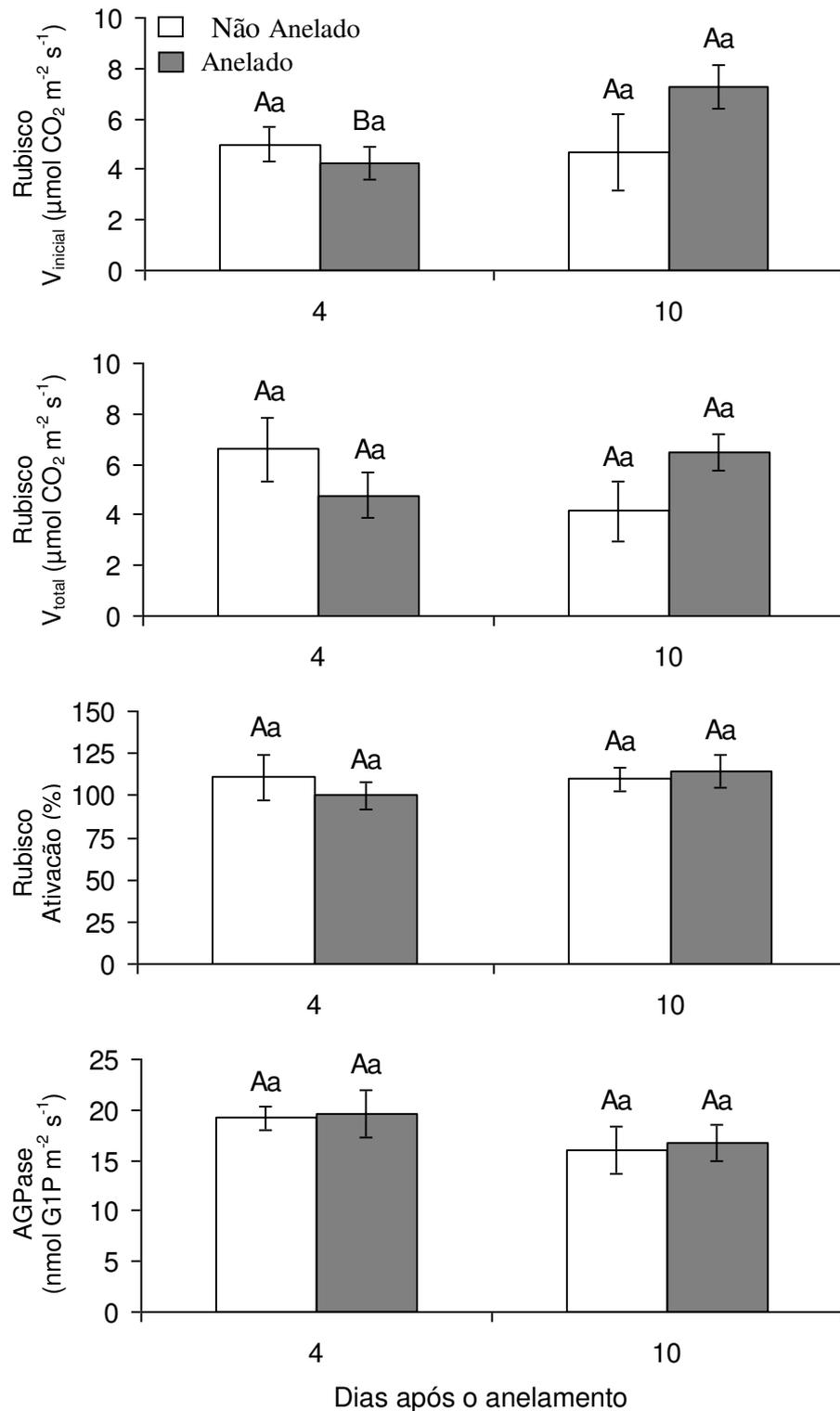


Figura 7: Atividades foliares ($V_{inicial}$ e V_{total}) e estado de ativação da carboxilase da ribulose-1,5-bisfosfato (Rubisco) e atividade da pirofosforilase da ADP-glicose (AGPase), às 08:00 h, em plantas de *Coffea arabica* cultivadas em vasos. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os dias e letras minúsculas distintas, entre ramos anelados e ramos não anelados ($P \leq 0,05$; Teste de Newman-Keuls). Cada coluna representa a média \pm erro padrão ($n = 6$).

Tabela 3: Partição do ^{14}C incorporado nos tecidos foliares, às 8:00 h, em plantas de *Coffea arabica* cultivadas em vasos. A radioatividade total incorporada foi particionada nas diferentes frações (insolúvel = amido, proteínas e componentes de parede celular; neutra = açúcares solúveis; ácida = ácidos orgânicos; e básica = aminoácidos). Os valores de radioatividade incorporada foram expressos em kBq m^{-2} e como porcentagem, em cada fração, da absorção total de ^{14}C . Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os dias e letras minúsculas distintas entre ramos anelados e ramos não anelados ($P \leq 0,05$; teste de Newman-Keuls). Cada valor representa a média \pm erro padrão ($n = 6$).

Frações	Época	Tratamentos			
		Anelado		Não anelado	
		kBq m^{-2}	%	kBq m^{-2}	%
Insolúvel	4 dias	64 ± 7 Ab	3	93 ± 9 Aa	5
	10 dias	46 ± 2 Ab	3	73 ± 4 Aa	4
Neutra	4 dias	1477 ± 89 Aa	79	1616 ± 144 Aa	79
	10 dias	1123 ± 76 Ba	82	1346 ± 122 Aa	82
Ácida	4 dias	79 ± 5 Aa	4	89 ± 7 Aa	4
	10 dias	60 ± 5 Ba	4	62 ± 9 Ba	4
Básica	4 dias	240 ± 15 Aa	13	256 ± 11 Aa	13
	10 dias	172 ± 16 Ba	11	170 ± 15 Ba	10
Total	4 dias	1860 ± 93 Aa	100	2044 ± 156 Aa	100
	10 dias	1498 ± 131 Aa	100	1639 ± 156 Ba	100

Tabela 4: Correlações canônicas entre variáveis-resposta (Grupo 1; taxa de assimilação líquida do carbono, A, e radioatividade total incorporada) e explicativas (Grupo 2; condutância estomática, g_s , sacarose, amido e razão hexoses:aminoácidos). As variáveis foram estimadas em folhas de ramos anelados e não anelados de plantas de *Coffea arabica* às 08:00 h. Os pares canônicos foram comparados pelo teste de Qui-quadrado.

Coeficientes Canônicos		
Características	Par Canônico 1	Par Canônico 2
Grupo 1		
A	1,0871	0,1507
Radioatividade total incorporada	-0,1984	1,0418
Grupo 2		
g_s	0,9329	-0,1972
Sacarose	-0,0971	0,5748
Amido	-0,2758	-0,5002
Razão hexoses:aminoácidos	0,2099	-0,6169
Correlação	0,9888	0,4876
Significância	0,00001	0,13286

4- DISCUSSÃO

Os valores máximos de A (aproximadamente $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) observados em ambos os experimentos foram similares aos maiores valores (aproximadamente $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) já registrados para café (Silva et al., 2004; Ronquim et al., 2006). As pequenas flutuações diurnas de A , contudo, parecem ter sido resultantes da manutenção artificial do DPV em níveis relativamente baixos, contrariamente aos resultados observados em experimentos tanto com plantas em vasos (Ronchi et al., 2006) como sob condições de campo (Araújo et al., 2008; Chaves et al., 2008; DaMatta et al., 2008), em situações em que a demanda evaporativa da atmosfera é particularmente elevada à tarde. Nesses experimentos, o padrão típico das oscilações diurnas das trocas gasosas consiste em valores relativamente elevados de g_s e A no início da manhã; na medida em que o dia avança, tanto g_s como A decrescem, podendo alcançar valores negligenciáveis à tarde, em função do aumento da temperatura foliar e do DPV (Araújo et al., 2008; Chaves et al., 2008; DaMatta et al., 2008). De modo oposto, sob baixo DPV, a abertura estomática, ao longo do dia, pode ser grandemente mantida, sem que isso se traduza em taxas de transpiração excessivas; ao mesmo tempo, isso permite que o influxo de CO_2 possa ser mantido a taxas consideráveis, de modo a manter A com flutuações diurnas mínimas. Com efeito, a alta correlação positiva entre A e g_s ($r = 0,812$; $P = 0,0001$) sugere, circunstancialmente, uma forte dependência de A em relação a g_s (Osório et al., 2006; DaMatta et al., 2008). Ademais, o padrão de flutuação diurna de A parece depender pouco de potenciais alterações nos níveis dos carboidratos, conforme se deduz da análise das correções canônicas. A dependência das trocas gasosas em relação ao DPV, em função da alta sensibilidade do estômato do cafeeiro ao DPV, conforme relatado por DaMatta (2004 b,c), tem sido também observada em outras espécies lenhosas, como a nectarina (Osório et al., 2006).

Limitações não-estomáticas de A , ao longo do dia, são normalmente associadas com a retroinibição metabólica acoplada ao acúmulo de carboidratos nas folhas-fonte (Azcón-Bieto, 1983; Krapp & Stitt, 1995), conforme sugerido por Franck et al. (2006), em café. Estes autores mediram A numa condição que, presumivelmente, não haveria limitação estomática à fotossíntese (as folhas foram

previamente submetidas a uma baixa concentração de CO₂, com o intuito de induzir-se a abertura estomática, quando, a posteriori, as trocas gasosas foram então estimadas) e concluíram, baseando-se em análises de correlação simples, que as flutuações de A, ao longo do dia, foram decorrente do acúmulo de açúcares solúveis nas folhas-fonte. Não obstante, análise de correlação, per se, não prova relação de causa/efeito, e pode apenas ser considerada como evidência circunstancial da associação de dependência entre duas variáveis. Neste trabalho, além das análises de correlação (simples e canônica) sugerirem que, de fato, não houve retroinibição da fotossíntese, a ausência de variações nas concentrações de carboidratos e aminoácidos, bem como a similaridade da partição de [¹⁴C]-fotoassimilados, ao longo do dia, para as principais rotas biossintéticas associadas à fotossíntese, indicam que as variações diurnas em A não são explicáveis pelo mecanismo da retroinibição e, sim, por limitações difusivas. Em adição, não se observou aumento na atividade da AGPase e decréscimo nas atividades inicial e total e no estado de ativação da Rubisco ao final da tarde. Um aumento na atividade da AGPase poderia indicar um incremento na capacidade potencial da síntese de amido e, um decréscimo na atividade da Rubisco poderia ser um indício de retroinibição metabólica da fotossíntese. Finalmente, nos experimentos sobre fluxo metabólico, tinha-se uma concentração de CO₂ saturante e, portanto, as limitações difusivas, nessa condição, são negligenciáveis. Uma vez que não houve variações na radioatividade total incorporada pelos tecidos foliares, sugere-se, portanto, que a capacidade fotossintética potencial tenha sido mantida ao longo do dia.

Quando o transporte de fotoassimilados de folhas-fonte é bloqueado, via, por exemplo, anelamento, A é inibida, a síntese de sacarose é reduzida e a síntese de amido é estimulada (Dunford, 2006), como ocorre nas espécies acumuladoras de amido (Goldschmidt & Huber, 1992). Ao longo de 11 dias de avaliação do experimento II, o anelamento dos ramos (aumento da relação fonte:dreno) resultou em um acentuado decréscimo em A e g_s. Vários outros trabalhos, cuja razão fonte:dreno também foi aumentada, demonstram resultados semelhantes. Por exemplo, Mayoral et al. (1985) relatam que, após poucas horas do anelamento em plantas de pepino, a queda em A foi resultado do fechamento estomático, mas, posteriormente, a redução em A foi associada ao acúmulo de carboidratos. Goldschmidt & Huber (1992) observaram, entre quatro e sete dias após o

anelamento em soja, algodão e pepino, um decréscimo em A e um aumento na resistência estomática. Zhou & Quebedeaux (2003), durante sete dias de anelamento em plantas de maçã, também observaram uma acentuada queda tanto em A quanto em g_s . Nesses experimentos, observou-se, invariavelmente, acúmulo expressivo de amido, conforme aqui verificado. Há duas teorias, contraditórias em suas essências, que explicariam o papel do amido na fotossíntese. Uma delas propõe que o acúmulo de amido seria responsável pela retroinibição de A via um mecanismo que envolveria um possível dano mecânico nos cloroplastos, devido à formação de grandes grãos de amido (Nafziger & Koller, 1976; Grub & Machler, 1990). Na outra teoria, postula-se que a síntese de amido seja essencial para a fotossíntese e não seria responsável por sua inibição (Ludewig et al., 1998; Sun et al., 1999). Em todo o caso, o amido acumulou-se num patamar equivalente ao observado no experimento I, a despeito dos valores relativamente elevados de A naquele experimento. Com efeito, resultados contraditórios têm sido reportados em café acerca da relação entre acúmulo de amido e fotossíntese em café: enquanto DaMatta et al. (1997) verificaram uma correlação negativa entre essas variáveis, nenhuma correlação significativa entre elas foi observada por Ronchi et al. (2006) e DaMatta et al. (2008) em condições de aumento da razão fonte:dreno.

Apesar do acúmulo de amido, as variações em A, em resposta ao anelamento, podem ser explicadas de modo similar ao que ocorreu com as variações de A do experimento I. Os decréscimos em A, nos ramos anelados, são grandemente explicados por alterações em g_s e não por eventuais alterações nos níveis dos carboidratos, conforme sugere, circunstancialmente, a análise das correlações canônicas. Salienta-se que 95 e 89% dos valores de A puderam ser explicados por g_s , respectivamente nas folhas dos ramos anelados e não-anelados. Salienta-se, também, que as atividades inicial e total e o estado de ativação da Rubisco, bem como a atividade da AGPase, não foram alteradas com o anelamento. Adicionalmente, a capacidade fotossintética potencial não variou, em resposta ao anelamento, provendo, por conseguinte, forte evidência de que as variações em A foram pouco afetadas por limitações bioquímicas à maquinaria fotossintética. Não obstante, deve-se mencionar que houve ligeiras diferenças significativas entre ramos anelados e não-anelados, no que respeita à partição de carbono para a síntese de amido, conforme se deduz das diferenças na incorporação da radioatividade na fração insolúvel.

No longo prazo (> três dias), o anelamento usualmente resulta em reduções da fotossíntese em decorrência de limitações bioquímicas associadas ao acúmulo de carboidratos (Mayoral et al., 1985; Goldschmidt & Huber, 1992). Declínios em g_s normalmente não explicam inteiramente, em vários experimentos, as reduções em A após o anelamento. Isso parece válido mesmo quando a fotossíntese é estimada sob concentrações elevadas de CO₂. Por exemplo, Zhou & Quebedeaux (2003), investigando ramos anelados de maçã, observaram, sob concentração ambiente de CO₂, uma queda de 80% em A. Entretanto, sob uma concentração de CO₂ de 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ (mínimas limitações estomáticas), o decréscimo em A foi de apenas 20%, evidenciando que as limitações estomáticas responderam pela maior parte dos decréscimos em A sob CO₂ ambiente. Diferentemente desses trabalhos, evidenciou-se, aqui, que as reduções nas trocas gasosas em folhas de ramos anelados (bem como ao longo do dia), em café, foram decorrentes meramente de limitações difusivas (estomáticas) e, não de possíveis alterações no metabolismo do carbono, o que, caracteriza, portanto, ausência de uma retroinibição da fotossíntese, mesmo numa condição em que houve um aumento expressivo nas concentrações foliares de amido. Sugere-se, como complementação deste trabalho, a investigação da natureza do sinal que leva à redução da abertura estomática, que, por sua vez, ocasiona a redução da fotossíntese, em plantas de café.

5- CONCLUSÃO

As variações nas trocas gasosas ao longo do dia, bem como as variações entre folhas de ramos anelados e não anelados, em café, foram decorrentes meramente de limitações difusivas (estomáticas) e, não de possíveis alterações no metabolismo do carbono e, portanto, dissociadas de retroinibição da fotossíntese.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araujo WL, Dias PC, Moraes GABK, Celin EF, Cunha RL, Barros RS, DaMatta FM (2008) Limitations to photosynthesis in coffee leaves from

different canopy positions. *Plant Physiology and Biochemistry*, DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.005.05

Azcón-Bieto J (1983) Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. *Plant Physiology* **73**: 681-686

Barros RS, Mota JWS, DaMatta FM, 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

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins using the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-258

Cannell MGR (1971) Effects of fruiting, defoliation and ring-barking on the accumulation and distribution of dry matter in branches of *Coffea arabica* L. in Kenya. *Experimental Agriculture* **7**: 63–74

Cannell MGR (1985) Physiology of coffee crop. In: Clifford MN, Wilson KC (eds), *Coffee: botany, biochemistry and production of bean and beverage*, Croom Helm, London, pp. 108-134

Chaves ARM, Caten AT, Pinheiro HA, Ribeiro A, DaMatta FM (2008) Seasonal changes in photoprotective mechanisms of leaves from shaded and unshaded field-grown coffee (*Coffea arabica* L.) trees. *Trees* **22**:351-361

DaMatta FM, Maestri M, Mosquim PR, Barros RS (1997) Photosynthesis in coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) as affected by winter and summer conditions. *Plant Science* **128**: 43-50

DaMatta FM, Loos RA, Rodrigues R, Barros RS (2001) Actual and photosynthetic rates of tropical crop species. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **13**: 24-32

- DaMatta FM** (2003) Drought as a multidimensional stress affecting photosynthesis in tropical tree crops. In: Hemantaranjan E (ed), *Advances in plant physiology*, Scientific Publishers, Jodhpur, pp. 227-265
- DaMatta FM** (2004a) Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **16**: 1-6
- DaMatta FM** (2004b) Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. *Field Crops Research* **86**: 99-114
- DaMatta FM** (2004c) Fisiologia do cafeeiro em sistemas arborizados. In: Matsumoto SN (ed), *Arborização de cafezais no Brasil*, Edições UESB, Vitória da Conquista, pp. 87-107
- DaMatta FM, Cunha RL, Antunes WC, Martins SV, Araújo WL, Fernie A, Moraes GABK** (2008). In field-grown coffee trees source-sink manipulation alters photosynthetic rates, independently of carbon metabolism, via alterations in stomatal function. *New Phytologist* **178**: 348-357
- Duan W, Fan PG, Wang LJ, Li WD, Yan ST, Li SW** (2008) Photosynthetic response to low sink demand after fruit removal in relation to photoinhibition and photoprotection in peach trees. *Tree Physiology* **28**: 123-132
- Dunford S** (2006) Translocação no floema. In: Taiz L, Zeiger E (eds), *Fisiologia vegetal*, Artmed, Poto Alegre, pp. 222-249
- Franck N, Vaast P, Génard M, Dautat J** (2006) Soluble sugars mediate sink feedback down-regulation of leaf photosynthesis in field-grown *Coffea arabica*, *Tree Physiology* **26**: 517-525

- Geigenberger P, Stitt M** (1993) Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta* **189**: 329-339
- Goldschmidt EE, Huber SC** (1992) Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. *Plant Physiology* **99**: 1443-1448
- Grub A, Machler F** (1990) Photosynthesis and light activation of Rubisco in the presence of starch. *Journal of Experimental Botany* **41**: 1293-1301
- Gutiérrez MV, Meinzer FC** (1994) Carbon isotope discrimination and photosynthetic gas exchange in coffee hedgerows during canopy development. *Australian Journal of Plant Physiology* **21**: 207-219
- Gutiérrez MV, Meinzer FC, Grantz DA** (1994) Regulation of transpiration in coffee hedgerows: covariation of environmental variables and apparent responses of stomata to wind and humidity. *Plant, Cell and Environment* **17**: 1305-1313
- Iglesias JD, Lliso I, Tadeo FR, Talon M** (2002) Regulation of photosynthesis through source:sink imbalances in citrus is mediated by carbohydrate content in leaves. *Physiologia Plantarum* **116**: 53–572
- Krapp A, Stitt M** (1995) An evaluation of direct and indirect mechanisms for the “sink-regulation” of photosynthesis in spinach: Changes in gas exchanges, carbohydrates, metabolites, enzyme activities and steady-state transcript levels after cold-girdling source leaves. *Planta* **195**: 313-323
- Li WD, Duan W, Fan PG, Yan ST, Li SH** (2007) Photosynthesis in response to sink–source activity and in relation to end products and activities of metabolic enzymes in peach trees. *Tree Physiology* **27**: 1307–1318

- Ludewig F, Sonnewald U, Kauder F, Heineke D, Geiger M, Stitt M, Müller-Röber BT, Gillissen B, Kühn C, Frommer WB** (1998) The role of transient starch in acclimation to elevated atmospheric CO₂. *FEBS Letters* **429**: 147-151
- Mayoral ML, Plaut Z, Reinhold L** (1985) Effect of translocation-hindering procedures on source leaf photosynthesis in cucumber. *Plant Physiology* **77**:712-717
- Moore S, Stein WH** (1948) Photometric ninhydrin method for use in chromatography of amino acids. *Journal of Biological Chemistry* **176**: 367-388
- Osório ML, Breia E, Rodrigues A, Osório J, Le Roux A, Daudet FA, Ferreira I, Chaves MM** (2006) Limitations to carbon assimilation by mild drought in nectarine trees growing under field conditions. *Environmental and Experimental Botany* **55**: 235-247
- Nafziger ED, Koller HR** (1976) Influence of leaf starch concentration on CO₂ assimilation in soybean. *Plant Physiology* **57**: 560-563
- Patakas A, Kofidis G, Bosabalidis AM** (2003) The relationships between CO₂ transfer mesophyll resistance and photosynthetic efficiency in grapevine cultivars. *Scientia Horticulturae* **97**: 255-263
- Paul MJ, Pellny TK** (2003) Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany* **54**: 539-547
- Praxedes SC, DaMatta FM, Loureiro ME, Ferrão MAG, Cordeiro AT** (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
- Rencher AC** (1992) Interpretation of canonical discriminant functions, canonical variates and principal components. *American Statistician* **46**: 217-225

- Rena AB, Maestri M, Barros RS, Söndahl MR** (1994) Coffee. In: Schaffer B, Andersen PC (eds), Handbook of environmental physiology of fruit crops: subtropical and tropical crops, CRC Press, Boca Raton, pp. 101-122
- Rivas F, Gravina A, Augustí M** (2007) Girdling effects on fruit set and quantum yield efficiency of PSII in two Citrus cultivars. *Tree Physiology* **27**: 527-535
- Ronchi CP, DaMatta FM, Batista KD, Moraes GABK, Loureiro ME, Ducatti C** (2006) Growth and photosynthetic down-regulation in *Coffea arabica* in response to restricted root volume. *Functional Plant Biology* **33**: 1013-1023
- Ronquim JC, Prado CHBA, Novaes P, Fahl JI, Ronquim CC** (2006) Carbon gain in *Coffea arabica* during clear and cloudy days in the wet season. *Experimental Agriculture* **42**: 147-164
- SAEG** - Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (1997) versão 7.1. Fundação Arthur Bernardes, Viçosa
- Sharkey TD, Vassey TL, Vanderveer PJ, Vierstra RD** (1991) Carbon metabolism enzymes and photosynthesis in transgenic tobacco having excess phytochrome. *Planta* **185**: 287-296
- Sheen J** (1990) Metabolic repression of transcription in plants. *Plant Cell* **10**: 1027-1038
- Silva EA, DaMatta FM, Ducatti C, Regazzi AJ, Barros RS** (2004) Seasonal changes in vegetative growth and photosynthesis in Arabica coffee trees. *Field Crops Research* **89**: 349-357
- Stitt M** (1991) Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* **14**: 741-762

- Stitt M** (1994) Manipulation of carbohydrate partitioning. *Current Opinion in Biotechnology* **5**: 137-143
- Stitt M, Krapp A** (1999) The interactions between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant, Cell and Environment* **22**: 583-621
- Sun J, Okita TW, Edwards GE** (1999) Modification of carbon partitioning, photosynthetic capacity, and O₂ sensitivity in Arabidopsis plants with low ADP-glucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiology* **119**: 267-276
- Urban L, Léchaudel M, Lu P** (2004) Effect of fruit load and girdling on leaf photosynthesis in *Mangifera indica* L. *Journal of Experimental Botany* **55**: 2075-2085
- Vaast P, Angrand J, Franck N, Dauzat J, Génard M** (2005) Fruit load and branch ring-barking affect carbon allocation and photosynthesis of leaf and fruit of *Coffea arabica* in the field. *Tree Physiology* **25**: 753-760
- Wünsche JN, Greer DH, Laing WA, Palmer JW** (2005) Physiological and biochemical leaf and tree responses to crop load in apple. *Tree Physiology* **25**: 1253-1263
- Zhou R, Quebedeaux B** (2003) Changes in photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature apple in response to whole plant source-sink manipulation. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **128**: 113-119