

ROBERTO LISBOA CUNHA

CRESCIMENTO, METABOLISMO DO CARBONO E PARTIÇÃO
DE ASSIMILADOS, EM RESPOSTA À MANIPULAÇÃO DA
RAZÃO FONTE:DRENO, EM *Coffea arabica* L. SOB CONDIÇÕES
DE CAMPO

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fisiologia Vegetal, para
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

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

T

C972c
2007

Cunha, Roberto Lisboa, 1978-

Crescimento, metabolismo do carbono e partição de assimilados, em resposta à manipulação da razão fonte:dreno, em *Coffea arabica* L. sob condição de campo / Roberto Lisboa Cunha. – Viçosa : UFV, 2007. xiv, 49f. : il. ; 29cm.

Orientador: Fábio Murilo da Matta.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 40-49.

1. Café - Fisiologia. 2. Fotossíntese. 3. Carbono - Isótopos. 4. Bioquímica. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 633.73

ROBERTO LISBOA CUNHA

CRESCIMENTO, METABOLISMO DO CARBONO E PARTIÇÃO
DE ASSIMILADOS, EM RESPOSTA À MANIPULAÇÃO DA
RAZÃO FONTE:DRENO, EM *Coffea arabica* L. SOB CONDIÇÕES
DE CAMPO

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fisiologia Vegetal, para
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 9 de fevereiro de 2007

Prof. Raimundo Santos Barros
(Co-Orientador)

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro
(Co-Orientador)

Dr. Rogério Ferreira Ribas

Prof^ª. Diolina Moura Silva

Prof. Fábio Murilo DaMatta
(Orientador)

DEDICO:

À vida.

Aos meus pais, Maria e Walter.

Aos meus irmãos, Patrícia, Christian e Augusto.

Aos meus sobrinhos Giovanni, Lorena, Yasmim e Clara.

Em especial a minha esposa, Elisa Ferreira Moura Cunha, pelos momentos felizes que passamos em Lavras e Viçosa - MG, sua paciência, compreensão e amor no decorrer da nossa caminhada.

Aos demais familiares, pelo incentivo.

OFEREÇO:

Aos meus sogros, Edila e Raimundo, a atenção e presteza em momentos oportunos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar.

Aos meus pais, aos irmãos e a todos os familiares, pelo incentivo.

A minha esposa, Elisa Ferreira Moura Cunha, pela sincera compreensão e amor.

A Universidade Federal de Viçosa.

Ao curso de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Fábio Murilo DaMatta, pelos ensinamentos, orientações e como exemplo profissional durante o curso de Doutorado.

Aos professores do curso de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal, Marcelo Ehlers Loureiro, Marco Aurélio Pedron Silva, Raimundo Santos Barros e Rolf Puschmann, pelos ensinamentos.

À Professora Ermínia E. P. Martinez, do Departamento de Fitotecnia, pela cessão da área experimental para a realização deste trabalho.

Ao grande amigo, Werner, pela incondicional ajuda.

Ao colega, Gustavo Kling, pelo suporte durante a realização deste trabalho.

Aos estagiários: Samuel, Marco, Elaine e Ricardo, pela ajuda.

Aos demais colegas: Adriano, Agnaldo, Alan, Ana, Ângela, Caroline, Cláudio, Dimas, Elaine, Franciscleudo, Gustavo, Karine, Hugo, Marcelo, Márcio, Paulo, Sidney, Vânia e Wagner, pelo apoio.

Aos funcionários do Setor de Fisiologia Vegetal, Beth, Carlos, Cássia, Geraldo, João, Mercês, Oswaldo, Reginaldo, Rogério, Zé Antônio e Zé Maria, pelo suporte técnico dado ao trabalho.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

ROBERTO LISBOA CUNHA, filho de Walter da Silva Cunha e Maria Consuelo Lisboa Cunha, nasceu em 20 de maio de 1978, em Belém-PA. Iniciou o curso de Bacharelado em Biologia na Universidade Federal do Pará, em 1997, concluindo-o em 2001. Em fevereiro do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Lavras, MG, concluindo-o em fevereiro de 2003. Em março do mesmo ano, iniciou o curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa, MG. Em 2006, foi aprovado em concurso público para Pesquisador III na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA - Belém - PA.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Aspectos gerais.....	4
2.2 Fotossíntese e partição de fotoassimilados.....	5
3. OBJETIVOS.....	8
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
4.1 Execução dos experimentos.....	9
4.2 Parâmetros agrometereológicos.....	10
4.3 Crescimento dos frutos, ramos e folhas.....	10
4.4 Produção e abscisão de frutos.....	11
4.5 Trocas gasosas.....	11
4.6 Parâmetros de fluorescência.....	11
4.7 Composição isotópica do carbono.....	12
4.8 Pigmentos.....	12
4.9 Nitrogênio.....	12
4.10 Ensaio enzimáticos.....	13
4.11 Intermediários metabólicos.....	13
4.12 Amido, glicose, frutose, sacarose e aminoácidos totais.....	14
4.13 Fluxos metabólicos de assimilação de C.....	14
4.14 Análises estatísticas.....	15
5. RESULTADOS.....	16
5.1 Considerações preliminares.....	16
5.2 Crescimento de frutos e caracterização das épocas de avaliação.....	16

5.3 <i>Crescimento vegetativo e produção</i>	17
5.4 <i>Ambiente, trocas gasosas, parâmetros fotoquímicos, pigmentos e nitrogênio</i>	19
5.5 <i>Concentração de carboidratos</i>	20
5.6 <i>Atividades enzimáticas e intermediários metabólicos</i>	20
5.7 <i>Partição do ¹⁴C fotossintético</i>	22
6. DISCUSSÃO.....	33
6.1 <i>Crescimento e produção de frutos</i>	33
6.2 <i>Trocas gasosas e metabolismo do carbono</i>	35
7. CONCLUSÕES.....	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- A = taxa de assimilação líquida de carbono
 AFE = área foliar específica
 $AGPase$ = pirofosforilase da ADP-glicose
 BSA = albumina de soro bovino
 C_a = concentração ambiente de CO_2
 C_i = concentração interna de CO_2
 DAF = dias após o florescimento
 DTT = ditionitrito
 EA = estado de ativação
 F_0 = fluorescência inicial
 $F1,6BP$ = frutose-1,6-bisfosfato
 $F6P$ = frutose-6-fosfato
 $FBPase$ = fosfatase da frutose-1,6-bisfosfato
 F_m = fluorescência máxima
 FS = fotossistema
 F_v/F_m = eficiência fotoquímica máxima do FSII
 $G1P$ = glicose-1-fosfato
 $GAPDH$ = desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato
 g_s = condutância estomática ao vapor de água
 INV = invertase ácida
 $NADP-GAPDH$ = desidrogenase do NADP:gliceraldeído-3-fosfato
 NPQ = coeficiente de extinção não-fotoquímico
 $3-PGA$ = 3-fosfoglicerato
 q_p = coeficiente de extinção fotoquímico
 RFA = radiação fotossinteticamente ativa interceptada pela folha
 $Rubisco$ = carboxilase/oxigenase da ribulose-1,5-bisfosfato
 $RuBP$ = ribulose-1,5-bisfosfato
 $SPase$ = fosforilase do amido
 SPS = sintase da sacarose-fosfato
 $SPPase$ = fosfatase da sacarose-fosfato
 $SuSy$ = sintase da sacarose

TCA = ácido tricloro acético

T_{ar} = temperatura do ar

T_f = temperatura foliar

TTE = taxa de transporte de elétrons

UDPG = uridina difosfato glicose

UGPase = pirofosforilase da UDPG

$V_{inicial}$ = atividade inicial da Rubisco

V_{max} = atividade catalítica máxima da SPS

V_{sel} = atividade catalítica seletiva da SPS

V_{total} = atividade total da Rubisco

T1 = tratamento das plantas com 100% de folhas e 0% de frutos

T2 = tratamento das plantas com 100% de folhas e 50% de frutos

T3 = tratamento das plantas com 50% de folhas e 100% de frutos

T4 = tratamento das plantas com 100% de folhas e 100% de frutos

$\delta^{13}C$ = composição isotópica do carbono

δe = déficit de pressão de vapor entre o interior da folha e a atmosfera

ϕ_{FSII} = rendimento quântico do transporte de elétrons

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1 - Crescimento de frutos do cafeeiro, em base de massa (A) e volume (B). Cada ponto representa a média de seis amostras de 100 frutos. A barra de erro-padrão foi menor que o tamanho dos símbolos. A seta mais à esquerda indica a data de aplicação dos tratamentos e as outras, as épocas de coletas e avaliações. Atentar para as diferenças de escalas na Figura 1A.....</p>	17
<p>Figura 2 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno sobre o crescimento de ramos plagiotrópicos primários por ramo (A), número de nós por ramo (B) e ganho de área foliar por ramo (C) em plantas de café cultivadas no campo. Foram aplicados três tratamentos: 100% folhas e 0% de frutos, 100% folhas e 50% de frutos, e 50% folhas e 100% de frutos. Cada ponto representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Quando não visível, a barra de erro-padrão é menor que o tamanho do símbolo. Nos retângulos internos às figuras, apresenta-se a taxa média de crescimento, de número médio de nós surgidos e o ganho médio de área foliar, ao longo do experimento; valores seguidos por letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p \leq 0,05$; teste de Newman-Keuls).....</p>	18
<p>Figura 3 - Curso diurno da radiação fotossinteticamente ativa interceptada pelas folhas (RFA) (A, B), da temperatura do ar (T_{ar}) (C, D), da temperatura foliar (T_f) (E, F) e do déficit de pressão de vapor entre a folha e a atmosfera (δe) (G, H). As plantas de café foram cultivadas em campo e submetidas a três tratamentos: 100% folhas e 0% de frutos, 100% folhas e 50% de frutos, e 50% folhas e 100% de frutos. Os dados foram obtidos em janeiro de 2006 (esquerda) e em março de 2006 (direita), épocas nas quais os frutos se achavam na fase linear de ganho de massa seca. Cada ponto representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Quando não visível, a barra de erro-padrão é menor que o tamanho do símbolo.....</p>	23
<p>Figura 4 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno sobre a taxa de assimilação líquida de carbono (A) (A, B), condutância estomática (g_s) (C, D), razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) (E, F) e composição isotópica do carbono ($\delta^{13}C$) (G, H) em plantas de café cultivadas em campo. As plantas foram distribuídas em três tratamentos: 100% folhas e 0% de frutos ($T1$), 100% folhas e 50% de frutos ($T2$), e 50% folhas e 100% de frutos ($T3$). Cada ponto ou coluna representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Nos retângulos internos às figuras, colunas representam os valores cumulativos diários (8:00-16:00 h) de A, g_s e C_i/C_a; valores seguidos por letras distintas diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste de Newman-Keuls). Asterisco (*) indica diferenças entre épocas de avaliações ($p \leq 0,05$).....</p>	24

Figura 5 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno sobre a eficiência fotoquímica máxima do FSII - F_v/F_m (A-B), rendimento quântico do transporte de elétrons - ϕ_{FSII} (C-D), eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII - F_v'/F_m' (E-F), coeficiente de extinção fotoquímica - q_p (E-F), e coeficiente de extinção não-fotoquímica - NPQ (I-J) em plantas de café. As plantas foram distribuídas em três tratamentos: 100% folhas e 0% de frutos (T1), 100% folhas e 50% de frutos (T2), e 50% folhas e 100% de frutos (T3). Os dados foram obtidos em janeiro de 2006 e em março de 2006, épocas nas quais os frutos se achavam na fase linear de ganho de massa seca. Cada ponto representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$).....	25
Figura 6 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno sobre as concentrações foliares de glicose (A), frutose (B), sacarose (C) e amido (D), em plantas de café cultivadas em campo. Cada coluna representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Vide legenda da Figura 4 para outros detalhes.....	27
Figura 7 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno, em plantas de café, sobre as razões sacarose/aminoácidos (A), sacarose/hexoses (B), hexoses/aminoácidos (C), amido/hexoses (D), amido/aminoácidos (E) e amido/sacarose (F). Cada coluna representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Vide legenda da Figura 4 para outros detalhes.....	28
Figura 8 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno, em plantas de café, sobre as atividades foliares V_{total} (A) e $V_{inicial}$ (C) e estado de ativação (E) da carboxilase da ribulose-1,5-bisfosfato – Rubisco, e V_{max} (B), V_{sel} (D) e estado de ativação (F) da sintase da sacarose fosfato - SPS. Cada coluna representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Vide legenda da Figura 4 para outros detalhes.....	29
Figura 9 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno, em plantas de café, sobre as atividades das enzimas desidrogenase do NADP: gliceraldeído-3-fosfato - NADP-GAPDH (A), fosfatase da frutose-1,6-bisfosfato - FBPase (B), fosforilase do amido - SPase (C), pirofosforilase da ADP-glicose - AGPase (D), Invertase ácida - INV (E) e sintase da sacarose - SuSy (F). Cada coluna representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Vide legenda da Figura 4 para outros detalhes.....	30
Figura 10 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno, em plantas de café, sobre as concentrações de glicose-6-fosfato - G6P (A), frutose-6-fosfato - F6P (B), glicose-1-fosfato - G1P (C), ortofosfato - Pi (D) e ribulose-1,5-bisfosfato - RuBP (E). Cada coluna representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Vide legenda da Figura 4 para outros detalhes.....	31

LISTA DE TABELAS

Página

- Tabela 1** - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno sobre a produção de frutos de café por planta e massa seca de 100 frutos. As plantas foram distribuídas em em três tratamentos: 100% folhas e 0% de frutos, 100% folhas e 50% de frutos, e 50% folhas e 100% de frutos. Frutos normais são os de maior densidade que a da água, e os frutos-bóia, de menor densidade. Cada valor representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Valores seguidos por letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste de Newman-Keuls)..... 21
- Tabela 2** - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno sobre a razão área foliar por fruto e porcentagem de abscisão de frutos, medidas em quatro ramos previamente marcados por planta. As plantas foram distribuídas em três tratamentos: 100% folhas e 0% de frutos, 100% folhas e 50% de frutos, e 50% folhas e 100% de frutos. Cada valor representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Vide legenda da Tabela 1 para detalhes estatísticos..... 21
- Tabela 3** - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno sobre a concentração foliar de N total, área foliar específica (AFE), concentração de clorofilas (Clo) totais ($a + b$), carotenóides totais (Car), razão Clo a :Clo b , proteína totais e aminoácidos (AA) totais em plantas de café cultivadas em campo. As plantas foram distribuídas em três tratamentos: 100% folhas e 0% de frutos ($T1$), 100% folhas e 50% de frutos ($T2$), e 50% folhas e 100% de frutos ($T3$). Os dados foram obtidos em janeiro de 2006 e em março de 2006, épocas nas quais os frutos se achavam na fase linear de ganho de massa seca. Cada ponto representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$); valores seguidos por letras distintas diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste de Newman-Keuls). Asterisco (*) indica diferenças entre épocas de avaliações ($p \leq 0,05$).... 26
- Tabela 4** - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno sobre a partição do ^{14}C fotossintético em folhas de plantas de café cultivadas em campo. Valores de radioatividade incorporada nas diferentes frações (aniônica = ácidos orgânicos; catiônica = aminoácidos; neutra = açúcares solúveis totais; e insolúvel = amido e componentes de parede celular) são expressos em kBq.m^{-2} . Valores representam a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Vide legenda da Tabela 3 para outros detalhes..... 32

RESUMO

CUNHA, Roberto Lisboa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007.

Crescimento, metabolismo do carbono e partição de assimilados, em resposta à manipulação da razão fonte:dreno, em *Coffea arabica* L. sob condições de campo. Orientador: Fábio Murilo DaMatta. Co-Orientadores: Marcelo Ehlers Loureiro e Raimundo Santos Barros.

Alterações no crescimento vegetativo, nas trocas gasosas, nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, no metabolismo de carboidratos e no particionamento do ¹⁴carbono, em resposta à manipulação da relação fonte:dreno, foram investigadas em plantas de café cultivadas em campo. Essas manipulações foram realizadas por meio de desfrutificação e desfolhamento controlados, visando-se induzir alterações na capacidade fotossintética das folhas. Os tratamentos consistiram de: (i) remoção de todos os frutos e 100% da área foliar (*T1*); (ii) metade da carga de frutos e 100% da área foliar (*T2*); e (iii) carga completa de frutos e 50% da área foliar (*T3*). As avaliações de crescimento foram realizadas a partir da aplicação dos tratamentos quando os frutos atingiram o estágio *chumbinho*, enquanto as trocas gasosas e análises fotoquímicas e metabólicas foram avaliadas durante a fase linear de ganho de massa seca dos frutos. As taxas de crescimento de ramos plagiotrópicos, do número de nós formados e do ganho de área foliar foram significativamente menores nas plantas do tratamento *T3* em relação às de *T1*. A massa seca média dos frutos foi significativamente maior em *T2* que em *T3*. Por outro lado, a produção de frutos-bóia por planta e a abscisão de frutos por ramo foram maiores em *T3* que em *T2*. Além disso, plantas do tratamento *T3* apresentaram valores mais negativos de composição isotópica do carbono, porém maiores taxas diárias de assimilação de carbono e condutância estomática, além de menor temperatura foliar (particularmente durante os períodos mais quentes). De modo geral, a alteração na razão fonte:dreno promoveu pouca ou nenhuma alteração (i) na atividade das enzimas do metabolismo do carbono (carboxilase/oxigenase da ribulose-1,5-bisfosfato, pirofosforilase da ADP-glicose, invertase ácida, sintase da sacarose, sintase da sacarose fosfato, bisfosfatase da frutose-1,6-bisfosfato, fosforilase do amido, desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato), (ii) na concentração de glicose, frutose, sacarose e amido, (iii) na concentração dos intermediários fosforilados (RuBP, glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, glicose-1-fosfato e ortofosfato), assim como (iv) no partição de ¹⁴C

recentemente fixado. Em conjunto, os resultados indicam que a redução na razão fonte:dreno pode afetar positivamente a fotossíntese, via aumentos na condutância estomática, porém sem alterar a fotoquímica e a bioquímica da fotossíntese durante a fase de rápido crescimento dos frutos do cafeeiro.

ABSTRACT

CUNHA, Roberto Lisboa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2007.

Growth, carbon metabolism and assimilate partitioning in response to source:sink manipulation in field-grown *Coffea arabica* L. trees. Adviser: Fábio Murilo DaMatta. Co-Advisers: Marcelo Ehlers Loureiro and Raimundo Santos Barros.

Changes in vegetative and reproductive growth, gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence parameters, carbohydrate metabolism, and ¹⁴C carbon partitioning in response to source/sink manipulations were investigated in field-grown coffee trees. Such manipulations were performed through controlled defruiting and defoliation in order to induce changes in leaf photosynthetic capacity. Treatments consisted of (i) complete defruiting and 100% leaf area (*T1*), (ii) half crop load and 100% leaf area (*T2*), and (iii) full crop load and 50% leaf area (*T3*). Growth evaluations started following treatment application when the fruits were at pinhead stage, while gas exchange, photochemical and metabolic analyses were performed during the linear phase of dry mass gain of fruits. Growth rates of plagiotropic branches, number of nodes and leaf area gain were significantly lower in *T3* plants than in *T1* plants. Mean fruit dry mass was significantly higher in *T2* than in *T3* individuals. On the other hand, production of partially-empty fruits per plant and fruit abscission per branch were higher in *T3* than in *T2* plants. In addition, *T3* plants showed more negative values of carbon isotopic composition ratio, but higher daily carbon assimilation rate and stomatal conductance in parallel with lower leaf temperature (particularly during the warmer spells). In general, changes in source:sink ratio caused little, if any, alteration in (i) activities of enzymes linked to carbon metabolism (Rubisco, ADP-glucose pyrophosphorylase, acid invertase, sucrose synthase, sucrose-P synthase, fructose-1,6-bisphosphatase, starch phosphorylase, glyceraldehyde-3-P dehydrogenase), (ii) glucose, fructose, sucrose, and starch, (iii) phosphorylated intermediates (ribulose-1,5-bisphosphate, glucose-6-P, fructose-6-P, glucose-1-P, and orthophosphate), as well as in (iv) partitioning of newly fixed ¹⁴C. Taken together, the results suggest that decreasing source:sink ratio might positively affect photosynthesis through increases in stomatal conductance with little, if any, changes in both photochemistry and biochemistry of photosynthesis during the linear phase of dry mass gain of coffee fruits.

1. INTRODUÇÃO

Limitações à produtividade vegetal podem depender tanto da taxa de fixação de carbono quanto da magnitude da distribuição e utilização dos carboidratos para órgãos e/ou tecidos não-fotossintéticos. De acordo com a capacidade de exportar ou importar fotoassimilados, os órgãos vegetais podem ser classificados em fonte e dreno, respectivamente.

Em geral, um aumento da razão fonte:dreno, e.g., via remoção parcial de frutos, pode ocasionar decréscimos correspondentes na taxa de assimilação líquida de carbono (A), devido à retroinibição derivada do acúmulo de carboidratos na folha (Stitt, 1991). Tem-se proposto, também, que grandes grãos de amido poderiam danificar o cloroplasto ou restringir a difusão de CO_2 , afetando, assim, o processo fotossintético (Sawada *et al.*, 2001; Iglesias *et al.*, 2002). Baixa demanda de drenos pode também acarretar em acúmulo de sacarose no floema das folhas-fonte que, por sua vez, inibiria o carregamento do floema, resultando em acúmulo de carboidratos no mesofilo e redução de A (Vaughn *et al.*, 2002). Em adição, alguns genes fotossintéticos podem ser reprimidos por acúmulo de açúcares em tecidos-fonte (Krapp *et al.*, 1993). Em todo o caso, a menor utilização da energia radiante, na medida em que A diminui, pode levar a inativação ou a danos às estruturas do fotossistema II (FSII) dos cloroplastos, ou ao fechamento parcial dos estômatos em resposta a alterações hormonais e/ou a variações na concentração intracelular de CO_2 (Wünsche *et al.*, 2005). Desde que o estômato se feche, pode ocorrer incremento na temperatura foliar (T_f), acarretando, em última análise, aumento nas taxas de respiração e fotorrespiração. De modo oposto, uma redução na razão fonte:dreno usualmente acarreta incrementos em A (Stitt, 1991; Lavigne *et al.*, 2001; Iglesias *et al.*, 2002; Sawada *et al.*, 2003; Vaast *et al.*, 2005; Franck *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2006; McCormick *et al.*, 2006).

Em café, os frutos são fortes drenos metabólicos, acumulando altas proporções dos assimilados totais da planta, limitando, assim, a mobilização de assimilados para outros órgãos, com reflexos negativos sobre o crescimento vegetativo (Cannell, 1971a, b). Com efeito, uma carga pesada de frutos pode levar ao depauperamento da planta, limitando-lhe, sobremodo, o crescimento na estação de crescimento ativo subsequente (DaMatta, 2004). Visto que uma área foliar de 20 cm^2 é necessária para suportar o crescimento de cada fruto de café (Cannell, 1976), torna-

se fácil perceber que a concorrência entre os crescimentos reprodutivo e vegetativo deve estar largamente envolvida na bienalidade da produção de café.

Os estudos sobre os fatores que afetam o uso e a distribuição de assimilados em cafeeiro mostraram forte influência dos frutos em desenvolvimento sobre a produção e o particionamento da matéria seca. Wormer & Ebagole (1965) verificaram que o crescimento vegetativo e o conteúdo de amido nos ramos aumentaram com o decréscimo da quantidade de frutos produzidos. Amaral *et al.* (2001) e Silva *et al.* (2004) não observaram qualquer relação entre as flutuações nos níveis de carboidratos nas folhas e a queda do crescimento vegetativo da parte aérea do cafeeiro, em Viçosa. Os teores foliares de amido aumentaram gradualmente a partir de fins de março, atingindo níveis mais altos na época fria, quando o crescimento havia praticamente cessado (Silva *et al.*, 2004). Em plantas lenhosas, em geral, o acúmulo de amido mais parece o resultado da sua não-utilização em processos de crescimento vegetativo e de desenvolvimento dos frutos (Priestley, 1962), o que explicaria o armazenamento de carboidratos nas épocas frias, em café. O nível de amido nas folhas do cafeeiro diminuiu rapidamente, em paralelo com a retomada do crescimento vegetativo e reprodutivo; em todo o caso, a remoção de frutos pouco ou nada alterou o padrão de crescimento de ramos e de ganho de área foliar nas plantas desfrutificadas, apesar de as taxas de crescimento terem sido superiores em plantas desfrutificadas em relação às plantas com frutos (Mota *et al.*, 1997; Amaral *et al.*, 2001, 2006; Castro, 2002). Apesar dessas considerações, pouco se conhece sobre como alterações da relação fonte:dreno modificariam a partição de assimilados e, por extensão, o metabolismo de carbono, em café.

Considerando-se que a produção vegetal depende da força-dreno e da eficiência da produção de fotoassimilados, e que a força-dreno depende do tamanho e da atividade metabólica do órgão-dreno, uma redução na razão fonte:dreno poderia acarretar um incremento da capacidade fotossintética das folhas e maiores taxas de carregamento. Com efeito, Vaast *et al.* (2005) e Franck *et al.* (2006) observaram, em café arábica, que A foi substancialmente menor em ramos desfrutificados ou com poucos frutos que em ramos com carga pesada de frutos. Franck *et al.* (2006) propuseram que a retroinibição de A foi mediada pelo aumento da concentração de sacarose no floema foliar e independente da concentração de açúcares solúveis nos outros compartimentos da folha. Não obstante, aqueles autores avaliaram apenas os teores de açúcares solúveis totais nas folhas e, portanto, as

conclusões de seus estudos devem ser consideradas com cautela. Neste estudo, portanto, procurou-se avaliar os crescimentos vegetativo e reprodutivo e possíveis mecanismos fisiológicos, em níveis biofísico, fotoquímico e bioquímico, associados à modulação das taxas de fotossíntese e da partição de assimilados, em café, em resposta à alteração da razão fonte-dreno.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais

Existem descritas cerca de cem espécies de *Coffea*, das quais apenas duas, *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre, têm importância econômica no mercado internacional, recebendo seus produtos comercializados a denominação genérica de "café arábica" e "café robusta", respectivamente. Cerca de 62% do café comercializado no mundo é do tipo "arábica" e os 38% restantes, do tipo "robusta". O Brasil é o maior produtor de café do mundo, tendo produzindo, em 2005/2006 cerca de 35% do total mundial.

Em Viçosa, Minas Gerais, a fase de crescimento ativo do cafeeiro ocorre entre setembro e março, período em que as temperaturas são elevadas, as chuvas abundantes e os fotoperíodos maiores. As taxas de crescimento reduzem-se gradativamente a partir de abril, atingindo valores negligenciáveis entre junho e agosto, períodos em que as temperaturas são mais baixas, as chuvas escassas e os fotoperíodos menores (Barros & Maestri, 1972; 1974; DaMatta *et al.*, 1999; Castro, 2002; Silva *et al.*, 2004). Também, em Viçosa, as flutuações sazonais do crescimento de ramos e A mostram tendências semelhantes, mas sem uma relação direta de causa e efeito. Enquanto a menor capacidade fotossintética do café, durante a época fria, parece consequência, principalmente, de limitações bioquímicas à maquinaria fotossintética, limitações estomáticas parecem preponderantes na época quente (Silva *et al.*, 2004).

O padrão do crescimento do fruto do cafeeiro arábico tem sido descrito com base na sua massa seca e volume, por meio de uma curva sigmoideal dupla (Cannell, 1985; Barros *et al.*, 1999; Castro, 2002). Com base nesse padrão, o crescimento dos frutos ocorre em cinco fases (Cannell, 1985): o primeiro estágio refere-se ao período sem crescimento visível - fase *chumbinho*; segundo estágio, caracterizado por uma expansão rápida, ao final da qual o endocarpo se endurece (pergaminho); terceiro estágio, em que ocorre a formação do endosperma; quarto estágio, endurecimento do endosperma, que continua até antes da maturação (granação); e quinto estágio, maturação (cereja). Nas fases de expansão rápida do fruto e de acúmulo de matéria seca nas sementes, os frutos restringem a expansão de ramo, o número de nós e o ganho de área foliar (Castro, 2002), pois atuam como drenos preferenciais de assimilados (Cannell, 1970, 1976, 1985; Maestri & Barros, 1977; Rena & Maestri,

1985; Rena *et al.*, 1994; Barros *et al.*, 1999; Maestri *et al.*, 2001; De Castro & Marraccini, 2006).

2.2 *Fotossíntese e partição de fotoassimilados*

Manipulação da relação fonte-dreno, via remoção de frutos, pode proporcionar redução da força do dreno, levando ao acúmulo de sacarose no citossol das células fotossintéticas, que, por conseguinte, pode inibir ou reduzir a atividade das enzimas envolvidas na biossíntese de sacarose (Hall & Milthorpe, 1978; Rufty & Huber, 1983). Logo, o acúmulo de sacarose nas folhas é acompanhado de elevadas concentrações de triose-fosfato e outros metabólitos fosforilados, e de baixas concentrações de ortofosfato (Pi). Essa condição inibe a saída de triose-fosfato do cloroplasto e, conseqüentemente, aumenta a disponibilidade de substrato para a biossíntese de amido nessa organela (Herold, 1980). A baixa concentração cloroplastídica de Pi acarreta aumento na relação 3-fosfoglicerato (3PGA):Pi, que ativa a pirofosforilase da ADP-glicose (AGPase) (Preiss, 1982), enzima-chave na biossíntese de amido (Neuhaus & Stitt, 1990; Neuhaus *et al.*, 1990). Por conseguinte, alguns mecanismos têm sido propostos para explicar a regulação da fotossíntese pelo dreno, e.g., mudanças na taxa de síntese de sacarose e amido (síntese de produto final), afetando, por extensão, a ciclagem de Pi para reações da fotossíntese (Paul & Foyer, 2001).

Segundo Stitt (1991), os carboidratos podem inibir a fotossíntese direta ou indiretamente. A inibição direta é tida como resposta não-adaptativa, porquanto permite reduzir ou prevenir acúmulos adicionais de carboidratos, mas não corrigiria o desbalanço básico na relação fonte:dreno. Essa inibição caracteriza-se por danos à estrutura dos cloroplastos, como os causados por grãos de amido de grande tamanho, ou pela lenta ciclagem de Pi, no citossol e no cloroplasto. A inibição indireta, por sua vez, caracteriza-se por decréscimos nos níveis de proteínas-chave e de outros componentes da maquinaria fotossintética. A inibição indireta é uma resposta adaptativa porque contribui para o reajustamento do balanço fonte:dreno, permitindo que N e outros compostos sejam remobilizados das folhas e investidos no crescimento de novos drenos.

A sacarose é o principal carboidrato transportado ao longo da planta, no sentido fonte-dreno. Uma fase crítica desse transporte é o descarregamento do floema, que pode ocorrer por meio de duas rotas distintas: simplástica ou apoplástica.

Na primeira, a sacarose é transportada de uma célula a outra através dos plasmodesmos, sendo hidrolisada pela sintase da sacarose (SuSy) e/ou invertase (INV) neutra, até chegar ao interior do tecido-dreno. Quando o descarregamento é apoplástico, a sacarose é transportada através do apoplasto, com o auxílio de proteínas carreadoras ou transportadoras, sendo hidrolisada pela ação de uma INV ácida ligada covalentemente à parede celular, e descarregada no interior da célula do tecido-dreno, na forma de hexose. Alternativamente, a sacarose pode ser descarregada como tal nas células do tecido-dreno, sendo então hidrolisada pelas enzimas SuSy e/ou INV neutra do citossol (Winter & Huber, 2000). Há evidências de que a SuSy e INV sejam as enzimas-chave na regulação da força-dreno em órgãos que acumulam amido (Koch *et al.*, 1992; Sun *et al.*, 1992; Zrenner *et al.*, 1995).

A biossíntese da sacarose é regulada pela atividade das enzimas citossólicas fosfatase da frutose-1-6-bisfosfato (FBPase), sintase da sacarose-fosfato (SPS) e fosfatase da sacarose-fosfato (SPPase) (Stitt *et al.*, 1987; Hubbard *et al.*, 1991). A FBPase catalisa a reação irreversível da frutose-1-6-bisfosfato (F1,6BP), em que há liberação de fosfato e formação de frutose-6-fosfato (F6P), enquanto a SPS catalisa a reação irreversível de uridina difosfato glicose (UDPG) e F6P, para formar sacarose-fosfato. Em folhas, variações na taxa de síntese de sacarose são associadas com mudanças no estado de ativação de SPS (Neuhaus *et al.*, 1990). Em frutos de tomate, Miron & Schaffer (1991) mostraram que o aumento da atividade da SPS está associado com o acúmulo de açúcares durante o amadurecimento. Hubbard *et al.* (1991) também observaram aumento da atividade da SPS em frutos de pêssigo, morango, manga e kiwi, durante o período de acúmulo de açúcares.

A pirofosforilase da UDPG (UGPase) apresenta uma função importante no metabolismo de carboidratos, pois catalisa a produção reversível de UDPG e pirofosfato (PPi) em glicose-1-fosfato (G1P) e UTP. Em folhas maduras, a UGPase está envolvida, primariamente, na via biossintética da sacarose, produzindo UDPG para a reação da SPS, enquanto em outros órgãos, incluindo-se folhas apicais imaturas, a UGPase pode utilizar parte da sacarose clivada, usando UDPG produzido pela SuSy (Winter & Huber, 2000).

A degradação da sacarose pode ser catalisada por duas diferentes classes de enzimas. As invertases catalisam a hidrólise altamente exotérmica e irreversível da sacarose em glicose e frutose. Em contraste, uma clivagem reversível da sacarose é catalisada pela sintase da sacarose, em UDPG e frutose, possuindo um papel

importante no metabolismo da sacarose em diversas rotas bioquímicas relacionadas a funções metabólicas, estruturais e de armazenamento em células de plantas (Winter & Huber, 2000).

A SuSy é uma enzima da qual são conhecidas seis isoformas, podendo estar localizadas no citossol, no vacúolo, associada à plasmalema e ao citoesqueleto (Barrat *et al.*, 2001; Bieniawska *et al.*, 2007). Sua principal função parece ser a de clivar a sacarose para síntese de amido (Déjardin *et al.*, 1997) e parede celular (Nakai *et al.*, 1999), pelo simples fato de que um dos produtos de sua hidrólise é UDPG, precursor para síntese de amido e parede celular. A forma citossólica pode fornecer produtos para o metabolismo geral, enquanto a forma associada à plasmalema pode fornecer UDPG, diretamente para a síntese de celulose e calose (Amor *et al.*, 1995). Entretanto, o mecanismo que separa a atividade diferencial da SuSy entre o citossol e a plasmalema é desconhecido (Barrat *et al.*, 2001).

Em muitos tecidos-dreno de crescimento e armazenamento ativo, a atividade da SuSy é bastante alta (Ross & Davies, 1992), e a sua atividade pode servir como um indicador bioquímico de crescimento ativo do dreno (Sung *et al.*, 1989; Sun *et al.*, 1992). Ressalta-se que a atividade da SuSy é geralmente baixa em tecidos-fonte, como em folhas, ocorrendo o oposto em tecidos-dreno (ap Ress, 1984).

Três isoformas de INV são conhecidas: INV ácidas solúveis, localizadas no vacúolo, INV ácida insolúvel extracelular, associada à parede celular, e as neutras ou alcalinas, localizadas no citossol de células vegetais (Quick, 1996). Acredita-se que a INV ácida da parede celular desempenhe papel importante na assimilação de sacarose fora dos tecidos-dreno, no apoplasto, estabelecendo um gradiente de concentração de sacarose, da fonte para o dreno (Escherich, 1980). A INV neutra ou alcalina é considerada uma enzima de "manutenção", envolvida na degradação da sacarose, quando as atividades da INV ácida e da SuSy são baixas (Winter & Huber, 2000), normalmente em tecidos cuja taxa metabólica é menor, quando comparada à de tecidos meristemáticos, por exemplo.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo investigar alterações no crescimento, no metabolismo do carbono e na partição de assimilados, em resposta à manipulação artificial da relação fonte-dreno em plantas de café arábica, por meio de desfrutificação e desfolhamento controlados, tendo em vista uma potencial alteração na capacidade fotossintética das folhas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em condições de campo, em uma lavoura de café (*Coffea arabica* L. cv Catuaí Vermelho IAC 44), com aproximadamente 10 anos de idade, em Viçosa (20°45'S, 42°15'W, 650 m de altitude), Minas Gerais. A região possui clima subtropical, com temperatura média anual de 19°C. A precipitação média anual é de 1200 mm. As plantas vêm sendo cultivadas a pleno sol, sob espaçamento de 3,0 x 1,0 m, com três a quatro ramos ortotrópicos, com uma planta por cova, e fileiras orientadas no sentido leste-oeste. O cafezal foi renovado, por meio de recepa, em 2002. As plantas foram previamente selecionadas com base na uniformidade de altura, números de ramos plagiotrópicos e ortotrópicos.

4.1 Execução dos experimentos

O experimento foi constituído de quatro tratamentos. No primeiro, as plantas foram conduzidas sob condições naturais de enfolhamento, porém removendo-se todos os frutos (*T1*); no segundo tratamento, procedeu-se à remoção de metade da carga dos frutos, mantendo-se todas as folhas da planta (*T2*); no terceiro tratamento, mantiveram-se todos os frutos produzidos, mas a área foliar total foi reduzida à metade (*T3*); no quarto tratamento, mantiveram-se todas as folhas e frutos produzidos (*T4*). Foram selecionados alguns ramos plagiotrópicos por cada planta, dentro de cada tratamento. Esses ramos tinham de 12 a 14 folhas completamente expandidas e cerca de 100 a 120 frutos. Para aumentar-se a uniformidade, ao aplicarem-se os tratamentos, foram deixados, nos ramos selecionados, seis ou 12 folhas expandidas, e 0, 50 ou 100 frutos, conforme o tratamento. Nesses ramos, procederam-se às medições de crescimento vegetativo, trocas gasosas e coletas para análises bioquímicas. A desfrutificação foi realizada, removendo-se frutos no estágio de *chumbinho*.

As avaliações de crescimento foram realizadas a partir da aplicação dos tratamentos, enquanto os demais parâmetros foram avaliados, em folhas, em duas épocas distintas, durante a fase de rápido ganho de massa seca do fruto (Figura 1). Nessas épocas, amostras de folhas, do terceiro ou quarto par, a partir do ápice de ramos plagiotrópicos, foram coletadas, envolvidas em papel alumínio e imediatamente imersas em nitrogênio líquido, e armazenadas a -80°C para análises posteriores. Quando não especificado, as folhas foram coletadas em torno de 8:00-

9:00 h, após as primeiras medições de trocas gasosas e corresponderam às mais novas completamente expandidas. Todas as avaliações foram realizadas em dias claros.

4.2 *Parâmetros agrometeorológicos*

O déficit de pressão de vapor entre o interior da folha e a atmosfera (δe) foi calculado, utilizando-se das fórmulas descritas por Landsberg (1986). Para isso, foram tomadas, ao longo do período de avaliação das trocas gasosas, as temperaturas do ar, do bulbo úmido e T_f . A T_f e a radiação fotossinteticamente ativa interceptada pela folha (RFA) foram medidas por meio de um analisador de gases a infravermelho portátil (*LCpro+*, Analytical Development Company, Hoddesdon, Reino Unido). Outros dados meteorológicos, como precipitação e insolação, foram obtidos de uma estação meteorológica localizada a cerca de 2,5 km do campo experimental.

4.3 *Crescimento dos frutos, ramos e folhas*

O crescimento de ramos e folhas foi avaliado mensalmente, de novembro de 2005 a março de 2006, e o de frutos, quinzenalmente, de novembro de 2005 a junho de 2006. O crescimento dos frutos foi avaliado com base na massa fresca, massa seca e volume. A massa fresca foi obtida pela pesagem individual de seis amostras de 100 frutos, aleatoriamente colhidos. O volume foi determinado a partir dessas mesmas seis amostras de frutos, por meio do deslocamento de água; a massa seca dessas amostras foi obtida após a secagem dos frutos, a 70°C, por 72 h. Os frutos foram obtidos de um lote extra de plantas.

Para a medição do crescimento de ramos, foram selecionados quatro ramos plagiotrópicos primários, no terço superior da copa da planta. De cada um desses ramos foram tomados o comprimento, com auxílio de uma fita métrica. O número de novos entrenós surgidos ao longo do experimento foi também registrado.

Em cada planta, foram identificados dois ramos do terço superior, nos quais foi determinada a dimensão de cada folha do lado direito do ramo, tomando-se o comprimento e a maior largura. Com as dimensões foliares, foi estimada a área foliar, por meio da equação $L = 0,667 X$ (Barros *et al.*, 1973), em que a variável independente é o retângulo circunscrito à folha. O ganho de área foliar foi estimado a

partir do seu incremento dividido pelo número de dias correspondentes ao intervalo de tempo entre as avaliações.

4.4 *Produção e abscisão de frutos*

Para se verificar o efeito da desfrutificação e desfolhamento sobre a produção, foi realizada a colheita dos frutos maduros, conforme prática usual adotada por produtores da região, por meio de derriça manual em pano colocado sob as plantas, em seguida vertidos em um tanque contendo água para avaliar-se a massa de “frutos-bóia”, frutos de menor densidade do que a da água, e de frutos normais, mais densos. Além disso, em ramos previamente marcados, foram tomados, ao final de março de 2006, o número de folhas e frutos, a área foliar e a massa seca dos frutos e a porcentagem de abscisão de frutos. A massa seca do café em coco, por planta, foi determinada por meio da secagem em terreiro, com padronização do teor de umidade para 13% e posterior pesagem.

4.5 *Trocas gasosas*

Foram avaliadas A , g_s e a razão entre as concentrações interna e externa de CO_2 (C_i/C_a), utilizando-se de um analisador portátil de gás a infravermelho, em sistema aberto (mencionado anteriormente) sob luz, temperatura e concentração de CO_2 ambientes. As medições foram realizadas em dois dias, em cada época, por volta das 8:00, 10:00, 13:00 e 16:00 h, como descrito por DaMatta *et al.* (1997).

4.6 *Parâmetros de fluorescência*

A fluorescência da clorofila a foi avaliada, utilizando-se de fluorômetro com amplitude de pulso modulado (FMS2, Hansatech, Norfolk, Reino Unido), concomitantemente às avaliações de trocas gasosas e, em adição, na antemanhã. As folhas foram adaptadas ao escuro, durante 30 min, expondo-se os tecidos foliares, inicialmente, a um fraco pulso de luz vermelho-distante ($1-2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para determinação da fluorescência inicial (F_0). Em seguida, um pulso de luz saturante, com irradiância de $6.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e duração de 1 s, foi aplicado, para estimar-se a fluorescência máxima emitida (F_m). Nas amostras adaptadas ao escuro, a máxima eficiência do FSII foi estimada pela razão entre as fluorescências variável e máxima, $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$. Subseqüentemente, as folhas foram irradiadas com luz actínica

durante 300 s, à irradiância de $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para obtenção da fluorescência constante (F_s). Em seguida, outro pulso de luz saturante foi aplicado, por 1 s, para obtenção da fluorescência máxima emitida pelas amostras sob luz (F_m'). A luz actínica foi desligada e as amostras foram irradiadas com luz vermelho-distante, para a obtenção de F_0 adaptada à luz (F_0'). A eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII foi estimada por $F_v'/F_m' = (F_m' - F_0')/F_m'$. O coeficiente de extinção fotoquímico foi calculado como $q_p = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$, e o de extinção não-fotoquímica por $\text{NPQ} = (F_m/F_m') - 1$ (Krause & Weis, 1991). O rendimento quântico do transporte de elétrons do FSII foi estimado como $\phi_{\text{FSII}} = (F_m' - F_s)/F_m'$ (Genty *et al.*, 1989).

4.7 *Composição isotópica do carbono*

A discriminação isotópica do carbono foi determinada em folhas novas (aproximadamente metade da expansão máxima), como descrito em DaMatta *et al.* (2003). Esse parâmetro permitiu avaliar o comportamento das trocas gasosas, que depende da capacidade fotossintética do mesófilo e de g_s , de modo integrado, ao longo do tempo. Foram coletadas, de outros ramos selecionados, duas folhas por planta.

4.8 *Pigmentos*

As concentrações foliares de clorofilas *a* e *b* e de carotenóides foram determinadas em extratos obtidos após a maceração de discos foliares retirados das mesmas folhas utilizadas nas avaliações de trocas gasosas, utilizando-se acetona 80%, conforme Lichtenthaler (1987).

4.9 *Nitrogênio*

Após a secagem das amostras foliares a 70°C , por 72 h, foram determinados o nitrogênio orgânico, conforme Jackson (1958), e o nitrogênio nítrico, de acordo com Cataldo *et al.* (1975). A soma do nitrogênio orgânico e nítrico representa o nitrogênio total, conforme descrito em DaMatta *et al.* (1999).

4.10 *Ensaaios enzimáticos*

Para a determinação da atividade das enzimas, discos foliares (~120 mg MF) foram homogeneizados num meio a 4°C, contendo 30% de polivinilpolipirrolidona (m/v) e 2 mL de tampão de extração (Stitt *et al.*, 1989) modificado por Praxedes *et al.* (2006) e Ronchi *et al.* (2006). O tampão foi constituído de 50 mol.m⁻³ HEPES-KOH (pH 7,4), 5 mol.m⁻³ MgCl₂, 1 mol.m⁻³ EDTA, 1 mol.m⁻³ EGTA, 5 mol.m⁻³ DTT, 2 mol.m⁻³ benzamidina, 2 mol.m⁻³ de ácido ε-amino-n-capróico, 0,5 mol.m⁻³ PMSF, 0,1% BSA (m/v), 10% glicerol (v/v) e 0,1% de Triton X-100 (v/v). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 15000 g, por 3 min, a 4°C. Os sobrenadantes foram quantificados e, em seguida, 500 µL foram dessalinizados através de uma coluna de 3 x 1 cm de gel Sephadex G-25. O extrato obtido foi, então, utilizado imediatamente para o ensaio da SPS - EC 2.4.1.14 (Huber, 1989) e Rubisco - EC 4.1.1.39 (Sharkey *et al.*, 1991b) e, o restante, armazenado a -80°C e utilizado, posteriormente, para o ensaio das enzimas abaixo mencionadas: INV ácida - EC 3.2.1.26 (Stitt *et al.*, 1989; Zrenner *et al.*, 1995), AGPase - EC 2.2.7.27 (Müller-Röber *et al.*, 1992), fosforilase do amido (SPase) - EC 2.4.1.1 (Sweetlove *et al.*, 1996), SuSy - EC 2.4.1.13 (Zrenner *et al.*, 1995), FBPases - EC 3.1.3.11 (Kruger & Beevers, 1984; Sharkey *et al.*, 1991a) e desidrogenase do NADP: gliceraldeído-3-fosfato (NADP-GAPDH) - EC 1.2.1.12 (Plaxton, 1990). Os ensaios supracitados foram previamente otimizados de acordo com a linearidade da resposta ao volume de extrato e tempo de reação. Esses ensaios e os subsequentes foram executados num leitor de placa “Elisa” (Molecular Devices, Sunny Valle, EUA). A concentração de proteína total foi determinada conforme Bradford (1976), utilizando-se de uma curva de calibração com BSA.

4.11 *Intermediários metabólicos*

Metabólitos foram extraídos de discos foliares (~400 mg MF) segundo Trethewey *et al.* (1998), num extrato com ácido tricloroacético (TCA) 16% (m/v) em dietiléter e deixado em gelo por cerca de 20 min, sendo acrescentados 800 µL de solução aquosa a 16% TCA com EGTA 5 mol.m⁻³. O homogenato foi, então, transferido para microtubos de centrífuga e deixados em gelo, por 3 h. Depois de completada a extração em gelo, as amostras foram centrifugadas por 5 min, a 15000 g, aproveitando-se somente a fase aquosa, que foi transferida para outro microtubo. O sobrenadante foi posteriormente lavado três vezes com 1 mL de éter dietílico

saturado em água, para removerem-se contaminações de caráter apolar e TCA. Todo o material usado na extração foi previamente lavado com HCl 2 kmol.m⁻³ e exaustivamente enxaguado com água destilada e desionizada, para evitarem-se contaminações com Pi. O branco foi obtido seguindo-se todos os passos, excluindo-se a amostra. A quantificação de glicose-6-fosfato (G6P), G1P e F6P foi efetuada pelo método cíclico, conforme Gibon *et al.* (2002), Pi conforme Penney (1976), e ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) conforme Stitt (1989) e Pieters *et al.* (2001).

4.12 *Amido, glicose, frutose, sacarose e aminoácidos totais*

Carboidratos e aminoácidos foram extraídos de tecidos foliares (~120 mg MF), em etanol 80% (v/v), incubados a 70°C, por 90 min, e submetidos a duas centrifugações (15000 g, 10 min). Na fração solúvel em etanol, foram determinadas, enzimaticamente, as concentrações de glicose, frutose e sacarose (Praxedes *et al.*, 2006) e aminoácidos (Moore & Stein, 1948) e, na fração insolúvel, as de amido (Praxedes *et al.*, 2006).

4.13 *Fluxos metabólicos de assimilação de C*

As folhas utilizadas do terço superior médio das plantas, assim que destacadas da planta, tiveram seus pecíolos rapidamente imersos em água e, então foram transferidos para o laboratório. Foram utilizados discos de 10 mm de diâmetro do limbo foliar. Os discos foram mantidos, durante 2 h, no escuro. O padrão de marcação com ¹⁴C foi realizado em um eletrodo de oxigênio, usando-se de uma câmara de Clark de fase gasosa (Hansatech, Kings Lynn, Norfolk, Reino Unido), sob 900 μmol m⁻² s⁻¹ de radiação fotossinteticamente ativa, a 35°C, por 30 min. O dióxido de carbono foi suprido a partir de 400 μL de uma solução 1 mol.m⁻³ de NaH¹⁴CO₃ [atividade específica de 1,96 GBq.mmol⁻¹ (pH 9,3)], aplicada na base da câmara. Em seguida, os discos foliares foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C, até o momento do uso. Posteriormente, o tecido foliar foi fracionado, para determinar-se o destino metabólico do ¹⁴CO₂ assimilado. Procedeu-se à separação da fração insolúvel em etanol (amido e celulose) da fração solúvel (ácidos orgânicos, aminoácidos e açúcares) a qual, então, foi fracionada em resinas catiônica (DOWEX® 50 WXZ 100-200 mesh, HF form - Supelco) e aniônica (LOWEX® 1X2 100-200 mesh, CL Form - Supelco), 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 tubos vedados. Todas as amostras foram combinadas e concentradas por liofilização. A radioatividade incorporada nas diferentes frações foi determinada em um contador de cintilação (Beckman LS 6500, Beckman Instruments, Fullerton, Califórnia, EUA), usando-se de líquido de cintilação (Ready Safe™ Cocktail), de acordo com Lytovchenko *et al.* (2002).

4.14 *Análises estatísticas*

O experimento foi conduzido e analisado em delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos: 100% folhas e 0% frutos; 50% folhas e 100% frutos; 100% folhas e 50% frutos, dispostos em esquema fatorial 3 x 2 (3 tratamentos e 2 épocas de avaliação), com seis repetições. Os dados de *T4*, em que não se manipulou a área foliar nem a carga de frutos, não foram incluídos (vide item 5.1). Cada unidade experimental foi constituída de uma planta. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e os efeitos de tratamentos comparados pelo teste F. As médias foram comparadas pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de significância utilizando-se do Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG-UFV, 1997).

5. RESULTADOS

5.1 *Considerações preliminares*

Os experimentos de manipulação da razão fonte:dreno foram inicialmente conduzidos durante a estação de crescimento de 2004/2005, aplicando-se três tratamentos a plantas inteiras: (i) enfolhamento e carga de frutos sem manipulação, (ii) remoção da metade de frutos apenas e (iii) remoção de metade da área foliar apenas. As medições foram feitas com frutos no estágio *chumbinho* e na fase linear de ganho de massa seca. Nessa fase, observaram-se maiores valores de A e de g_s , e menores de $\delta^{13}C$, nas plantas com metade da área foliar em relação às plantas dos outros dois tratamentos. Concentração de açúcares, aminoácidos e amido, assim como a atividade de várias enzimas (vide Material e Métodos) do metabolismo do carbono e a partição de ^{14}C não responderam aos tratamentos aplicados. Quando os frutos estavam na fase de *chumbinho*, no entanto, nenhuma das variáveis supracitadas, responderam aos tratamentos. Ressalte-se que a concentração de amido e partição de ^{14}C para fração insolúvel (amido + parede celular) foi significativamente maior nessa fase em relação à fase de ganho linear de massa seca dos frutos.

Na estação de crescimento de 2005/2006, o experimento foi repetido, introduzindo-se mais um tratamento (desfrutificação completa), a fim de se ter maior contraste entre os tratamentos. Neste segundo experimento, não foi possível avaliar plantas com frutos no estágio de *chumbinho*. Devido a problemas técnicos, boa parte dos dados obtidos com plantas sem manipulação da área foliar e carga de frutos foi perdida, não se apresentando esses resultados. Apenas os dados do segundo experimento são, pois, apresentados.

As concentrações de carboidratos e as atividades das enzimas avaliadas foram muito similares, comparando-se amostras coletadas, às 8:00-9:00 h ou às 12:00-13:00 h.

5.2 *Crescimento de frutos e caracterização das épocas de avaliação*

O crescimento do fruto do café, tomando-se por base variações na massa fresca e no volume, seguiu uma curva sigmoideal dupla (Figura 1 A, B). Entretanto, em base massa seca, observou-se um lento crescimento até 50 dias após o florescimento (DAF) e, posteriormente, o ganho de massa seca foi praticamente

linear (Figura 1 A). Portanto, conforme se depreende da Figura 1, nas avaliações fisiológicas e bioquímicas, feitas nos meses de janeiro e março, os frutos já estavam numa fase de ganho linear de massa seca (Figura 1 A), apresentando 26 e 44% da sua massa seca final, respectivamente.

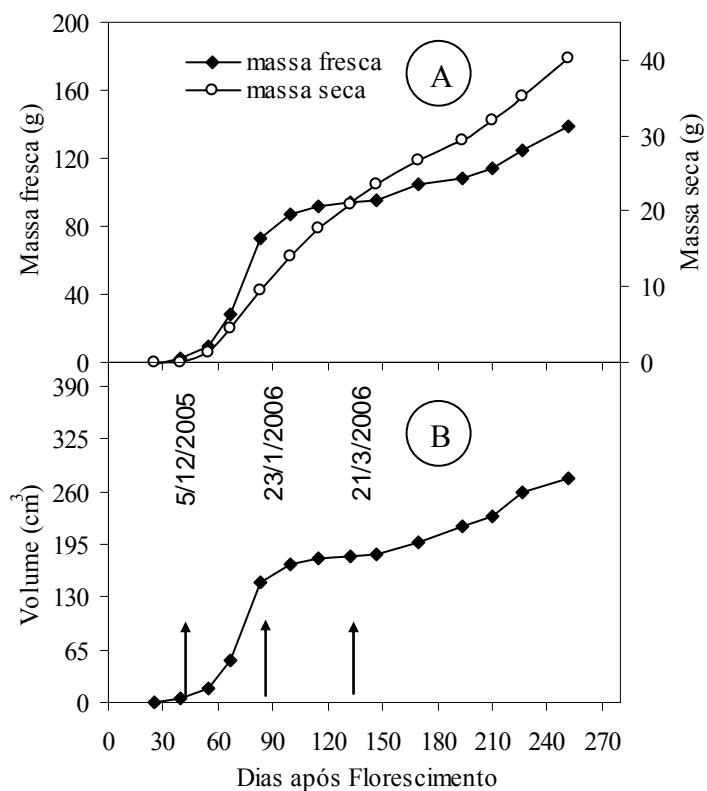


Figura 1 - Crescimento de frutos do cafeeiro, em base de massa (A) e volume (B). Cada ponto representa a média de seis amostras de 100 frutos. A barra de erro-padrão foi menor que o tamanho dos símbolos. A seta mais à esquerda indica a data de aplicação dos tratamentos e as outras, as épocas de coletas e avaliações. Atentar para as diferenças de escalas na Figura 1A

Ressalte-se que a estação chuvosa se iniciou na segunda quinzena de setembro de 2005 e estendeu-se até meados de abril de 2006, quando foram computados 1100 mm de chuva regularmente distribuídos. Além disso, uma semana antes das medições em janeiro e em março, respectivamente, foram registrados, 43 e 87 mm de chuva (dados não mostrados).

5.3 Crescimento vegetativo e produção

Nas plantas em que foram removidos os frutos, o crescimento vegetativo foi maior que nas plantas não-desfrutificadas (Figura 2). Tomando-se as plantas de T1 como uma referência, o crescimento de ramos plagiotrópicos em T2 e em T3 foi,

respectivamente, 49 e 24% daquele observado em *T1*. O número de nós surgidos e o ganho de área foliar também decresceram, na medida em que a razão folha:fruto foi diminuída (Figura 2 A, B). De fato, os parâmetros de crescimento foram significativamente influenciados pelos tratamentos aplicados, à exceção das primeiras avaliações, quando se observaram, de modo geral, número de nós surgidos e ganho de área similares aos de plantas parcialmente desfrutificadas e com plena carga de frutos (Figura 2 B, C).

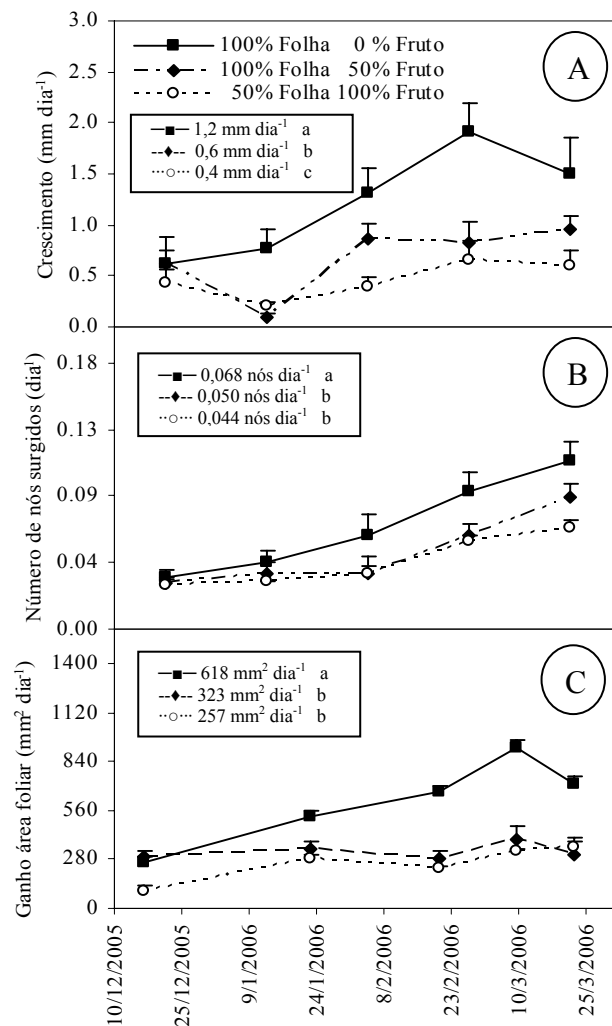


Figura 2 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno sobre o crescimento de ramos plagiotrópicos primários por ramo (A), número de nós por ramo (B) e ganho de área foliar por ramo (C) em plantas de café cultivadas no campo. Foram aplicados três tratamentos: 100% folhas e 0% de frutos, 100% folhas e 50% de frutos, e 50% folhas e 100% de frutos. Cada ponto representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Quando não visível, a barra de erro-padrão é menor que o tamanho do símbolo. Nos retângulos internos às figuras, apresenta-se a taxa média de crescimento, de número médio de nós surgidos e o ganho médio de área foliar, ao longo do experimento; valores seguidos por letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($p \leq 0,05$; teste de Newman-Keuls)

A produção total de frutos, em base de massa seca, como era de se esperar, foi maior em *T3* (Tabela 1). Contudo, cumpre ressaltar que a produção média dos frutos em *T2* correspondeu a 71,6% da de *T3*, fato possivelmente associado ao (i) incremento de 39% na massa seca média dos frutos em *T2* quando comparada à de *T3* e (ii) à menor produção de frutos-bóia em *T2* em relação à de *T3* (Tabela 1). Com efeito, a porcentagem de frutos-bóia foi de 20% em *T2*, e de 32% em *T3*, em relação à produção total de frutos, sugerindo que, nas condições deste experimento, houve enchimento deficiente dos endospermas das sementes. Registre-se que, ao final do experimento, a razão área foliar:fruto foi 13,4 e 4,7 cm².fruto⁻¹ e a porcentagem de abscisão de frutos por ramo foi de 13 e 25%, respectivamente, em *T2* e *T3* (Tabela 2).

5.4 Ambiente, trocas gasosas, parâmetros fotoquímicos, pigmentos e nitrogênio

A RFA foi quase sempre maior do que a irradiância de saturação em café (~600 μmol m⁻² s⁻¹) em todos os horários e épocas avaliados (Figura 3 A, B). Verificou-se que T_f , independentemente da época e dos horários avaliados, a partir das 8:00 h, já era maior que 30°C e atingiu, ao longo do dia, valores iguais ou superiores a 40°C, particularmente em janeiro (Figura 3 C). Em janeiro, mas não em março, as flutuações de T_f acompanharam estreitamente as flutuações de T_{ar} (Figura 3 E, F). Registre-se que, nas medições feitas às 10:00 e 13:00 h, T_f foi sempre menor nas plantas de *T3* que nas de *T1*, especialmente em março (Figura 3 F), quando diferenças de até 3°C foram registradas entre folhas de plantas daqueles tratamentos. Registre-se, ainda, que a diferença em T_f não esteve associada a variações na interceptação de energia radiante, conforme se deduz ao compararem-se as Figuras 3 B e 3 D. Os valores médios de δ_e foram maiores durante a primeira época de avaliação, com aumento progressivo ao longo do dia, por volta de 3,0 kPa, às 13:00 e 16:00 h. Entretanto, não se observaram diferenças de δ_e ao se compararem os tratamentos, ao longo do dia (Figura 3 E, F).

Durante a fase de ganho linear de massa seca dos frutos, quando estes passam a ser drenos fortes, verificou-se que, quando comparadas às plantas do tratamento *T1*, A e g_s exibiram aumento com a redução na razão fonte:dreno, particularmente nas plantas do tratamento *T3*, em várias avaliações (Figura 4 A-D). Parte das diferenças em A pôde ser explicada em função de diferenças em g_s : maior g_s , maior A . Não obstante, diferenças em A não estiveram necessariamente associadas a g_s , como se

observa às 13:00 e às 16:00 h, em janeiro. Em todo o caso, os valores cumulativos diários de g_s e A nas plantas de $T3$ foram significativamente maiores que os das plantas de $T1$, mas sem diferir estatisticamente dos valores das plantas de $T2$ (Figura 4 A-D). Todavia, a razão C_i/C_a não se alterou significativamente em resposta à alteração na razão fonte:dreno (Figura 4 E, F). Por outro lado, os valores de $\delta^{13}C$ foram significativamente menores (mais negativos) nas plantas do tratamento $T3$ em relação às de $T1$ (Figura 4 G, H). Salienta-se, ainda, que variações em A não estiveram associadas a decréscimos na eficiência fotoquímica máxima do FSII, avaliada pela razão F_v/F_m , que se manteve praticamente inalterada na antemanhã (dados não apresentados) e ao longo do dia, com os valores diários muito próximos ou acima de 0,8 (Figura 5 A, B). Além disso, para os demais parâmetros fotoquímicos (ϕ_{FSII} , F_v'/F_m' , q_p e NPQ), não se observaram diferenças significativas em decorrência da manipulação na relação fonte:dreno. Como um todo, os dados de fluorescência da clorofila a (Figura 5) indicam ausência de fotoinibição, independentemente dos tratamentos e de épocas de avaliação.

A manipulação na razão fonte:dreno pouco ou nada alterou a área foliar específica, a concentração de N total, clorofilas totais, carotenóides, razão clorofila $a:b$, proteína total e aminoácidos totais, independentemente das épocas de avaliação (Tabela 3). Em adição, a concentração de nitrogênio total foi superior a $28 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$ (Tabela 3), indicando que as plantas não estiveram sob deficiência de N. Portanto, os maiores valores observados em A nas plantas do tratamento $T3$ não estiveram relacionados à alocação de N para a produção de pigmentos fotossintéticos, ou mesmo proteínas e aminoácidos (Tabela 3).

5.5 Concentração de carboidratos

As concentrações foliares de glicose, frutose, sacarose e amido (Figura 6 A-D) e as razões sacarose:aminoácidos, sacarose:hexose, hexoses:aminoácidos, amido:hexoses, amido:aminoácidos e amido:sacarose (Figura 7 A-F) mantiveram-se praticamente inalteradas, em decorrência da manipulação na razão fonte:dreno.

5.6 Atividades enzimáticas e intermediários metabólicos

As atividades total (V_{total}) e inicial (V_{inicial}) e o estado de ativação (EA) da Rubisco mantiveram-se inalterados, em resposta à manipulação da relação fonte:dreno, nas duas épocas de avaliação (Figura 8). De forma semelhante, V_{max} ,

V_{sel} e EA da SPS não responderam significativamente aos tratamentos aplicados (Figura 8). Aparentemente, portanto, maiores valores de A , observados nas plantas de $T3$ em relação às de $T1$ (Figura 4 A, B), não estiveram associados com diferenças na atividade da Rubisco e da SPS.

Tabela 1 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno sobre a produção de frutos de café por planta e massa seca de 100 frutos. As plantas foram distribuídas em três tratamentos: 100% folhas e 0% de frutos, 100% folhas e 50% de frutos, e 50% folhas e 100% de frutos. Frutos normais são os de maior densidade que a da água, e os frutos-bóia, de menor densidade. Cada valor representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Valores seguidos por letras diferentes diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste de Newman-Keuls)

Tratamentos		Massa seca frutos.planta ⁻¹ (g)		
		Frutos normais	Frutos-bóia	Normais + Bóia
100% Folhas	0% Frutos ($T1$)	—	—	—
100% Folhas	50% Frutos ($T2$)	1186 \pm 106 ^a	298 \pm 57 ^b	1485 \pm 137 ^b
50% Folhas	100% Frutos ($T3$)	1326 \pm 89 ^a	748 \pm 159 ^a	2075 \pm 213 ^a
Nível de significância		$p = 0,3418$	$p = 0,0239$	$p = 0,0425$
Tratamentos		Massa seca de 100 frutos (g)		
		Frutos normais	Frutos-bóia	Normais + Bóia
100% Folhas	0% Frutos ($T1$)	—	—	—
100% Folhas	50% Frutos ($T2$)	71 \pm 3,2 ^a	59 \pm 1,4 ^a	65 \pm 1,6 ^a
50% Folhas	100% Frutos ($T3$)	51 \pm 2,1 ^b	47 \pm 1,2 ^b	48 \pm 1,5 ^b
Nível de significância		$p = 0,0002$	$p = 0,0000$	$p = 0,0001$

Tabela 2 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno sobre a razão área foliar por fruto e porcentagem de abscisão de frutos, medidas em quatro ramos previamente marcados por planta. As plantas foram distribuídas em três tratamentos: 100% folhas e 0% de frutos, 100% folhas e 50% de frutos, e 50% folhas e 100% de frutos. Cada valor representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Vide a legenda da Tabela 1 para detalhes estatísticos

Parâmetros	Tratamentos			Nível de significância
	100% Folhas 0% Frutos	100% Folhas 50% Frutos	50% Folhas 100% Frutos	
Razão área foliar:fruto (cm ² .fruto ⁻¹)	—	13,4 \pm 3,2 ^a	4,7 \pm 1,0 ^b	$p = 0,0054$
Abscisão de frutos (%)	—	13,4 \pm 4,2 ^b	24,9 \pm 3,6 ^a	$p = 0,0088$

De modo geral, as atividades das outras enzimas do metabolismo do carbono (NADP-GAPDH, FBPase, SPase, AGPase, INV e SuSy) seguiram o mesmo comportamento da Rubisco e SPS, mantendo-se inalteradas em resposta aos tratamentos aplicados (Figura 9 A-F).

As concentrações foliares dos intermediários fosforilados G6P, G1P, F6P, P_i e RuBP (Figura 10 A-E), também, pouco ou nada respondem à manipulação da relação fonte:dreno. Apenas pequenas alterações na concentração de G1P foram observadas, quando se comparam as duas épocas de avaliação (Figura 10 C).

5.7 Partição do ¹⁴C fotossintético

A alteração da razão fonte:dreno não modificou, significativamente, a partição de ¹⁴C fotossintético incorporado nas frações aniônica, catiônica e neutra (Tabela 4), à exceção de março, quando a absorção de ¹⁴C na fração insolúvel foi menor nas plantas parcialmente desfolhadas. Em função dos valores similares de radioatividade total incorporada (Tabela 4), sugere-se que não tenha havido variações na capacidade de fixação de CO₂, independentemente dos tratamentos.

Cerca de 5% do ¹⁴CO₂ foi incorporado na fração aniônica, que representa uma estimativa da partição em ácidos orgânicos. Por outro lado, observou-se menor partição do ¹⁴C para a fração catiônica (que representa uma estimativa da partição em aminoácidos), que variou de 9 e 13% da radioatividade incorporada na fração solúvel. A partição de ¹⁴CO₂ para a fração neutra (que representa uma estimativa da partição em açúcares solúveis) foi cerca de 80% da radioatividade incorporada na fração solúvel total. Na fração insolúvel (que representa uma estimativa da partição em amido e parede celular), apenas 1,6% da radioatividade incorporada na fração solúvel total foi observada, nas duas épocas avaliadas.

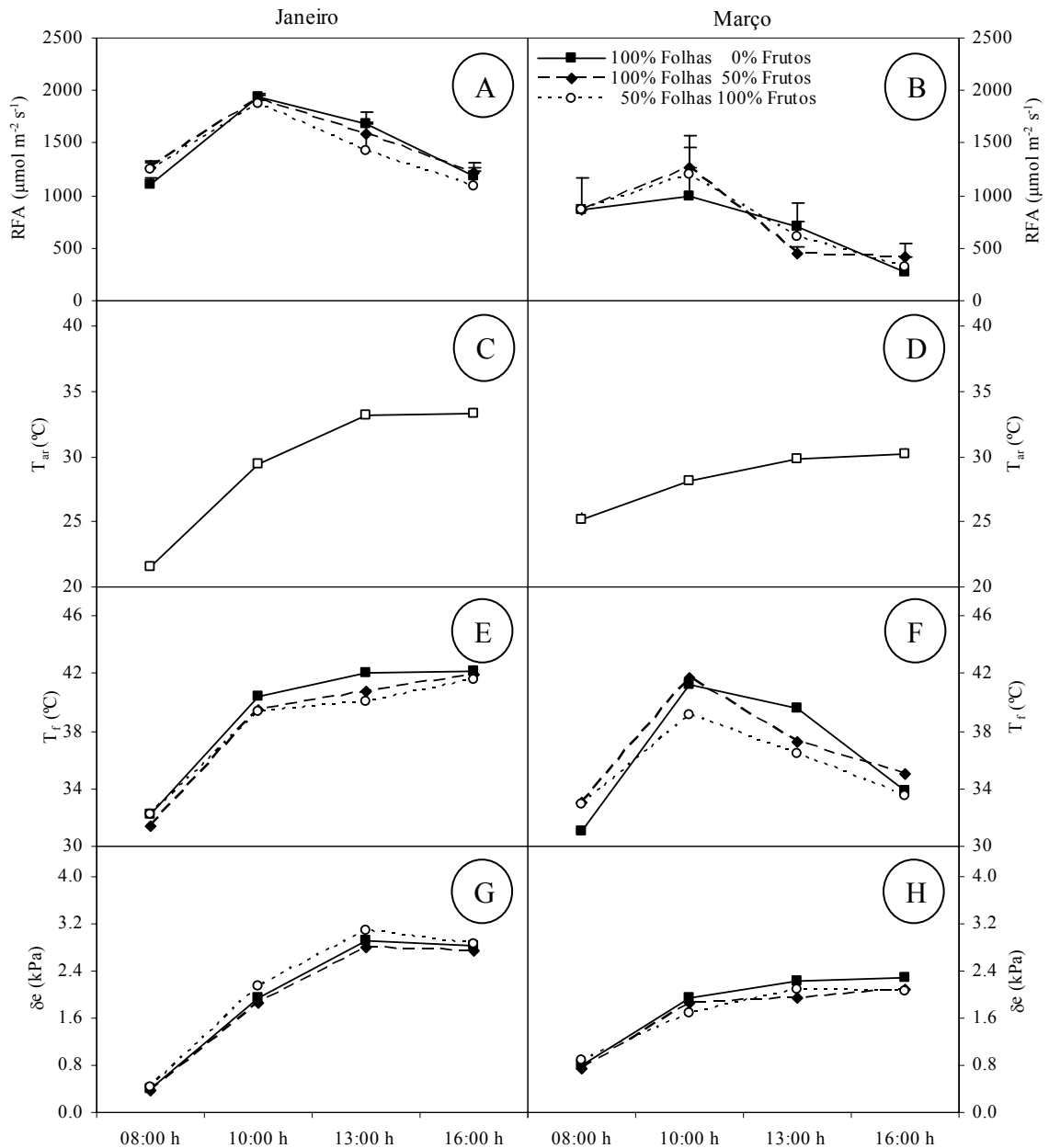


Figura 3 - Curso diurno da radiação fotossinteticamente ativa interceptada pelas folhas (RFA) (A, B), da temperatura do ar (T_{ar}) (C, D), da temperatura foliar (T_f) (E, F) e do déficit de pressão de vapor entre a folha e a atmosfera (δe) (G, H). As plantas de café foram cultivadas em campo e submetidas a três tratamentos: 100% folhas e 0% de frutos, 100% folhas e 50% de frutos, e 50% folhas e 100% de frutos. Os dados foram obtidos em janeiro de 2006 (esquerda) e em março de 2006 (direita), épocas nas quais os frutos se achavam na fase linear de ganho de massa seca. Cada ponto representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Quando não visível, a barra de erro-padrão é menor que o tamanho do símbolo

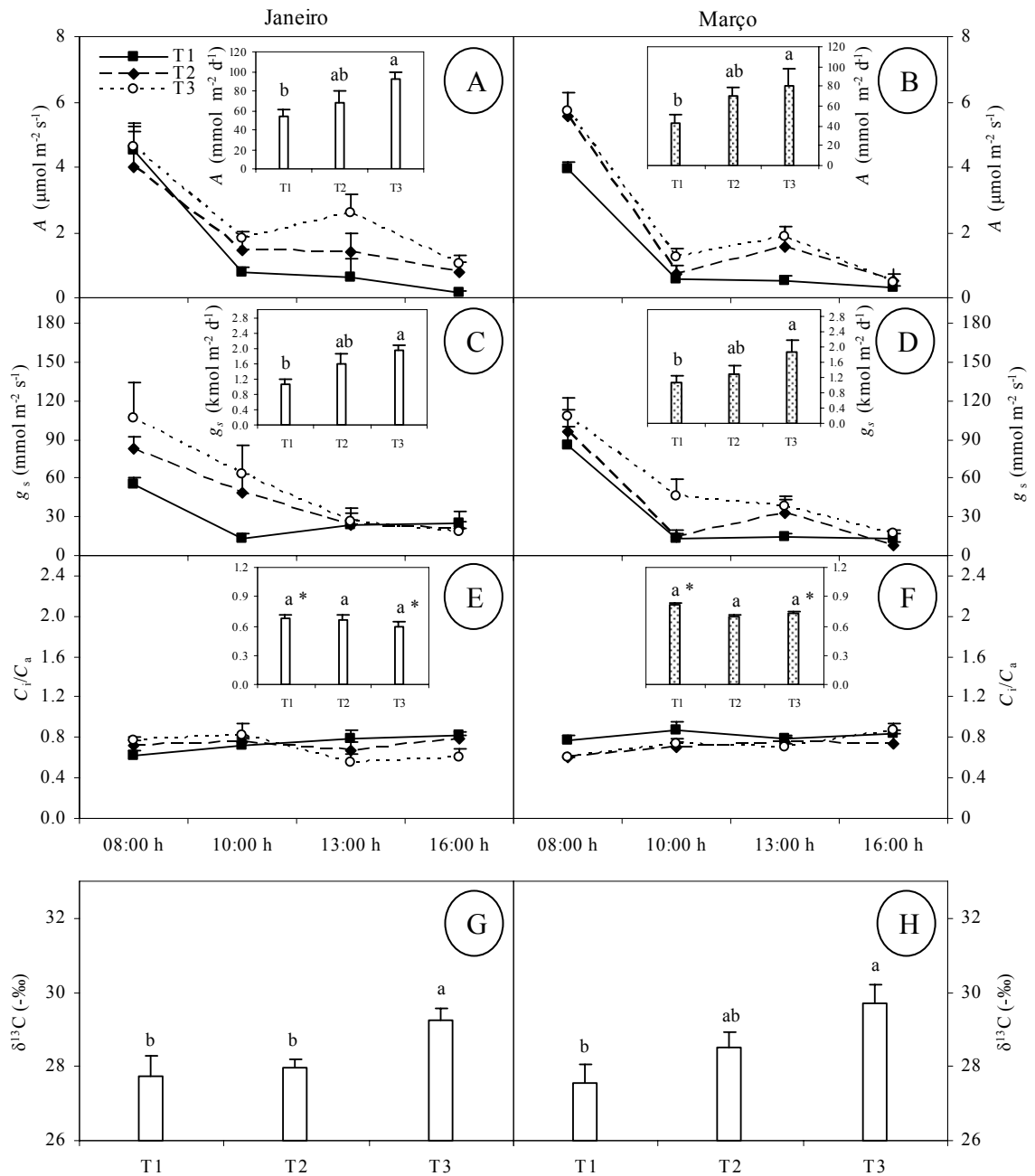


Figura 4 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno sobre a taxa de assimilação líquida de carbono (A) (A, B), condutância estomática (g_s) (C, D), razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) (E, F) e composição isotópica do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) (G, H) em plantas de café cultivadas em campo. As plantas foram distribuídas em três tratamentos: 100% folhas e 0% de frutos (T1), 100% folhas e 50% de frutos (T2), e 50% folhas e 100% de frutos (T3). Cada ponto ou coluna representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Nos retângulos internos às figuras, colunas representam os valores cumulativos diários (8:00-16:00 h) de A , g_s e C_i/C_a ; valores seguidos por letras distintas diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste de Newman-Keuls). Asterisco (*) indica diferenças entre épocas de avaliação ($p \leq 0,05$)

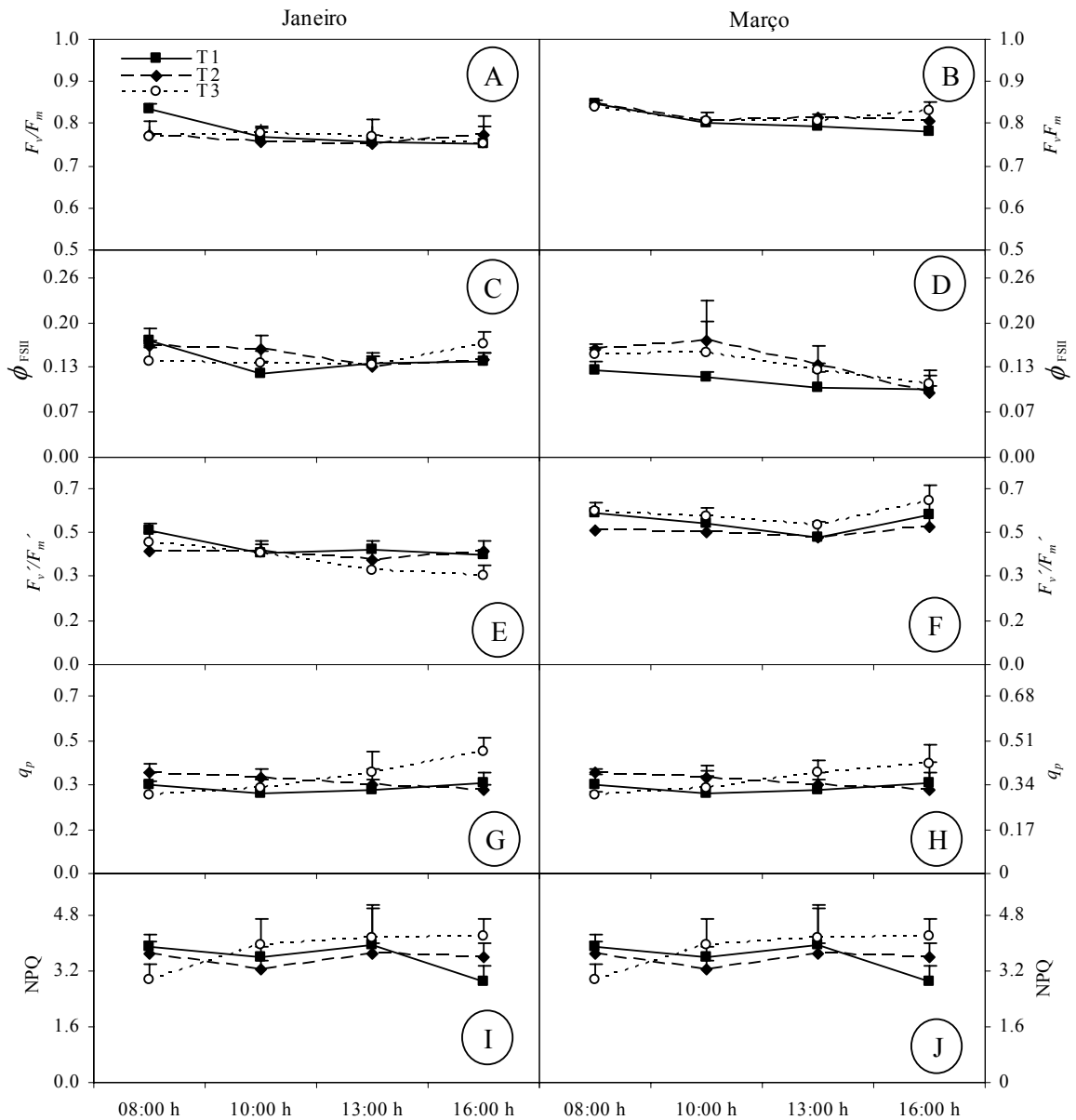


Figura 5 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno sobre a eficiência fotoquímica máxima do FSII - F_v/F_m (A-B), rendimento quântico do transporte de elétrons - ϕ_{FSII} (C-D), eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII - F_v'/F_m' (E-F), coeficiente de extinção fotoquímica - q_p (G-H), e coeficiente de extinção não-fotoquímica - NPQ (I-J) em plantas de café. As plantas foram distribuídas em três tratamentos: 100% folhas e 0% de frutos (T1), 100% folhas e 50% de frutos (T2), e 50% folhas e 100% de frutos (T3). Os dados foram obtidos em janeiro de 2006 e em março de 2006, épocas nas quais os frutos se achavam na fase linear de ganho de massa seca. Cada ponto representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$)

Tabela 3 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno sobre a concentração foliar de N total, área foliar específica (AFE), concentração de clorofilas (Clo) totais ($a + b$), carotenóides totais (Car), razão Clo a :Clo b , proteína total e aminoácidos (AA) totais em plantas de café cultivadas em campo. As plantas foram distribuídas em três tratamentos: 100% folhas e 0% de frutos ($T1$), 100% folhas e 50% de frutos ($T2$), e 50% folhas e 100% de frutos ($T3$). Os dados foram obtidos em janeiro de 2006 e em março de 2006, épocas nas quais os frutos se achavam na fase linear de ganho de massa seca. Cada ponto representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$); valores seguidos por letras distintas diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste de Newman-Keuls). Asterisco (*) indica diferenças entre épocas de avaliações ($p \leq 0,05$)

Parâmetros	Época	Tratamentos		
		100% Folha 0% Fruto	100% Folha 50% Fruto	50% Folha 100% Fruto
N total (g kg^{-1} MS)	Janeiro	$33,24 \pm 0,84^a$	$31,35 \pm 1,68^a$	$31,50 \pm 2,08^a$
	Março	$31,87 \pm 1,83^a$	$28,31 \pm 1,17^a$	$28,31 \pm 2,26^a$
AFE ($\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$ MF)	Janeiro	$11,95 \pm 0,44^a$	$11,96 \pm 0,34^a$	$12,00 \pm 0,35^a$
	Março	$11,39 \pm 0,39^a$	$12,39 \pm 0,38^a$	$12,47 \pm 0,34^a$
Clo totais (mmol kg^{-1} MF)	Janeiro	$2,39 \pm 0,15^a$	$2,19 \pm 0,13^a$	$2,13 \pm 0,26^a$
	Março	$2,57 \pm 0,07^a$	$2,60 \pm 0,28^a$	$2,04 \pm 0,42^a$
Car (mmol kg^{-1} MF)	Janeiro	$0,46 \pm 0,02^a$	$0,45 \pm 0,01^a$	$0,42 \pm 0,02^a$
	Março	$0,46 \pm 0,01^a$	$0,47 \pm 0,03^a$	$0,38 \pm 0,02^b$
Clo a :Clo b	Janeiro	$2,80 \pm 0,04^a$	$2,88 \pm 0,08^a$	$2,91 \pm 0,08^a$
	Março	$2,96 \pm 0,05^a$	$2,94 \pm 0,13^a$	$2,99 \pm 0,03^a$
Proteína total (g kg^{-1} MF)	Janeiro	$87,7 \pm 5,2^a$	$80,2 \pm 4,6^a$	$95,8 \pm 6,7^a$
	Março	$100,8 \pm 6,1^a$	$103,3 \pm 2,4^a$	$100,1 \pm 6,7^a$
AA totais (mmol kg^{-1} MF)	Janeiro	$67,7 \pm 5,4^a$	$54,2 \pm 6,7^a$	$56,0 \pm 7,0^{a*}$
	Março	$52,7 \pm 7,2^a$	$49,3 \pm 5,1^a$	$38,3 \pm 5,3^{a*}$

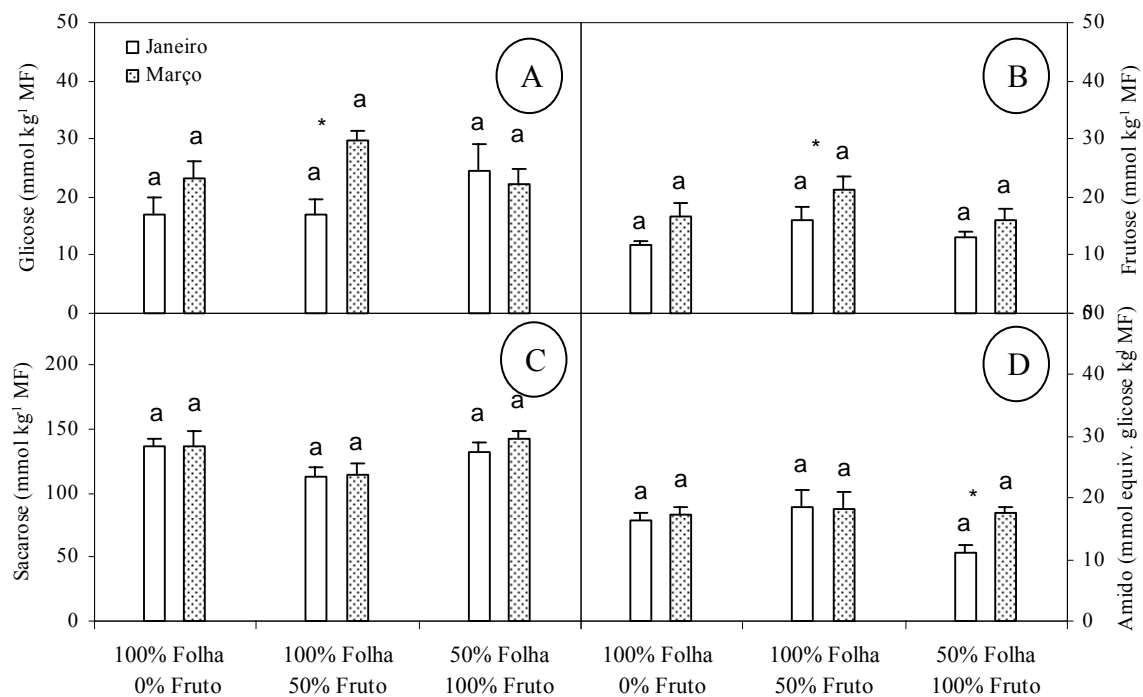


Figura 6 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno sobre as concentrações foliares de glicose (A), frutose (B), sacarose (C) e amido (D), em plantas de café cultivadas em campo. Cada coluna representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Cada coluna representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Vide legenda da Figura 4 para outros detalhes

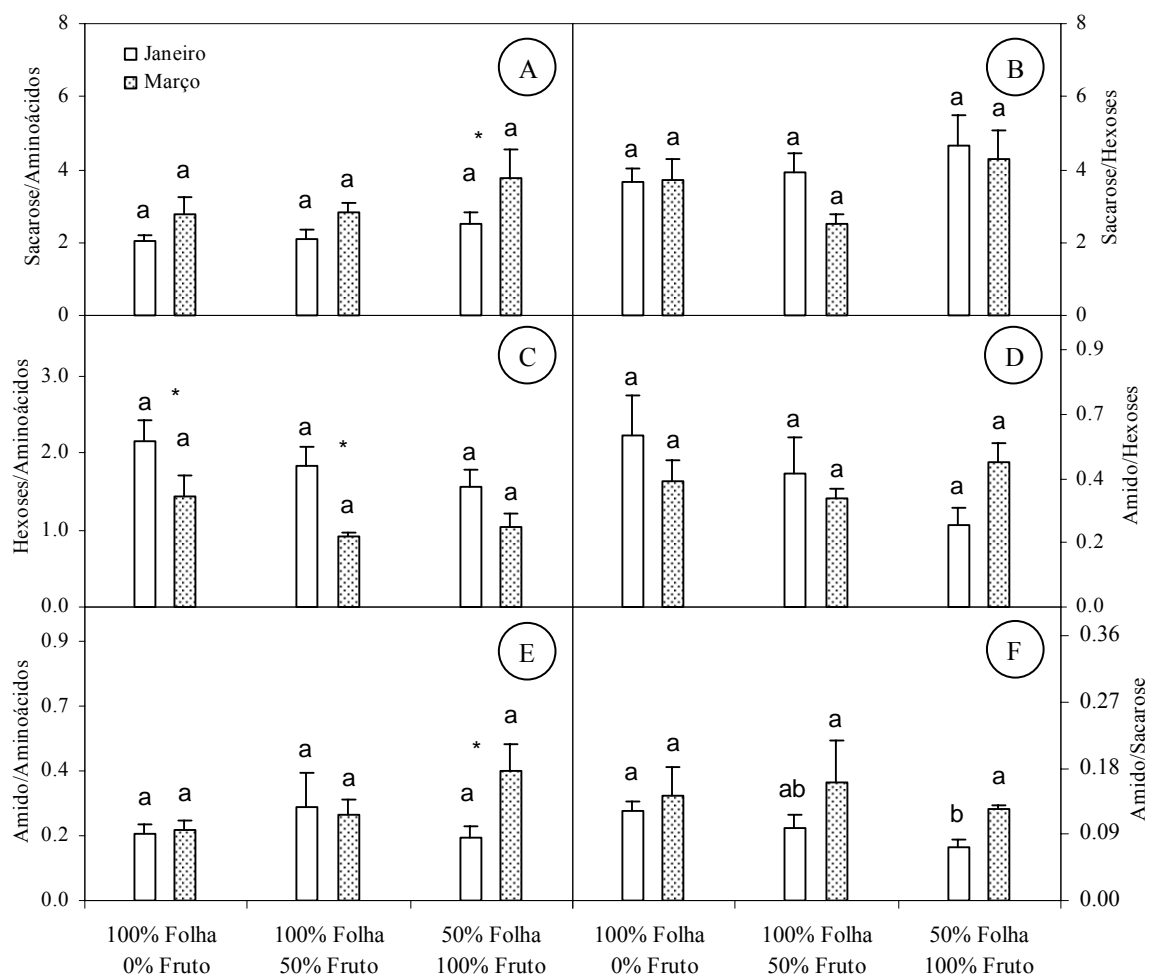


Figura 7 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno, em plantas de café, sobre as razões sacarose/aminoácidos (A), sacarose/hexoses (B), hexoses/aminoácidos (C), amido/hexoses (D), amido/aminoácidos (E) e amido/sacarose (F). Cada coluna representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Vide legenda da Figura 4 para outros detalhes

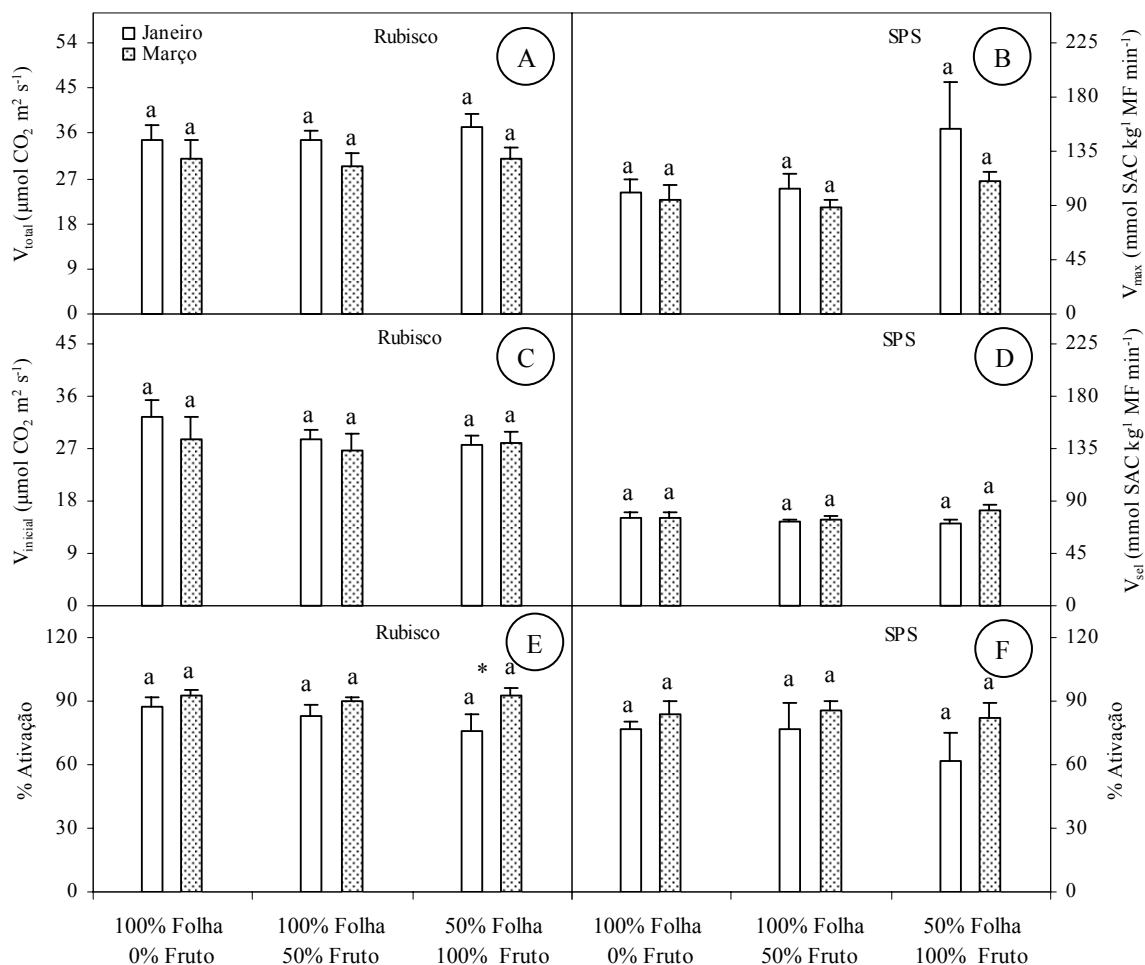


Figura 8 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno, em plantas de café, sobre as atividades foliares V_{total} (A) e $V_{inicial}$ (C) e estado de ativação (E) da carboxilase da ribulose-1,5-bisfosfato – Rubisco, e V_{max} (B), V_{sel} (D) e estado de ativação (F) da sintase da sacarose fosfato - SPS. Cada coluna representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Vide legenda da Figura 4 para outros detalhes

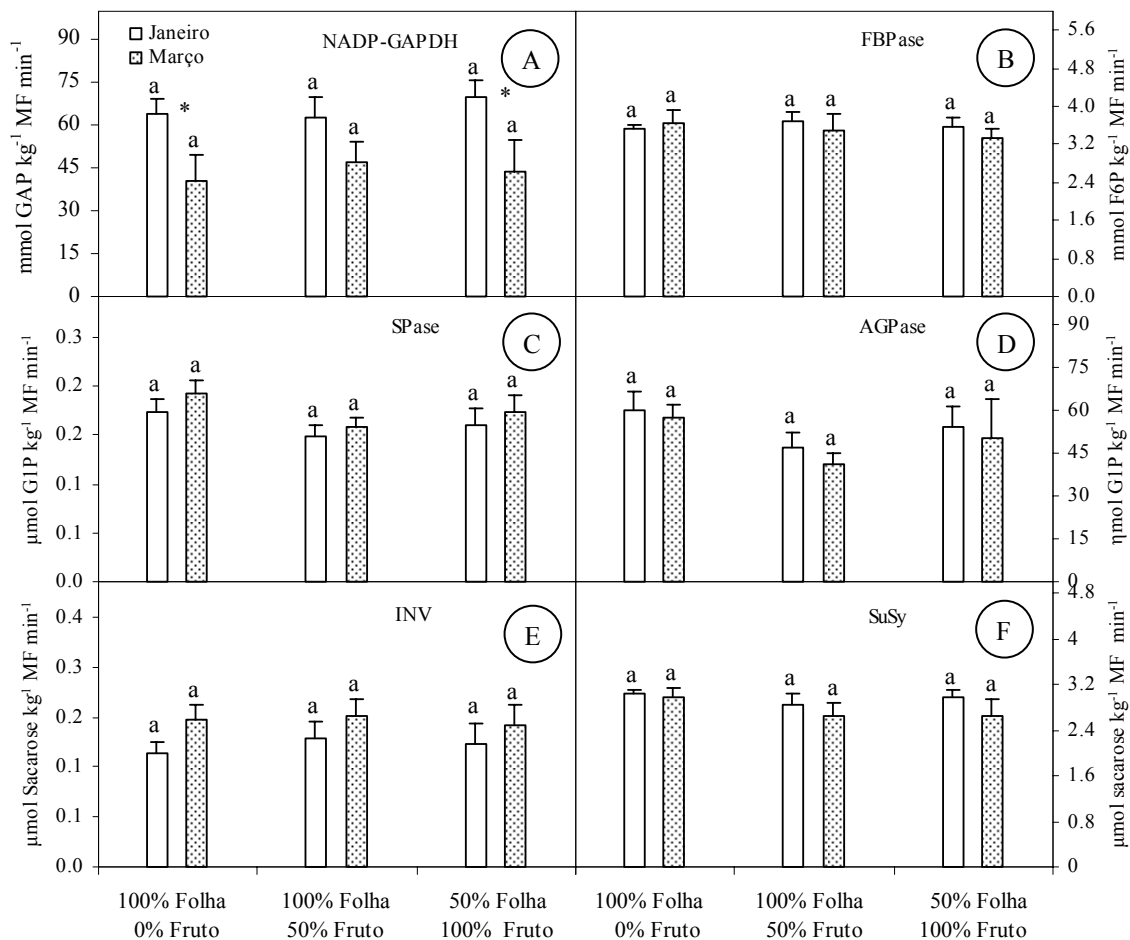


Figura 9 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno, em plantas de café, sobre as atividades das enzimas desidrogenase do NADP: gliceraldeído-3-fosfato - NADP-GAPDH (A), fosfatase da frutose-1,6-bisfosfato - FBPase (B), fosforilase do amido - SPase (C), pirofosforilase da ADP-glicose - AGPase (D), Invertase ácida - INV (E) e sintase da sacarose - SuSy (F). Cada coluna representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Vide legenda da Figura 4 para outros detalhes

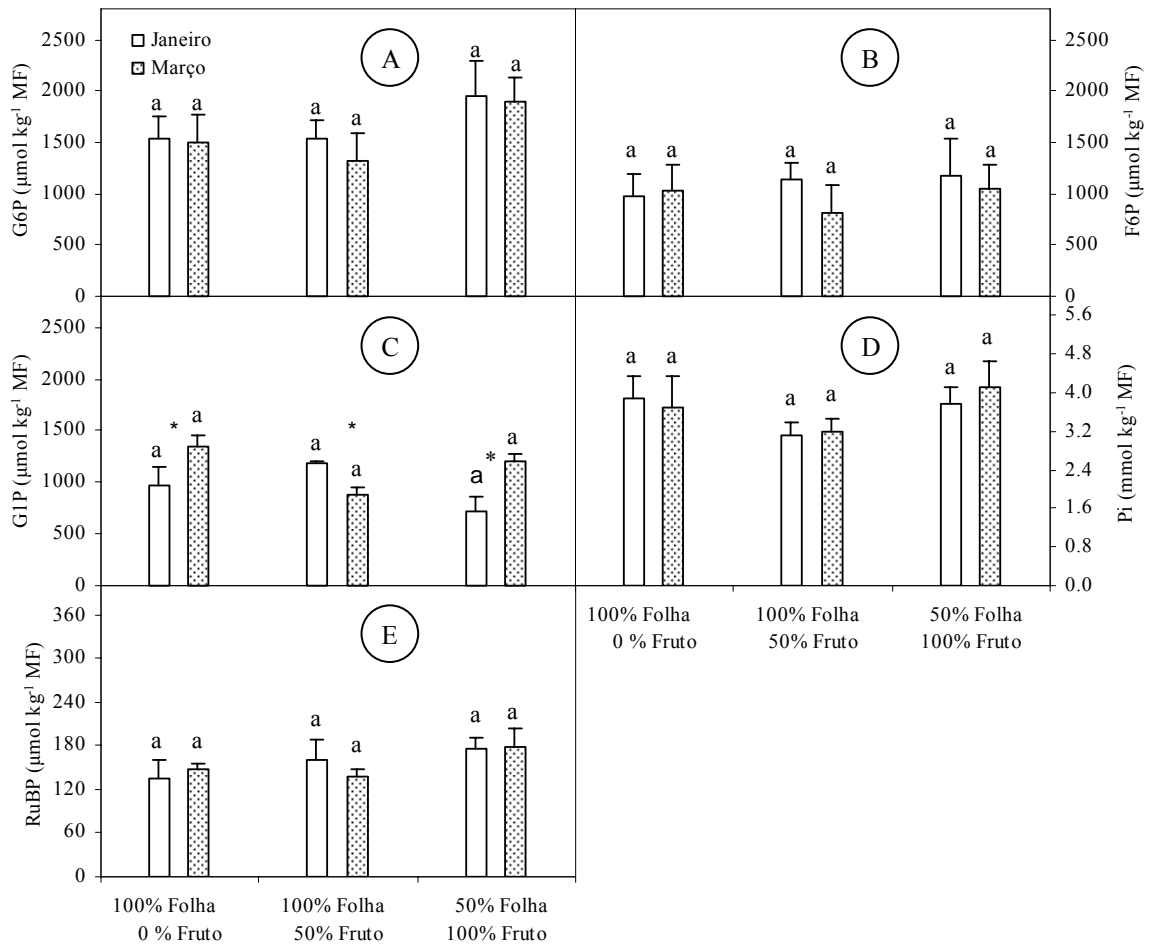


Figura 10 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno, em plantas de café, sobre as concentrações de glicose-6-fosfato - G6P (A), frutose-6-fosfato - F6P (B), glicose-1-fosfato - G1P (C), ortofosfato - Pi (D) e ribulose-1,5-bisfosfato - RuBP (E). Cada coluna representa a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Vide legenda da Figura 4 para outros detalhes

Tabela 4 - Efeito da manipulação artificial na relação fonte:dreno sobre a partição do ^{14}C fotossintético em folhas de plantas de café cultivadas em campo. Valores de radioatividade incorporada nas diferentes frações (aniônica = ácidos orgânicos; catiônica = aminoácidos; neutra = açúcares solúveis totais; e insolúvel = amido e componentes de parede celular) são expressos em kBq.m^{-2} . Valores representam a média \pm erro-padrão ($n = 6$). Vide legenda da Tabela 3 para outros detalhes

Frações	Época	Tratamentos		
		100% Folha 0% Fruto	100% Folha 50% Fruto	50% Folha 100% Fruto
Aniônica	Janeiro	100 \pm 14 ^a	112 \pm 18 ^a	103 \pm 7 ^a
	Março	97 \pm 14 ^a	93 \pm 7 ^a	97 \pm 14 ^a
Catiônica	Janeiro	192 \pm 25 ^b	272 \pm 44 ^{ab}	337 \pm 24 ^{a*}
	Março	214 \pm 23 ^a	184 \pm 27 ^a	179 \pm 14 ^a
Neutra	Janeiro	1544 \pm 215 ^a	1622 \pm 308 ^a	1798 \pm 112 ^a
	Março	1733 \pm 190 ^a	1613 \pm 201 ^a	2048 \pm 464 ^a
Insolúvel	Janeiro	33 \pm 4 ^{a*}	37 \pm 3 ^a	27 \pm 3 ^a
	Março	43 \pm 2 ^a	39 \pm 3 ^a	28 \pm 4 ^b
Total	Janeiro	1922 \pm 123 ^a	2044 \pm 365 ^a	2257 \pm 164 ^a
	Março	2088 \pm 162 ^a	2146 \pm 299 ^a	2536 \pm 158 ^a

6. DISCUSSÃO

6.1 *Crescimento e produção de frutos*

As avaliações experimentais foram feitas durante a fase de crescimento ativo do cafeeiro, que se estende de setembro a março, em Viçosa (Barros & Maestri, 1972, 1974; Mota *et al.*, 1997; Amaral *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2004), período em que as temperaturas foram elevadas e as chuvas abundantes. Em função da distribuição adequada das chuvas, é pouco provável que as plantas tenham sofrido de déficit hídrico.

O padrão de crescimento do fruto, avaliado em base de massa fresca ou volume, seguiu características de uma curva sigmoideal dupla, a exemplo do observado por Cannell (1974, 1985), Castro (2002), Cavalari (2004) e Geromel (2006). Porém, em base de massa seca, o crescimento do fruto foi tipicamente linear logo após a fase *chumbinho*. Estes dados corroboram os de Clowes (1977), mas contrastam com as observações de Cannell (1974, 1985) e de Castro (2002) nas quais o padrão de crescimento dos frutos foi muito similar, independentemente se avaliado com base na massa fresca, massa seca ou volume.

A redução na razão fonte:dreno acarretou decréscimos significativos na taxa de crescimento dos ramos plagiotrópicos, no número de nós surgidos e no ganho de área foliar, particularmente nas plantas do tratamento *T3*. Estes resultados confirmam as observações de vários autores (e.g. Cannell, 1970, 1971 a, b, 1974; Barros *et al.*, 1997; Mota *et al.*, 1997; Amaral *et al.*, 2001, 2006), i.e., sob forte frutificação, os frutos do cafeeiro tornam-se drenos preferenciais e são capazes de importar assimilados de outras regiões da planta, restringindo o suprimento para os pontos vegetativos e, por conseguinte, a expansão dos ramos. Registre-se que, nas primeiras avaliações após a aplicação dos tratamentos, poucas foram as diferenças nas taxas de crescimento e de número de nós surgidos entre as plantas parcialmente desfrutificadas e aquelas com plena carga de frutos, conforme já observado por Carvalho (1985). O fato de os frutos encontrarem-se na fase de *chumbinho*, quando são considerados drenos metabólicos fracos (Maestri *et al.*, 2001), pode largamente explicar esse comportamento.

O incremento médio (39%) na massa seca de cada fruto das plantas de *T2* em relação às de *T3*, foi ligeiramente maior que o incremento (~25%) observado por

outros autores (Clowes & Wilson, 1977; Carvalho, 1985) trabalhando com cafeeiros parcialmente desfrutificados. Conforme demonstrado por Vaast *et al.* (2006), quando a carga de frutos é pesada, há competição por carboidratos entre os frutos, fato que afeta fortemente o tamanho final do grão, a composição bioquímica e a qualidade da bebida. Como um todo, esses resultados contrastam com os de Cannell (1974) e Castro (2002), que observaram que o tamanho das sementes foi pouco afetado pela carga de frutos e tampouco pelo desfolhamento parcial. Tomando-se essas informações em conjunto, parece haver considerável plasticidade genotípica em café arábica no que respeita ao tamanho (massa) do grão, em resposta a alterações da razão fonte:dreno.

A razão área foliar:fruto, mesmo nas plantas de T2, foi consideravelmente inferior aos cerca de 20 cm² de área necessários para suportar o desenvolvimento de cada fruto de café (Cannell, 1985). Isso poderia largamente explicar a porcentagem relativamente alta de frutos chochos, evidenciando que a planta não conseguiu levar a cabo, de modo eficiente, o enchimento de todos os frutos. Plantas lenhosas, de modo geral, ajustam sua carga de frutos à disponibilidade de carboidratos e de minerais (Kozlowski & Pallardy, 1997), via aumentos da capacidade fotossintética e, mais particularmente, via abscisão de frutos. Não obstante, os baixos percentuais de abscisão de frutos ora observados parecem corroborar a sugestão de Cannell (1985). Segundo este autor, o cafeeiro produz poucas flores em seu ambiente nativo sombreado e, portanto, não teria necessidade de desenvolver, ao longo de sua evolução, mecanismos para manter sua carga de frutos balanceada com a disponibilidade de carboidratos. Assim, o cafeeiro tende a levar a cabo o enchimento de todos os frutos formados após a fase de expansão do fruto (Cannell, 1985). Portanto, neste experimento, a falta de uma área foliar compatível com a carga pode ter resultado na formação de frutos mal desenvolvidos. Isso deve concorrer para o depauperamento do cafeeiro e para o desenvolvimento de ciclos bienais de produção (DaMatta, 2004).

As concentrações de carboidratos nas folhas e nos ramos têm sido freqüentemente consideradas para explicar as alterações nas taxas de crescimento vegetativo, bem como na intensidade da frutificação do cafeeiro (Wormer & Ebagole, 1965; Patel, 1970; Janardhan *et al.*, 1971; Rena & Maestri, 1985; Amaral *et al.*, 2001, 2006). Assim, quanto maior a carga de frutos, menor o teor de amido nos ramos, podendo até ocorrer o esgotamento total das reservas da planta na fase de

expansão rápida dos frutos (Wormer & Ebagole, 1965; Patel, 1970). Segundo Priestley (1962), o amido é convertido em açúcar, principalmente nas ocasiões de crescimento vegetativo intenso, quando as reservas são usadas para suportar a atividade meristemática de ápices caulinares e também o crescimento de frutos. Porém, neste trabalho, a alteração na razão fonte:dreno não produziu nenhum efeito significativo nas concentrações de carboidratos e de açúcares fosforilados. Estes resultados corroboram os de Castro (2002), que verificou que a desfrutificação pouco ou nada alterou os teores de carboidratos na folha, bem como em ramos plagiotrópicos.

6.2 Trocas gasosas e metabolismo do carbono

Os valores máximos de A ($\sim 6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) observados neste trabalho foram menores que os máximos ($\sim 12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) já registrados para a espécie (Silva *et al.*, 2004), porém, similares aos de outros autores (e.g., Chaves, 2005; Araújo, 2006). As taxas de trocas gasosas também foram maiores no início da manhã, quando a temperatura é mais amena e δ_e menor, podendo alcançar valores negligenciáveis à tarde, a exemplo de observações anteriores (e.g., Silva *et al.*, 2004; Chaves, 2005; Araújo, 2006). As correlações estreitas entre A e g_s , particularmente na segunda época de avaliação ($r = 0,912$; $p \leq 0,001$) (dados não mostrados), sugerem que limitações estomáticas podem restringir grandemente a fotossíntese do cafeeiro.

Quando os frutos estavam no estágio de *chumbinho*, os tratamentos aplicados não afetaram a magnitude das trocas gasosas (dados não mostrados). Possivelmente, uma vez que as taxas de crescimento pouco foram afetadas no início do experimento, em resposta à manipulação da relação fonte:dreno, aliado ao fato de os frutos, naqueles estádios, serem fracos drenos metabólicos (Maestri *et al.*, 2001), explicariam a similaridade da magnitude das trocas gasosas entre as plantas avaliadas. Por outro lado, durante a fase de ganho linear de massa seca dos frutos, quando estes passam a ser drenos fortes, verificaram-se maiores valores cumulativos diários de A nas plantas sem redução da carga de frutos em comparação com aquelas em que a carga de frutos foi eliminada. Maiores valores de A , na medida em que a carga de frutos aumenta, já foram relatados em café (Vaast *et al.*, 2005; Franck *et al.*, 2006). Grande parte das diferenças em A pôde ser explicada em função de diferenças em g_s . Cumpre ressaltar que as diferenças em magnitude de A e g_s , observadas em medidas instantâneas, refletiram-se no longo prazo, a julgar-se pelos menores valores

de $\delta^{13}\text{C}$, na medida em que a razão fonte:dreno diminuiu. Maior discriminação isotópica (menor $\delta^{13}\text{C}$) pode ser resultante de aumentos em g_s ou redução em A (Farquhar *et al.*, 1989). Conquanto neste trabalho A aumentou nas plantas de $T3$, em relação às de $T1$, (fato que, isoladamente, resultaria em valores menos negativos de $\delta^{13}\text{C}$), sugere-se que, no longo prazo, o aumento de g_s deve ter sido proporcionalmente maior que o de A . Ademais, como $\delta^{13}\text{C}$ reflete a disponibilidade intracelular de CO_2 , sendo estreita e negativamente correlacionada com a razão C_i/C_a (Farquhar *et al.*, 1989), sugere-se também que o aumento em A deve ter ocorrido principalmente em função de uma maior disponibilidade de CO_2 , e não de uma maior capacidade mesofílica para fixar o CO_2 , conforme se evidenciará mais à frente. Salienta-se, ainda, que maior g_s se traduziu em incrementos na transpiração (dados não mostrados), resultando em menor T_f , conforme observado principalmente nas horas mais quentes nas plantas de $T3$ em relação às de $T1$. Menor T_f , por seu turno pode concorrer para menores taxas respiratórias e fotorrespiratórias e, em última análise, concorrendo para alargar as diferenças em A .

Ressalte-se que, provavelmente, diferenças de g_s em resposta aos tratamentos impostos não estiveram associadas com diferenças na disponibilidade de CO_2 , uma vez que, em várias determinações, maiores valores de g_s não foram acompanhados de menores valores de C_i/C_a (Figura 4 C, E). Além disso, apesar de o estômato do cafeeiro apresentar uma alta sensibilidade a δe (Nunes, 1988; DaMatta *et al.*, 2002; DaMatta, 2004), não se pôde associar diferenças de g_s a δe , a julgar-se pelos resultados mostrados nas Figuras 3 e 4. Portanto, resta demonstrar o(s) mecanismo(s) que controlaria(m) o comportamento estomático diferencial ora observado, em resposta à manipulação da razão fonte:dreno.

Apesar das diferenças em A entre as plantas dos três tratamentos, os valores da razão F_v/F_m foram superiores a 0,8, indicando ausência de fotoinibição da fotossíntese (Björkman & Demming, 1987). Além disso, as concentrações de pigmentos fotossintéticos e N, e F_v'/F_m' , q_p e ϕ_{FSII} mantiveram-se inalterados, independentemente dos tratamentos, indicando que houve capacidades similares de absorção e de eficiência do uso da radiação para a fotossíntese (Ishida *et al.*, 1999). Por conseguinte, as diferenças em A não estiveram associadas com as reações fotoquímicas da fotossíntese.

Em maçã, Fujji & Kennedy (1985) observaram aumentos em A , mas sem alteração de g_s , quando as plantas foram submetidas a uma redução na razão fonte:dreno. Por outro lado, Wünsche *et al.* (2005) observaram, também em maçã, que A e g_s aumentaram linearmente com o aumento da carga de frutos. No entanto, contrariamente ao verificado neste trabalho, Wünsche *et al.* (2005) detectaram acúmulo de amido nas folhas de plantas com menor carga de frutos. Resultados similares foram também obtidos em manga (Urban *et al.*, 2004). A formação de amido nos cloroplastos e o desvio do CO_2 fixado para a síntese de amido podem causar, respectivamente, decréscimo na atividade catalítica da rubisco e inibição da síntese de sacarose, que, por sua vez, limitaria a fotossíntese por meio da restrição de fosfato para os cloroplastos (Stitt, 1991). Adicionalmente, o acúmulo de amido, em plantas com baixa atividade de drenos, pode, parcialmente, limitar a fotossíntese, via maior resistência à difusão do CO_2 , desde os espaços intercelulares até o estroma (Sawada *et al.*, 2001; Iglesias *et al.*, 2002). Em qualquer caso, neste trabalho as concentrações foliares de amido, assim como a atividade da AGPase, foram baixas (cf. Praxedes *et al.*, 2006; Ronchi *et al.* 2006); como também a partição de carbono para a sua biossíntese, independentemente dos tratamentos. Assim, é pouco provável que as diferenças em A aqui observadas tenham alguma relação com os teores de amido. Com efeito, é também pouco provável que outras alterações metabólicas, em resposta à manipulação da razão fonte:dreno, tenham tido papel de destaque na modulação das taxas de fotossíntese, porquanto (i) as concentrações de hexoses, sacarose e de intermediários fosforilados (G1P, G6P, F6P, Pi, RuBP), (ii) as atividades das enzimas que regulam o metabolismo de carbono (e.g. SPS, FBPase e AGPase) e a rubisco, (iii) o estado de ativação da SPS e da rubisco, (iv) e a partição do carbono pouco ou nada responderam aos tratamentos aplicados. Ressalte-se que, nos experimentos sobre fluxo metabólico, tinha-se uma concentração de CO_2 saturante ($\sim 5\%$) e, portanto, as limitações difusivas, nessa condição, devem ser mínimas. Conseqüentemente, a incorporação similar de ^{14}C nos tecidos fotossintéticos pode ser tomada como evidência de que a capacidade fotossintética não foi afetada pelos tratamentos impostos. Analisados em conjunto, os presentes resultados indicam que o aumento em A , na medida em que a razão fonte:dreno diminuiu, foi largamente independente da fotoquímica e da bioquímica da fotossíntese, sendo governado, fundamentalmente, por maior disponibilidade interna de CO_2 associado a maior g_s .

Considerando-se as diferenças em *A* entre as plantas analisadas, e as similaridades nas concentrações de sacarose e de outros carboidratos (como também na partição de ^{14}C) entre elas, sugere-se que as taxas de exportação de assimilados tenham sido maiores com a redução da razão fonte:dreno. Usualmente, maior taxa de exportação está associada com maior atividade (ou ativação) da SPS (Praxedes *et al.*, 2006), porém neste trabalho, isto não foi observado.

De modo geral, os resultados permitem sugerir que a redução na razão fonte:dreno proporcionou restrição significativa no crescimento vegetativo dos ramos plagiotrópicos. Comparando-se as plantas de *T2* com as de *T3*, o maior crescimento associado com a maior massa seca e menor porcentagem de abscisão de frutos fez aumentar a força do dreno nas primeiras, o que explicaria, em parte, o comportamento similar das trocas gasosas entre as plantas de *T2* e de *T3*, a despeito das diferenças substanciais na razão fonte:dreno entre elas, quando os tratamentos foram aplicados. Apenas quando se comparam os tratamentos mais contrastantes (*T1* x *T3*), pôde-se observar diferenças significativas na magnitude das trocas gasosas. A redução de *A* com o aumento da razão fonte:dreno foi, contudo, largamente dissociada de retroinibição da fotossíntese decorrente do acúmulo de carboidratos. Estes resultados estão em franco contraste com o que vem sendo publicado na literatura sobre manipulação da relação fonte-dreno. Em conjunto, os resultados indicam que a redução na razão fonte:dreno pode afetar positivamente a fotossíntese, via aumentos na condutância estomática, porém sem alterar a fotoquímica e a bioquímica da fotossíntese durante a fase de rápido crescimento dos frutos do cafeeiro.

7. CONCLUSÕES

A manipulação da razão fonte:dreno, via desfolhamento e desfrutificação controlados, acarretou forte competição entre os crescimentos vegetativo e reprodutivo, bem como competição entre frutos. As evidências apresentadas indicam que o aumento em A , quando a razão fonte:dreno foi mais reduzida, foi associada fundamentalmente a efeitos estomáticos, sem qualquer alteração aparente na capacidade mesofílica de fixação do CO_2 durante a fase de rápido crescimento dos frutos do cafeeiro.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 F.A.T. (2006) Crescimento vegetativo sazonal do cafeeiro e sua relação com fotoperíodo, frutificação, resistência estomática e fotossíntese. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41, 377-384.
- Amor Y., Haigler C.H., Wainscott M., Delmer D.A. (1995) Membrane associated form of SuSy and its potential role in the synthesis of cellulose and callose in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 92, 9353-9357.
- ap Rees T. (1984) Sucrose metabolism. In: Lewis D.H. (Ed.), *Storage carbohydrates in vascular plants*. Cambridge University Press, Cambridge, 53-73 p.
- Araújo W.L. (2006) *Limitações da fotossíntese e metabolismo do carbono em folhas de diferentes posições da copa do cafeeiro (Coffea arabica L.)*. Viçosa, UFV, Tese (MS), 43 p.
- Barrat D.H.P., Barber L., Kruger N.J., Smith A.M., Wang T.L., Martin E. (2001) Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea. *Plant Physiology* 127, 655-664.
- Barros R.S., Maestri M. (1972) Periodicidade de crescimento em café. *Revista Ceres* 19, 424-448.
- Barros R.S., Maestri M., Vieira M., Braga-Filho L.J. (1973) Determinação da área de folhas do café (*Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo). *Revista Ceres* 20, 44-52.
- Barros R.S., Maestri M. (1974) Influência dos fatores climáticos sobre a periodicidade do crescimento vegetativo do café (*Coffea arabica* L.). *Revista Ceres* 21, 268-279.
- Barros R.S., Maestri M., Rena A.B. (1999) Physiology of growth and production of the coffee tree - a review. *Journal of Coffee Research* 27, 1-54.
- 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.

- Bieniawska Z., Barrat D.H.P., Garlick A.P., Thole V., Kruger N.J., Martin C., Zrenner R., Smith, A.M. (2007) Analysis of the sucrose synthase gene family in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, no prelo.
- Björkman O., Demming B. (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170, 489-504.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Cannell M.G.R. (1970) The contribution of carbohydrates from vegetative laterals to the growth of fruits on the bearing branches of *Coffea arabica*. *Turrialba* 20, 15-19.
- Cannell M.G.R. (1971a) 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 M.G.R. (1971b) Production and distribution of dry matter in trees of *Coffea arabica* L. in Kenya as affected by seasonal climatic differences and the presence of fruits. *Annals of Applied Biology* 67, 99-120.
- Cannell M.G.R. (1974) Factors affecting arabica coffee bean size in Kenya. *Journal of Horticultural Science* 49, 65-76.
- Cannell M.G.R. (1976) Crop physiological aspects of coffee bean yield. A review. *Kenya Coffee* 41, 245-53.
- Cannell M.G.R. (1985) Physiology of coffee crop. In: Clifford M.N., Willson K.C. (Eds.), *Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage*. Croom Helm, London, 108-134 p.
- Castro A.M. (2002) *Efeito de desfrutificações seqüenciadas sobre o crescimento e a produção do cafeeiro arábico*. Viçosa, UFV, Tese (DS), 106 p.
- Carvalho C.H.S. (1985) *Relação entre a seca de ramos e a produção, teor de amido e morte de raízes da progênie de Catimor UFV-1359 (Coffea arabica L.)*. Viçosa, UFV, Tese (MS), 43 p.
- Cataldo D.A., Haroon M., Schrader L.E., Youngs V.L. (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6, 71-80.

- Cavalari A.A. (2004) *Invertase ácida, sintase da sacarose e o metabolismo de açúcares no desenvolvimento de sementes de café (Coffea arabica L.)*. Campinas, UNICAMP, Tese (MS), 73 p.
- Chaves A.R.M. (2005) *Fotossíntese e mecanismos de proteção contra estresse fotooxidativo em Coffea arabica L., cultivado em condições de campo sob dois níveis de irradiância*. Viçosa, UFV, Tese (MS), 36 p.
- Clowes M.S.J. (1977) Study of the growth of the *Coffea arabica* L. fruits in Rhodesia. *Rhodesia Journal of Agricultural Research* 15, 89-93.
- Clowes M.S.J., Wilson J.H. (1977) The growth and development of lateral branches of *Coffea arabica* L. in Rhodesia. *Rhodesia Journal of Agricultural Research* 15, 171-85.
- 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.
- 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) Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *Journal of Plant Physiology* 159, 975-981.
- DaMatta F.M., Chaves A.R.M., Pinheiro H.A., Ducatti C., Loureiro M.E. (2003) Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. *Plant Science* 164, 111-117.
- DaMatta F.M. (2004) Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. *Field Crops Research* 86, 99-114.
- De Castro R., Marraccini P. (2006) Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18, 175-199.
- Déjardin A., Rochat C., Wuillém S., Boutin J.P. (1997) Contribution of sucrose synthase, ADP-glucose pyrophosphorylase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds. *Plant, Cell and Environment* 20, 1421-1430.
- Escherich W. (1980) Free space invertase, its possible role in phloem unloading. *Berlin Deutsche Botanical Gesellschaft* 93, 363-378.

- Farquhar G.D., Ehleringer J.R., Hubik, K.T. (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40, 503-537.
- Flore J.A., Layne D.R. (1999) Photoassimilate production and distribution in cherry. *HortScience* 34, 1015-1019.
- Franck N., Vaast P., Génard M., Dauzat J. (2006) Soluble sugars mediate sink feedback down-regulation of leaf photosynthesis in field-grown *Coffea arabica*. *Tree Physiology* 26, 517-525.
- Fujji J.A., Kennedy R.A. (1985) Seasonal changes in the photosynthetic rate in apple trees. A comparison between fruiting and nonfruiting trees. *Plant Physiology* 78, 519-524.
- Genty B., Briantais J., Baker N. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990, 87-92.
- Geromel C. (2006) *Metabolismo de sacarose em frutos de café*. Campinas, UNICAMP, Tese (DS), 115 p.
- Gibon Y., Vigeolas H., Geigenberger P., Stitt M. (2002) Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates, and glycolytic intermediates based on a novel enzymatic cycling system. *The Plant Journal* 30, 221-235.
- Goldschmidt E.E., Huber S.C. (1992) Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. *Plant Physiology* 99, 1443-1448.
- Hall A.J., Milthorpe F.L. (1978) Assimilate source-sink relationship in *Capsicum annuum* L. III. The effects of fruit excision on photosynthesis and leaf and stem carbohydrates. *Australian Journal of Plant Physiology*, 5, 1-13.
- Herold A. (1980) Regulation of photosynthesis by sink activity - the missing link. *New Phytologist* 86, 131-144.
- Hubbard N.L., Pharr M., Huber S.C. (1991) Sucrose phosphate synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species. *Physiologia Plantarum* 82, 191-196.
- Huber S.C. (1989) Biochemical mechanism for regulation of sucrose accumulation in leaves during photosynthesis. *Plant Physiology* 91, 656-662.

- Ishida A., Nakano T., Matsumoto Y., Sakoda M., Ang L.H. (1999) Diurnal changes in leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence in tropical tree species with contrasting light requirements. *Ecological Research* 14, 77-88.
- Iglesias J.D., Liso I., Tadeo F.R., Talon M. (2002) Regulation of photosynthesis through source:sink imbalance in citrus is mediated by carbohydrate content in leaves. *Physiologia Plantarum* 116, 563-572.
- Jackson M.L. (1958) *Soil chemical analysis*. Englewood Cliffs, Prentice Hall, 498 p.
- Janardhan K.V., Gopal N.H., Ramaiah P.K. (1971) Carbohydrate reserves in relation to vegetative growth, flower bud formation and crop levels in arabica coffee. *Indian Coffee* 35, 145-148.
- Koch K.E., Nolte K.D., Duke E.R., McCarty D.R., Avigne W.T. (1992) Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *Plant Cell* 4, 59-69.
- Koch K.E. (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 509-540.
- Kozlowski T.T., Pallardy S.G. (1997) *Physiology of woody plants*, Academic Press, San Diego, 441 p.
- Krapp A., Hofmann B., Schäfer C., Stitt M. (1993) Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink regulation' of photosynthesis? *Plant Journal* 3, 817-828.
- Kruger N.J., Beevers H. (1984) Effect of fructose 2,6-bisphosphate on the kinetic properties of cytoplasmic fructose 1,6-bisphosphate in germinating castor bean seedlings. *Plant Physiology* 76, 49-54.
- Landsberg J.J. (1986) *Physiological ecology of forest production*. Academic Press, Orlando, 198 p.
- Lavigne M.B., Little C.H.A., Major J.E. (2001) Increasing the sink:source balance enhances photosynthesis rate of 1-year-old balsam fir foliage by increasing allocation of mineral nutrients. *Tree Physiology* 21, 417-426.
- Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Colowick S.P., Kaplan N.O. (Eds.), *Methods in enzymology*. vol. 148, Academic Press, San Diego, 350-382 p.
- Long S.P., Zhu X., Naidu S.L., Ort D.R. (2006) Can improvement in photosynthesis increase crop yields? *Plant, Cell and Environment* 29, 315-330.

- Lytovchenko A., Bieberich K., Willmitzer L., Fernie A.R. (2002) Carbon assimilation and partitioning in potato leaves deficient in plastidial phosphoglucomutase. *Planta* 215, 802-811.
- Maestri M., Barros R.S. (1977) Coffee. In Alvim P.T., Kozłowski T.T. (Eds.), *Ecophysiology of tropical crops*. Academic Press, London, 249-278 p.
- Maestri M., Barros R.S., Rena A.B. (2001) Coffee. In Last F.T. (Ed.), *Tree crop ecosystems*. Elsevier, Amsterdam. 339-360 p.
- McCormick A.J., Cramer M.D., Watt D.A. (2006) Sink strength regulates photosynthesis in sugarcane. *New Phytologist* 171, 759-770.
- Miron D., Schaffer A.A. (1991) Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase, and the sucrose accumulating *Lycopersicon hirsutum* Humb. and Bonpl. *Plant Physiology* 95, 623-627.
- Moore S., Stein W.H. (1948) Photometric ninhydrin method for use in chromatography of amino acids. *Journal of Biological Chemistry* 176, 367-388.
- Mota J.W.S., DaMatta F.M., Barros R.S., Maestri M. (1997) Vegetative growth in *Coffea arabica* as affected by irrigation, daylength and fruiting. *Tropical Ecology* 38, 73-79.
- Müller-Röber B., Sonnewald U., Willmitzer L. (1992) Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO Journal* 11, 1229-1238.
- Nakai T., Tonouchi N., Konishi T., Tsuchida T., Yoshinaga F., Sakai F., Hayashi T. (1999) Enhancement of cellulose production by expression of sucrose synthase in *Acetobacter xylinum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96, 14-18.
- Neuhaus H.E., Quick W.P., Siegl G., Stitt M. (1990) Control of photosynthate partitioning in spinach leaves. *Planta* 181, 583-592.
- Neuhaus E.H., Stitt M. (1990) Control analysis of photosynthate partitioning: impact of reduced activity of ADP-glucose pyrophosphorylase or plastid phosphoglucomutase on the fluxes to starch and sucrose in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 182, 44-54.
- Nunes M.A. (1988) Environmental effects on stomatal and mesophyll regulation of photosynthesis in coffee leaves. *Photosynthetica* 22, 547-553.

- Patel R.Z. (1970) A note on the seasonal variations in starch content of different parts of arabica coffee trees. *East African Agricultural and Forestry Journal* 36, 1-4.
- Penney C.L. (1976) A simple micro-assay for inorganic phosphate. *Analytical Biochemistry* 75, 201-210.
- Plaxton W.C. (1990) Glycolysis. In: Lea P.J. (Ed.), *Methods in plant biochemistry: enzymes of primary metabolism*. Academic Press, San Diego, 145-173 p.
- Pieters A.J., Paul M.J., Lawlor D.W. (2001) Low sink demand limits photosynthesis under P_i deficiency. *Journal of Experimental Botany* 52, 1083-1091.
- Paul M.J., Foyer C.H. (2001) Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52, 1383-1400.
- 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 canefora* Pierre var. *kouillou*) leaves. *Environmental and Experimental Botany* 56, 263-273.
- Priestley C.A. (1962) *Carbohydrate resources within the perennial plant*. Commonwealth Agricultural Bureaux, England, 116 p.
- Preiss J. (1982) Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Annual Review of Plant Physiology* 33, 431-454.
- Quick W.P. (1996) Sucrose metabolism in sources and sinks. In: Zamski E., Schaffer A.A. (Eds.), *Photoassimilate distribution in plants and crops*. Marcel Dekker, New York, 115-160 p.
- Rena A.B., Maestri M. (1985) Fisiologia do cafeeiro. *Informe Agropecuário* 21, 26-40 p.
- Rena A.B., Barros R.S., Maestri M., Söndahl M.R. (1994) Coffee. In: Schaffer B., Andersen P.C. (Eds.), *Handbook of environmental physiology of fruit crops: subtropical and tropical crops*. vol II. CRC Press, Boca Raton, 101-122 p.
- 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.
- Ross H.A., Davies H.V. (1992) Sucrose metabolism in tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). Effects of sink removal and sucrose flux on sucrose-degrading enzymes. *Plant Physiology* 98, 287-293.

- Rufty T.W., Huber S. (1983) Changes in starch formation and activities of sucrose phosphate synthase and cytoplasmic fructose-1,6-bisphosphatase in response to source-sink alterations. *Plant Physiology* 72, 474-480.
- Sawada S., Kuminaka M., Watanabe K., Sato A., Kawamura H., Komine K., Sakamoto T., Kassai A. (2001) The mechanism to suppress photosynthesis through end-product inhibition in single-rooted soybean leaves during acclimation to CO₂ enrichment. *Plant and Cell Physiology* 42, 1093-1102.
- Sawada S., Sato M., Kassai A., Yaochi D., Kameya Y., Matsumoto I., Kasai M. (2003) Analysis of the feed-forward effects of sink activity on the photosynthetic source-sink balance in single-rooted sweet potato leaves. I. Activation of RuBPCase through the development of sinks. *Plant and Cell Physiology* 44, 190-197.
- Sharkey T.D., Savitch L.V., Butz N.D. (1991b) Photometric method for routine determination of k_{cat} and carbamylation of rubisco. *Photosynthesis Research* 28, 41-48.
- Sharkey T.D., Vassey T.L., Vanderveer P.J., Vierstra R.D. (1991a) Carbon metabolism enzymes and photosynthesis in transgenic tobacco having excess phytochrome. *Planta* 185, 287-296.
- 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.
- Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas - SAEG. (1997) Versão 7.1. Viçosa, Fundação Arthur Bernardes.
- Stitt M., Gerhardt R., Wilke I., Heldt H.W. (1987) The contribution of fructose-2,6-bisphosphate to the regulation of sucrose synthesis during photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 59, 377-386.
- Stitt M., Lilley R.M.C., Gerhard R., Heldt H.W. (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. In: Colowick S.P., Kaplan N.O. (Eds.), *Methods in enzymology*. vol. 174, Academic Press, San Diego, 518-555 p.
- Stitt M. (1991) Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* 14, 741-762.

- Sun J.D., Loboda T., Sung S.J.S., Black Jr. C.C. (1992) Sucrose synthase in wild tomato, *Lycopersicon chmielewskii*, and tomato fruit sink strength. *Plant Physiology* 98, 1163-1169.
- Sung S.S., Xu D.P., Black C.C. (1989) Identification of actively filling sucrose sinks. *Plant Physiology* 89, 1117-1121.
- Sweetlove L.J., Burrell M.M., ap Rees T. (1996) Starch metabolism in tubers of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) with increased ADPglucose pyrophosphorylase. *Biochemistry Journal* 320, 493-498.
- Trethewey R.N., Geigenberger P., Riedel K., Hajirezaei M.R., Sonnewald U., Stitt M., Riesmeier J.W., Willmitzer L. (1998) Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. *Plant Journal* 15, 109-118.
- 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.
- Vaast P., Bertrand B., Angrand J., Perriot J.J., Guyot B., Génard M. (2006) Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. *Journal of Science and Food Agriculture* 86, 197-204.
- Vaughn M.W., Harrington G.N., Bush D.R. (2002) Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 99, 10876-10880.
- Winter H., Huber. S.C. (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Plant Science* 19, 31-67.
- Wormer T.M., Ebagole H.E. (1965) Visual scoring of starch in *Coffea arabica* L. II. Starch in bearing and non-bearing branches. *Experimental Agriculture* 1, 41-53.
- Wünsche J.N., Greer D.H., Laing W.A, Palmer J.W. (2005) Physiological and biochemical leaf and tree responses to crop load in apple. *Tree Physiology* 25, 1253-1263.

Zrenner R., Salanoubat M., Willmitzer L., Sonnewald U. (1995) Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Journal* 7, 97-107.