

CLÁUDIO PAGOTTO RONCHI

ACLIMATAÇÃO DA MAQUINARIA FOTOSSINTÉTICA DO CAFEIEIRO À  
ALTERAÇÃO DA FORÇA-DRENO E À SECA, EM FUNÇÃO DA RESTRIÇÃO DO  
VOLUME RADICULAR

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  
2005

CLÁUDIO PAGOTTO RONCHI

ACLIMATAÇÃO DA MAQUINARIA FOTOSSINTÉTICA DO CAFEIEIRO À  
ALTERAÇÃO DA FORÇA-DRENO E À SECA, EM FUNÇÃO DA RESTRIÇÃO DO  
VOLUME RADICULAR

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: 02 de setembro de 2005

---

Prof. Antonio Alberto da Silva  
(Conselheiro)

---

Prof. José Donizeti Alves

---

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva

---

Prof. Raimundo Santos Barros

---

Prof. Fábio Murilo DaMatta  
(Orientador)

A Murilo, meu filho.

A Vanessa, minha esposa.

A Jair e Florita, meus pais.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, maior responsável pelo êxito deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade para a realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e financiamento do projeto original.

À minha esposa Vanessa, pelo amor, pela paciência e pela amizade.

Ao Murilo, meu filho, por ensinar-me a ser mais paciente e capaz, e pelas infinitas alegrias que me proporcionou a cada dia, fortalecendo-me rumo a mais uma importante conquista profissional.

Ao meu Orientador, Prof. Fábio, pela grande amizade, pela orientação profissional, pelos ensinamentos e pelo empenho e cumplicidade na realização deste projeto.

Aos funcionários Carlos Raimundo, Geraldo, Mercês, Oswaldo, Reginaldo, Zé Antônio e Zé Maria, pela amizade, pela ajuda, pelas brincadeiras e pelo carisma.

Aos bolsistas de iniciação científica, Karine e Gustavo, pela amizade e grande dedicação na execução dos experimentos.

Agradeço, da mesma forma, aos colegas Agnaldo e Werner, que, além da grande amizade, nunca mediram esforços para auxiliar-me nos experimentos.

A todos os colegas de curso, em especial a Adriano Nesi, Adriano Simões, Ângela, Fábio Vinícius, Gilberto, Gustavo Resque, Hugo, Laudiene, Marcelo, Márcio Rocha, Paulo Cesar, Roberto, Sidney, Vânia e Wagner, pelo companheirismo, ajuda e saudosas brincadeiras.

Aos professores Antônio T. Cordeiro, Paulo Roberto Mosquim, Raimundo Santos Barros, Rolf Puschmann e, em especial, ao Prof. Marcelo Ehlers Loureiro, pela amizade e ensinamentos compartilhados durante este curso.

Ao Prof. Antonio Alberto, pela amizade de sempre, pelo apoio, pelas sugestões e pelo constante incentivo.

Aos professores José Donizeti Alves e Marco Aurélio Pedron e Silva, pelas críticas e sugestões oportunas.

Ao amigo Cuca e ao Incaper, pela concessão das mudas de café para o experimento.

Ao amigo Gino, pela aquisição e transporte do solo para o experimento.

Ao chefe do CRDRN-Incaper, Fanton, pela compreensão e apoio para a finalização da tese.

Aos demais que colaboraram para o êxito deste trabalho, meu eterno agradecimento.

## **BIOGRAFIA**

CLÁUDIO PAGOTTO RONCHI, filho de Jair Ronchi e Florita Pagotto Ronchi, nasceu em Afonso Cláudio, ES, em 15 de fevereiro de 1976.

Em dezembro de 1993, concluiu o Curso de Técnico em Agropecuária, na Escola Agrotécnica Federal de Alegre, em Alegre, ES.

Em fevereiro de 1995, iniciou no Curso de Agronomia, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, graduando-se em janeiro de 2000.

Obteve o título de mestre em Fitotecnia, por meio do curso de Pós-Graduação da UFV, em 04 de abril de 2002.

Em seguida, ingressou no programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da UFV, concluindo o Doutorado em setembro de 2005. Neste mesmo ano, por meio de concurso público, ingressou no Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – Incaper, como Pesquisador em Fisiologia Vegetal.

## ÍNDICE

	Página
Resumo .....	vii
Abstract.....	x
I. Introdução geral.....	1
Literatura citada.....	4
II. Capítulo 1: Growth and photosynthetic down-regulation in <i>Coffea arabica</i> in response to restricting root volume.....	7
Abstract.....	8
1.1. Introduction.....	8
1.2. Material and methods.....	10
1.3. Results.....	14
1.4. Discussion.....	17
1.5. References.....	20
III. Capítulo 2: Efeitos de taxas de imposição e de severidade do déficit hídrico sobre a fotossíntese e o metabolismo de carboidratos em folhas de <i>Coffea canephora</i> .....	33
Resumo.....	33
Abstract.....	34
2.1. Introdução.....	35
2.2. Material e métodos.....	37
2.3. Resultados e discussão.....	39
2.4. Literatura citada.....	50
IV. Conclusões gerais.....	54

## RESUMO

RONCHI, Cláudio Pagotto, D.S., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2005.  
**Aclimação da maquinaria fotossintética do cafeeiro à alteração da força-dreno e à seca, em função da restrição do volume radicular.** Orientador: Fábio Murilo DaMatta.  
Conselheiros: Antonio Alberto da Silva e Marcelo Ehlers Loureiro.

Neste trabalho, foram feitos dois experimentos, conduzidos separadamente e analisados como tal, para investigar (i) os efeitos da restrição do volume radicular no crescimento e aclimação fotossintética em *Coffea arabica* e (ii) os efeitos de taxas de imposição e severidade do déficit hídrico sobre a fotossíntese e metabolismo de carboidratos em *C. canephora*. No primeiro, plantas de *C. arabica* cv Catuaí Vermelho IAC 44, cultivadas em vasos de diferentes volumes (3 L - pequeno, 10 L - médio e 24 L - grande), foram avaliadas em duas épocas, aos 115 e 165 dias após o transplântio (DAT), de modo a obterem-se diferentes graus de restrição radicular. Os efeitos da alteração na relação fonte:dreno foram estudados, procurando-se investigar os possíveis mecanismos, estomáticos e não-estomáticos, de aclimação fotossintética. O aumento da restrição radicular causou forte redução no crescimento da planta, associada ao aumento na razão raiz:parte aérea. Os tratamentos não afetaram o potencial hídrico foliar, tampouco os teores foliares de nutrientes, com exceção da concentração de N, que se reduziu fortemente com o incremento da restrição radicular, apesar da disponibilidade adequada no substrato. As taxas fotossintéticas foram severamente reduzidas pelo cultivo das plantas nos vasos de pequeno volume, devido, principalmente, a limitações não-estomáticas, *e.g.*, redução na atividade da Rubisco. Aos 165 DAT, os teores de



hexoses, sacarose e aminoácidos diminuíram, enquanto os de amido e hexoses-P aumentaram, com a redução do tamanho do vaso. As taxas fotossintéticas correlacionaram-se significativamente e negativamente com a razão hexose:aminoácidos, mas não com os níveis de hexoses *per se*. As atividades de invertase ácida, sintase da sacarose (SuSy), sintase da sacarose-fosfato (SPS), bisfosfatase da frutose-1,6-bisfosfato (FBPase), pirofosforilase da ADP-glicose (AGPase), fosforilase do amido (SPase), desidrogenase do gliceraldeído-3-P (G3PDH), fosfofrutocinase dependente de P<sub>i</sub> (P<sub>i</sub>-PFK) e desidrogenase do NADP:gliceraldeído-3-P (NADP-GAPDH), e as razões 3-PGA:P<sub>i</sub> e glicose-6-P:frutose-6-P decresceram, particularmente nas plantas sob restrição radicular severa. A aclimação da maquinaria fotossintética não esteve relacionada a limitações diretas pela redução da síntese de produtos finais da fotossíntese, mas sim a reduções na atividade da Rubisco. Aparentemente, a aclimação fotossintética foi reflexo do status deficiente de nitrogênio, em função do aumento da restrição radicular. No segundo experimento, plantas de *C. canephora* (clone 109A) também foram cultivadas em vasos de volumes contrastantes (6 L - pequeno e 24 L - grande), durante 11 meses. Em seguida, foram submetidas ao déficit hídrico, via suspensão da irrigação, aplicando-se, neste caso, duas taxas de imposição (rápida, nos vasos pequenos, e lenta, nos vasos grandes), e dois níveis de déficit hídrico: potencial hídrico na antemãhã ( $\Psi_{am}$ ) equivalente a -2,0 MPa (déficit moderado) e -4,0 MPa (déficit severo). Foram estudadas as respostas da maquinaria fotossintética e do metabolismo de carboidratos à seca, em função tanto da taxa de imposição como da severidade do déficit hídrico. Após suspender-se a irrigação, os níveis de déficit moderado e severo foram atingidos aos quatro e seis dias nas plantas dos vasos de 6 L, e aos 12 e 17 dias naquelas dos vasos de 24 L, respectivamente. Os tratamentos aplicados não afetaram as concentrações de clorofilas e carotenóides. Pequenas alterações nos parâmetros de fluorescência foram observadas, mas apenas nas plantas sob déficit severo, imposto lentamente. Sob déficit severo, os níveis de prolina aumentaram 31 e 212% nas plantas dos vasos pequenos e grandes, respectivamente, em relação às das plantas-controle. A seca ( $\Psi_{am} = -4,0$  MPa) aumentou o extravazamento de eletrólitos em 183%, independentemente do tamanho do vaso. A taxa fotossintética reduziu-se em 44 e 96%, a  $\Psi_w$  de -2,0 e -4,0 MPa, respectivamente, em relação às plantas-controle, sem, contudo, observarem-se alterações expressivas nesses parâmetros, em função das diferentes taxas de imposição do déficit hídrico. O déficit hídrico reduziu a condutância estomática e a transpiração, mas apenas quando foi severo. De modo geral, o metabolismo de carboidratos, em resposta à seca, foi afetado pela taxa de imposição do déficit hídrico. Não obstante, as atividades de enzimas-chave do metabolismo do carbono (AGPase, invertase ácida, SuSy, SPS, FBPase, G3PDH, SPase, P<sub>i</sub>-PFK) foram pouco ou nada afetadas pelas taxas de imposição e severidade do déficit.

## ABSTRACT

RONCHI, Cláudio Pagotto, D.S., Universidade Federal de Viçosa, September, 2005. **Acclimation of the photosynthetic apparatus of the coffee tree to alterations in sink-strenght and drought, as a function of restricting rooting volume.** Adviser: Fábio Murilo DaMatta. Committee Members: Antonio Alberto da Silva and Marcelo Ehlers Loureiro.

This work consisted of two separate experiments, and was so analysed to investigate (i) the effects of rooting volume restriction on the growth and photosynthetic acclimation in *Coffea arabica* and (ii) the effect of the rate of imposition and severity of water deficit on photosynthesis and carbohydrate metabolism in *C. canephora*. In the first experiment, plants of *C. arabica* cv Red Catuaí IAC 44 were grown in small (3 L), medium (10 L) and large (24 L) pots during 115 or 165 days after transplanting (DAT), which allowed different degrees of root restriction. The effects of increasing souce:sink ratio were evaluated in order to explore possible stomatal and non-stomatal mechanisms of photosynthetic down-regulation. Increasing root restriction brought about general and great reductions in plant growth associated with a rising root:shoot ratio. Treatments did not affect leaf water potential or leaf nutrient status, with the exception of N content, which drastically dropped with increasing root restriction even though an adequate supply was available. Coffee photosynthesis was severely reduced by growing plants in small pots, what was largely associated with non-stomatal factors, e.g., decreased Rubisco activity. At 165 DAT, contents of hexose, sucrose and amino acids decreased, whereas those of starch and hexose-P increased, with smaller pots. Photosynthetic rates were negatively and significantly correlated with hexose:free amino

acids ratio, but not with hexose content *per se*. Activities of acid invertase, sucrose synthase (SuSy), sucrose-P synthase (SPS), fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), starch phosphorylase (SPase), glyceraldehyde-3-P dehydrogenase (G3PDH), PPi: fructose-6-P 1-phosphotransferase (PPi-PFK) and NADP: glyceraldehyde-3-P dehydrogenase (NADP-GAPDH), and glycerate-3-P:Pi and glucose-6-P:fructose-6-P ratios all decreased with severe root restriction. Photosynthetic down-regulation was unlikely associated with a direct end-product limitation, but rather with decreases in Rubisco activity. Such a down-regulation was largely an expression of deficient N status triggered by growing coffee plants in small pots. In the second experiment, plants of *C. canephora* (clone 109A) were grown in pots of different volumes (6 L – small and 24 L – large) during 11 months, after which a drought treatment was applied. Two rates of water deficit imposition (fast in small pots, and slow in large ones), and two levels of water deficit [predawn leaf water potential,  $\Psi_{pd}$ , of -2,0 MPa (mild) and -4,0 MPa (severe)] were considered. Responses of photosynthetic apparatus and carbohydrate metabolism to drought, as affected by both water deficit progression and severity, were investigated. Mild and severe water deficit levels were achieved at 4 and 6 days, or at 12 and 17 days, after suspending irrigation, respectively in plants grown in small and large pots. Total chlorophyll and carotenoid contents were not affected by treatments. Small changes in chlorophyll *a* fluorescence parameters were observed, but only in plants submitted to severe, slowly-imposed water deficit. Under severe water deficit, proline content increased both in small-pot- (31%) and large-pot-grown-plants (212%), as compared with irrigated ones. Drought ( $\Psi_{pd} = -4,0$  MPa) led to increased electrolyte leakage (~183%), irrespective of pot size. Photosynthetic rates decreased by about 44 and 96%, at  $\Psi_{pd}$  of -2,0 and -4,0 MPa, respectively, in comparison with control plants. However, only minor changes were detected in those parameters in response to the rates of water deficit progression. Stomatal conductance and leaf transpiration were significantly affected by water deficit, but only when it was severe. In general, changes in carbohydrate metabolism depended on the rate of imposition of water deficit. However, the activities of key enzymes of carbon metabolism (AGPase, acid invertase, SuSy, SPS, FBPase, G3PDH, SPase, PPi-PFK) were little affected by both the progression and severity of water deficit.

## I. Introdução geral

A maioria dos experimentos em Fisiologia Vegetal, como em muitas outras áreas afins, requer controle das condições ambientes. Por essa razão, freqüentemente, os experimentos são realizados com plantas cultivadas em pequenos vasos, mantidas em câmaras de crescimento ou casa de vegetação. Apesar das vantagens, o cultivo em vasos de pequeno volume leva à formação de plantas com volume radicular reduzido, quando comparado àquele formado no campo ou mesmo em plantas cultivadas em vasos grandes (Townend e Dickinson, 1995), alterando-se, assim, a relação fonte:dreno.

A restrição do crescimento de raízes pode causar redução geral do crescimento da parte aérea (Carmi et al., 1983; Robbins e Pharr, 1988; Ismail e Noor, 1996; Iersel, 1997; Schaffer et al., 1997; Mataa e Tominaga, 1998). Apesar de muitos resultados serem divergentes, várias causas ou mecanismos são relacionados como possíveis bases fisiológicas que explicariam a redução do crescimento da parte aérea, geralmente verificada em condições de restrição do crescimento radicular: (i) menor eficiência de absorção de água e nutrientes, devido ao pequeno volume de raízes (Atwell, 1990; Ousible et al., 1992) e, também, a possíveis modificações anatômicas ou morfológicas do sistema radicular (Peterson et al., 1984); (ii) decréscimos ou mudanças no balanço entre substâncias de crescimento (Herold, 1980; Carmi e Heuer, 1981); (iii) reduções do potencial osmótico, devido à concentração de nutrientes na solução do solo (Peterson et al., 1984; Townend e Dickinson, 1995); e, principalmente, (iv) retroinibição da fotossíntese pela redução da força do dreno, com conseqüente aumento da relação fonte:dreno (Neales e Incoll, 1968; Arp, 1991; Thomas e Strain, 1991; Pezeshki e Santos, 1998).

De acordo com o mecanismo da retroinibição (Neales e Incoll, 1968; Barrett e Gifford, 1995), a restrição física ao crescimento do sistema radicular, imposta por vasos de

pequeno volume, reduz a força do dreno, acarretando acúmulo de carboidratos nas células mesofílicas da folha-fonte (aumentando a relação fonte:dreno) que, por seu turno, leva à redução e, ou, “aclimatação” das taxas de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A). Esse mecanismo parece explicar as reduções verificadas em A em plantas de *Taxodium distichum* (Pezeshki e Santos, 1998), *Nicotiana tabacum* (Herold e McNeil, 1979), *Gossypium hirsutum* (Sasek et al., 1985; Thomas e Strain, 1991), *Cucumis sativus* (Robbins e Pharr, 1988) e *Flaveria linearis* (Micallef et al., 1996). Contudo, há relatos de que A não se alterou em *Glycine max* (Krizek et al., 1985), chegando, inclusive, a aumentar em plantas de *Phaseolus vulgaris* (Carmi et al., 1983), com a redução do tamanho do vaso. Não obstante, a retroinibição da fotossíntese pode ser mais uma consequência que uma causa da redução do crescimento. De qualquer modo, a retroinibição pode afetar a aclimatação da maquinaria fotossintética a condições potencialmente fotoinibitórias. Isso deve resultar, concomitantemente, em alterações na atividade do sistema antioxidativo e de enzimas-chave no metabolismo de carboidratos.

Atualmente, vários mecanismos são mencionados na literatura para explicar a regulação (redução) da fotossíntese a partir do acúmulo de carboidratos na parte aérea, causada pela redução da força do dreno (Sheen, 1990; Stitt, 1991; Sheen, 1994; Pollock e Farrar, 1996; Paul e Driscoll, 1997; Stitt e Krapp, 1999; Paul e Foyer, 2001; Paul e Pellny, 2003). Contudo, na maioria das vezes, as respostas não são gerais, e o mecanismo preciso de retroinibição ainda é questão de debate.

Dentre cerca de 100 espécies do gênero *Coffea*, apenas duas têm importância no mercado mundial de café: *C. arabica* L. (café Arábica) e *C. canephora* Pierre (café Canéfora). O cafeeiro é tradicionalmente considerado como planta que apresenta valores de A muito baixos, geralmente inferiores a 4  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Contudo, esses valores, frequentemente obtidos em experimentos em vasos, podem estar associados à retroinibição da fotossíntese, decorrente do confinamento do sistema radicular em pequenos vasos de cultivo, e a limitações estomáticas da fotossíntese (DaMatta, 2003). Essa suposição parece sustentada pelos dados de Lima et al. (2002) e Pinheiro et al. (2004). Os primeiros verificaram, em clones de *C. canephora*, cultivados em vasos com 6 L de substrato, por 10 meses, valores de A iguais a 3  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Porém, quando os mesmos clones foram cultivados em vasos com 120 L de substrato, por igual período, verificaram-se valores de A iguais ou mesmo superiores a 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Pinheiro et al., 2004), indicando, portanto, que ocorreu aclimatação da maquinaria fotossintética do cafeeiro cultivado em vasos pequenos. Ademais, as taxas fotossintéticas comumente obtidas de plantas cultivadas em vasos são geralmente inferiores às verificadas em plantas no campo, sob condições normais de cultivo, para uma dada

condutância estomática (DaMatta, 2003). Portanto, a ausência de aclimatação em plantas cultivadas no campo ou em vasos de grande volume indica que a redução de *A* pode ser um artefato da restrição do crescimento radicular, causada pelo volume inadequado do vaso (Campbell et al., 1988; Arp, 1991; Ziska et al., 1991). Obviamente, as respostas fotossintéticas do cafeeiro devem depender não somente de interações entre a planta e o tamanho dos vasos, mas também do tempo de cultivo ou de permanência das plantas nesses recipientes.

Além de promover a aclimatação fotossintética pela alteração na relação fonte-dreno, o tamanho do vaso pode ter também importantes implicações na aclimatação da maquinaria fotossintética à seca, uma vez que afeta diretamente a quantidade de água disponível às plantas neles cultivadas. Resultados contrastantes de Lima et al. (2002) e Pinheiro et al. (2004), obtidos em clones de café Canéfora submetidos à seca, sugerem respostas diferenciais de aclimatação da maquinaria fotossintética ao tamanho do vaso de cultivo e, portanto, à taxa de imposição do déficit hídrico. Portanto, a necessidade de se considerar judiciosamente o tamanho do vaso em experimentos com déficit hídrico, em café, como em qualquer outra espécie, é premente, sob pena de as conclusões auferidas em estudos com vasos de pequeno tamanho revestirem-se de nenhuma importância prática. Ademais, um estudo recente (Praxedes et al., 2005), realizado com quatro clones de café Canéfora, evidenciou que o metabolismo de carboidratos exibe variações clonais em resposta ao déficit hídrico, imposto lentamente. Contudo, a importância da taxa de imposição do déficit sobre o metabolismo de carboidratos e, também, sobre a maquinaria fotossintética, em café, é desconhecida.

Neste trabalho, foram feitos dois experimentos, conduzidos separadamente e analisados como tal. No primeiro experimento, plantas de *C. arabica*, cultivadas em vasos de diferentes volumes, foram avaliadas em duas épocas após o transplântio, obtendo-se, desse modo, diferentes graus de restrição radicular. Os efeitos da alteração na relação fonte:dreno foram estudados, procurando-se investigar os possíveis mecanismos, estomáticos e não-estomáticos, de aclimatação fotossintética em café. No segundo experimento, plantas de *C. canephora* também foram cultivadas em vasos de volumes contrastantes, porém foram submetidas ao déficit hídrico pela suspensão da irrigação, obtendo-se, neste caso, duas taxas de imposição (rápida, nos vasos pequenos, e lenta, nos vasos grandes), e dois níveis de déficit hídrico (potencial hídrico na antemanhã equivalente a -2,0 e a -4,0 MPa). Foram então estudadas as respostas da maquinaria fotossintética e do metabolismo de carboidratos à seca, em função tanto da taxa de progressão quanto da severidade do déficit hídrico.

## Literatura citada

- Arp W.J. (1991) Effects of source-sink relations on photosynthesis acclimation to elevated CO<sub>2</sub>. *Plant, Cell and Environment* 14, 869-875.
- Atwell B.J. (1990) The effect of soil compaction on wheat during early tillering. Growth, development, and root structure. *New Phytologist* 115, 29-35.
- Barrett D.J., Gifford R.M. (1995) Acclimation of photosynthesis and growth by cotton to elevated CO<sub>2</sub>: interactions with severe phosphate deficiency and restricted rooting volume. *Australian Journal of Plant Physiology* 22, 955-963.
- Campbell W.J., Allen L.H., Bowes G. (1988) Effects of CO<sub>2</sub> concentration on rubisco activity, amount, and photosynthesis in soybean leaves. *Plant Physiology* 88, 1310-1316.
- Carmi A., Hesketh J.D., Enos W.T., Peters D.B. (1983) Interrelationships between shoot growth and photosynthesis, as affected by root growth restriction. *Photosynthetica* 17, 240-245.
- Carmi A., Heuer B. (1981) The role of roots in control of bean shoot growth. *Annals of Botany* 48, 519-527.
- DaMatta F.M. (2003) Drought as a multidimensional stress affecting photosynthesis in tropical tree crops. In: Hemantaranjan E. (Ed.) *Advances in Plant Physiology* 5, pp. 227-265. Jodhpur: Scientific Publishers.
- Herold A. (1980) Regulation of photosynthesis by sink activity – the missing link. *New Phytologist* 86, 131-144.
- Herold A., McNeil P.H. (1979) Restoration of photosynthesis in pot-bound tobacco plants. *Journal of Experimental Botany* 30, 1187-1194.
- Iersel M.V. (1997) Root restriction effects on growth and development of *Salvia (Salvia splendens)*. *HortScience* 32, 1186-1190.
- Ismail M.R., Noor K.M. (1996) Growth, water relations and physiological processes of starfruit (*Averhoa carambola* L.) plants under root growth restriction. *Scientia Horticulture* 66, 51-58.
- Krizek D.T., Carmi A., Mirecki R.M., Snyder F.W., Bunge J.A. (1985) Comparative effects of soil moisture stress and restricted root zone volume on morphogenetic and physiological responses of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Journal of Experimental Botany* 36, 25-38.

- Lima A.L.S., DaMatta F.M., Pinheiro H.A., Totola M.R., Loureiro M.E. (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany* 47, 239-247.
- Mataa M., Tominaga S. (1998) Effects of root restriction on tree development in Pondan Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). *Journal of American Society of Horticultural Science* 123, 651-655.
- Micallef B.J., Vanderveer P.J., Sharkey T.D. (1996) Responses to elevated CO<sub>2</sub> of *Flaveria linearis* plants having a reduced activity of cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant, Cell and Environment* 19, 10-16.
- Neales T.F., Incoll L.D. (1968) The control of leaf photosynthesis rate by the level of assimilate concentration in the leaf: a review of the hypothesis. *Botanical Review* 34, 107-125.
- Ousible M., Crookston R.K., Larson W.E. (1992) Subsurface compaction reduces the root and shoot growth and grain yield of wheat. *Agronomy Journal* 84, 519-527.
- Paul M.J., Driscoll S.P. (1997) Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signaling nitrogen deficiency through source sink-imbalance. *Plant, Cell and Environment* 20, 110-116.
- Paul M.J., Foyer C.H. (2001) Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52, 1383-1400.
- Paul M.J., Pellny T.K. (2003) Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany* 54, 539-547.
- Peterson C.M., Klepper B., Punphrey F.V., Rickman R.W. (1984) Restricted rooting decreases tillering and growth of winter wheat. *Agronomy Journal* 76, 861-863.
- Pezeshki S.R., Santos M.I. (1998) Relationships among rhizosphere oxygen deficiency, root restriction, photosynthesis, and growth in baldcypress (*Taxodium distichum* L.) seedlings. *Photosynthetica* 35, 381-390.
- Pinheiro H.A., DaMatta F.M., Chaves A.R.M., Fontes E.P.B., Loureiro M.E. (2004) Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Science* 167, 1307-1314.
- Pollock C.J., Farrar J.F. (1996) Source-sink relations: the role of sucrose. In: *Photosynthesis and the environment*. In: Baker N.R. (Ed.) *Advances in Photosynthesis*, pp. 261-279. Dordrecht: Kluwer Academic Press.



- Praxedes S.C., DaMatta F.M., Loureiro M.E., Ferrão M.A.G., Cordeiro A.T. (2005) Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. *Environmental and Experimental Botany*, no prelo.
- Robbins N.S., Pharr D.M. (1988) Effect of restricted root growth on carbohydrate metabolism and whole plant growth of *Cucumis sativus* L. *Plant Physiology* 87, 409-413.
- Sasek T.W., DeLucia E.H., Strain B.R. (1985) Reversibility of photosynthesis inhibition in cotton after long-term exposure to elevated CO<sub>2</sub> concentrations. *Plant Physiology* 78, 619-622.
- Schaffer B., Whiley A.W., Searle C., Nilssen R.J. (1997) Leaf gas exchange, dry matter partitioning, and mineral element concentrations on mango as influenced by elevated atmospheric carbon dioxide and root restriction. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122, 849-855.
- Sheen J. (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. *The Plant Cell* 2, 1027-1038.
- Sheen J. (1994) Feedback control of gene expression. *Photosynthesis Research* 39, 427-438.
- Stitt M. (1991) Rising CO<sub>2</sub> levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* 14, 741-762.
- Stitt M., Krapp A. (1999) The interactions between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant, Cell and Environment* 22, 583-621.
- Thomas R.B., Strain B.R. (1991) Root restriction as a factor in photosynthetic acclimation of cotton seedlings grown in elevated carbon dioxide. *Plant Physiology* 96, 627-634.
- Townend J., Dickinson A.L. (1995) A comparison of rooting environments in containers of different sizes. *Plant and Soil* 175, 139-146.
- Ziska L.H., Hogan K.P., Smith A.P., Drake B.G. (1991) Growth and photosynthetic response of nine tropical species with long-term exposure to elevated carbon dioxide. *Oecologia* 86, 383-389.

## II. Capítulo 1

### **Growth and photosynthetic down-regulation in *Coffea arabica* in response to restricting root volume<sup>1</sup>**

Cláudio P. Ronchi<sup>2</sup>, Fábio M. DaMatta<sup>2</sup>, Karine D. Batista<sup>2</sup>, Gustavo A.B. K. Moraes<sup>2</sup>, Marcelo E. Loureiro<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Manuscript submitted to Journal of Experimental Botany*

<sup>2</sup> *Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil*

#### **Corresponding author:**

Fábio M. DaMatta

Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, MG, Brazil

Phone: (+55) 31-3899-1291; Fax: (+55) 31-3899-2580

E-mail: fdamatta@ufv.br

## Abstract

Coffee (*Coffea arabica*) plants were grown in small (3 L), medium (10 L) and large (24 L) pots during 115 or 165 days after transplanting (DAT), which allowed different degrees of root restriction. Effects of altered source:sink ratio were evaluated in order to explore possible stomatal and non-stomatal mechanisms of photosynthetic down-regulation. Increasing root restriction brought about general and large reductions in plant growth associated with a rising root:shoot ratio. Treatments did not affect leaf water potential or leaf nutrient status, with the exception of N content, which dropped drastically with increasing root restriction even though an adequate N supply was available. Coffee photosynthesis was severely reduced by growing plants in small pots, what was largely associated with non-stomatal factors, *e.g.*, decreased Rubisco activity. At 165 DAT, contents of hexose, sucrose and amino acids decreased, whereas those of starch and hexose-P increased, with smaller pots. Photosynthetic rates were negatively and significantly correlated with hexose:free amino acids ratio, but not with hexose content *per se*. Activities of acid invertase, sucrose synthase, sucrose-P synthase, fructose-1,6-bisphosphatase, ADP-glucose pyrophosphorylase, starch phosphorylase, glyceraldehyde-3-P dehydrogenase, PPI: fructose-6-P 1-phosphotransferase and NADP: glyceraldehyde-3-P dehydrogenase all decreased with severe root restriction. Glycerate-3-P:Pi and glucose-6-P:fructose-6-P ratios decreased accordingly. Photosynthetic down-regulation was unlikely associated with a direct end-product limitation, but rather with decreases in Rubisco. Such a down-regulation was largely an expression of deficient N status triggered by growing coffee plants in small pots.

Key words: coffee, nitrogen deficiency, photosynthesis, pot size, Rubisco, sink regulation

## 2.1. Introduction

Many studies on crop physiology have been done on plants grown in small containers that limit root growth (DaMatta, 2003). Since root growth is a major metabolic sink for photosynthetically fixed carbon, such a limitation lowers sink strength, leading to carbohydrate accumulation in leaves in addition to affecting the source:sink ratio (Barrett and Gifford, 1995). The imbalance in this ratio can lead to a general reduction of shoot growth (Carmi *et al.*, 1983; Iersel, 1997; Robbins and Pharr, 1988), and also may have a pronounced, but not well understood, negative effect on the rate of net carbon assimilation (*A*) (Paul and Foyer, 2001; Paul and Pellny, 2003). Several works have shown a feedback inhibition of *A*

through carbohydrate accumulation, imposed by restricted rooting volume due to small pot size (*e.g.*, Robbins and Pharr, 1988; Thomas and Strain, 1991; Whiley *et al.*, 1999). In a few studies, however, *A* was apparently unresponsive to (*e.g.*, Barrett and Gifford, 1995; Krizek *et al.*, 1985), or might ultimately increase with (Carmi *et al.*, 1983), decreasing pot size.

Currently, the potential mechanisms underling *A* reduction following carbohydrate accumulation are numerous, somewhat unclear and controversial (Paul and Foyer, 2001; Paul and Pellny, 2003; Stitt, 1991). According to Stitt (1991), such an accumulation may inhibit *A* directly or indirectly. A direct inhibition can minimise or even prevent carbohydrate accumulating further, but does not do anything to rectify basic imbalance of investment in the sinks and sources, so it is a short-term non-adaptive response (*e.g.* physical disruption of chloroplast due to large starch grains; low rates at which Pi is recycled back to photosynthetic reactions). Although there are several consistent arguments weaken the hypothesis for the acclimation of photosynthesis through the direct end-product limitation (Arp, 1991; Stitt, 1991; Stitt and Krapp, 1999), this short-term response takes place by alteration either in the contents of several metabolites (including RuBP, 3-PGA, ATP, ADP) and on the regulation and activity of key enzymes (*e.g.*, sucrose-phosphate synthase – SPS, fructose-1,6-bisphosphatase – FBPase, ADP-glucose pyrophosphorylase – AGPase) of C metabolism (Paul and Foyer, 2001; Stitt, 1991). Briefly, low rates of end-product synthesis is thought to lead to a reduction in both SPS and FBPase activities, acute depletion of Pi, reduction of ATP/ADP ratios, an increase in 3-PGA and partial deactivation of Rubisco (Stitt, 1991; Stitt and Krapp, 1999).

Indirect inhibition of *A*, as described as an adaptive response, does decrease the levels of proteins and other components of the photosynthetic apparatus, contributing to a readjustment of the source-sink balance (Stitt, 1991). Under conditions of restricted rooting volume and high CO<sub>2</sub> concentrations, decreases in *A* were strongly matched by a decline in Rubisco activity suggesting that Rubisco is very sensitive to changes in source-sink balance (Thomas and Strain, 1991). In fact, when photosynthesis is Rubisco-limited, low 3-PGA levels, high ATP/ADP ratio, saturating RuBP levels and a high activation state of Rubisco is commonly observed (Stitt, 1991). Other studies suggest that acclimation of photosynthesis may be ascribed to sugar-mediated repression of transcripts encoding photosynthesis-involved proteins, particularly that one encoding *rbcS* (Koch, 1996; Stitt, 1991). However, most knowledge of sugar-sensing model was gained under conditions of high CO<sub>2</sub> concentration and probably under a strongly N limitation, so depression of Rubisco activity and protein may have been triggered by N limitation instead of sugar signalling *per se* (Stitt and Krapp, 1999). According to Paul and Pellny (2003), C supply is an important controlling force for

photosynthetic gene expression, but N status is the overriding determinant of repression of photosynthesis by C.

Most pot experiments have shown that tropical tree crops, such as coffee, which evolved in the forest understorey, exhibit very low  $A$ , usually below  $4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (DaMatta, 2003). It is conceivable that such low rates might be associated with a feedback inhibition of photosynthesis in containerised plants in addition to stomatal limitations to photosynthesis (DaMatta, 2003). By growing clones of *C. canephora* for ten months in 6 L-pots, Lima *et al.* (2002) obtained maximal  $A$  values of  $3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , whereas Pinheiro *et al.* (2004) found  $A$  values around  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , when the same clones were also grown for ten months in 120 L-pots. Additionally, the photosynthetic response to pot size would also vary depending on how long plants remain containerized. This is particularly important for tree species since in most experiments they are often grown in small pots for extended periods. Currently, a lot of information about source-sink interaction and hence photosynthetic acclimation to reduced sink strength is available, particularly for herbaceous species grown under elevated  $\text{CO}_2$ . By contrast, much less is known about how  $A$  is down-regulated in tropical tree species such as coffee. In this study, coffee plants were grown for different periods in pots of different sizes in an attempt to explore the effects of reduced sink strength on their growth and photosynthetic down-regulation. We hypothesized that photosynthetic acclimation in potted coffee plants would be an artifact of the inadequate rooting volume, imposed by growing plants for a long period in relatively small pots.

## 2.2. Material and methods

### Experimental design

Uniform seedlings of *Coffea arabica* L. cv Red Catuaí IAC 44 were transplanted to small pots (SP), medium pots (MP), and large pots (LP), which contained 3, 10, and 24 L, respectively, of a mixture of soil, sand and manure (3:1:1, v/v/v). The plants were grown in a screen house with walls of course mesh screen, which allowed free air exchange with the external environment. The experiment was a completely randomized design, with six treatment-combinations, forming a 3 x 2 factorial (three pot sizes and two sampling periods) with six plants in individual pots per treatment-combination as replication. The experimental plot was one plant per pot. The plants were regularly watered and received a maximal photosynthetic photon flux (PPF) of  $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Supplemental N fertilisation was top-

dressed with 3.0 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> per pot at 45 day intervals, starting at the 15<sup>th</sup> day after transplanting (DAT).

Root restriction treatments were imposed by growing plants in pots of different sizes during 115 or 165 DAT. In the first case, only SP plants showed some apparent degree of restriction (Fig. 1); in the second case, root restriction was exacerbated in SP plants and began to occur in MP plants, but not in LP plants. These allowed, therefore, a high, moderate and no degree of apparent root restriction to the plants grown in SP, MP and LP, respectively (Fig. 1). Restricted growth was characterised by twisted roots, particularly at the pot bottom. All sampling and measurements were performed at about 115 and 165 DAT (with the exception of enzyme activities and phosphorylated intermediate determinations, which were assessed only at 165 DAT), using completely expanded leaves from the third or fourth pair from the apex of plagiotropic branches. For biochemical analyses, leaf discs, collected at about midday, were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until required.

### **Vegetative growth and nutrient analysis**

Plant height, stem diameter (5 cm above ground), number of both leaves and plagiotropic branches, total leaf area per plant and shoot and root dry matter were assessed. Dry mass of stems, leaves, petiole and roots were obtained after oven-drying for 72 h at 70 °C. Specific leaf area was estimated for the whole plant. Leaf samples were submitted to nitroperchloric digestion after which concentrations of P, S, K, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe, and Mn were determined through routine methods. Total-N was calculated as in DaMatta *et al.* (1999).

### **Photosynthetic measurements**

Net carbon assimilation rate ( $A$ ), stomatal conductance to water vapour ( $g_s$ ), and internal to ambient CO<sub>2</sub> concentration ratio ( $C_i/C_a$ ) were measured under artificial, saturating PPF (850–900 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) at an ambient CO<sub>2</sub> concentration, using an LCA-4 portable, open-system infrared gas analyser (Analytical Development Company, Hoddesdon, UK). Chlorophyll *a* fluorescence parameters were measured using a portable pulse amplitude modulation fluorometer (FMS2, Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK). Maximum photochemical efficiency of PSII ( $F_v/F_m$ ), capture efficiency of excitation energy by open PSII reaction centres ( $F_v'/F_m'$ ), photochemical quenching ( $q_P$ ), and quantum yield of PSII electron transport ( $\phi_{PSII}$ ) were estimated as described by Lima *et al.* (2002). Photosynthetic parameters were estimated on a single, attached leaf per plant. Measurements were made between 7:00 and 8:30 h, on three-four consecutive days, so that measurements on each plant

were computed as average values for gas-exchange parameters. During measurements, air temperature inside the screen house varied from 21.4 to 26.3 °C, air relative humidity was about 82%, leaf-to-air vapour pressure deficit was at most 1.1 kPa, and leaf temperature ranged from 22.7 to 30.7 °C.

### **Carbon isotope composition ratio and water status**

Leaf tissue was collected between 11:00 and 13:00 h, and analysed for their stable carbon isotope ratio ( $\delta^{13}\text{C}$ ), as described in DaMatta *et al.* (2002).

Measurements of water potential ( $\Psi_w$ ) were made using a Scholander-type pressure chamber at both 07:00 h and 13:00 h.

### **Carbohydrate extraction and analysis**

Frozen samples (100 mg FW) were homogenised with 800  $\mu\text{L}$  80% (v/v) ethanol, and then incubated at 70 °C for 90 min, following centrifugation at 15000  $g$  for 10 min. The pellet was extracted further once. Supernatants were combined, and stored at -20 °C for soluble sugars and amino acid determinations. Hexoses [glucose (Glc) + fructose (Fru)] and sucrose were assessed as described in Praxedes *et al.* (2005). The ethanol-insoluble pellet was washed with 80% (v/v) aqueous ethanol, re-suspended in 200  $\text{mol m}^{-3}$  KOH, incubated at 95 °C for 2 h, neutralised with 1  $\text{kmol m}^{-3}$  acetic acid and centrifuged at 15000  $g$  for 10 min (Trethewey *et al.*, 1998). Subsequently, the supernatant was incubated with 300  $\text{mol m}^{-3}$  Na-citrate buffer pH 4.6 at 60 °C for 1 h in a reaction mixture containing 3 units  $\text{mL}^{-1}$   $\alpha$ -amylase and 1 unit  $\text{mL}^{-1}$  amyloglucosidase, and the released Glc was measured as already mentioned .

### **Amino acids, protein and pigment determinations**

Free amino acids were quantified as described in DaMatta *et al.* (1999). Leaf soluble protein content was determined in desalted extracts, according to Bradford (1976). Chlorophylls and total carotenoids were extracted by grinding leaves in 80% (v/v) acetone/water, and then determined according to Lichtenthaler (1987).

### **Enzyme extraction and assays**

Enzymes were extracted from frozen material (250 mg FW) essentially as described in Praxedes *et al.* (2005). SPS (EC 2.4.1.14) (under saturating –  $V_{\text{max}}$ , and limiting –  $V_{\text{sel}}$ , substrate conditions), AGPase (EC 2.2.7.27), FBPase (EC 3.1.3.11), acid invertase (EC 3.2.1.26) and sucrose synthase (SuSy; EC 2.4.1.13) were assayed as described by Praxedes *et al.* (2005). Glyceraldehyde-3-P dehydrogenase (GAPDH; EC 1.2.1.12) was assayed in the

direction of 3-phosphoglyceric acid (3-PGA) production (Burrell *et al.*, 1994). ATP-dependent 6-phosphofructokinase (ATP-PFK; EC 2.7.1.11) and PPI: Fru-6-P 1-phosphotransferase (PPI-PFK; EC 2.7.1.90) were assayed spectrophotometrically by following the production of Fru-1,6-BP from Fru-6-P (Burrell *et al.*, 1994). Initial and total activities of Ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) carboxylase/oxygenase (Rubisco; EC 4.1.1.39) were measured using the spectrophotometric, NADH, enzyme-coupled assay as described in Sharkey *et al.* (1991), using freshly desalted extract. Activation state of Rubisco was calculated as the ratio of initial to total activity (per cent). NADP:glyceraldehyde-3-P dehydrogenase (NADP-GAPDH; EC 1.2.1.13) was assayed in the direction of glyceraldehyde-3-P production as in Häusler *et al.* (2001), with the exception that 3-PGA was omitted in the reaction mixture. Starch phosphorylase (SPase; EC 2.4.1.1) was measured in the phosphorolytic direction in a 250  $\mu\text{L}$  reaction mixture consisting of 75  $\text{mol m}^{-3}$  Mes-NaOH pH 6.0, 0.025% (w/v) soluble starch, 5  $\text{mol m}^{-3}$  NaF, 75  $\text{mol m}^{-3}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 80  $\mu\text{L}$  of extract as modified from Harada and Ishizawa (2003). After incubation at 37 °C for 90 min, the reaction was stopped by boiling for 2 min, centrifuged at 15000  $g$  for 5 min, and the amount of Glc-1-P formed was determined in a 300  $\mu\text{L}$  reaction mixture containing 50  $\text{mol m}^{-3}$  HEPES-KOH (pH 7.4), 5  $\text{mol m}^{-3}$   $\text{MgCl}_2$ , 500  $\text{mmol m}^{-3}$   $\text{NAD}^+$ , 1.5  $\text{mol m}^{-3}$  EDTA, 25  $\text{mmol m}^{-3}$  Glc-1,6-BP, 2 units  $\text{mL}^{-1}$  phosphoglucomutase and 145  $\mu\text{L}$  of the sample. The reaction was initiated by adding Glc-6-P dehydrogenase to a final concentration of 1.4 unit  $\text{mL}^{-1}$ ; the amount of NADH formed was monitored at 340 nm using an ELISA reader.

### **Phosphorylated intermediate determination**

Frozen leaf samples were extracted in trichloroacetic acid/diethyl ether as described by Trethewey *et al.* (1998). Glucose-6-P, Fru-6-P and 3-PGA were determined spectrophotometrically using an enzymic cycling system (Gibon *et al.*, 2002). Inorganic phosphate (Pi) was quantified according to Pennley (1976). Recoveries of metabolites added to leaf material in physiological concentrations during extraction were in excess of 85%.

### **Statistical analyses**

Data were subjected to ANOVA using a split-plot design, in which the pot sizes were considered as the main plot and the periods of growth (115 and 165 DAT) as split-plots. Statistical significance of mean differences were analysed by Newman-Keuls' test, at  $P < 0.05$ . Correlations (*Pearson* parametric method) among different variables were tested using *t*-test. Unless otherwise indicated, correlations were significant at  $P < 0.001$ . All the statistical analyses were performed using the SAEG System version 8.0 (SAEG, 1999).



## 2.3. Results

### Plant growth, water and nutrient status

Reducing pot volume strongly affected growth of coffee plants (Table 1). At 115 DAT, total shoot dry matter of SP plants was smaller (48%) than that of MP or LP plants; at 165 DAT, it was smaller in SP (66%) and MP (23%) plants than in LP ones. Similar trends were also observed for total leaf area, stem diameter, plant height, number of leaves and plagiotropic branches, and dry matter of stems, petioles and leaves (data not shown). Because shoot growth was affected more than root growth, an increased root:shoot dry matter ratio with decreasing pot size was found. Similar effects were observed for leaf area:root dry mass ratio, which declined with decreasing pot size. Specific leaf area was greater in SP plants than in MP and LP ones. This may be to a certain extent associated with a reduction in the mesophyll thickness, particularly in spongy parenchyma (data not shown). In addition, as compared with LP plants, stomatal density and stomatal index increased by 35 and 14%, and by 21 and 5%, respectively, for SP and MP plants (data not shown).

Foliar concentrations of essential macro- and micro-nutrients (P, S, K, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe, and Mn) did not vary appreciably for plants grown in different pot volumes (data not shown), and were within the optimum range for coffee. However, total-N concentration drastically dropped with decreasing pot volume. This was particularly evident at 165 DAT when N concentration was lower in both SP (40%) and MP (23%) plants than in LP ones (Table 1).

Leaf  $\Psi_w$ , as measured at either 07:00 h (Table 2) or 13:00 h (data not shown) was unaffected by pot size treatments, indicating that water status was largely unrelated to changes in both growth and photosynthetic performance as associated with rooting restriction. It should be highlighted that weather was warmer during the first sampling period than during the second one (average maximum daily temperature of 34.5°C and 30.7°C, respectively). At 115 DAT, leaf temperature of SP plants was higher by 4°C at 13:00 h, as compared with MP or LP plants, and thus the maintenance of  $\Psi_w$  in those plants was likely associated with stomatal closure to avoid excessive transpiration. Therefore, tissue hydration was maintained at expense of latent heat loss, so increasing leaf temperature. Differences in leaf temperature among treatments were not found at 165 DAT (data not shown).

### Leaf gas exchange and pigments

Considering the LP plants as a reference, there were significant decreases in  $A$  (58%) and  $g_s$  (48%), but only in SP plants at 165 DAT (Table 2). Leaf gas exchange was also

measured at noon but the results were similar regardless of the treatments (data not shown). In SP plants, because  $g_s$  varied proportionally more than  $A$ , as compared with MP or LP plants (Fig. 2), a lower coupling between  $A$  vs  $g_s$  with decreasing pot size is to be expected. For example, for a doubling in  $g_s$  (from 80 to 160 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>),  $A$  would increase only by 25% in SP plants as compared with an average 48% rise in  $A$  in either MP or LP plants, regardless of the sampling dates (Fig. 2). Moreover,  $C_i:C_a$  ratio did not decrease but rather increased in SP plants. Also, carbon isotope ratio ( $\delta^{13}C$ ) significantly decreased with increasing root restriction, as found at 165 DAT (Table 2);  $\delta^{13}C$  was strongly associated with both initial and total *in vitro* Rubisco activity ( $r^2 = 0.90$ ,  $n = 15$ ), but only modestly with  $g_s$  ( $r^2 = 0.65$ ,  $n = 15$ ,  $P < 0.01$ ) (data not shown). Collectively, these results provide compelling evidence that stomatal limitations did not play a decisive role on the impaired photosynthetic performance with smaller pot volumes.

Compared with LP plants, total chlorophyll content decreased at 115 DAT by 26% in SP plants; at 165 DAT, it declined by 59% in these plants and by 20% in MP ones (Table 1). Similar trends were found for total carotenoids (Table 1). There was a significant correlation between  $A$  with total-N concentration ( $r^2 = 0.65$ ; data not shown) regardless of whether data from both sampling periods were pooled together or not.

### **Photochemical parameters**

Chlorophyll fluorescence was assessed in order to test whether photosynthetic acclimation was a result of reduced irradiance capture at PSII level. Results suggest that photosynthetic acclimation was not associated with decreased maximum PSII photochemical efficiency ( $F_v/F_m$ ), which was above 0.80 regardless of the treatments (Table 3). Changes in PSII photochemistry in light-adapted leaves of SP plants were evident through significant decreases (about 35%) in  $\phi_{PSII}$  irrespective of sampling period, as compared with LP plants. Such reductions were matched by significant decreases in  $F_v'/F_m'$  and  $q_P$ , respectively, 14% and 22% at 115 DAT, and 10 and 29% at 165 DAT. There was no significant difference in chlorophyll fluorescence parameters between MP and LP plants in either sampling date (Table 3).

### **Carbohydrate and amino acid concentrations**

Hexose content was significantly lowered by 17% both in SP and MP plants at 115 DAT, and by 28% in SP plants at 165 DAT, as compared with LP plants (Fig. 3a). Sucrose content did not vary among pot size treatments at 115 DAT, but at 165 DAT it was lower in SP (68%) and MP (25%) plants than in LP ones (Fig. 3b). Starch content enhanced as pot size

increased at 115 DAT, whereas at 165 DAT it was larger in SP and MP plants than in LP ones (Fig. 3c). As a consequence, starch:sucrose ratio declined at 115 DAT, but strongly increased at 165 DAT, with decreasing pot size (Fig. 3d). With regard to LP plants, amino acid content was lowered at 115 DAT by 31%, but only in SP plants; at 165 DAT, it decreased both in SP (77%) and MP (49%) plants (Fig. 3e). Similar results were obtained for protein content (Table 1). At 115 DAT, hexose:amino acid ratio tended to be larger in SP over LP plants, while at 165 DAT this ratio decreased significantly as root restriction decreased (Fig. 3f). Interestingly, no significant correlation of *A* with hexose content was observed ( $r^2 = 0.28$ ;  $P > 0.05$ ,  $n=36$ ), but *A* correlated negatively with hexose:amino acid ratio ( $r^2 = -0.73$ ;  $n=36$ ; data not shown).

### Enzyme activity and phosphorylated intermediates

Although there was no effect of pot size on SPS activation state (60% on average; not shown), decreasing pot size resulted in an average reduction of SPS activity in SP (52%) and MP (27%) plants, for both  $V_{\max}$  and  $V_{\text{sel}}$  assays (Fig. 4a). SPS correlated positively with *A* ( $r^2 = 0.87$ ), amino acids ( $r^2 = 0.80$ ), protein ( $r^2 = 0.82$ ) and sucrose ( $r^2 = 0.77$ ) content, and negatively with starch:sucrose ratio ( $r^2 = -0.74$ ), hexose:free amino acid ratio ( $r^2 = -0.74$ ), and sucrose:amino acid ratio ( $r^2 = -0.63$ ) ( $n=18$ , data not shown).

As compared with LP plants, FB Pase activity was reduced (28%) significantly, but only in SP plants (Fig. 4b), whereas AG Pase activity was dramatically reduced with decreasing pot size (Fig. 4c), despite starch content comparatively being high in SP plants and low in LP ones (Fig. 3c). In any case, SPase activity was lower (54%) in SP plants than in LP ones (Fig. 4d).

Decreases in the activities of acid invertase (53%; Fig. 4e), SuSy (17%; Fig. 4f), ATP-PFK (20%; Fig. 4g), PPI-PFK (30%; Fig. 4h), and GAPDH (37%; Fig. 4i) were found in SP plants when compared with LP plants. Decreases in both initial and total *in vitro* activities of Rubisco were also observed in SP (~69%) and MP (~21%) plants relative to LP ones (Fig. 4j), but its activation state was unaffected by rooting restriction (Fig. 4k). There was a positive correlation between *A* and both the initial ( $r^2 = 0.88$ ;  $n=17$ ) and total ( $r^2 = 0.90$ ;  $n=17$ ) *in vitro* Rubisco activity (data not shown), and between Rubisco activity and both total-N ( $r^2 = 0.77$ ;  $n=18$ ) and protein ( $r^2 = 0.84$ ;  $n=18$ ) content (data not shown). The activity of the other Calvin cycle enzyme, NADP-GAPDH, was also significantly reduced in SP (36%) and MP (18%) plants relative to that of LP ones (Fig. 4l).

Restriction to root growth also led to marked changes in leaf phosphorylated intermediates. Hexoses-P dramatically enhanced with increasing root restriction. Glc-6-P and

Fru-6-P increased by 363 and 1150% in SP plants, and by 25 and 391% in MP ones, respectively, as compared to LP plants (Fig. 5a-b). By contrast, 3-PGA levels were 60% lower in SP plants than either in MP or LP ones (Fig. 5c). Relative to LP plants, significant increases of 72% in Pi concentrations were observed, but only in SP ones (Fig. 5d). As a result, Pi:3-PGA ratio ratio increased in SP and MP plants, as could be depicted from Fig. 5.

## 2.4. Discussion

Increasing root restriction brought about general and great reductions in plant growth associated with a rising root:shoot ratio. These results support the hypothesis that plants maintain a functional balance between materials essential for growth by allocating resources to the organs nearest to the source of the most limiting factor (Arp, 1991). In this study, N, rather than water or any other nutrient, was much likely that factor. Particularly at 165 DAT, leaf N concentration was near or below 23 g kg<sup>-1</sup> DM in SP and MP plants, a mean value at which visual symptoms of N deficiency start appearing in coffee (Moraes, 1981). In fact, SP plants, and to a lesser extent the MP ones, showed several symptoms typical of N limitation, which can include changes in allometric characteristics, remarkable reductions in pigment, aminoacid and protein contents, decreased Rubisco activity, as well as, starch accumulation. It should be stressed that substrate of the small pots contained about 5.5 g N and, regardless of that, it has been applied 2.5 g N per each plant throughout the experiment. Thus, the overall amount of N in the small pots was considerably larger than one that is expected to be taken up in the six first months after planting by a coffee seedling grown without physical limitation to root development (about 1.0 g N; Instituto Brasileiro do Café, 1985). Therefore, it was assumed that containerised rooting volume probably was unable to take up adequate amounts of N required for optimum growth even though an appropriate N supply was available. This could be a result of root morphological or anatomical alterations (*e.g.*, increased thickness and reduced number of root hairs) (Atwell, 1990; Ousible *et al.*, 1992; Peterson *et al.*, 1984), or due to low energy supply by shoot to N absorption and assimilation in the roots. As a consequence, much of the growth and photosynthesis responses related to decreasing pot size were, indeed, a reflection of N deficiency.

Results from this study showed that source:sink imbalance imposed by root restriction severely reduced coffee photosynthesis. Photosynthetic inhibition may be caused by stomatal and/or non-stomatal limitations. Stomatal limitation is considered to decrease  $A$  as a consequence of depletion of  $C_i$  due to stomatal closure (Lawlor, 2002). The present results

argue against stomatal limitations and indicate that non-stomatal constraints were largely responsible for the decreases in  $A$  with increasing root restriction. Non-stomatal constraints on  $A$  consider that chloroplast assimilation of  $\text{CO}_2$  may be limited by PSII activity or Rubisco activity (Farquhar *et al.*, 1980). Despite the strong decreases in chlorophyll content,  $F_v'/F_m'$  declined only marginally with smaller pots, thus a relatively high efficiency with which excitation energy was delivered to open PSII reaction centres was to be expected. In addition, a decrease on the excitation pressure on PSII (analysed as  $q_p$ ) was also found, implying that a fraction of the PSII traps was closed during actinic irradiance, thus leading to a decrease in  $\Phi_{\text{PSII}}$ . However, reductions in  $\Phi_{\text{PSII}}$  paralleling an unchanged  $F_v/F_m$  were likely associated with a down-regulation of PSII during steady-state photosynthesis. Such a reduction should represent a photoprotective mechanism by adjusting the rate of photochemistry to match that of ATP and NADPH consumption. Therefore, the changes in  $\Phi_{\text{PSII}}$ , and thus in apparent electron transport rate, should have been a consequence, rather than a cause, of the partial loss of the photosynthetic capacity (Cruz *et al.*, 2003).

Non-stomatal limitation to photosynthesis was likely associated with a decreased carboxylation activity with decreasing pot size. As there was no change in the Rubisco activation state, decreased initial and total enzyme activity should have been a consequence of depleted Rubisco content (Aranjuelo *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 1999) with increasing root restriction. Despite the correlation between Rubisco activity and protein content, the observed decreased specific activity of Rubisco (34% in SP plants; data not shown) suggests that there was an apparent selective reduction in leaf Rubisco protein. Since root restriction led to N deficiency, plants tend to maximize resource-use efficiency, *e.g.*, by reallocating N away from the  $\text{CO}_2$  fixation machinery into more limiting processes such as carbohydrate synthesis and non-photochemical processes (Bowes, 1991). Rubisco comprises 30-50% of leaf N (Stitt, 1991), a fact that may to a great extent explain the strong relationship between Rubisco activity and leaf N concentration. From the above, it follows that photosynthetic acclimation of plants grown in limiting pot sizes was a consequence of N limitation. From this perspective, down-regulation was an expression from an inadequate leaf N status, as already pointed out.

Changes in Rubisco activity or protein might have been triggered by sugar signalling, or by N limitation, or by an earlier onset of senescence as a consequence of N limitation (Stitt and Krapp, 1999). Sugar-mediated photosynthetic acclimation is commonly associated with sucrose and hexose metabolism (*e.g.* increased hexose:sucrose ratio - Moore *et al.* 1998), through a mechanism involving an increased acid invertase and hexokinase activities, which ultimately is thought to lead to a repression of photosynthetic gene expression (Koch, 1996;

Moore *et al.*, 1998). In this study, the hexose:sucrose ratio increased, but the absolute contents of hexoses and sucrose, as well as acid invertase activity, significantly decreased with rising root restriction, arguing against a sugar signalling mechanism. The observed negative correlation between *A* and the ratio of hexose:free amino acids, and the lack of correlation between *A* and hexose content *per se* circumstantially suggest that photosynthetic gene repression would depend more crucially on the leaf active pools of C and N than on the carbohydrate status alone (Paul and Driscoll, 1997; Stitt and Krapp, 1999; Paul and Pellny, 2003). In fact, the ratio of hexose:free amino acids, which is thought to represent the relation of active pools of C and N, usually increases in plants subjected to any treatment which increases the source:sink ratio, mainly if it is associated with a low-N supply (Paul and Driscoll, 1997). This ratio was negatively correlated with photosynthetic capacity in *Nicotiana tabacum* subjected to increased source:sink ratio (Paul and Driscoll, 1997) and with SPS content in *Lolium perenne* subjected to either low N or high CO<sub>2</sub> supply (Isopp *et al.*, 2000). In the present study, the increases in the ratio of hexose:amino acids in SP and MP plants suggest that photosynthetic acclimation in coffee plants grown under root restriction was associated with C and N status at the whole plant level. If coffee plants cannot synthesise amino acids and protein and to develop new sinks, since the growth of root system was restricted and N status was inadequate, photosynthetic metabolism is down-regulated to prevent further carbohydrate accumulation.

Much attention has been paid as to whether there is evidence of feedback mechanisms by which the accumulation of carbohydrates can act directly or indirectly to inhibit photosynthesis (Nakano *et al.*, 1997). The increased starch:sucrose ratio might suggest that assimilate export was reduced (Lawlor, 2001). However, sucrose (and also hexoses) decreased rather than increased with smaller pots despite the general accumulation of hexoses-P, a fact likely associated with a decline in SPS activity without changes in its activation state. Such a decline should have been linked to a decreased Glc-6-P/Fru-6-P ratio and increased Pi, as particularly found in SP plants. In this situation, fructose-2,6-bisphosphate, which is expected to increase with increasing starch:sucrose ratio (Scott *et al.*, 1995), might inhibit FBPase (Lawlor, 2001). The reductions in SPS and FBPase activities with increasing root restriction have probably occurred to match the reductions in photosynthetic capacity to the reduced sink strength of containerised root systems. Moreover, there was no evidence that sucrose breakdown has increased since acid invertase and SuSy activities decreased, but only in SP plants.

At 165 DAT, starch accumulated in SP plants, despite the decrease in AGPase activity. This was somewhat surprising by taking into account that N deficiency usually leads to an

increased starch synthesis (Stitt, 1991). Probably, the enzyme was allosterically inhibited since the Pi:3-PGA ratio increased (Lawlor, 2001). The accumulation of starch was also linked to a reduction in SPase activity in SP plants. Thus, starch accumulation should have primarily been a long-term process associated with a low sink demand along the whole period of growth into small pots. In fact, starch contents as those shown in SP plants have commonly been observed in coffee plants in different growth conditions (DaMatta *et al.*, 1997; Praxedes *et al.*, 2005). Furthermore, the highest starch content was found in LP plants at 115 DAT [probably a consequence of temporary decrease in the growth of those plants due to low sink demand since coffee growth rates is particularly constrained by high temperatures (Barros *et al.*, 1997)] with no apparent effect on A. Thus starch grains formed in the chloroplasts probably were not high enough to disrupt chloroplasts and to restrict CO<sub>2</sub> diffusion so they should not represent a significant feedback mechanism on photosynthetic capacity (Arp, 1991; Schulz *et al.*, 1998; Paul and Foyer, 2001). Considering the above results collectively, it may be proposed that acclimation of photosynthesis through a direct end-product limitation did not occur in plants under root restriction. This was likely because the responses of plant metabolism to root restriction were exactly the opposite (high Pi levels, low 3-PGA content and high activation state of Rubisco) to those usually observed when end-product limitation is the case (Stitt, 1991; Stitt and Krapp, 1999). In fact, the mechanism of photosynthetic down-regulation by direct end-product limitation has been questioned elsewhere (Arp, 1991; Stitt, 1991; Stitt and Krapp, 1999).

The activity of key enzymes of the glycolytic pathway, as well as enzymes associated with the Calvin cycle such as NADP-GAPDH, decreased in SP plants. Since sucrose and starch synthesis was also likely depressed in these plants, a decreased utilisation of 3-PGA was to be expected. Therefore, the declined 3-PGA content should have been associated with a decrease in CO<sub>2</sub> fixation. Consequently, N limitation induced by growing coffee plants in small pot volumes should have triggered photosynthetic acclimation through decreased Rubisco activity (and possibly RuBP regeneration capacity) rather than through an inadequate rate of end-product synthesis.

## 2.5. References

**Aranjuelo I, Pérez P, Hernández L, Irigoyen JJ, Zita G, Martínez-Carrasco R, Sánchez-Díaz M.** 2005. The response of nodulated alfalfa to water supply, temperature and elevated CO<sub>2</sub>: photosynthetic downregulation. *Physiologia Plantarum* **123**, 348-358.

- Arp WJ.** 1991. Effects of source-sink relations on photosynthesis acclimation to elevated CO<sub>2</sub>. *Plant, Cell and Environment* **14**, 869-875.
- Atwell BJ.** 1990. The effect of soil compaction on wheat during early tillering. Growth, development, and root structure. *New Phytologist* **115**, 29-35.
- Barrett DJ, Gifford RM.** 1995. Acclimation of photosynthesis and growth by cotton to elevated CO<sub>2</sub>: interactions with severe phosphate deficiency and restricted rooting volume. *Australian Journal of Plant Physiology* **22**, 955-963.
- Barros RS, Mota JWS, DaMatta FM, Maestri M.** 1997. Decline of vegetative growth in *Coffea arabica* L. in relation to leaf temperature, water potential and stomatal conductance. *Field Crops Research* **54**, 65-72.
- Bowes G.** 1991. Growth at elevated CO<sub>2</sub>: photosynthesis mediated through Rubisco. *Plant, Cell and Environment* **14**, 795-806.
- Bradford MM.** 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.
- Burrell MM, Mooney PJ, Blundy M, Carter D, Wilson F, Green J, Blundy KS, Rees TA.** 1994. Genetic manipulation of 6-phosphofruktokinase in potato tubers. *Planta* **194**, 95-101.
- Carmi A, Hesketh JD, Enos WT, Peters DB.** 1983. Interrelationships between shoot growth and photosynthesis as affected by root growth restriction. *Photosynthetica* **17**, 240-245.
- Cruz JL, Mosquim PR, Pelacani CR, Araújo WL, DaMatta FM.** 2003. Photosynthesis impairment in cassava leaves in response to nitrogen deficiency. *Plant and Soil* **257**, 417-423.
- DaMatta FM.** 2003. Drought as a multidimensional stress affecting photosynthesis in tropical tree crops. In: Hemantaranjan E, ed. *Advances in Plant Physiology*, Vol. V. Jodhpur: Scientific Publishers, 227-265.
- DaMatta FM, Amaral JAT, Rena AB.** 1999. Growth periodicity in trees of *Coffea arabica* L. in relation to nitrogen supply and nitrate reductase activity. *Field Crops Research* **60**, 233-229.
- DaMatta FM, Loos RA, Silva EA, Loureiro ME, Ducatti C.** 2002. Effects of soil water deficit and nitrogen nutrition on water relations and photosynthesis of pot-grown *Coffea canephora* Pierre. *Trees* **16**, 555-558.



- DaMatta FM, Maestri M, Mosquim PR., Barros RS.** 1997. Photosynthesis in coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) as affected by winter and summer conditions. *Plant Science* **128**, 43–50.
- Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA.** 1980. A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta* **149**, 78-90.
- Gibon Y, Vigeolas H, Tiessen A, Geigenberger P, Stitt M.** 2002. Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates, and glycolytic intermediates based on a novel enzymic cycling system. *Plant Journal* **30**, 221-235.
- Harada T, Ishizawa K.** 2003. Starch degradation and sucrose metabolism during anaerobic growth of pondweed (*Potamogeton distinctus* A. Benn.) turions. *Plant and Soil* **253**: 125–135, 2003.
- Häusler RE, Rademacher T, Li J, Lipka V, Fischer KL, Schubert S, Kreuzaler F, Hirsch H-J.** 2001. Single and double over-expression of C4-cycle genes had differential effects on the pattern of endogenous enzymes, attenuation of photorespiration and on contents of UV protectants in transgenic potato and tobacco plants. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1785-1803.
- Instituto Brasileiro do Café.** 1985. *Cultura do Café no Brasil - Manual de Recomendações*. Instituto Brasileiro do Café - G.E.R.C.A., Rio de Janeiro.
- Isopp H, Frehner M, Long SP, Nösberger J.** 2000. Sucrose-phosphate synthase responds differently to source-sink relations and to photosynthetic rates: *Lolium perenne* L. growing at elevated pCO<sub>2</sub> in the field. *Plant, Cell and Environment* **23**, 597-607.
- Kock KE.** 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 509-540.
- Krizek DT, Carmi A, Mirecki RM, Snyder FW, Bunge JA.** 1985. Comparative effects of soil moisture stress and restricted root zone volume on morphogenetic and physiological responses of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Journal of Experimental Botany* **36**, 25-38.
- Lawlor DH.** 2001. *Photosynthesis*. Springer-Verlag, New York.
- Lawlor DH.** 2002. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany* **89**, 275-294.
- Lichtenthaler HK.** 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in Enzymology*, Vol. 148. San Diego: Academic Press, 350-382.

- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME.** 2002. Photochemical responses and oxidative stress in two clone of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany* **47**, 239-247.
- Moore BD, Cheng S-H, Rice J, Seeman J.** 1998. Sucrose cycling, Rubisco expression and prediction of photosynthetic acclimation to elevated carbon dioxide. *Plant, Cell and Environment* **21**, 905-915.
- Moore B, Cheng S-H., Sims D, Seemann JR.** 1999. The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. *Plant, Cell and Environment* **22**, 567–582.
- Moraes FRP.** 1981. Adubação do cafeeiro. Macronutrientes e adubação orgânica. In: Malavolta E, Yamada T, Guidolin JA, eds. *Nutrição e Adubação do Cafeeiro*. Piracicaba: Instituto Internacional da Potassa, 77-89.
- Nakano H, Makine A, Mae T.** 1997. The effect of elevated partial pressures of CO<sub>2</sub> on the relationship between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. *Plant Physiology* **115**, 191-198.
- Ousible M, Crookston RK, Larson WE.** 1992. Subsurface compaction reduces the root and shoot growth and grain yield of wheat. *Agronomy Journal* **84**, 519-527.
- Paul MJ, Driscoll SP.** 1997. Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signaling nitrogen deficiency through source sink-imbalance. *Plant, Cell and Environment* **20**, 110-116.
- Paul MJ, Foyer CH.** 2001. Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1383-1400.
- Paul MJ, Pellny TK.** 2003. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany* **54**, 539-547.
- Pennley CL.** 1976. A simple micro-assay for inorganic phosphate. *Analytical Biochemistry* **75**, 201-210.
- Peterson CM, Klepper B, Punphrey FV, Rickman RW.** 1984. Restricted rooting decreases tillering and growth of winter wheat. *Agronomy Journal* **76**, 861-863.
- Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Fontes EPB, Loureiro ME.** 2004. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Science* **167**, 1307-1314.

- Praxedes SC, DaMatta FM, Loureiro ME, Ferrão MAG, Cordeiro AT.** 2005. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. *Environmental and Experimental Botany*, in press.
- Robbins NS, Pharr DM.** 1988. Effect of restricted root growth on carbohydrate metabolism and whole plant growth of *Cucumis sativus* L. *Plant Physiology* **87**, 409-413.
- Schulz A, Kühn C, Riesmeier JW, Frommer WB.** 1998. Ultrastructural effects in potato leaves due to antisense-inhibition of the sucrose transporter indicate an apoplasmic mode of phloem loading. *Planta* **206**: 533-543.
- Scott P, Lange AJ, Pilkis SJ, Kruger NJ.** 1995. Carbon metabolism in leaves of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) containing elevated fructose-2,6-bisphosphatase levels. *Plant Journal* **7**, 461-469.
- Sharkey TD, Vasey TI, Vanderveer PJ, Vierstra RD.** 1991. Carbon metabolism enzymes and photosynthesis in transgenic tobacco having excess phytochrome. *Planta* **185**, 287-296.
- Sistema para Análises Estatísticas* - SAEG. 1999. version 8.0. Viçosa: Fundação Arthur Bernades.
- Stitt M, Krapp A.** 1999. The interactions between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant, Cell and Environment* **22**, 583-621.
- Stitt M.** 1991. Rising CO<sub>2</sub> levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* **14**, 741-762.
- Thomas RB, Strain BR.** 1991. Root restriction as a factor in photosynthetic acclimation of cotton seedlings grown in elevated carbon dioxide. *Plant Physiology* **96**, 627-634.
- Trethewey RN, Geigenberger P, Riedel K, Hajirezaei MR, Sonnewald U, Stitt M, Riesmeier JW, 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.
- Whiley AW, Searle C, Schaffer B, Wolstenholme BN.** 1999. Cool orchard temperatures or growing trees in containers can inhibit leaf gas exchange of avocado and mango. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **124**, 46-51.

Table 1. Total shoot and root dry matter, leaf area, root:shoot (dry matter) ratio, leaf area: root mass ratio, specific leaf area, leaf content of total-N, protein and total chlorophylls and carotenoids of coffee plants grown during 115 or 165 days after transplanting (DAT) in small (3 L), medium (10 L) and large (24 L) pots. Data are the mean  $\pm$  SE of six replicates. Different superscript capital letters represent statistical significance between means for each parameter within each sampling period. Different superscript small letters represent statistical significance among means for each parameter within each pot size ( $P < 0.05$ , Newman-Keuls' test)

Parameters	DAT	Pot size		
		Small	Medium	Large
Total shoot dry matter (g)	115	19.6 $\pm$ 0.7 <sup>Bb</sup>	35.2 $\pm$ 1.3 <sup>Ab</sup>	40.1 $\pm$ 0.7 <sup>Ab</sup>
	165	41.4 $\pm$ 2.0 <sup>Ca</sup>	93.1 $\pm$ 3.3 <sup>Ba</sup>	120.2 $\pm$ 4.4 <sup>Aa</sup>
Root dry matter (g)	115	6.75 $\pm$ 0.38 <sup>Ab</sup>	9.58 $\pm$ 0.64 <sup>Ab</sup>	8.20 $\pm$ 0.54 <sup>Ab</sup>
	165	18.56 $\pm$ 1.93 <sup>Ba</sup>	30.98 $\pm$ 1.73 <sup>Aa</sup>	31.02 $\pm$ 1.73 <sup>Aa</sup>
Leaf area (m <sup>2</sup> )	115	0.197 $\pm$ 0.007 <sup>Bb</sup>	0.328 $\pm$ 0.010 <sup>Ab</sup>	0.379 $\pm$ 0.008 <sup>Aa</sup>
	165	0.328 $\pm$ 0.012 <sup>Ca</sup>	0.721 $\pm$ 0.021 <sup>Ba</sup>	1.007 $\pm$ 0.037 <sup>Aa</sup>
Root:shoot	115	0.34 $\pm$ 0.02 <sup>Ab</sup>	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>ABb</sup>	0.21 $\pm$ 0.02 <sup>Ba</sup>
	165	0.45 $\pm$ 0.05 <sup>Aa</sup>	0.34 $\pm$ 0.02 <sup>Ba</sup>	0.26 $\pm$ 0.01 <sup>Ba</sup>
Leaf area:root mass (m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> DM)	115	29.4 $\pm$ 1.4 <sup>Ba</sup>	34.8 $\pm$ 1.9 <sup>Ba</sup>	47.3 $\pm$ 3.3 <sup>Aa</sup>
	165	18.9 $\pm$ 2.3 <sup>Bb</sup>	23.7 $\pm$ 1.5 <sup>Bb</sup>	32.7 $\pm$ 1.2 <sup>Ab</sup>
Specific leaf area (m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> DM)	115	15.25 $\pm$ 0.28 <sup>Aa</sup>	14.14 $\pm$ 0.14 <sup>Ba</sup>	13.76 $\pm$ 0.24 <sup>Ba</sup>
	165	13.40 $\pm$ 0.21 <sup>Ab</sup>	12.31 $\pm$ 0.16 <sup>Bb</sup>	12.55 $\pm$ 0.17 <sup>Bb</sup>
Total N (g kg <sup>-1</sup> DM)	115	26.8 $\pm$ 0.7 <sup>Ba</sup>	32.6 $\pm$ 0.9 <sup>Aa</sup>	33.4 $\pm$ 1.9 <sup>Aa</sup>
	165	18.1 $\pm$ 0.8 <sup>Cb</sup>	23.4 $\pm$ 0.8 <sup>Ba</sup>	30.2 $\pm$ 2.2 <sup>Aa</sup>
Total protein (g kg <sup>-1</sup> DM)	115	167 $\pm$ 3.5 <sup>Ba</sup>	203 $\pm$ 5.4 <sup>Aa</sup>	209 $\pm$ 12 <sup>Aa</sup>
	165	113 $\pm$ 5.3 <sup>Cb</sup>	146 $\pm$ 5.1 <sup>Ba</sup>	189 $\pm$ 13.5 <sup>Aa</sup>
Total chlorophylls (mmol m <sup>-2</sup> )	115	0.97 $\pm$ 0.04 <sup>Ba</sup>	1.30 $\pm$ 0.05 <sup>Aa</sup>	1.31 $\pm$ 0.04 <sup>Ab</sup>
	165	0.67 $\pm$ 0.03 <sup>Cb</sup>	1.30 $\pm$ 0.04 <sup>Ba</sup>	1.62 $\pm$ 0.06 <sup>Aa</sup>
Total carotenoids (mmol m <sup>-2</sup> )	115	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>Ba</sup>	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>Aa</sup>	0.28 $\pm$ 0.01 <sup>Ab</sup>
	165	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>Cb</sup>	0.25 $\pm$ 0.01 <sup>Bb</sup>	0.30 $\pm$ 0.01 <sup>Aa</sup>

Table 2. Net CO<sub>2</sub> assimilation rate (*A*), stomatal conductance (*g<sub>s</sub>*), carbon isotope composition ratio ( $\delta^{13}\text{C}$ ), ratio of internal to ambient CO<sub>2</sub> concentration (*C<sub>i</sub>:C<sub>a</sub>*), and leaf water potential ( $\Psi_w$ ; 07:30 – 08:30 h) of coffee plants grown in small (3 L), medium (10 L) and large (24 L) pots during 115 or 165 days after transplanting (DAT). Statistics as in Table 1

Parameters	DAT	Pot size		
		Small	Medium	Large
<i>A</i> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	115	$5.9 \pm 0.3^{\text{Ba}}$	$7.7 \pm 0.5^{\text{Aa}}$	$7.1 \pm 0.6^{\text{ABa}}$
	165	$3.5 \pm 0.6^{\text{Bb}}$	$6.9 \pm 0.4^{\text{Aa}}$	$8.0 \pm 0.3^{\text{Aa}}$
<i>g<sub>s</sub></i> ( $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	115	$95 \pm 8^{\text{Aa}}$	$108 \pm 10^{\text{Aa}}$	$93 \pm 10^{\text{Ab}}$
	165	$73 \pm 18^{\text{Ba}}$	$116 \pm 9^{\text{Aa}}$	$148 \pm 16^{\text{Aa}}$
<i>C<sub>i</sub> : C<sub>a</sub></i>	115	$0.65 \pm 0.01^{\text{Ab}}$	$0.60 \pm 0.02^{\text{Ab}}$	$0.60 \pm 0.01^{\text{Ab}}$
	165	$0.77 \pm 0.05^{\text{Aa}}$	$0.70 \pm 0.01^{\text{Aa}}$	$0.70 \pm 0.01^{\text{Aa}}$
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	115	$27.98 \pm 0.19^{\text{Aa}}$	$28.33 \pm 0.05^{\text{Aa}}$	$27.86 \pm 0.09^{\text{Ab}}$
	165	$29.68 \pm 0.18^{\text{Cb}}$	$27.94 \pm 0.23^{\text{Ba}}$	$26.59 \pm 0.20^{\text{Aa}}$
$\Psi_w$ (-MPa)	115	$0.73 \pm 0.04^{\text{Ab}}$	$0.78 \pm 0.05^{\text{Ab}}$	$0.68 \pm 0.08^{\text{Ab}}$
	165	$0.31 \pm 0.04^{\text{Aa}}$	$0.41 \pm 0.07^{\text{Aa}}$	$0.43 \pm 0.06^{\text{Aa}}$

Table 3. Maximum photochemical efficiency of PSII ( $F_v/F_m$ ), quantum yield of PSII electron transport ( $\phi_{\text{PSII}}$ ), capture efficiency of excitation energy by open PSII reaction centers ( $F_v'/F_m'$ ), photochemical ( $q_P$ ) and Stern-Volmer non-photochemical (NPQ) quenching coefficients of coffee plants grown in small (3 L), medium (10 L) and large (24 L) pots for 115 or 165 days after transplanting (DAT). Statistics as in Table 1

Parameters	DAT	Pot size		
		Small	Medium	Large
$F_v/F_m$	115	$0.812 \pm 0.003^{\text{Ba}}$	$0.832 \pm 0.004^{\text{Aa}}$	$0.827 \pm 0.003^{\text{Ab}}$
	165	$0.807 \pm 0.007^{\text{Ba}}$	$0.841 \pm 0.004^{\text{Aa}}$	$0.841 \pm 0.003^{\text{Aa}}$
$\phi_{\text{PSII}}$	115	$0.282 \pm 0.008^{\text{Ba}}$	$0.404 \pm 0.018^{\text{Aa}}$	$0.427 \pm 0.026^{\text{Aa}}$
	165	$0.247 \pm 0.028^{\text{Ba}}$	$0.370 \pm 0.012^{\text{Aa}}$	$0.393 \pm 0.012^{\text{Aa}}$
$F_v'/F_m'$	115	$0.492 \pm 0.009^{\text{Ba}}$	$0.563 \pm 0.008^{\text{Aa}}$	$0.573 \pm 0.022^{\text{Aa}}$
	165	$0.503 \pm 0.017^{\text{Ba}}$	$0.538 \pm 0.009^{\text{ABa}}$	$0.561 \pm 0.009^{\text{Aa}}$
$q_P$	115	$0.576 \pm 0.017^{\text{Ba}}$	$0.712 \pm 0.022^{\text{Aa}}$	$0.734 \pm 0.027^{\text{Aa}}$
	165	$0.497 \pm 0.063^{\text{Ba}}$	$0.686 \pm 0.024^{\text{Aa}}$	$0.699 \pm 0.015^{\text{Aa}}$
NPQ	115	$2.817 \pm 0.060^{\text{Aa}}$	$2.253 \pm 0.092^{\text{Ba}}$	$2.101 \pm 0.104^{\text{Ba}}$
	165	$2.240 \pm 0.254^{\text{Ab}}$	$2.501 \pm 0.100^{\text{Aa}}$	$2.228 \pm 0.064^{\text{Aa}}$



Figure 1. Root system of coffee plants grown in small (3 L; right), medium (10 L; middle) and large (24 L; left) pots during 115 (above) or 165 (below) days after transplanting.

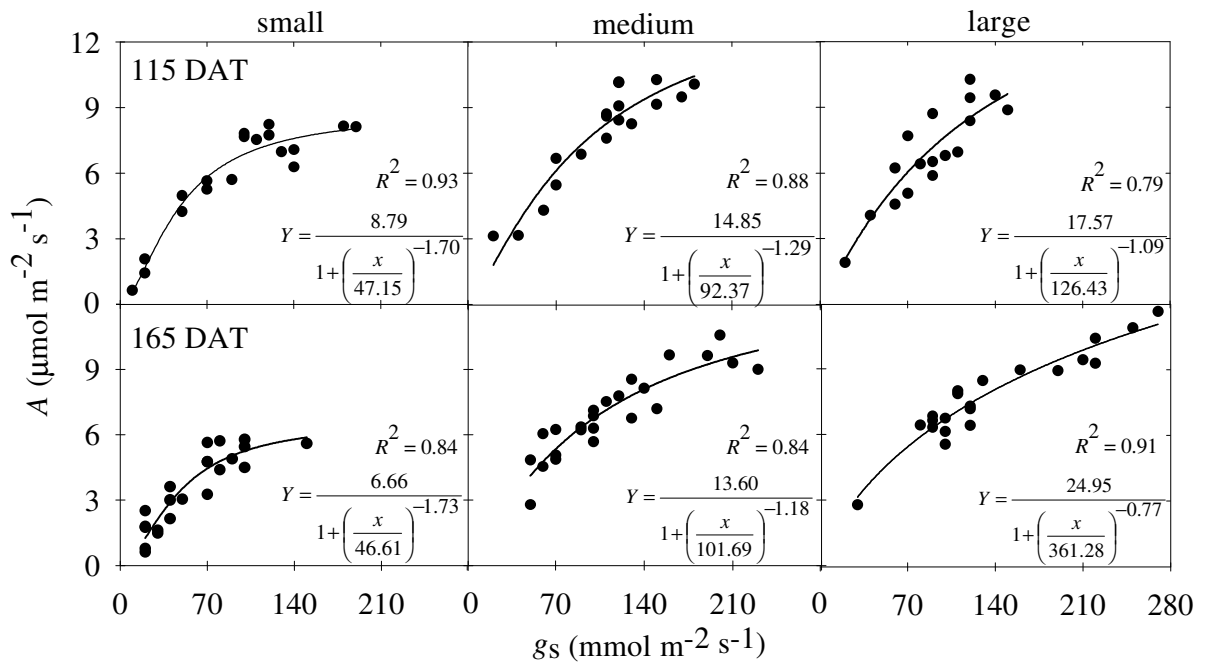


Figure 2. The relationship of  $A$  vs  $g_s$  in coffee plants grown in small (3 L), medium (10 L) and large (24 L) pots during 115 or 165 days after transplanting (DAT). ( $n = 18$  at 115 DAT;  $n = 24$  at 165 DAT)



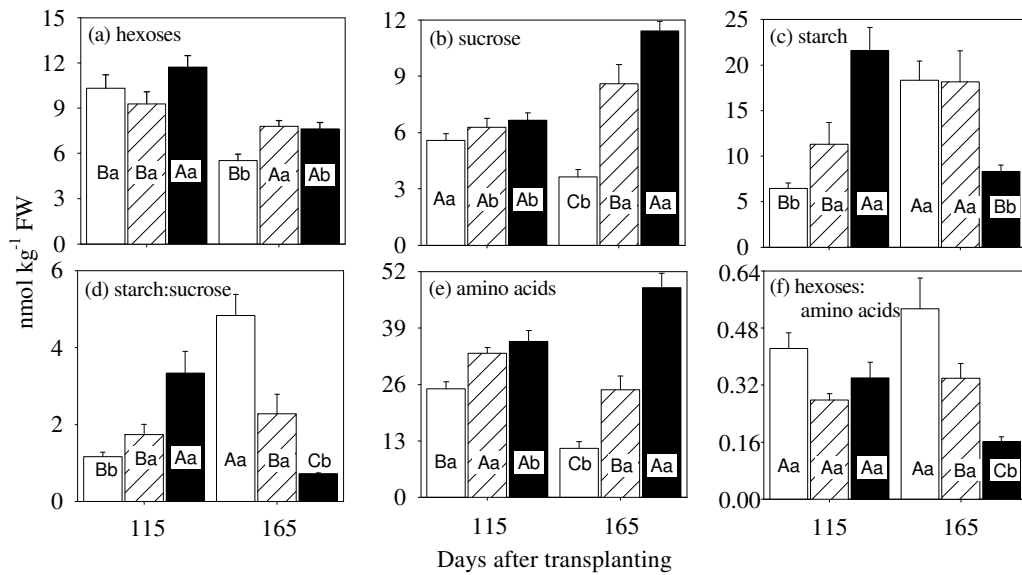


Figure 3. The effect of pot size, as evaluated at 115 or 165 days after transplanting, on leaf contents of hexoses (a), sucrose (b), starch (c) and amino acid (d), and ratios of starch:sucrose, and hexoses:amino acids of coffee plants. Plants were grown in small (3 L, open columns), medium (10 L, hatched columns), and large (24 L, full columns) pots. Each column represents the mean  $\pm$  SE of six replicates. For each parameter means accompanied by the same capital letter within each sampling period, or by the same small letter within each pot size, are not statistically different to each other ( $P > 0.05$ , Newman-Keuls' test)

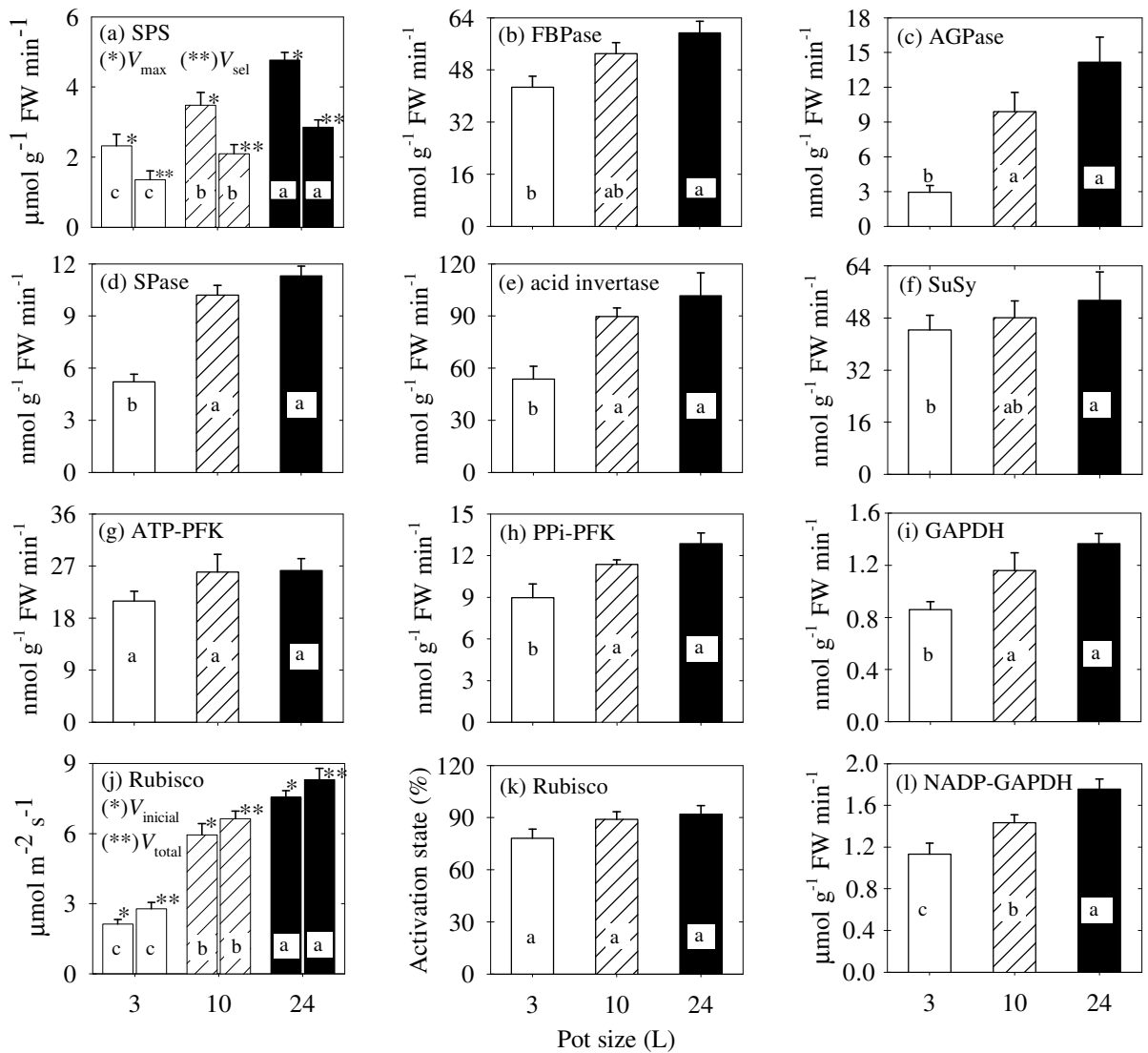


Figure 4. The effect of pot size, as evaluated at 165 days after transplanting, on the activity of cytosolic and chloroplastidic enzymes of coffee leaves (sucrose-P synthase – SPS, fructose-1,6-bisphosphatase – FBPase, ADP-glucose pyrophosphorylase – AGPase, starch phosphorylase – SPase, sucrose synthase – SuSy, ATP-dependent 6-phosphofructokinase – ATP-PFK, PPi: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase – PPi-PFK, glyceraldehyde-3-P dehydrogenase – GAPDH, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase – Rubisco, and NADP: glyceraldehyde-3-P dehydrogenase – NADP-GAPDH). Plants were grown in small (3 L, open columns), medium (10 L, hatched columns), and large (24 L, full columns) pots. Each column represents the mean  $\pm$  SE of six replicates. For each enzyme, means accompanied by the same small letter are not statistically different to each other ( $P > 0.05$ , Newman-Keuls' test)

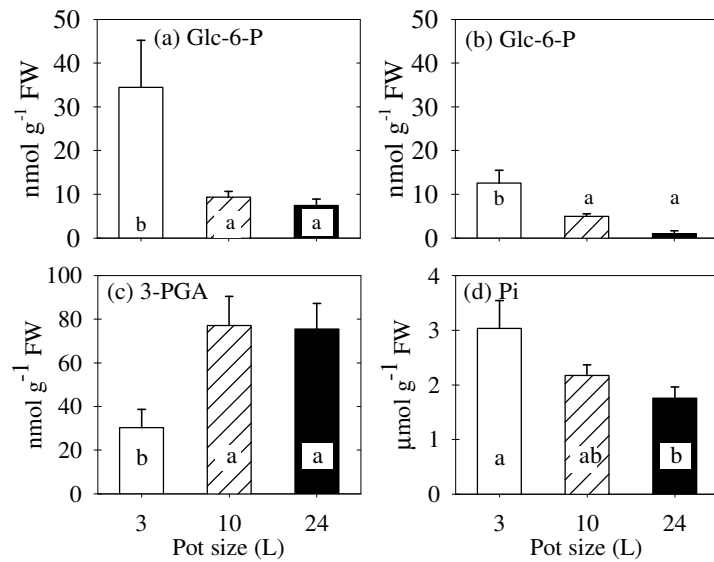


Figure 5. The effect of pot size, as evaluated at 165 days after transplanting, on the leaf contents of Glc-6-P (a), Fru-6-P (b), 3-PGA (c) and Pi (d) of coffee plants. Plants were grown in small (3 L, open columns), medium (10 L, hatched columns), and large (24 L, full columns) pots. Each column represents the mean  $\pm$  SE of six replicates. For each metabolite, means accompanied by the same small letter are not statistically different to each other ( $P > 0.05$ , Newman-Keuls' test)

### III. Capítulo 2

#### **Efeitos de taxas de imposição e de severidade do déficit hídrico sobre a fotossíntese e o metabolismo de carboidratos em folhas de *Coffea canephora***

##### **Resumo**

Mudas de *Coffea canephora* (clone 109A) foram cultivadas em casa de vegetação e submetidas a duas taxas de imposição de déficit hídrico, utilizando-se, para isso, de vasos de diferentes volumes: 6 L, taxa rápida; e 24 L, taxa lenta de imposição. As amostragens e medições foram feitas quando as plantas atingiram um potencial hídrico de antemã de, aproximadamente, -2,0 MPa (déficit moderado) e - 4,0 MPa (déficit severo), sendo necessários, para isso, 4 e 6 dias nas plantas dos vasos de 6 L, e 12 e 17 dias naquelas dos vasos de 24 L, respectivamente, após suspensão da irrigação. Os tratamentos aplicados não influenciaram as concentrações de clorofilas e carotenóides. Pequenas alterações nos parâmetros de fluorescência foram observadas, mas apenas em plantas sob déficit severo, imposto lentamente. Sob déficit severo, os níveis de prolina aumentaram 31 e 212% nas plantas dos vasos pequenos e grandes, respectivamente, em relação aos das plantas-controle. A seca ( $\Psi_{am} = -4,0$  MPa) aumentou o extravazamento de eletrólitos (~183%), independentemente do tamanho do vaso. A taxa fotossintética reduziu-se em 44 e 96%, a  $\Psi_w$  de -2,0 e -4,0 MPa, respectivamente, em relação às plantas-controle, sem, contudo, observar-se alterações expressiva nesse parâmetro, em função das diferentes taxas de imposição do

déficit hídrico. O déficit hídrico reduziu a condutância estomática e a transpiração apenas quando severo. De modo geral, o metabolismo de carboidratos, em resposta à seca, foi afetado pela taxa de imposição do déficit hídrico; as atividades de enzimas-chave do metabolismo do carbono (pirofosforilase da ADP-glicose, invertase ácida, sintase da sacarose, sintase da sacarose-fosfato, bisfosfatase da frutose 1,6-bisfosfato, fosforilase do amido, fosfofrutocinase dependente de PPI e desidrogenase do gliceraldeído 3-P) foram pouco ou nada afetadas pelas taxas de imposição e severidade do déficit.

Palavras-chave: fluorescência da clorofila, café, trocas gasosas, tamanho de vaso

### **Effects of the rate of imposition and severity of water deficit on photosynthesis and carbohydrate metabolism in *Coffea canephora* leaves**

#### **Abstract**

Seedlings of *Coffea canephora* (clone 109A) were grown under screenhouse conditions in pots containing 6- and 24-L of substrate, which allowed, respectively, a fast or a slow rate of water deficit progression after withholding irrigation. All sampling and measurements were performed when predawn leaf water potential ( $\Psi_{pd}$ ) about -2.0 (mild) and -4.0 MPa (severe water deficit) was reached. This was achieved at 4 and 6 days, or at 12 and 17 days after suspending irrigation, respectively, in plants grown in the small or large pots. Total chlorophyll and carotenoid concentrations were not affected by treatments. Small changes in chlorophyll *a* fluorescence parameters were observed, but only in plants submitted to severe, slowly-imposed water deficit. Under severe water deficit, proline concentration increased in plants both in small (31%) and large (212%) pots, as compared with control plants. Drought ( $\Psi_{pd} = -4,0$  MPa) led to increased electrolyte leakage (183%), irrespective of pot size. Photosynthetic rates decreased by about 44 and 96%, at  $\Psi_{pd}$  of -2,0 and -4,0 MPa, respectively, in comparison with control plants. However, only minor changes were detected in those parameters in response to the rate of water deficit imposition. Stomatal conductance and leaf transpiration were significantly affected by water deficit only when it was severe. In general, changes in carbohydrate metabolism depended on pot size and, thus, on the rate of water deficit imposition; however, the activities of key enzymes of carbon metabolism (ADP-

Glc pyrophosphorylase, acid invertase, sucrose syntase, sucrose-phosphate synthase, fructose-2,6-bisphosphatase, starch phosphorylase, PPi:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) were only marginally affected by both the rate of progression and severity of water deficit.

Key words: chlorophyll fluorescence, coffee, gas exchange, pot size

## 2.1. Introdução

Poucos trabalhos consideram a possibilidade de o tamanho do vaso influenciar a resposta das plantas à taxa de imposição do déficit hídrico. O tamanho do vaso tem grande influência na quantidade de água disponível às plantas nele cultivadas. Obviamente, vasos menores se traduzem em menor disponibilidade global de água, acarretando, portanto, imposição mais rápida do déficit hídrico (Will e Teskey, 1997; Ray e Sinclair, 1998). A imposição de níveis realísticos de déficit hídrico é difícil, particularmente nos pequenos vasos, com observações largamente dependentes da taxa de desenvolvimento do déficit (Jones e Rawson, 1979).

A progressão do déficit hídrico pode ter implicações importantes no crescimento das plantas: se for muito rápido, em toda a zona radicular, como freqüentemente é observado em vasos pequenos, pode causar estresse hídrico irreversível à planta e, possivelmente, morte de porção considerável de raízes. Em situação oposta, quando o déficit é imposto lentamente, as plantas podem destinar grande proporção de seus fotoassimilados à produção de raízes para retirar água em regiões mais profundas do solo e, também, proteger as raízes nas regiões (superficiais) mais secas do solo, por meio da suberização (Townend e Dickinson, 1995). Ademais, uma taxa rápida de imposição do déficit hídrico, quando se usam vasos pequenos, pode invalidar resultados de estudos em que o objetivo é justamente discriminar materiais com tolerância diferencial à seca, uma vez que, diferentemente do que ocorre em condições de campo, ou mesmo em vasos de cultivo de grande volume, a planta não teria tempo de expressar seus atributos adaptativos frente à seca, isto é, não ocorreria aclimação. Se o déficit progredir lentamente, é possível que a planta invista, por exemplo, em mecanismos para dissipação do excesso de energia de excitação sobre a cadeia fotossintética de transporte de elétrons, como é comumente observado sob condições de seca, reduzindo, portanto, os

riscos da ocorrência de danos fotooxidativos (Ort e Baker, 2002), ou promova o ajustamento osmótico, para retardar a desidratação (Lawlor e Cornic, 2002).

O déficit hídrico, além de afetar a fotossíntese direta ou indiretamente, por mecanismos estomáticos e não-estomáticos ainda não elucidados completamente, reduz drasticamente o crescimento das plantas. Conseqüentemente, a produção e o consumo de fotoassimilados são restringidos, levando a alterações na partição do carbono na folha e na planta como um todo (Chaves, 1991; Cornic, 2000; Lawlor e Cornic, 2002). Tais alterações caracterizam-se, predominantemente, por modificações nos níveis foliares de açúcares solúveis (hexoses e sacarose) e de amido (DaMatta et al., 1997; Vu *et al.*, 1998, Praxedes et al., 2005). Além disso, as atividades das enzimas-chave na síntese (bisfosfatase da frutose 1,6-bisfosfato – FBPase, e sintase da sacarose-fosfato – SPS) (Pelleschi et al., 1997; Foyer et al., 1998; Basu et al., 1999; Praxedes et al., 2005) e degradação (invertase ácida e sintase da sacarose – SuSy) (Pelleschi et al., 1997; Lawlor e Cornic, 2002, Praxedes et al., 2005) da sacarose e, também, na síntese (pirofosforilase da ADP-glicose - AGPase) e degradação (fosforilase do amido – SPase) do amido (Zeeman et al., 2004) são alteradas.

No Brasil, a maior parte das lavouras de café Canéfora vem sendo formada, nos últimos anos, a partir de mudas clonais, selecionadas de matrizes muitas vezes cultivadas sob irrigação. Os clones assim obtidos, uma vez conduzidos com restrição hídrica, exibem grande variabilidade quanto a tolerância à seca (DaMatta et al., 2003). Lima et al. (2002), trabalhando com dois clones de café Canéfora, com diferentes sensibilidades à seca, em vasos com 6 L de substrato, observaram aumentos pronunciadamente maiores na atividade do sistema antioxidativo no clone tolerante (clone 120), em relação ao sensível (clone 109A) ao déficit hídrico. Esse fato foi observado quando a fotossíntese, em ambos os clones, foi virtualmente suprimida, em resposta ao déficit hídrico, imposto via suspensão da irrigação, por seis dias (potencial hídrico de antemanhã,  $\Psi_{am} = -3,0$  MPa). Paralelamente, a extensão dos danos celulares, avaliada pela peroxidação de lipídios e extravasamento de eletrólitos, foi menor no clone 120 que no 109A. Por outro lado, Pinheiro et al. (2004) verificaram, naqueles clones, mas cultivados em tambores de 120 L de substrato, taxas de fotossíntese aproximadamente 300% maiores que nas plantas do experimento de Lima et al. (2002). Além disso, o desempenho da maquinaria fotossintética foi muito menos afetado após cerca de 30 dias de imposição de déficit hídrico, quando as plantas também atingiram  $\Psi_{am}$  de -3,0 MPa. Não somente a atividade do sistema antioxidativo como também a extensão de danos celulares foram pronunciadamente menores (e com menor amplitude de resposta entre clones) no experimento de Pinheiro et al. (2004) que as observadas por Lima et al. (2002). Isso sugere respostas diferenciais de aclimatação da maquinaria fotossintética ao tamanho do vaso de

cultivo e, portanto, à taxa de imposição do déficit hídrico. Ademais, em estudo recente, realizado com quatro clones de café Canéfora, Praxedes et al. (2005) evidenciaram que o metabolismo de carboidratos exibe variações clonais em resposta ao déficit hídrico, imposto lentamente. Contudo, a importância da taxa de imposição do déficit sobre o metabolismo de carboidratos em café é desconhecida. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a aclimação da maquinaria fotossintética a taxas diferenciais de imposição e severidade do déficit hídrico, em café Canéfora.

## 2.2. Material e métodos

Mudas de *Coffea canephora* Pierre var. *kouillou* (clone 109A), com cinco pares de folhas, obtidas no Instituto Capixaba de Assistência Técnica e Extensão Rural – Incaper, foram plantadas e cultivadas em vasos de volumes diferentes (6 e 24 L), em Viçosa, MG (20°45'S, altitude de 650 m), sob fluxo de fótons fotossinteticamente ativos médio de 1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ao meio-dia. O substrato utilizado para enchimento dos vasos consistiu de uma mistura de solo, areia e esterco bovino (3:1:1, v/v/v), fertilizada (para cada 1 m<sup>3</sup>) com 0,437 kg de P, 0,143 kg de K e 1,0 kg de calcário dolomítico. As mudas foram mantidas em casa de vegetação, cujas laterais permitiam livre troca de ar entre seu interior e exterior. Após 11 meses de cultivo (setembro de 2004), as plantas foram separadas em dois grupos, sendo cada grupo constituído por 10 plantas. Um grupo foi mantido sob irrigação periódica (controle) e outro, sob déficit hídrico, imposto pela suspensão da irrigação, até que as plantas atingissem  $\Psi_{\text{am}}$  de, aproximadamente, -2,0 e - 4,0 MPa (medidos com uma bomba de pressão tipo Scholander), caracterizando, portanto, dois níveis de déficit, moderado e severo, respectivamente. Os dois níveis de déficit foram atingidos aos quatro e seis dias nas plantas dos vasos de 6 L, e aos 12 e 17 dias naquelas dos vasos de 24 L, respectivamente, após suspender-se a irrigação. Obtiveram-se, então, duas taxas de imposição do déficit hídrico: rápida, nos vasos pequenos, e relativamente lenta, nos vasos grandes.

Uma vez atingido o nível de déficit desejado, avaliaram-se as trocas gasosas e vários parâmetros de fluorescência, entre 07:00 e 08:30 h, em folhas completamente expandidas do terceiro ou quarto par a partir do ápice de ramos plagiotrópicos do terço superior das plantas. As taxas de assimilação líquida de carbono ( $A$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ), a transpiração ( $E$ ) e a razão entre concentrações interna e externa de CO<sub>2</sub> ( $C_i/C_a$ ) foram medidas em sistema aberto, sob luz saturante artificial (1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), concentração de CO<sub>2</sub> ambiente e temperatura constante de 25°C, com um analisador de gás a infravermelho portátil (LICOR



6400, Li-COR, Lincoln, EUA). Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram medidos, usando-se de um fluorômetro com amplitude de pulso modulado (FMS2, Hansatech, Norfolk, Reino Unido). A fluorescência inicial ( $F_0$ ), fluorescência máxima ( $F_m$ ), eficiência fotoquímica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ), eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII ( $F_v'/F_m'$ ), coeficiente de extinção fotoquímica ( $q_p$ ), rendimento quântico do transporte de elétrons ( $\phi_{FSII}$ ), coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) e a fração de energia absorvida não utilizada na fotoquímica nem dissipada termicamente ( $P_E$ ) foram estimadas exatamente como descrito em DaMatta et al. (2002) e Lima et al. (2002).

Paralelamente às medições e nas mesmas folhas utilizadas para a avaliação das trocas gasosas, foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, amostras de material vegetal (~0,160 g) para quantificação dos níveis foliares de pigmentos e de prolina. As clorofilas e os carotenóides totais foram extraídos em acetona/água 80% (v/v) e determinadas segundo Lichtenthaler (1987). Os teores de prolina foram determinados segundo Bates et al. (1973), no mesmo extrato (etanólico) utilizado para determinação dos carboidratos. Amostras de folhas foram também coletadas em dois horários do dia (entre 07:00 e 08:00 h; e entre 13:00 e 14:00 h) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, para a determinação das concentrações foliares de hexoses (glicose + frutose), sacarose, amido e aminoácidos solúveis totais, além das atividades de várias enzimas-chave no metabolismo de carboidratos. As amostras vegetais foram, então, submetidas à extração etanólica, a quente, determinando-se, na fração solúvel em etanol, os teores de açúcares, aminoácidos e prolina e, na fração insolúvel, os de amido (Stitt et al., 1989; Trethewey et al., 1998; Praxedes et al., 2005).

Para a extração das enzimas, as amostras congeladas de folhas (~0,160 g) foram homogeneizadas com 1,4 mL de tampão de extração (Geigenberger e Stitt, 1993) utilizando-se de 100% (p/v) de PVPP. O extrato foi centrifugado a 25.000 g, por 30 min, e o sobrenadante dessalinizado através de colunas Sephadex G-25M. Todo o procedimento foi realizado a 4°C e os ensaios enzimáticos foram previamente otimizados para o tempo de reação e volume de extrato. As atividades de SPS (velocidades máxima – SPS- $V_{max}$  e seletiva – SPS- $V_{sel}$ ; EC 2.4.1.14), FBPase (EC 3.1.3.11), AGPase (EC 2.2.7.27), fosfofrutocinase dependente de ATP (ATP-PFK, EC 2.7.1.11), invertase ácida (EC 3.2.1.26) e SuSy (EC 2.4.1.13) foram determinadas conforme descrito em Praxedes et al. (2005). Foram determinadas ainda as atividades da desidrogenase do NADP:gliceraldeído-3-P [NADP-G3PDH, EC 1.2.1.12; Häusler et al. (2001)], SPase [(EC 2.4.1.1; Harada e Ishizawa (2003)], e da e fosfofrutocinase dependente de PPi (PPi-PFK, EC 2.7.1.90) e da desidrogenase do gliceraldeído-3-P (G3PDH, EC 1.2.1.12), estas conforme Burrell et al. (1994). Os danos

celulares foram estimados pelo extravazamento de eletrólitos (Lima et al., 2002), em discos foliares coletados ao meio-dia; o procedimento iniciou-se imediatamente após a coleta dos discos.

Utilizou-se do delineamento inteiramente casualizado, com tratamentos dispostos em esquema fatorial 2 x 2 x 2 (duas taxas de imposição do déficit hídrico, dois níveis de déficit e dois regimes hídricos), com cinco repetições. Cada unidade experimental consistiu de uma planta por vaso. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos foram comparadas entre si pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade.

### 2.3. Resultados e discussão

Mudas de café Canéfora (clone 109A) foram submetidas ao estresse hídrico progressivo, até que  $\Psi_{am}$  atingisse -4,0 MPa. Em função dos diferentes tamanhos de vaso utilizados, foi possível obterem-se duas taxas de imposição do déficit hídrico: nos vasos pequenos (6 L), o declínio em  $\Psi_{am}$ , após suspensão da irrigação, ocorreu rapidamente (667 kPa d<sup>-1</sup>), e mais lentamente, nos vasos grandes (24 L, 235 kPa d<sup>-1</sup>). O  $\Psi_{am}$  de -4,0 MPa foi atingido aos seis dias nas plantas dos vasos pequenos, e aos 17 dias, naquelas dos vasos grandes.

Nas plantas dos vasos pequenos, nas quais a taxa de imposição do déficit hídrico foi rápida, houve redução em  $A$  de 39 e 100%, sob déficit moderado (-2,0 MPa) e severo (-4,0 MPa), respectivamente, em relação às plantas-controle; nas plantas dos vasos grandes, submetidas a uma imposição mais lenta do déficit hídrico, verificaram-se reduções em  $A$  de 49 e 91%, sob déficit moderado e severo, respectivamente (Figura 1a). Resultados semelhantes aos verificados nas plantas dos vasos pequenos foram observados em *C. arabica* por Kanechi et al. (1988). Esses autores observaram que  $A$  se reduziu a partir de  $\Psi_{am}$  inferior a -2,0 MPa e praticamente se anulou quando  $\Psi_{am}$  atingiu valores de -3,0 MPa, após 11 dias sem irrigação. Neste experimento, nos vasos grandes, as reduções observadas em  $A$ , nas plantas sob déficit hídrico, foram semelhantes àquelas obtidas por Pinheiro et al. (2004), em plantas do clone 109A submetidas a taxas de imposição do déficit ainda menores (155 kPa d<sup>-1</sup>) que as do presente experimento (235 kPa d<sup>-1</sup>).

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas em  $A$  nas plantas dos diferentes tamanhos de vasos, para um dado nível de déficit hídrico, nas plantas sob déficit severo  $A$  foi suprimida (-0,07  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) nos vasos pequenos, mas permaneceu baixa, porém positiva (0,67  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) nas plantas dos vasos grandes (Figura 1a). Respostas similares foram observadas para  $g_s$  (Figura 1b) e  $E$  (Figura 1c).

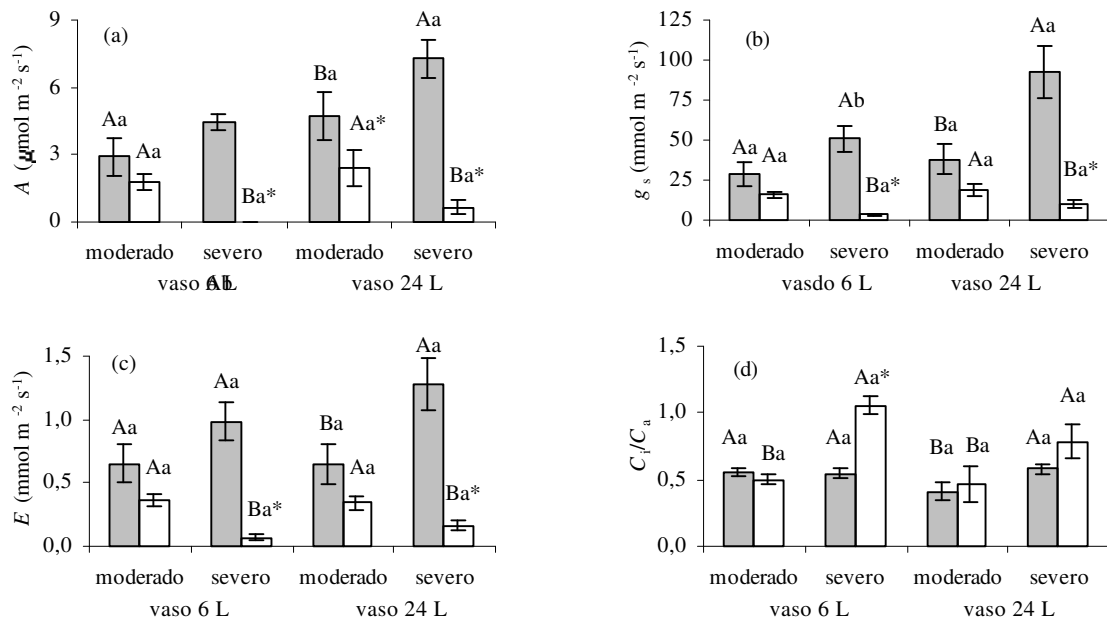


Figura 1. Efeitos de taxas de imposição (tamanho de vasos) e níveis de déficit hídrico sobre a taxa de assimilação líquida de carbono –  $A$  (a), condutância estomática -  $g_s$  (b), transpiração –  $E$  (c) e razão entre concentração interna e ambiente de  $\text{CO}_2$  -  $C_i/C_a$  (d) em plantas de café. Tanto para plantas-controle (colunas cinzas) ou plantas estressadas (colunas brancas), letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as médias dos parâmetros obtidos nas plantas sob déficit moderado e severo, dentro de cada tamanho de vaso; letras minúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias dos parâmetros obtidos nas plantas cultivadas nos vasos de 6 e 24 L, dentro de cada nível de déficit (teste de Newman-Keuls;  $P < 0.05$ ). As médias de plantas estressadas marcadas com um asterisco diferem das médias das plantas-controle (teste  $t$ ; para  $P < 0.05$ ). As colunas representam a média e as barras o erro-padrão, de cinco repetições.

Não houve diferenças significativas na razão  $C_i/C_a$  entre plantas de diferentes tamanhos de vasos, para cada nível de déficit; entretanto, para ambos os tamanhos de vaso, as plantas sob déficit hídrico severo apresentaram maior razão  $C_i/C_a$  que aquelas sob déficit moderado (Figura 1d). Ainda, nas plantas sob déficit severo, imposto rapidamente, a razão  $C_i/C_a$  aumentou em relação à observada em plantas irrigadas (Figura 1d). Estes resultados sugerem a ocorrência de limitações não-estomáticas à fotossíntese, ainda que  $g_s$  se tenha reduzido grandemente. Apesar de pouco expressivos, tomados em conjunto, os resultados das

trocas gasosas sugerem que os efeitos negativos do déficit hídrico sobre a maquinaria fotossintética foram ligeiramente mais pronunciados em plantas submetidas à taxa rápida de imposição do déficit. É importante ressaltar que, sob déficit severo, o aumento na razão  $C_i/C_a$  nas plantas dos vasos pequenos foi muito maior (93%) que aquele verificado nas plantas dos vasos grandes (35%), em relação ao das plantas-controle (Figura 1d), caracterizando, portanto, o completo colapso da fixação de  $CO_2$  (supressão da fotossíntese) nas plantas submetidas a taxa rápida de imposição do déficit hídrico. Ademais, mesmo apresentando dramática redução em  $A$ , as plantas sob déficit hídrico severo, no vaso maior, mantiveram suas taxas de assimilação de  $CO_2$  positivas. Portanto, possivelmente, sob taxas lentas de progressão do déficit hídrico, as plantas de café poderiam aclimatar-se aos efeitos da seca, em parte, mantendo as taxas fotossintéticas (Praxedes et al. 2005).

Apesar da drástica redução em  $A$ , a eficiência fotoquímica máxima do FSII ( $F_v'/F_m'$ ) não foi afetada pelo estresse hídrico, independentemente da sua severidade e taxa de imposição (Figura 2a). Este resultado, também verificado em outros trabalhos com café Canéfora, em diferentes condições de cultivo (DaMatta et al., 2002; Lima et al, 2002; Pinheiro et al. 2004; Praxedes et al., 2005), indica ausência de danos fotoinibitórios.

Comparando-se plantas estressadas e irrigadas, não se verificaram diferenças significativas nos parâmetros fotoquímicos quando o déficit hídrico foi imposto rapidamente, portanto em plantas cultivadas nos vasos de 6 L, independentemente de sua severidade (Figura 2b-f). Entretanto, quando o déficit hídrico severo foi imposto lentamente, a razão  $F_v'/F_m'$  não se alterou em resposta ao déficit hídrico (Figura 2b), enquanto  $q_P$  decresceu 33% naquelas plantas (Figura 2c). A redução em  $q_P$  esteve, portanto, associada ao decréscimo em  $\phi_{FSII}$  (32%; Figura 2d), uma vez que  $\phi_{FSII} = F_v'/F_m' \times q_P$  (Maxwell e Johnson, 2000). Contudo, houve redução acentuada em NPQ (49%, Figura 2e), fato que pode ter contribuído para o incremento de 18% em  $P_E$  (Figura 2f). Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que as plantas nos vasos grandes, sob déficit severo, possivelmente apresentaram um mecanismo fotoprotetor, uma vez que ajustaram a taxa de transporte de elétrons à taxa de consumo de poder redutor (Cruz et al., 2003; Praxedes et al., 2005). Resultados de parâmetros fotoquímicos semelhantes aos observados em plantas sob déficit severo ( $\Psi_{am} = -4$  MPa), imposto lentamente, também foram constatados por Praxedes et al. (2005), em plantas do clone 109A submetidas a déficit hídrico imposto ainda mais lentamente ( $155$  kPa  $d^{-1}$ ). Todavia, apenas pequenas alterações nos parâmetros fotoquímicos foram observadas em resposta aos níveis e taxas de imposição do déficit hídrico; provavelmente, ocorreram em função das variações nas condições ambientes entre dias de medição, e não devido a efeitos de tratamentos (Figuras 2b, c, d, e, f). Ademais, nenhuma relação pôde ser estabelecida entre

parâmetros fotoquímicos e teores de pigmentos, uma vez que estes não tiveram suas concentrações alteradas, em função dos tratamentos aplicados (Tabela 1). A invariabilidade da concentração de pigmentos fotossintéticos, em resposta à seca, em café, tem sido observada em outros estudos (*e.g.*, DaMatta et al., 1997; Almeida e Maestri, 1996; Kanechi et al., 1996), apesar de as clorofilas serem altamente sensíveis à seca (Castrillo e Trujillo, 1994).

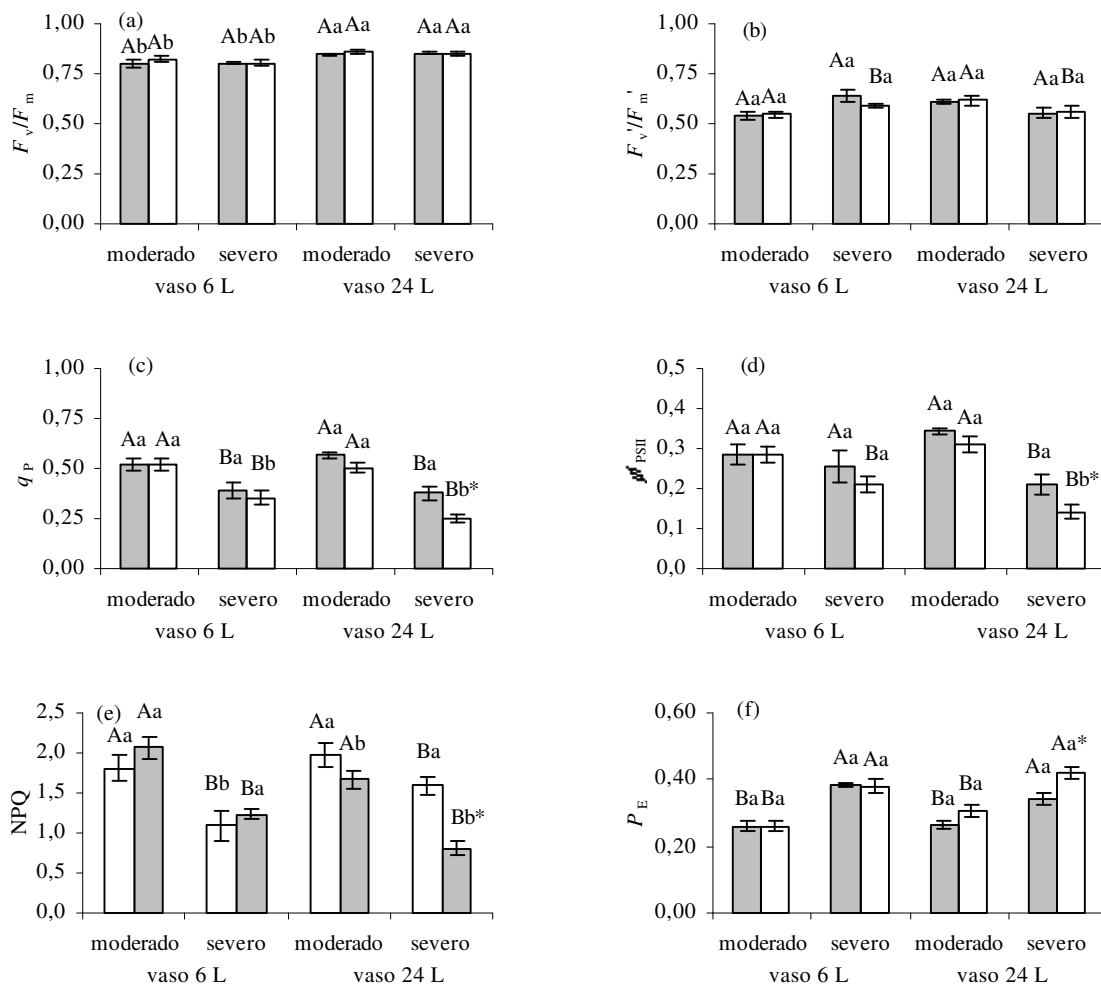


Figura 2. Efeitos de taxas de imposição (tamanho de vasos) e níveis de déficit hídrico sobre a eficiência fotoquímica máxima do FSII -  $F_v/F_m$  (a), eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII -  $F_v'/F_m'$  (b), coeficiente de extinção fotoquímica -  $q_p$  (c), rendimento quântico do transporte de elétrons -  $\phi_{FSII}$  (d), coeficiente de extinção não-fotoquímica - NPQ (e) e a fração de energia absorvida não utilizada na fotoquímica nem dissipada termicamente -  $P_E$  (f) em plantas de café. Outros detalhes conforme Figura 1

Tabela 1. Efeitos de taxas de imposição (tamanho de vasos<sup>1</sup>) e níveis de déficit hídrico sobre as concentrações foliares de clorofilas *a* (Cl *a*), *b* (Cl *b*) e totais (Cl totais), e de carotenóides (Car) em plantas de café. Estatística conforme Figura 1

Tamanho vasos (L)	Nível de déficit	Regime hídrico	Pigmentos (mg m <sup>-2</sup> )			
			Cl <i>a</i>	Cl <i>b</i>	Cl totais	Car
6	Moderado	Controle	501 ± 14 Ab	188 ± 14 Aa	689 ± 24 Ab	132 ± 4 Ab
6	Moderado	Estresse	492 ± 40 Aa	179 ± 16 Aa	671 ± 55 Aa	141 ± 8 Aa
6	Severo	Controle	473 ± 18 Ab	167 ± 6 Ab	640 ± 22 Ab	132 ± 3 Aa
6	Severo	Estresse	528 ± 23 Aa	187 ± 6 Aa	714 ± 28 Aa	144 ± 6 Aa
24	Moderado	Controle	620 ± 49 Aa	222 ± 15 Aa	842 ± 64 Aa	154 ± 9 Aa
24	Moderado	Estresse	597 ± 16 Aa	211 ± 8 Aa	808 ± 24 Aa	146 ± 1 Aa
24	Severo	Controle	605 ± 39 Aa	222 ± 15 Aa	827 ± 54 Aa	152 ± 9 Aa
24	Severo	Estresse	563 ± 57 Aa	198 ± 19 Aa	761 ± 74 Aa	147 ± 9 Aa

<sup>1</sup> 6 L : taxa de imposição rápida; 24 L: taxa de imposição lenta. Outros detalhes conforme Figura 1.

Os níveis foliares de prolina alteraram-se apenas sob déficit severo, nas plantas cultivadas nos vasos grandes, portanto, sob taxa lenta de imposição do déficit hídrico. Neste caso, verificou-se aumento de 212% nos níveis de prolina, em relação àqueles de plantas-controle (Figura 3a). O incremento nos níveis de prolina, que em valor absoluto equívaleu a um aumento de 18 mmol kg<sup>-1</sup> MS, possivelmente esteve associado ao aumento semelhante (21 mmol kg<sup>-1</sup> MS) verificado na concentração de aminoácidos livres totais, que passou de 9,4 mmol kg<sup>-1</sup> MS nas plantas-controle para 29,3 mmol kg<sup>-1</sup> MS nas plantas sob déficit severo cultivadas nos vasos grandes (dados não mostrados). O acúmulo de prolina na folha, sob condições de seca, pode contribuir para o ajustamento osmótico e, por extensão, para a manutenção da turgescência, fato de vital importância à atividade metabólica celular (Kramer e Boyer, 1995; Samaras et al. 1995; Monneveux e Belhassen, 1996; Mullet e Whitsitt, 1996). Segundo Blum (1996), o ajustamento osmótico é fortemente dependente, dentre outros fatores, da severidade do déficit hídrico e, principalmente, de sua taxa de imposição. Nesse caso, o ajustamento osmótico necessitaria de tempo, de forma que uma lenta redução no *status* hídrico da planta, como aquela verificada nas plantas cultivadas nos vasos grandes, permitiria a ocorrência do ajustamento. Nesse contexto, Pinheiro et al. (2005) verificaram que o clone 109A apresentou leve ajustamento osmótico quando foi submetido também a taxa lenta de imposição do déficit hídrico. Em todo o caso, no presente experimento, o possível

ajustamento osmótico e as alterações fotoquímicas supramencionadas pouco contribuíram para a manutenção das trocas gasosas em plantas de café submetidas ao déficit hídrico imposto lentamente. Ademais, sob déficit severo, o nível de danos celulares, estimado pelo extravazamento de eletrólitos, provavelmente causado pelo estresse oxidativo induzido pela seca, foi similar entre plantas submetidas a diferentes taxas de imposição do déficit (Figura 3b), aumentando em torno de 183% em relação às plantas-controle.

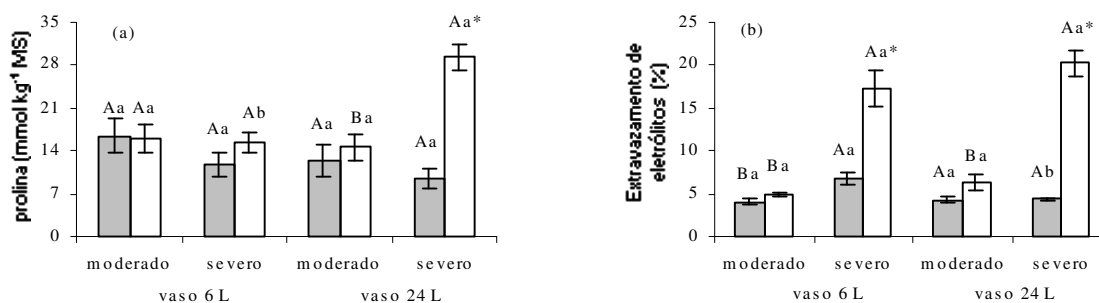


Figura 3. Efeitos de taxas de imposição (tamanho de vasos) e níveis de déficit hídrico sobre a concentração foliar de prolina e o extravazamento de eletrólitos em folhas de café. Outros detalhes conforme Figura 1.

Sob déficit hídrico moderado (-2,0 MPa), imposto rapidamente, as concentrações foliares de hexoses, sacarose e amido não se alteraram nas plantas estressadas, em relação às das plantas-controle, em ambos os horários de avaliação (Figura 4a-f). Entretanto, sob déficit severo (-4,0 MPa), nos vasos pequenos, os níveis foliares de hexoses aumentaram em 113 e 142%, às 08:00 e 13:00 h, respectivamente (Figura 4a, b), e os de sacarose e amido reduziram-se em 59 e 43 %, respectivamente, às 13:00 h, em relação àqueles observados nas plantas-controle (Figura 4d, f). Nas plantas dos vasos de 24 L, nas quais o déficit progrediu lentamente, os níveis de hexoses não se alteraram (Figura 4a, b); os de sacarose reduziram-se em 69% sob déficit severo, às 08:00 h (Figura 4c) e 36%, sob déficit moderado, às 13:00 h (Figura 4d); e os de amido reduziram-se em 61% sob déficit severo, às 08:00 h (Figura 4e) e, em aproximadamente, 64%, às 13:00 h, independentemente do nível de déficit imposto (Figura 4f).

Nos vasos pequenos, ainda pela manhã, os níveis de hexoses apresentaram-se elevados nas plantas submetidas ao déficit hídrico severo, comparados aos das plantas-controle (Figura 4a), sugerindo baixa demanda dos drenos para o consumo de carboidratos durante o período noturno. Ademais, no decorrer do fotoperíodo, o nível de hexoses aumentou ainda mais nessas

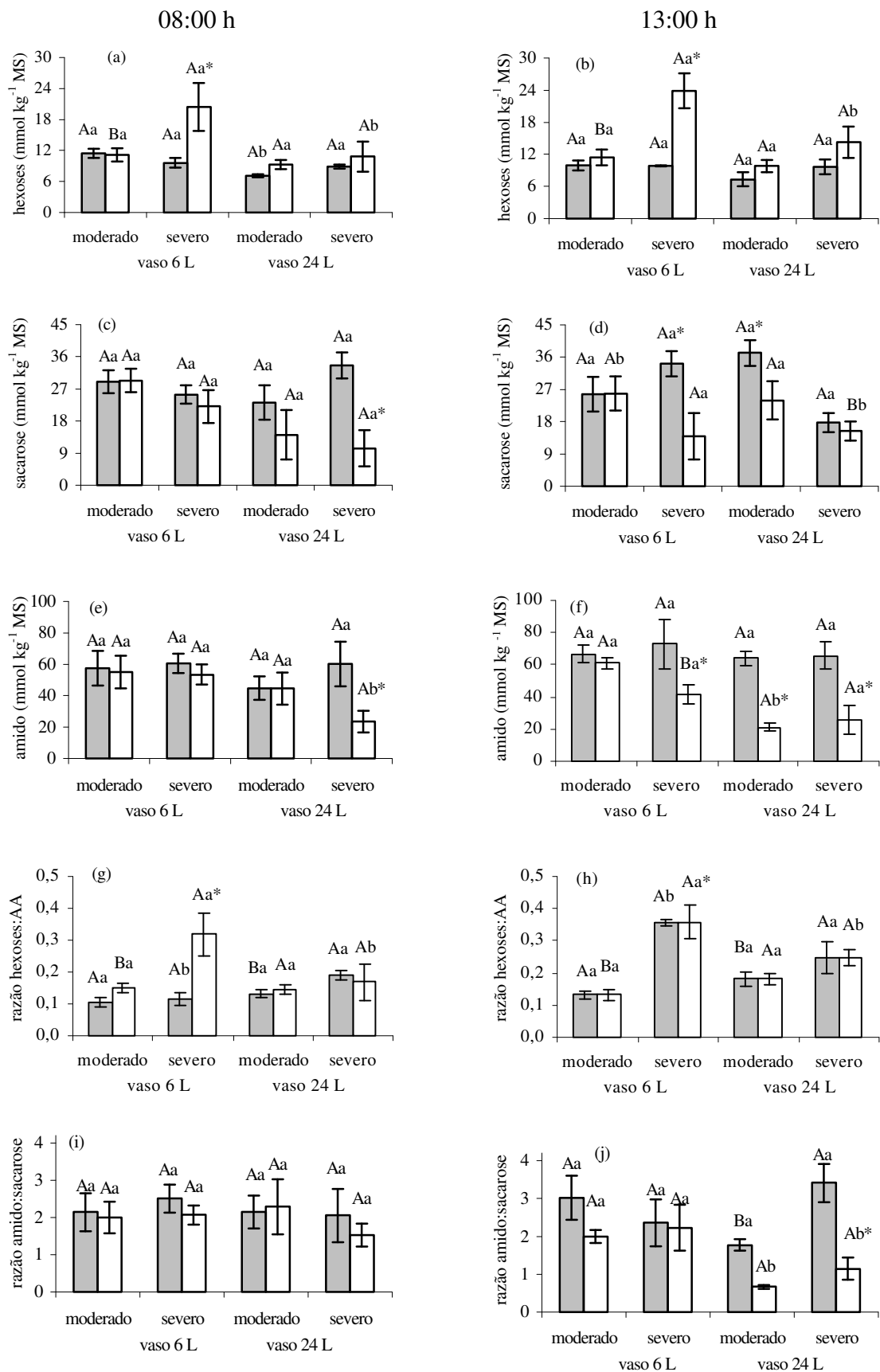


Figura 4. Efeitos de taxas de imposição (tamanho de vasos) e níveis de déficit hídrico sobre as concentrações foliares de hexoses (a, b), sacarose (c, d) e amido (e, f), e sobre as razões hexoses:aminoácidos (g, h) e amido:sacarose (i, j) em plantas de café, em dois horários no dia. Outros detalhes conforme Figura 1



plantas (Figura 4b). Considerando-se que as plantas dos vasos pequenos, sob déficit severo, tiveram suas taxas de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> suprimidas às 07:00 h (Figura 1a) e, também, às 13:00h (dados não mostrados), o aumento no nível de hexoses às 13:00 h ocorreu provavelmente em função da degradação de sacarose e amido (Figuras 4d, f). Contudo, nenhuma alteração significativa foi observada nas atividades da FBPase (Figura 5a, b) e SPS ( $V_{max}$  e  $V_{sel}$ ; Figura 5c, f) e, também, da Susy (Figura 5g, h) nas plantas dos vasos pequenos, independente do nível de déficit e horário de avaliação. Em relação às plantas-controle, a atividade da invertase ácida aumentou significativamente nas plantas sob déficit moderado, nos vasos de 6 L, e sob déficit severo, nos vasos de 24 L, ambas avaliadas às 08:00 h (Figura 5i, j). A redução de 43% no nível de amido nas plantas dos vasos de 6 L, sob déficit severo, às 13:00 h, foi acompanhada por redução de 38% na atividade da AGPase (Figura 6d) e de um aumento de 55% na atividade da SPase (Figura 6f), em relação às das plantas-controle. Sob condições de seca, geralmente, verifica-se redução na atividade das enzimas responsáveis pela síntese da sacarose, particularmente a SPS (Pelleschi et al., 1997; Foyer et al., 1998) enquanto a atividade das enzimas que degradam a sacarose - invertase ácida e SuSy (Pelleschi et al., 1997; Lawlor e Cornic, 2002) e o amido - SPase (Zeeman et al., 2004), aumentam.

Sob déficit hídrico severo, imposto rapidamente, o aumento no nível de hexoses poderia representar mecanismo de ajustamento osmótico, para retardar a desidratação (Daie, 1996; Lawlor e Cornic, 2002). Entretanto, o aumento no nível de hexoses parece mais uma consequência da restrição radicular que uma resposta de defesa da planta ao déficit hídrico. Isso é possível, pois, é pouco provável que o decréscimo de sacarose observado nas plantas dos vasos pequenos submetidas ao déficit hídrico severo esteja relacionado à exportação de fotoassimilados, uma vez que a razão hexoses:aminoácidos aumentou fortemente (161 e 260% às 08:00 e 13:00 h, respectivamente; Figura 4g, h) e, além disso, a razão amido:sacarose permaneceu inalterada nessas plantas (Figura 4i, j). Portanto, tomados em conjunto, estes resultados sugerem a ocorrência de processo acentuado de retroinibição da fotossíntese pela redução da força-dreno (Paul e Driscoll, 1997; Isopp et al., 2000; Paul e Foyer, 2001; Paul e Pellny, 2003), provavelmente em função do elevado grau de restrição radicular (pelo pequeno volume do vaso – 6 L), paralelamente à severidade do déficit hídrico.

Diferentemente do que ocorreu nos vasos pequenos, o nível de hexoses foram semelhantes pela manhã e à tarde nas plantas dos vasos de 24 L (Figura 4a, b), independentemente do nível de déficit. As concentrações de sacarose e amido reduziram-se tanto às 08:00 h como às 13:00 h, nas plantas estressadas, em comparação às das plantas-controle, independentemente do nível de déficit (Figura 4c-f). Verificou-se, também, constância na razão hexose:aminoácidos (Figura 4g, h) (Paul e Driscoll, 1997; Isopp et al., 2000),

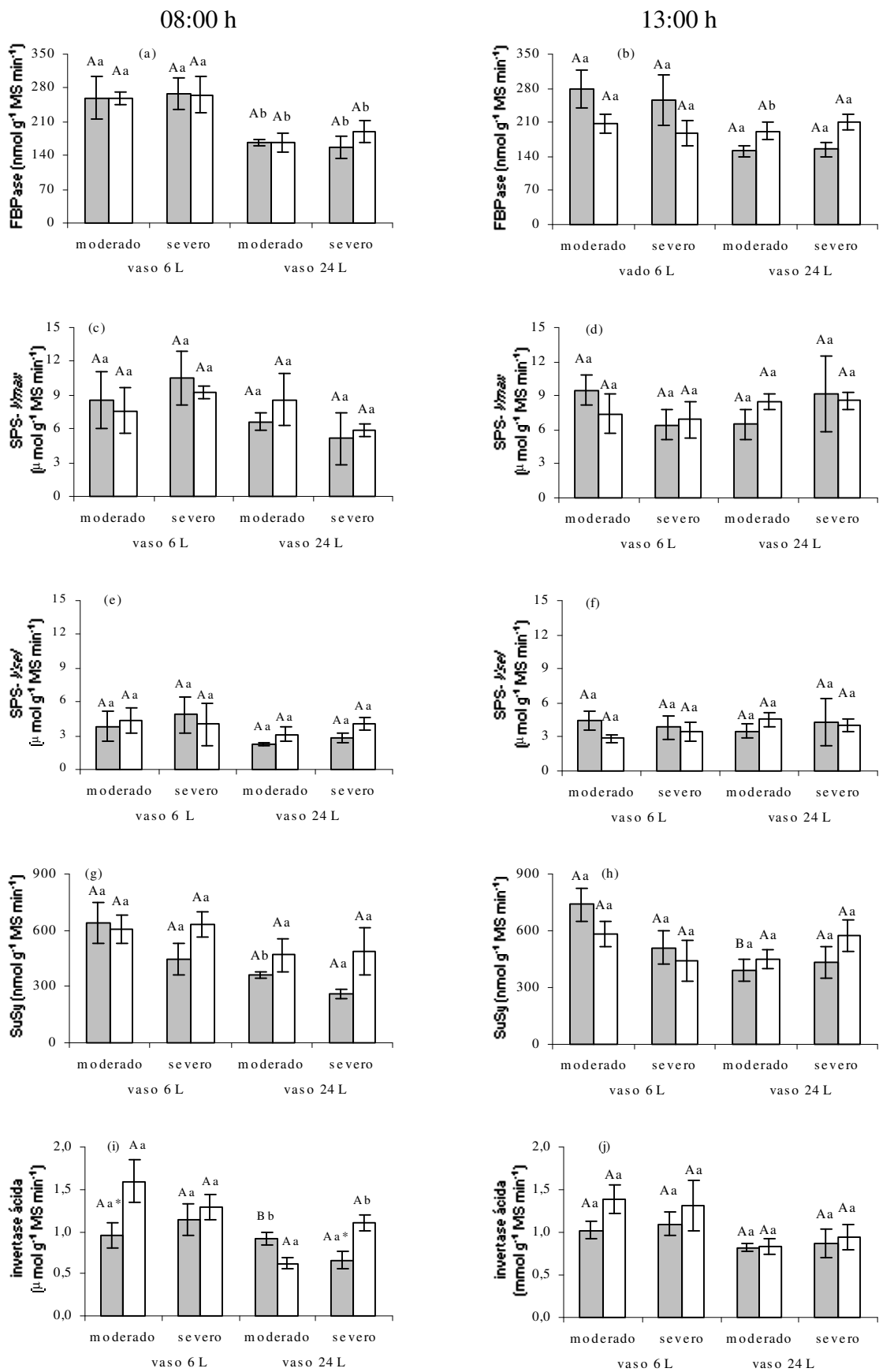


Figura 5. Efeitos de taxas de imposição e níveis de déficit hídrico na atividade de enzimas-chave na síntese de sacarose (FBPase: a, b; SPS: c, d, e, f) e sua degradação (SuSy: g, h; invertase ácida: i, j) em folhas de café, em dois horários no dia. Detalhes conforme Figura 1

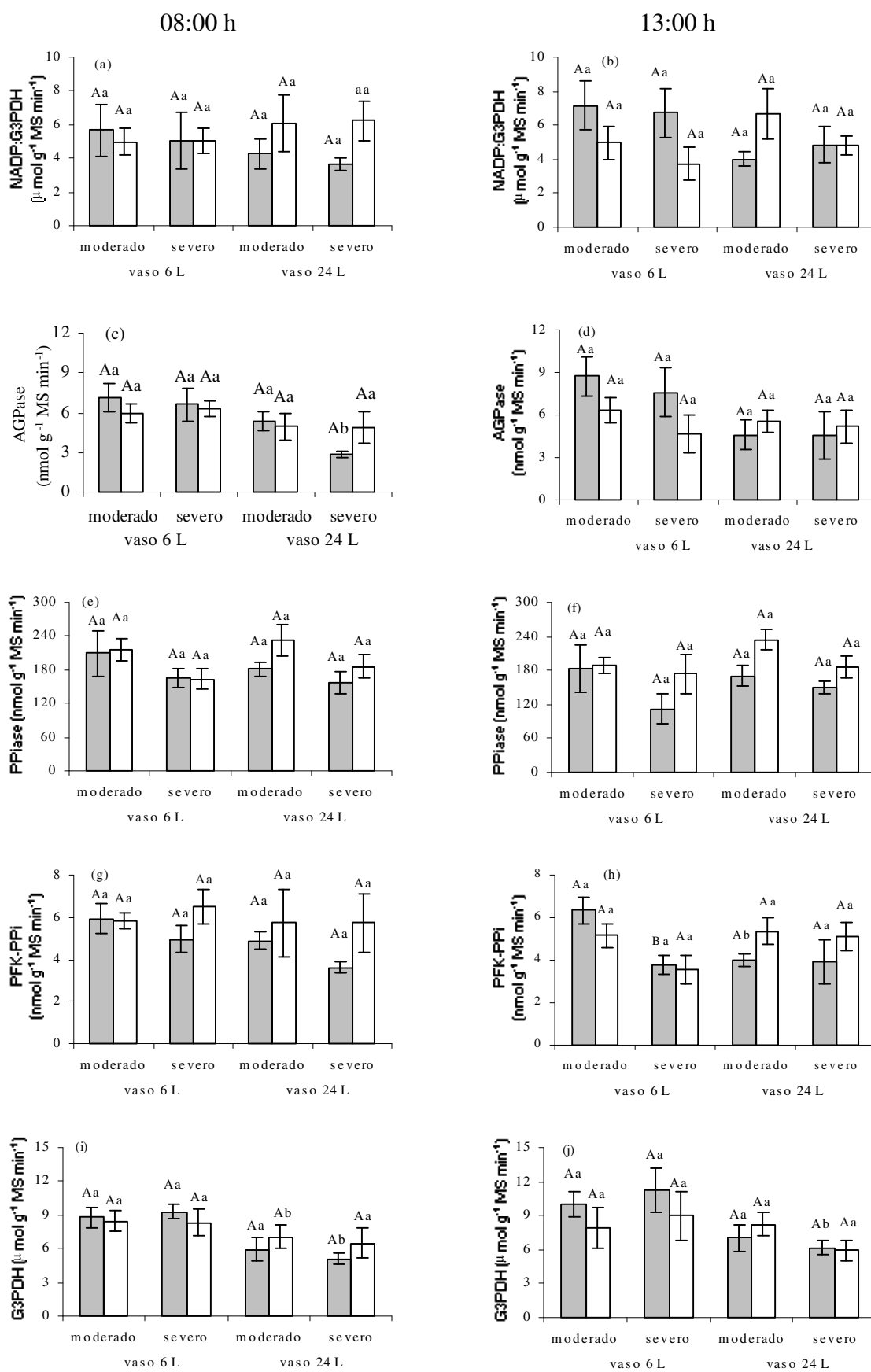


Figura 6. Efeitos de taxas de imposição (tamanho de vasos) e níveis de déficit hídrico sobre a atividade das enzimas NADP-G3PDH (a, b), AGPase (c, d), SPase (e, f), PPI-PFK (g, h) e G3PDH (i, j) em folhas de café, em dois horários no dia. Outros detalhes conforme Figura 1

associada a reduções mais pronunciadas nos níveis de amido em detrimento dos de sacarose (portanto, gerando forte redução na razão amido:sacarose nas plantas estressadas, principalmente às 13:00 h; Figura 4: j). Concomitantemente, estes resultados sugerem que a exportação de fotoassimilados foi mantida, ainda que a taxas reduzidas, nas plantas em que o déficit foi imposto lentamente (vasos de 24 L) (Lawlor, 2001). Logo, a manutenção do crescimento, provavelmente de raízes (drenos ativos), pode representar mecanismo importante para retardar a desidratação (Lawlor e Cornic, 2002; Pinheiro et al., 2004; Praxedes et al., 2005). Vale ressaltar, portanto, que, em virtude da lenta progressão do déficit hídrico, é possível que as plantas de café apresentem respostas de aclimação, tanto morfológicas como fisiológicas, para enfrentar o período de seca (DaMatta, 2003).

Apesar das alterações significativas verificadas no nível de carboidratos, nenhuma ou pequenas modificações ocorreram nas atividades das enzimas-chave no metabolismo do carbono nas plantas dos vasos grandes submetidas à seca (Figuras 5a-j; Figura 6a-j). É importante ressaltar que apenas experimentos de fluxo metabólico através das vias bioquímicas poderiam evidenciar desbalanços entre consumo e produção de substratos pelas enzimas. Todavia, apesar de as análises de atividades enzimáticas *in vitro* não permitirem conhecer-se a atual atividade dessas enzimas *in vivo*, elas refletem a capacidade potencial de uso de diferentes substratos (Lima et al., 2002; Pinheiro et al., 2004). Nas plantas dos vasos grandes, às 08:00 h, as atividades da SuSy e da invertase ácida aumentaram em 86 e 57%, respectivamente, sob déficit severo, em relação às das plantas-controle (Figura 5g, i); e a atividade da SPase aumentou, em média 10% ( $P > 0,05$ ), independentemente do nível de déficit e horário de avaliação (Figura 6: e, f). No clone 109A, submetido a uma taxa lenta de progressão do déficit hídrico, Praxedes et al. (2005) verificaram que, quando as plantas atingiram  $\Psi_{am}$  de  $-3,0$  MPa (no 19º dia após suspender-se a irrigação), o nível de hexoses aumentou (36%;  $P > 0,05$ ), o de amido reduziu-se (72%;  $P < 0,05$ ) e o de aminoácidos aumentou (67%;  $P < 0,05$ ), em relação aos das plantas irrigadas, corroborando, portanto, os resultados do presente experimento. Praxedes et al. (2005) verificaram, ainda, pouca ou nenhuma alteração nas atividades das enzimas-chave do metabolismo de carboidratos, com destaque apenas para reduções nas atividades da SuSy e SPS, que não foram aqui observadas.

Apesar das taxas diferenciais de imposição do déficit hídrico, devido a utilização de vasos de cultivo de volumes diferentes, pequenas foram as alterações nas respostas de aclimação fotossintética à seca, em café Canéfora, entre plantas cultivadas em vasos pequenos ou grandes. Observaram-se, apenas, como características de uma imposição lenta do déficit hídrico, em comparação ao déficit hídrico imposto rapidamente, ainda que em baixa magnitude, a manutenção de taxas fotossintéticas positivas, melhor adequação da taxa de

transporte de elétrons à taxa de consumo de poder redutor, uma possível manutenção da exportação de fotoassimilados (ainda que a taxas reduzidas), maior acúmulo de prolina e, aparentemente, melhor balanço entre as disponibilidades de carbono e nitrogênio (indicado pela relação hexoses:aminoácidos), necessárias ao crescimento. Estas respostas, mais evidentes sob déficit hídrico severo, podem revestir-se de importância no processo de retardamento da desidratação, caso a progressão do déficit hídrico ocorra lentamente. Todavia, o material genético utilizado neste experimento (clone 109A) é considerado sensível à seca (Lima et al., 2002; DaMatta, 2003; Pinheiro, 2004, 2005). O clone 109A apresenta controle estomático da transpiração não muito efetivo em relação aos clones testados por Pinheiro et al. (2005), o que deve resultar em taxas elevadas de transpiração e de rápida exaustão de água do solo, concorrendo para a sua baixa tolerância. De fato, no presente experimento, sob déficit moderado, não houve redução significativa em  $g_s$  e em  $E$ . Portanto, a baixa capacidade de aclimação deste clone, em resposta à taxa de imposição do déficit hídrico, poderia, em certa medida, estar associada à sua baixa tolerância à seca, conforme se observou empiricamente no campo e foi testado em experimentos sob condições controladas, sem limitação de crescimento radicular (Pinheiro et al., 2004, 2005; Praxedes et al., 2005). Por isso, não se descarta a possibilidade de que alguns clones de café Canéfora, que apresentem maior tolerância à seca, possam expressar os atributos que lhes conferem tal tolerância desde que a progressão do déficit hídrico seja lenta, como geralmente ocorre no campo.

#### 2.4. Literatura citada

- Almeida A.F., Maestri M. (1996) Characteristics of slow chlorophyll fluorescence emission in four *Coffea arabica* genotypes submitted to water stress. *Photosynthetica* 32, 161-169.
- Basu P.S., Sharma A., Garg I.D., Sukumaran N.P. (1999) Tuber sink modifies photosynthetic response in potato tuber under water stress. *Environmental and Experimental Botany* 42, 25-39.
- Bates L., Waldren R.P., Teare I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39, 205-207.
- Blum A. (1996) Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. In: Belhassen E. (Ed.) *Drought Tolerance in Higher Plants: Genetical, Physiological and Molecular Biological Analysis*, pp. 57-67. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Burrell M.M., Mooney P.J., Blundy M., Carter D., Wilson F., Green J., Blundy K.S., Rees T. A. (1994) Genetic manipulation of 6-phosphofructokinase in potato tubers. *Planta* 194, 95-101.

- Castrillo, M., Trujillo, I. (1994) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity and chlorophyll and protein contents in two cultivars of French bean plants under water stress and rewatering. *Photosynthetica* 30, 175-181.
- Chaves M.M. (1991) Effects of water deficit on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany* 42, 1-16.
- Cornic G. (2000) Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science* 5, 187-188.
- Cruz J.L., Mosquim P.R., Pelacani C.R., Araújo W.L., DaMatta F.M. (2003) Photosynthesis impairment in cassava leaves in response to nitrogen deficiency. *Plant and Soil* 257, 417-423.
- Daie J. (1996) Metabolic adjustments, assimilate partitioning, and alterations in source-sink relations in drought-stressed plants. In: Zamski E., Schaffer A.A. (Eds.) *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops*, pp. 407-420. Marcel Dekker, New York.
- DaMatta F.M. (2003) Drought as a multidimensional stress affecting photosynthesis in tropical tree crops. In: Hemantaranjan E. (Ed.) *Advances in Plant Physiology* 5, pp. 227-265. Jodhpur, Scientific Publishers.
- 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., 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., Maestri M., Barros R.S. (1997) Photosynthetic performance of two coffee species under drought. *Photosynthetica* 34, 257-264.
- Foyer C.H., Valadier M.-H., Migge A., Becker T.W. (1998) Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiology* 117, 283-292.
- Geigenberger P., Stitt M. (1993) Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta*, 189 329-339.
- Harada T., Ishizawa K. (2003) Starch degradation and sucrose metabolism during anaerobic growth of pondweed (*Potamogeton distinctus* A. Benn.) turions. *Plant and Soil* 253, 125-135.
- Häusler R.E., Rademacher T., Li J., Lipka V., Fischer K.L., Schubert S., Kreuzaler F., Hirsch H.-J. (2001) Single and double over-expression of C4-cycle genes had differential effects on the pattern of endogenous enzymes, attenuation of photorespiration and on contents of UV protectants in transgenic potato and tobacco plants. *Journal of Experimental Botany* 52, 1785-1803.
- Isopp H., Frehner M., Long S.P., Nösberger J. (2000) Sucrose-phosphate synthase responds differently to source-sink relations and to photosynthetic rates: *Lolium perene* L. growing at elevated  $p_{CO_2}$  in the field. *Plant, Cell and Environment* 23, 597-607.

- Jones H.G., Rawson H.M. (1979) Influence of rate of development of leaf water deficits upon photosynthesis, leaf conductance, water use efficiency and osmotic potential of sorghum. *Physiologia Plantarum* 45, 103-111.
- Kanechi M., Uchida N.U., Yasuda T., Yamaguchi T. (1988) Relationships between leaf water potential and photosynthesis of *Coffea arabica* L. grown under various environmental conditions as affected by withholding irrigation and re-irrigation. *Japanese Journal of Tropical Agriculture* 32, 16-21.
- Kanechi M., Uchida N.U., Yasuda T., Yamaguchi T. (1996) Non-stomatal inhibition associated with inactivation of Rubisco in dehydrated coffee leaves under unshaded and shaded conditions. *Plant Cell Physiology* 37, 455-460.
- Kramer P.J., Boyer J.S. (1995) *Water Relations of Plants and Soils*. Academic Press, San Diego.
- Lawlor D.H. (2001) *Photosynthesis*. Springer-Verlag, New York.
- Lawlor D.H., Cornic G. (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment* 25, 275-294.
- Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Colowick S.P., Kaplan N.O. (Eds.) *Methods in Enzymology* 148, pp. 350-382. Academic Press, San Diego.
- Lima A.L.S., DaMatta F.M., Pinheiro H.A., Totola M.R., Loureiro M.E. (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany* 47, 239-247.
- Maxwell K., Johnson G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51, 659-668.
- Monneveux P., Belhassen E. (1996) The diversity of drought adaptation in the wide world . In: Belhassen E. (Ed.) *Drought Tolerance in Higher Plants: Genetical, Physiological and Molecular Biological Analysis*, pp. 7-14. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Mullet J.E., Whitsitt M.S. (1996) Plant cellular responses to water deficit. In: Belhassen E. (Ed.) *Drought Tolerance in Higher Plants: Genetical, Physiological and Molecular Biological Analysis*, pp. 41-46. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Ort D.R., Baker N.R. (2002) A photoprotective role for O<sub>2</sub> as an alternative electron sink in photosynthesis? *Current Opinion in Plant Biology* 5, 193-198.
- Paul M.J., Driscoll S.P. (1997) Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signaling nitrogen deficiency through source sink-imbalance. *Plant, Cell and Environment* 20, 110-116.
- Paul M.J., Foyer C.H. (2001) Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52, 1383-1400.
- Paul M.J., Pellny T.K. (2003) Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany* 54, 539-547.

- Pelleschi S., Rocher J.-P., Prioul J.-L. (1997) Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. *Plant, Cell and Environment* 20, 493-503.
- Pinheiro H.A., DaMatta F.M., Chaves A.R.M., Fontes E.P.B., Loureiro M.E. (2004) Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Science* 167, 1307-1314.
- Pinheiro H.A., DaMatta F.M., Chaves A.R.M., Loureiro M.E., Ducatti C. (2005) Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. *Annals of Botany* 96, 101-108.
- Praxedes S.C., DaMatta F.M., Loureiro M.E., Ferrão M.A.G., Cordeiro A.T. (2005) Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. *Environmental and Experimental Botany*, no prelo.
- Ray J.D., Sinclair T.R. (1998) The effect of pot size on growth and transpiration of maize and soybean during water deficit stress. *Journal of Experimental Botany* 49, 1381-1386.
- Samaras Y., Bressan R.A., Csonka L.N, García-Ríos M.G., Paino D'Urzo M., Rhodes D. (1995) Proline accumulation during drought and salinity. In: Smirnoff N. (Ed.) *Environment and Plant Metabolism*, pp. 161-187. Bios Scientific Publishers, Oxford.
- Stitt M., Lilley R.M.C., Gerhard R., Heldt H.W. (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods in Enzymology* 174, 518-552.
- Townend J., Dickinson A.L. (1995) A comparison of rooting environments in containers of different sizes. *Plant and Soil* 175, 139-146.
- 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.
- Vu J.C.V., Baker J.T., Pennanen A.H., Allen Jr. H., Bowes G., Boote K.J. (1998) Elevated CO<sub>2</sub> and water deficit effects on photosynthesis, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, and carbohydrate metabolism in rice. *Physiologia Plantarum* 103, 327-339.
- Will R.E., Teskey R.O. (1997) Effects of elevated carbon dioxide concentration and root restriction on net photosynthesis, water relations and foliar carbohydrate status of loblolly pine seedlings. *Tree Physiology* 17, 655-661.
- Zeeman S.C., Smith S.M., Smith A.M. (2004) The breakdown of starch in leaves. *New Phytologist* 163, 247-261.



#### IV. Conclusões gerais

Neste trabalho, foram feitos dois experimentos, conduzidos separadamente e analisados como tal, para investigar (i) os efeitos da restrição do volume radicular no crescimento e aclimatação fotossintética em *Coffea arabica* e (ii) os efeitos de taxas de imposição e severidade do déficit hídrico sobre a fotossíntese e metabolismo de carboidratos em *C. canephora*.

No primeiro experimento, o aumento da restrição radicular causou forte redução no crescimento da planta, associada ao aumento na razão raiz:parte aérea. A concentração de N reduziu-se fortemente com o incremento da restrição radicular, apesar da disponibilidade adequada desse nutriente no substrato. As taxas fotossintéticas foram severamente reduzidas pelo cultivo das plantas em vasos de pequeno volume, devido, principalmente, a limitações não-estomáticas, como, por exemplo, à redução na atividade da Rubisco. As taxas fotossintéticas correlacionaram-se significativamente e negativamente com a razão hexose:aminoácidos, mas não com os níveis de hexoses *per se*. As atividades de invertase ácida, sintase da sacarose, sintase da sacarose-fosfato, bisfosfatase da frutose-1,6-bisfosfato, pirofosforilase da ADP-glucose, fosforilase do amido, desidrogenase do gliceraldeído-3-P, fosfofrutocinase dependente de PPi e desidrogenase do NADP:gliceraldeído-3-P, e as razões 3-PGA:Pi e glicose-6-P:frutose-6-P decresceram com o incremento da restrição radicular. A aclimatação da maquinaria fotossintética não se mostrou relacionada a limitações diretas pela redução na síntese de produtos finais da fotossíntese, mas sim às reduções na atividade da Rubisco. A aclimatação fotossintética em café foi reflexo do *status* deficiente de N da planta, que ocorreu devido ao cultivo do cafeeiro em vasos pequenos.

No segundo experimento, a aclimatação da maquinaria fotossintética de *C. canephora* à seca ocorreu principalmente em resposta ao aumento na severidade do déficit

hídrico, sendo, contudo, pouco afetada pela taxa de imposição do déficit. Entretanto, o metabolismo de carboidratos alterou-se em resposta à seca, em função da taxa de imposição do déficit hídrico. Enquanto nas plantas dos vasos pequenos verificou-se possível redução na exportação de fotoassimilados e acúmulo de hexoses, provavelmente a partir da degradação de sacarose e amido, naquelas cultivadas nos vasos grandes foi mantida, parcialmente, a exportação de fotoassimilados, o que permitiu o crescimento (provavelmente de raízes), mesmo que as taxas reduzidas. Além disso, nas plantas dos vasos grandes, verificou-se aumento acentuado no nível de prolina. Estas respostas, mais evidentes sob déficit hídrico severo, podem revestir-se de importância no processo de retardamento da desidratação, caso a progressão do déficit ocorra lentamente. É importante ressaltar, também, que o clone 109A é considerado sensível à seca, o que poderia explicar, em certa medida, a baixa capacidade de aclimação deste clone, em resposta à taxa de imposição do déficit hídrico. Por isso, não se descarta a possibilidade de que clones de café canéfora, que apresentem maior tolerância à seca, possam apresentar respostas diferenciais de aclimação da maquinaria fotossintética à taxa de imposição do déficit hídrico.