

**SIDNEY CARLOS PRAXEDES**

**Efeito do déficit hídrico no metabolismo fotossintético de clones de  
*Coffea canephora* cv. Conilon com tolerância diferencial à seca**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2003**

**SIDNEY CARLOS PRAXEDES**

**Efeito do déficit hídrico no metabolismo fotossintético de clones de  
*Coffea canephora* cv. Conilon com tolerância diferencial à seca**

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

Aprovada em 17 de dezembro de 2003

---

Fábio Murilo DaMatta  
(Conselheiro)

---

Paulo Roberto Mosquim

---

Marco Aurélio Pedron e Silva

---

Ney Sussumu Sakiyama

---

Marcelo Ehlers Loureiro  
(Orientador)

## ***DEDICO***

**À companheira e amiga Maria de Lourdes Figueiredo por esta e outras conquistas.**

Aos colegas: Adriano Simões, Alessandro Waclawovsky, Carmen Rodriguez, Cláudio Ronchi, Danilo Centeno, Fábio Mendonça, Francisco Lobo, Frank Pinheiro, Gilberto Justino, Laudiene Meyer, Marilice Chapper, Natália Rust, Rogério Ribas, Silvane Vestena, Ueliton Messias.

## ***OFEREÇO***

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao professor Marcelo Ehlers Loureiro, pela orientação e apoio durante todo o mestrado.

Ao professor Fábio Murilo DaMatta, pelo apoio e conselhos durante a realização e redação deste trabalho.

Aos professores Paulo Roberto Mosquim e Elisabeth Pacheco Batista Fontes pelos ensinamentos e ajuda.

Aos colegas do laboratório Maria Mercês, Carlos Raimundo, Geraldo “Marreco”, Agnaldo Chaves, Werner Antunes, Hugo Pinheiro, Karine Batista e Wagner Araújo pelo apoio e amizade.

Aos companheiros de república Tassiano Maxwell e Samuel Ângelo pelo convívio, amizade e ajuda.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho, o meu respeito e gratidão.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
INTRODUÇÃO .....	1
MATERIAL E MÉTODOS .....	6
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	12
1) <i>Status</i> hídrico e trocas gasosas .....	12
2) Parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i> e pigmentos fotossintéticos .....	13
3) Carboidratos e aminoácidos .....	14
4) Enzimas do metabolismo de carboidratos .....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27

## RESUMO

PRAXEDES, Sidney Carlos, M. S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2003, **Efeito do déficit hídrico no metabolismo fotossintético de clones de *Coffea canephora* cv. Conilon com tolerância diferencial à seca**. Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Conselheiros: Fábio Murilo DaMatta e Elisabeth Pacheco Batista Fontes.

Os efeitos do déficit hídrico no metabolismo dos carboidratos, foram investigados em quatro clones de *Coffea canephora* Pierre cv. Conilon, com tolerância diferencial à seca. Quando o potencial hídrico foliar na antemanhã ( $\Psi_w$ ) decresceu para valores em torno de  $-2$  e  $-3$  MPa, estresse hídrico moderado e severo, respectivamente, houve redução na fotossíntese líquida, provocada principalmente pelo fechamento dos estômatos, visto que, não houve fotoinibição nem alteração nos teores de clorofilas *a* e *b*. Sob estresse hídrico severo houve aumento na concentração foliar de sacarose nos clones tolerantes à seca (120 e 14). Porém, com exceção do clone 120, todos apresentaram redução na atividade da sintase da sacarose-fosfato, que ficou mais bem evidenciada no ensaio seletivo, principalmente sob estresse hídrico severo. O clone 120 foi o único também em que foi verificado estímulo da fosfatase da frutose-1,6-bisfosfato, sob estresse hídrico. Uma tendência geral de estímulo na atividade da invertase ácida foi verificada, principalmente sob estresse hídrico severo, sendo que somente no clone 14, nesse nível de estresse houve aumento na atividade da invertase alcalina. Entretanto, não se verificaram grandes alterações nos níveis de hexoses. A sintase da sacarose não teve sua atividade alterada. Tanto sob estresse hídrico moderado quanto severo, verificou-se redução no conteúdo de amido, em todos os clones. No entanto, apenas nos clones 14 e 46, houve redução na atividade da pirofosforilase da ADP-glicose. Os clones 120 e 109A também apresentaram uma tendência de aumento na concentração de aminoácidos, que ficou mais bem evidenciada sob estresse hídrico severo. A atividade da cinase da frutose-6-fosfato, não foi alterada em resposta ao déficit hídrico, sugerindo que não houve alteração no fluxo glicolítico. Apesar da complexidade apresentada com

relação a atividade das enzimas de metabolismo dos carboidratos, esses resultados permitem sugerir que os clones mais tolerantes acumulam mais açúcares solúveis sob estresse hídrico, indicando maior eficiência fotossintética.

## ABSTRACT

PRAXEDES, Sidney Carlos, M. S., Universidade Federal de Viçosa, December 2003, **Effect of water déficit in the photosynthetic metabolism of *Coffea canephora* cv. Conilon clones with differential drought tolerance**. Adviser: Marcelo Ehlers Loureiro. Committee Members: Fábio Murilo DaMatta and Elisabeth Pacheco Batista Fontes.

The effects of water deficit on carbohydrate metabolism were investigated in four clones of *Coffea canephora* Pierre cv. Conilon, with differential drought tolerance. When the leaf predawn water potential ( $\Psi_w$ ) decreased for values around  $-2$  and  $-3$  MPa, moderate and severe water stress, respectively, there was reduction in the net photosynthesis, provoked mainly by the closing of the stomata, because, there probably were not photoinhibition nor alteration in the levels of chlorophylls *a* and *b*. Under severe water stress there was increase in the leaf concentration of sucrose in the drought tolerant clones (120 and 14). However, except for the clone 120, all presented reduction in the activity of the sucrose-phosphate sintase, that was better evidenced in the selective assay, under severe water stress. The clone 120 was also the only in that increase in the activity of fructose-1,6-bisphosphate phosphatase was verified under water stress. A general tendency of increase in the activity of acid invertase was verified, mainly under severe water stress, and only in the clone 14, in that stress level, there was increase in the activity of the alkaline invertase. However, great alterations were not verified in the hexoses levels. There was not alteration in the activity of sucrose sintase. Under moderate and severe water stress, reduction was verified in the levels of starch, in all the clones. However, only in the clones 14 and 46, there was reduction in the activity of the ADP-glucose pirophosphorilase. The clones 120 and 109A also presented a tendency to increase the concentration of amino acids, that was better evidenced under severe water stress. The activity of fructose-6-phosphate kinase was not altered in response to water déficit, suggesting



that there was not alteration in the glycolytic path. In spite of the complexity presented with relationship the activity of the enzymes of carbohydrate metabolism, those results allow us to suggest that the most tolerant clones accumulate more soluble sugars under water stress, indicating better photosynthetic efficiency.

## INTRODUÇÃO

A redução na produtividade provocada pela seca pode ser devido a um declínio na capacidade fotossintética, tanto pelo efeito direto da desidratação no aparato fotossintético, quanto por um efeito indireto associado ao fechamento estomático (Chaves, 1991; Lawlor e Cornic, 2002). Na medida em que o déficit se torna mais severo, ocorrem várias alterações, que incluem o aumento na resistência mesofílica à difusão de CO<sub>2</sub>, alterações nas reações fotoquímicas e na atividade das enzimas da fase bioquímica da fotossíntese, bem como das enzimas do metabolismo dos carboidratos e do nitrogênio (Foyer *et al.*, 1994; Boyer, 1995; Kanechi *et al.*, 1996; Palleschi *et al.* 1997). DaMatta *et al.* (1997a) observaram, em *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho, que a redução na fotossíntese nas fases iniciais da seca é governada, principalmente, por fatores não-estomáticos, enquanto em *C. canephora* cv. Conilon fatores estomáticos estariam associados com a redução do seu desempenho fotossintético. Contudo, sob déficit hídrico severo, limitações não-estomáticas foram as mais importantes no controle das taxas fotossintéticas em ambos os cultivares. Em quatro genótipos de *C. arabica* submetidos a déficit hídrico, Almeida e Maestri (1997) também verificaram que houve inibição não-estomática da fotossíntese.

O acúmulo de açúcares solúveis, induzido pela seca, tem sido relatado como fenômeno associado à inibição da fotossíntese em várias culturas (Chaves, 1991; Lawlor e Cornic, 2002). A hexose é um potente inibidor da fotossíntese, e seu nível elevado nas folhas ou seu aparecimento transientemente, pode iniciar uma retro-inibição de enzimas do ciclo de Calvin (Sheen, 1990). De todas as espécies que Goldschmidt e Huber (1992) trabalharam, as que apresentaram maior inibição da taxa fotossintética em condições saturantes de CO<sub>2</sub> foram aquelas com alta atividade da invertase ácida nas folhas. Essa correlação levou os autores a sugerirem que a inibição da fotossíntese pode envolver a ciclagem de sacarose e hexoses nas folhas, que resultaria em regulação negativa do ciclo de Calvin. Todavia, o mecanismo de inibição da fotossíntese pelo acúmulo de açúcares ainda não está bem estabelecido. O acúmulo de carboidratos é muito variável entre as espécies, quando da inibição da fotossíntese (Goldschmidt e Huber, 1992), e pode

ser regulado pelos níveis dos metabólitos fotossintéticos, e não necessariamente pela ação dos produtos finais propriamente ditos (Geiger, 1987; Plaut *et al.*, 1987; Bagnall *et al.*, 1988; Foyer, 1988).

As hexoses podem também seqüestrar o fosfato inorgânico (Pi) livre no citossol, durante a refosforilação, diminuindo assim o Pi dos cloroplastos (Foyer, 1988), resultando em outra causa da inibição da fotossíntese. Para Herold (1980) e Herold *et al.* (1980), a redução na taxa de assimilação fotossintética de carbono é provocada por uma redução na reciclagem de Pi para os cloroplastos. O aumento nas taxas de hidrólise da sacarose ligado à refosforilação de hexoses livres para glicose e frutose-fosfato resulta em um seqüestro do fosfato citossólico. Esse mesmo mecanismo foi considerado como responsável pela inibição da fotossíntese em discos foliares de soja e espinafre com deficiência de fósforo (Foyer, 1988), quando a adição exógena de sacarose e glicose foi acompanhada pela redução dos níveis de Pi e aumento dos níveis de hexoses. Morcuende *et al.* (1997) também encontraram evidências de que aquele mecanismo seja o responsável pela inibição da fotossíntese em folhas de trigo tratadas com sacarose ou glicerol.

Em discos foliares de espinafre submetidos a déficit hídrico, Quick *et al.* (1989) observaram que a inibição da fotossíntese foi acompanhada por um pequeno aumento da razão triose-fosfato:ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP), o que indica que a regeneração da RuBP foi afetada. Krapp *et al.* (1991) verificaram uma redução na atividade da carboxilase-oxigenase da RuBP (Rubisco), fosfatase da frutose-1,6-bisfosfato (FBPase) cloroplastídica e desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato, quando forneceram glicose a folhas destacadas de espinafre. Adicionalmente, Krapp *et al.* (1993) demonstraram que a adição de glicose a cultivos autotróficos de células de *Chenopodium* levou a uma diminuição rápida e reversível do nível de transcritos do gene responsável pela subunidade pequena da Rubisco. Esses trabalhos não fornecem evidências de que a limitação de fosfato seja a responsável pela retro-inibição da fotossíntese, mas sugerem que a inibição da fotossíntese foi provocada por alteração na atividade de enzimas do ciclo de Calvin. Em uma cultivar de café arábica, Kanechi *et al.* (1996) verificaram que a inibição da fotossíntese em plantas submetidas a déficit hídrico rápido estava associada com a inibição da atividade da Rubisco.

De acordo com Lawlor e Cornic (2002), é muito improvável, todavia que o acúmulo de assimilados resulte em uma retro-inibição da fotossíntese em plantas submetidas a déficit hídrico. Esse argumento é baseado em observações prévias de que o conteúdo de sacarose diminui rapidamente em folhas estressadas de girassol, devido à redução da fotossíntese e continuação da respiração juntamente com a síntese de aminoácidos (Lawlor e Fock, 1977).

A produção de assimilados nas folhas, bem como a sua translocação para regiões em crescimento, é regulada pela partição entre a biossíntese de amido e sacarose. Plantas  $C_3$  sob deficiência hídrica acumulam menos amido (Munns e Pearson, 1974; Ferrario-Méry *et al.*, 1998) e mais sacarose (Quick *et al.*, 1989, 1992) que plantas em condições hídricas normais, o que pode ser atribuído a uma síntese reduzida de amido (Foyer, 1988; Quick *et al.*, 1989), ou à sua degradação (Fox e Geiger, 1986).

Geralmente é aceito que os pontos de controle da síntese de sacarose nas folhas residiriam na sintase da sacarose-fosfato (SPS) e na FBPase citoplasmática (Taiz e Zeiger, 2002). A atividade da SPS é grandemente reduzida em plantas submetidas a déficit hídrico (Lawlor e Cornic, 2002; Chaitanya *et al.*, 2003), sendo que, muitos trabalhos, apresentam evidências de que essa redução está associada à diminuição da concentração subestomática de  $CO_2$  ( $C_i$ ) (Quick *et al.*, 1989; Vassey *et al.*, 1991; Li *et al.*, 2001; Aoki *et al.*, 2003; Widodo *et al.*, 2003). No entanto, em algumas espécies submetidas a déficit hídrico, sob concentração externa saturante de  $CO_2$ , verifica-se ativação da SPS (Quick *et al.*, 1989; Zrenner e Stitt, 1991; Basu *et al.*, 1999).

Uma vez que não é observada grande variação no *pool* de sacarose ao longo do dia (Quick *et al.*, 1992), e que em folhas de várias espécies submetidas a déficit hídrico há acúmulo de açúcares solúveis (Pelleschi *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 2002), pode-se sugerir que esse acúmulo esteja relacionado a algum tipo de inibição da exportação de sacarose, presumivelmente como resultado da redução da demanda dos drenos (Quick *et al.*, 1989; Pereira e Chaves, 1993). Com a redução do conteúdo relativo de água, ocorre uma redução substancial, se não total, na expansão dos órgãos (Lawlor e Cornic, 2002), resultando em limitação no consumo de carboidratos pelos drenos (Quick *et al.*, 1989). Assim, o acúmulo de carboidratos

pode sugerir que a fotossíntese, de forma geral, é menos afetada que a demanda total por assimilados (Lawlor e Cornic, 2002), indicando, mais uma vez, que o acúmulo de açúcares solúveis não resultaria em inibição da fotossíntese. A capacidade de exportação das folhas provavelmente não é afetada pela redução no conteúdo de água (Taiz e Zeiger, 2002), mas pode diminuir quando a síntese de sacarose é muito limitada (Lawlor e Fock, 1977).

Tal acúmulo de carboidratos também pode ser uma forma de a planta se adaptar às condições hídricas desfavoráveis do solo, por meio de osmoregulação (Lawlor e Cornic, 2002), sendo que, nesse caso, o acúmulo de açúcares solúveis geralmente é acompanhado por um aumento na atividade da invertase ácida (Pelleschi *et al.*, 1997). Alguns cultivares de café realizam ajuste osmótico, sob déficit hídrico (DaMatta *et al.*, 1993), o que concorda com o acúmulo de açúcares, observado por DaMatta *et al.* (1997a). Entretanto, não está claro se existe uma relação entre a manutenção das taxas de fotossíntese e o ajuste osmótico, nessas condições.

No Brasil, e especialmente no estado do Espírito Santo, o cultivo do café Robusta (*Coffea canephora* Pierre) tem-se expandido para áreas marginais, onde a deficiência hídrica é o principal fator limitante à produção. A solução tradicional para a escassez de água na agricultura é a irrigação. Porém, a irrigação não pode ser aplicada com facilidade em toda região de cultivo do café, ficando mais restrita às áreas de topografia plana; além disso, os custos elevados restringem a sua aplicação a pequenos produtores, os quais são responsáveis por grande parcela da produção nacional de café. Nos últimos anos, foram lançados alguns clones de Robusta promissores, no que respeita a tolerância à seca (Ferrão *et al.*, 2000). Contudo, a nível bioquímico, pouco se sabe sobre o mecanismo de tolerância à seca em café (Lima *et al.*, 2002; DaMatta *et al.*, 2002a, 2002b, 2003).

Estudos preliminares, de natureza empírica, feitos em Sooretama (ES), mostraram que há grande diversidade genética entre clones de café Robusta quanto à tolerância à seca (Ferrão *et al.*, 2000). Nesses clones, foram observadas grandes diferenças quanto ao crescimento da parte aérea, *status* hídrico foliar e perda de folhas. Quatro clones selecionados a partir desses estudos mostraram respostas diferenciais quanto aos mecanismos de tolerância à seca, destacando-se clones que

mantêm a condutância estomática ( $g_s$ ) mesmo sob potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) de antemanhã menor que -2,5 MPa. Nesses materiais, parece haver deficiência no controle estomático e, por essa razão, a assimilação líquida de carbono é mantida às expensas de perda de água. Isso sugere que, se os estômatos permanecem com alto grau de abertura, a maquinaria bioquímica é capaz de reduzir o  $CO_2$ , mesmo a baixo  $\Psi_w$ . Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar mecanismos bioquímicos de tolerância à seca, associados ao metabolismo do carbono.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG (20°45'S, 42°54'W, 651 m de altitude), em casa de vegetação. Utilizaram-se tambores de polipropileno com capacidade para 120 L, medindo 0,80 m de altura e 0,44 m de diâmetro, com uma planta por tambor. Foi colocada uma camada de, aproximadamente, 40 mm de brita no fundo do tambor, sendo os espaços entre as britas preenchidos com areia. O volume restante foi preenchido com uma mistura constituída de três partes de solo, uma parte de esterco de curral e uma de areia. A adubação foi feita de acordo com a análise de solo, segundo recomendações da Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais (1990), na ocasião do plantio das mudas, que foram obtidas a partir de estacas enraizadas. As plantas foram mantidas irrigadas e adubadas até a aplicação dos tratamentos, no mês de fevereiro de 2002, quando completaram 12 meses de idade. A intensidade média de fluxo de fótons fotossintético na casa de vegetação, na época de aplicação dos tratamentos, foi de  $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ao meio-dia.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial 4x2 (quatro clones de *Coffea canephora* Pierre var. Conillon x dois regimes hídricos), com cinco repetições. Cada tambor constituiu-se numa parcela experimental. Os clones utilizados foram dois tolerantes (120 e 14) e dois suscetíveis (109A e 46) à seca, enquanto os regimes hídricos utilizados foram deficiência hídrica, imposta pela suspensão da irrigação, e controle continuamente irrigado.

As plantas foram mantidas sem limitações hídricas durante todo o período antes da imposição dos tratamentos. Após a última irrigação, todos os tambores tiveram a superfície do solo coberta com palha para minimizar a evaporação superficial. A irrigação foi suspensa até que o  $\Psi_w$  na antemanhã, das plantas submetidas à deficiência hídrica, atingisse aproximadamente  $-2,0$  e  $-3,0$  MPa, déficit hídrico considerado moderado e severo, respectivamente, baseado em observações anteriores. Nas plantas irrigadas o  $\Psi_w$  não foi maior que  $-0,1$  MPa. Nestes níveis de déficit foram efetuadas medições de parâmetros fisiológicos e coleta de amostras foliares, na 3ª ou 4ª folha completamente expandida dos ramos

plagiotrópicos. Evitou-se coletar amostras com a nervura central e as nervuras laterais mais espessas.

Avaliaram-se os seguintes parâmetros:

a) **Potencial hídrico da folha** – determinado em folhas individuais com uma bomba de pressão tipo Scholander, na antemanhã.

b) **Trocas gasosas** – a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A$ ),  $g_s$  e  $C_i$ , foram estimadas com um analisador portátil de gases no infravermelho (LCA-4, ADC, Hoddesdon, Reino Unido), em sistema aberto, sob luz saturante e concentração ambiente de CO<sub>2</sub>, por volta das 08:00 h, conforme descrito em DaMatta *et al.* (1997b).

c) **Parâmetros de fluorescência** – a fluorescência da clorofila *a* foi medida com um fluorômetro de pulso modulado (FMS2, Hansatech, King's Lynn, Norfolk, Reino Unido), usando luz actínica com intensidade de fluxo fotossintético de 900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  por 480 s, e um pulso de 1 s de luz saturante de 6.000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As medições da razão entre a fluorescência máxima e variável ( $F_v/F_m$ ) e fluorescência variável e máxima após tratamento com luz actínica ( $F_v'/F_m'$ ) foram feitas após adaptação das folhas a 30 min de escuridão. O coeficiente de extinção fotoquímico ( $q_P$ ), coeficiente de extinção não fotoquímico de Stern-Volmer (NPQ) e o rendimento quântico do transporte de elétrons do fotossistema II ( $\phi_{FSII}$ ) foram calculados conforme descrito em Schreiber *et al.* (1995).

d) **Açúcares solúveis, pigmentos fotossintéticos e aminoácidos**

d.1) **Obtenção dos extratos etanólicos**: discos foliares de 12 mm de diâmetro foram coletados por volta das 11:00 h. Os discos foram rapidamente homogeneizados e dois armazenados, separadamente, para cada amostra, contendo aproximadamente 20 mg de massa fresca em cada disco. Os discos foram armazenados em microtubos de 1,5 mL, congelados em nitrogênio líquido e mantidos a  $-80^\circ\text{C}$ , até a obtenção dos extratos etanólicos. Os discos foram triturados dentro do microtubo de armazenamento, em 250  $\mu\text{L}$  de etanol 80%, agitados e incubados por 20 min, a  $80^\circ\text{C}$ . Após, foram centrifugados a 16.000  $g$  em microcentrífuga, coletando-se o sobrenadante, que foi armazenado em outro microtubo em gelo. Ao resíduo adicionaram-se 150  $\mu\text{L}$  de etanol 80%, novamente agitou-se, incubou-se e centrifugou-se, como anteriormente. Ao novo



resíduo adicionaram-se 250  $\mu\text{L}$  de etanol 50% e feito o mesmo procedimento descrito anteriormente. Os sobrenadantes foram combinados e usados para a determinação de açúcares solúveis e pigmentos; o resíduo armazenado foi utilizado para determinação de amido.

d.2) **Pigmentos fotossintéticos:** clorofilas (*a* e *b*) foram determinadas em leitor de ELISA (Tunable Microplate Reader, VERSAmax, Sunnyvale, EUA). Em uma microplaca adicionaram-se 25  $\mu\text{L}$  do extrato etanólico e 145  $\mu\text{L}$  de etanol 98%, lendo-se a densidade óptica (DO) a 645 e 665 nm. As seguintes fórmulas foram usadas para quantificação dos pigmentos em  $\mu\text{g}$  por célula da microplaca: clorofila a =  $5,48A_{665} - 2,16A_{645}$  e clorofila b =  $9,67A_{645} - 3,04A_{665}$ .

d.3) **Açúcares solúveis:** foram determinados em reação enzimática conduzida em leitor de ELISA, conforme Trethewey *et al.* (1998). Utilizaram-se 270  $\mu\text{L}$  de meio contendo: 20  $\mu\text{L}$  do extrato etanólico, 100  $\text{mol m}^{-3}$  imidazol (pH 6,9), 2  $\text{mol m}^{-3}$   $\text{NAD}^+$ , 1  $\text{mol m}^{-3}$  ATP e  $10^{-3}$   $\text{U mL}^{-1}$  de desidrogenase da glicose 6-fosfato obtida de *Leuconostoc mesenteroides*. A determinação dos açúcares consistiu na quantificação do  $\text{NAD}^+$  reduzido, a 340 nm, a partir da oxidação da glicose-6-fosfato. Para determinação de glicose foram adicionados ao meio 1,4  $\text{U mL}^{-1}$  de hexocinase. Em seguida, para determinar-se a concentração de frutose, 1,4  $\text{U mL}^{-1}$  de isomerase da glicose-6-fosfato foram adicionadas ao meio. Finalmente, para se quantificar a sacarose, adicionaram-se 5  $\mu\text{L}$  de uma solução saturada da invertase no meio descrito neste item. Para cada açúcar, a concentração foi calculada a partir da diferença entre DO final e inicial, utilizando-se o coeficiente de extinção de 6,22  $\text{mol m}^{-3} \text{cm}^{-1}$ , sendo que se considerou a estequiometria da redução de 1 mol de  $\text{NAD}^+$  para cada mol de glicose e frutose, e de 2 moles de  $\text{NAD}^+$  para cada mol de sacarose.

d.4) **Aminoácidos:** Em microtubos de 1,5 mL, foram dispostos em duplicata: 50  $\mu\text{L}$  de tampão citrato-NaOH 1  $\text{kmol m}^{-3}$  (pH 5,2) + ácido ascórbico 0,2% (p/v), 50  $\mu\text{L}$  de extrato etanólico e 100  $\mu\text{L}$  de ninhidrina 1% (p/v) em etanol 70% (v/v). Os microtubos foram mantidos a 95°C, por 20 min; em seguida, seu conteúdo foi transferido para microplaca e a DO lida a 570 nm, no leitor de ELISA. O cálculo da concentração de aminoácidos foi feito comparando-se os valores de DO com uma curva padrão de 0, 2, 5, 10, 20 e 50 nmol da solução equimolecular dos aminoácidos glicina, ácido

glutâmico, fenilalanina e arginina, em etanol 70%.

e) **Amido:** O resíduo foi suspenso em 1 mL 200 mol m<sup>-3</sup> KOH, homogeneizado e incubado a 95°C, por 1 h. Em seguida, adicionaram-se 70 µL de 1 kmol m<sup>-3</sup> ácido acético, para neutralização. A solução foi centrifugada por 10 min, a 16.000 g. Após extração, o amido foi hidrolizado em meio de reação com volume final de 150 µL, utilizando-se 100 µL do extrato, 100 mol m<sup>-3</sup> tampão citrato (pH 4,6) e 420 U mL<sup>-1</sup> de amiloglicosidase. Posteriormente, quantificou-se a glicose formada, em reação idêntica à feita para determinação de glicose do extratos etanólicos, usando-se 30 µL da solução obtida da reação anterior, conforme descrito em Trethewey *et al.* (1998).

f) **Atividades enzimáticas** – discos foliares foram coletados conforme descrito anteriormente, porém utilizando-se 10 discos (aproximadamente 200 mg MF) por repetição. Os discos foram armazenados em microtubos de 1,5 mL, os quais foram posteriormente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C, até a obtenção dos extratos. O processo de coleta e congelamento foi feito rapidamente, para evitarem-se danos oxidativos ao material vegetal. Os discos foram triturados em microtubos de 1,5 mL, juntamente com 200 mg de PVPP e 500 µL de tampão de extração, baseado na metodologia utilizada por Geigenberger e Stitt (1993): 50 mol m<sup>-3</sup> HEPES-KOH (pH 7,4), 5 mol m<sup>-3</sup> MgCl<sub>2</sub>, 1 mol m<sup>-3</sup> EDTA, 1 mol m<sup>-3</sup> EGTA, 10 mol m<sup>-3</sup> β-mercaptoetanol, 2 mol m<sup>-3</sup> benzamidina, 2 mol m<sup>-3</sup> ácido-ε-amino-*n*-capróico, 0,5 mol m<sup>-3</sup> PMSF, 0,1% (p/v) BSA, 10% (v/v) glicerol e 0,1% (v/v) Triton X-100. Após a homogeneização completa, as amostras foram centrifugadas por 15 min, a 15.000 g e, então, dessalinizadas em colunas Sephadex G-25. As colunas foram pré-equilibradas com 15 mL do tampão de extração. Para cada amostra, foram aplicados 500 µL do sobrenadante na coluna, e eluiu-se com posterior adição de 1 mL do tampão de extração. Os extratos foram armazenados a -80°C, até a realização dos ensaios enzimáticos. As reações enzimáticas ou a quantificação de seus produtos, quando não especificado, foram realizadas em leitor de ELISA, tomando-se sempre a parte linear da reação para o cálculo das atividades enzimáticas.

f.1) **Sintase da sacarose-fosfato (SPS; EC 2.4.1.14):** a atividade foi determinada de acordo com Doehlert e Huber (1983) em 70 µL de meio de reação contendo: 50

mol m<sup>-3</sup> MOPS-KOH (pH 7,4), 12 mol m<sup>-3</sup> MgCl<sub>2</sub>, 1 mol m<sup>-3</sup> DTT e 6 mol m<sup>-3</sup> UDP. Para o ensaio não-seletivo (V<sub>máx</sub>), 34 mol m<sup>-3</sup> glicose-6-fosfato e 12 mol m<sup>-3</sup> frutose-6-fosfato foram adicionados ao meio de reação. No ensaio seletivo (V<sub>sel</sub>), adicionaram-se 6 mol m<sup>-3</sup> glicose-6-fosfato, 12 mol m<sup>-3</sup> frutose-6-fosfato e 5 mol m<sup>-3</sup> Pi. Para ambos os ensaios, utilizaram-se 50 µL de extrato dessalinizado. Os ensaios foram realizados em duplicata, para cada repetição, a 25°C. Após 20 min, a reação foi paralizada com 70 µL de 5 kmol m<sup>-3</sup> KOH. Em seguida, adicionou-se 1 mL de antrona a 0,15% em 27 kmol m<sup>-3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, em cada microtubo. Os microtubos foram então incubados por 20 min, a 40°C. Posteriormente, determinou-se a concentração de sacarose, a 620 nm, comparando-se as leituras de densidade ótica das amostras com as de uma curva de calibração (0 a 50 nmol) de sacarose.

f.2) **Fosfatase da frutose-1,6-bisfosfato (FBPase; EC 3.1.3.11)**: a atividade da enzima foi medida de acordo com Sharkey *et al.* (1991), utilizando-se 30 µL de extrato dessalinizado, em meio de reação contendo 300 µL de volume final, composto de: 20 mol m<sup>-3</sup> HEPES-KOH (pH 7,0), 5 mol m<sup>-3</sup> MgCl<sub>2</sub>, 500 mmol m<sup>-3</sup> NAD<sup>+</sup>, 0,25 U mL<sup>-1</sup> de isomerase da glicose-6-fosfato e 0,25 U mL<sup>-1</sup> de desidrogenase da glicose 6-fosfato (*Leuconostoc mesenteroides*; dependente de NAD<sup>+</sup>). A reação foi iniciada com 300 mol m<sup>-3</sup> frutose-1,6-bisfosfato.

f.3) **Pirofosforilase da ADP-glicose (AGPase; EC 2.2.7.27)**: foram adicionados 150 µL do extrato dessalinizado ao meio de reação que continha 80 mol m<sup>-3</sup> HEPES-KOH (pH 7,9), 2 mol m<sup>-3</sup> MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol m<sup>-3</sup> glicose-1,6-bisfosfato, 10 mol m<sup>-3</sup> ácido 3-fosfoglicérico, 5 mol m<sup>-3</sup> DTT, 0,2 mol m<sup>-3</sup> NAD<sup>+</sup>, 1 mol m<sup>-3</sup> ADP-glicose, 10 mol m<sup>-3</sup> NaF, 1 U mL<sup>-1</sup> de mutase da glicose-1-fosfato, 2,5 U mL<sup>-1</sup> de desidrogenase da glicose-6-fosfato (*Leuconostoc mesenteroides*; dependente de NAD<sup>+</sup>), conforme Müller-Röber *et al.* (1992). Iniciou-se a reação com 1,5 mol m<sup>-3</sup> Na-PPi, em um volume final de 300 µL.

f.4) **Cinase da frutose-6-fosfato dependente de ATP (ATP-PFK; EC 2.1.7.11)**: foi determinada como em Burrell *et al.* (1994), adicionando-se 70 µL do extrato dessalinizado ao meio de reação contendo: 100 mol m<sup>-3</sup> Tris-HCl (pH 8,0), 5 mol m<sup>-3</sup> MgCl<sub>2</sub>, 1 mol m<sup>-3</sup> ATP, 0,1 mol m<sup>-3</sup> NADH, 1 U mL<sup>-1</sup> aldolase, 10 U mL<sup>-1</sup> de isomerase de triose-fosfato e 1,8 U mL<sup>-1</sup> de desidrogenase do glicerol-3-fosfato. A reação foi iniciada com 5 mol m<sup>-3</sup> de frutose-6-fosfato, em volume final de 300 µL.

f.5) **Invertase ácida (EC 3.2.1.26)**: a atividade foi determinada conforme Geigenberger e Stitt (1993), em 100  $\mu\text{L}$  de meio de reação contendo 60  $\text{mol m}^{-3}$  tampão acetato (pH 4,7), 100  $\text{mol m}^{-3}$  sacarose e 60  $\mu\text{L}$  de extrato dessalinizado. Após 3 h, a 37°C, a reação foi neutralizada com 15  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 1  $\text{kmol m}^{-3}$  (pH 7,2), e interrompida por fervura durante 5 min. Determinou-se a concentração de glicose, após a reação, conforme descrito no item d.3.

f.6) **Invertase alcalina (EC 3.2.1.26)**: determinada como em Geigenberger e Stitt (1993). A 100  $\mu\text{L}$  de meio de reação adicionaram-se: 80  $\mu\text{L}$  do extrato dessalinizado, 100  $\text{mol m}^{-3}$  HEPES-KOH (pH 7,5) e 100  $\text{mol m}^{-3}$  sacarose. Após 1 h, a 37°C, a reação foi interrompida por fervura durante 5 min. Em seguida, tomaram-se 10  $\mu\text{L}$  da solução do meio de reação para determinação de glicose, conforme descrito no item d.3.

f.7) **Sintase da sacarose (SuSy; EC 2.4.1.13)**: sua atividade foi medida de acordo com Geigenberger e Stitt (1993). Em 100  $\mu\text{L}$  de meio de reação adicionaram-se 70  $\mu\text{L}$  do extrato dessalinizado, 20  $\text{mol m}^{-3}$  HEPES-KOH (pH 7,0), 100  $\text{mol m}^{-3}$  sacarose e 4  $\text{mol m}^{-3}$  UDP. A reação foi conduzida por 1 h, a 25°C, sendo interrompida por fervura, durante 3 min. A concentração de UDP-glicose formada foi determinada em reação enzimática, adicionando-se 80  $\mu\text{L}$  do volume da solução do meio de reação a um meio contendo: 200  $\text{mol m}^{-3}$  glicina (pH 8,9), 5  $\text{mol m}^{-3}$   $\text{MgCl}_2$ , 2  $\text{mol m}^{-3}$   $\text{NAD}^+$  e 0,02  $\text{U mL}^{-1}$  de desidrogenase da UDP-glicose. Acompanhou-se a redução do  $\text{NAD}^+$  a 340 nm, a qual é estequiometricamente igual à de UDP-glicose oxidada.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1) *Status* hídrico e trocas gasosas

As plantas dos clones 109A, 120, 46 e 14 somente alcançaram o estresse hídrico moderado ( $\Psi_w = -2\text{MPa}$ ) aos 15, 18, 20 e 23 dias, após a suspensão da irrigação, enquanto o déficit hídrico severo ( $\Psi_w = -3\text{MPa}$ ) só foi observado após 19,5, 24, 24 e 29 dias, respectivamente. Estes resultados diferem um pouco de observações de campo (DaMatta *et al.*, 2000) e de trabalhos anteriores, realizados em casa de vegetação (Pinheiro *et al.*, 2003b), em que o clone 120 retardou por mais tempo a perda de água em relação aos clones sensíveis 109A e 46. Tais diferenças poderiam, talvez, estar associadas à idade das plantas, com sistema radicular e área foliar bem menos desenvolvidos que nos trabalhos citados.

Independentemente do nível de déficit hídrico imposto, tanto  $g_s$  e  $A$  reduziram-se fortemente em todos os clones avaliados. Conquanto as reduções em  $g_s$  ocorreram em maior extensão que as reduções em  $A$  (Tabela 1), fato ainda acompanhado por redução na razão  $C_i/C_a$ , pode-se sugerir que a inibição fotossintética foi ocasionada principalmente devido ao fechamento dos estômatos. Estes resultados são consistentes com os apresentados por DaMatta *et al.* (1997a). Entretanto, à medida que o estresse aumenta, pode ocorrer também uma inibição não-estomática da fotossíntese (Kanechi *et al.*, 1996; DaMatta *et al.*, 1997a; Almeida e Maestri, 1997).

**Tabela 1:** Reduções percentuais da condutância estomática ( $g_s$ ;  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ;  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e razão entre a concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ) de quatro clones de café Robusta submetidos a déficit hídrico moderado (Mod;  $\Psi_w = -2\text{MPa}$ ) ou severo (Sev;  $\Psi_w = -3\text{MPa}$ ), em relação aos valores das trocas gasosas obtidos nas plantas-controle continuamente irrigadas. Asteriscos indicam diferença significativa dos valores dos parâmetros em relação aos das plantas-controle (teste  $t$ ,  $P < 0,05$ ).

Parâmetros	Redução percentual							
	Clones							
	14		120		46		109A	
	Mod	Sev	Mod	Sev	Mod	Sev	Mod	Sev
$g_s$	88,2*	79,5*	84,3*	87,6*	77,8*	92,4*	84,2*	88,0*
$A$	70,7*	67,2*	66,1*	63,2*	64,7*	69,6*	60,2*	74,1*
$C_i/C_a$	19,6*	16,5*	4,4	19,3*	13,1*	34,6*	23,8*	22,8*

Nas plantas-controle, os valores médios de  $A$ ,  $g_s$  e  $C_i/C_a$  foram respectivamente: (Clone 14: 7,5; 179 e 0,77 – Clone 120: 6,6; 186 e 0,75 – Clone 46: 9,4; 233 e 0,77 – Clone 109A: 8,4; 214 e 0,80).

Em um mesmo nível de déficit hídrico, não houve diferença significativa entre as médias dos parâmetros avaliados, nos quatro clones (teste de Newman Keuls,  $P < 0,05$ ).

## 2) Parâmetros de fluorescência da clorofila a e pigmentos fotossintéticos

Tanto sob estresse hídrico moderado quanto severo, não foram observadas alterações na eficiência de captura de excitação pelos centros abertos do FSII (estimada pela razão  $F_v'/F_m'$ ) (Tabela 2). Por outro lado, houve apenas decréscimos marginais em  $qP$ ; apenas pequenas alterações em NPQ e  $\phi_{\text{FSII}}$  foram também observadas, independentemente da magnitude do estresse imposto. Visto que tais mudanças não foram acompanhadas de reduções na eficiência fotoquímica máxima do FSII (avaliada pela razão  $F_v/F_m$ ), presume-se que não tenha havido fotoinibição da fotossíntese. Em adição, também não se observou alteração significativa nas concentrações de clorofilas a e b (Tabela 3). Concomitantemente, estes resultados confirmam informações prévias (Almeida e Maestri, 1997; DaMatta *et al.*, 1997a; Lima *et al.*, 2002) de que as reações fotoquímicas do café não são substancialmente afetadas pelo déficit hídrico.

**Tabela 2.** Percentual da razão entre a fluorescência variável e máxima ( $F_v/F_m$ ), fluorescência variável e máxima, após tratamento com luz actínica ( $F_v'/F_m'$ ), coeficiente de extinção fotoquímico (qP), coeficiente de extinção não fotoquímico de Stern-Volmer (NPQ) e eficiência quântica do transporte de elétrons do fotossistema II ( $\phi_{FSII}$ ) de quatro clones de café Robusta submetidos a déficit hídrico moderado (Mod;  $\Psi_w = -2\text{MPa}$ ) ou severo (Sev;  $\Psi_w = -3\text{MPa}$ ), em relação aos valores de fluorescência da clorofila *a*, obtidos nas plantas-controle continuamente irrigadas. Detalhes das comparações estatísticas na Tabela 1.

Parâmetros	Percentual em relação ao controle							
	Clones							
	14		120		46		109A	
	Mod	Sev	Mod	Sev	Mod	Sev	Mod	Sev
$F_v/F_m$	101,5	102,5*	103,3	104,4*	103,1	103,1	101,2	102,9*
$F_v'/F_m'$	104,0	110,3*	95,5	103,2	109,0	116,5*	103,5	104,8
qP	85,8	72,6*	95,1	84,7*	77,6	69,7*	90,5	75,2*
NPQ	97,7	77,7*	123,1	100,7	100,7	71,9*	96,0	89,3
$\phi_{FSII}$	88,4	76,7*	90,9	87,2	84,7	81,3*	93,5	78,1*

Nas plantas-controle, os valores médios de  $F_v/F_m$ ,  $F_v'/F_m'$ , qP, NPQ e  $\phi_{FSII}$  foram respectivamente: (Clone 14: 0,83; 0,54; 0,53; 2,16 e 0,29 – Clone 120: 0,81; 0,54; 0,51; 2,03 e 0,27 – Clone 46: 0,82; 0,50; 0,58; 2,16 e 0,29 – Clone 109A: 0,83; 0,54; 0,48; 2,12 e 0,26).

**Tabela 3.** Percentual da concentração ( $\text{g kg}^{-1}$  MS) de clorofila *a* (clf *a*) e clorofila *b* (clf *b*) de quatro clones de café Robusta submetidos a déficit hídrico moderado (Mod;  $\Psi_w = -2\text{MPa}$ ) ou severo (Sev;  $\Psi_w = -3\text{MPa}$ ), em relação aos valores obtidos nas plantas-controle continuamente irrigadas. Detalhes das comparações estatísticas na Tabela 1.

Parâmetros	Percentual em relação ao controle							
	Clones							
	14		120		46		109A	
	Mod	Sev	Mod	Sev	Mod	Sev	Mod	Sev
clf <i>a</i>	123,3	117,9	97,5	109,5	96,2	119,8	121,8	88,9
clf <i>b</i>	123,4	111,1	94,4	122,2	102,0	121,1	113,6	92,4

Nas plantas-controle, os valores médios de clf *a*, clf *b* foram respectivamente: (Clone 14: 0,99 e 1,19 – Clone 120: 1,08 e 1,21 – Clone 46: 0,99 e 1,14 – clone 109A: 1,01 e 1,26).

### 3) Carboidratos e aminoácidos

Sob estresse hídrico moderado, não houve qualquer alteração significativa na concentração foliar de sacarose em nenhum dos clones avaliados (Figura 1). Isso poderia ser explicado por uma redução no transporte de assimilados, que pode ser provocado pela redução no crescimento, sob estresse hídrico, ainda que *A* tenha sido reduzida (Pelleschi *et al.*, 1997). De forma geral, os conteúdos de glicose também permaneceram inalterados, sob estresse hídrico moderado (Figura 1). Com relação à concentração de frutose, houve aumento significativo no clone 46 (32%) e redução no clone 14 (45%) (Figura 1). Também foi observada, sob estresse moderado, uma redução significativa na concentração de amido, de 77, 61, 31 e

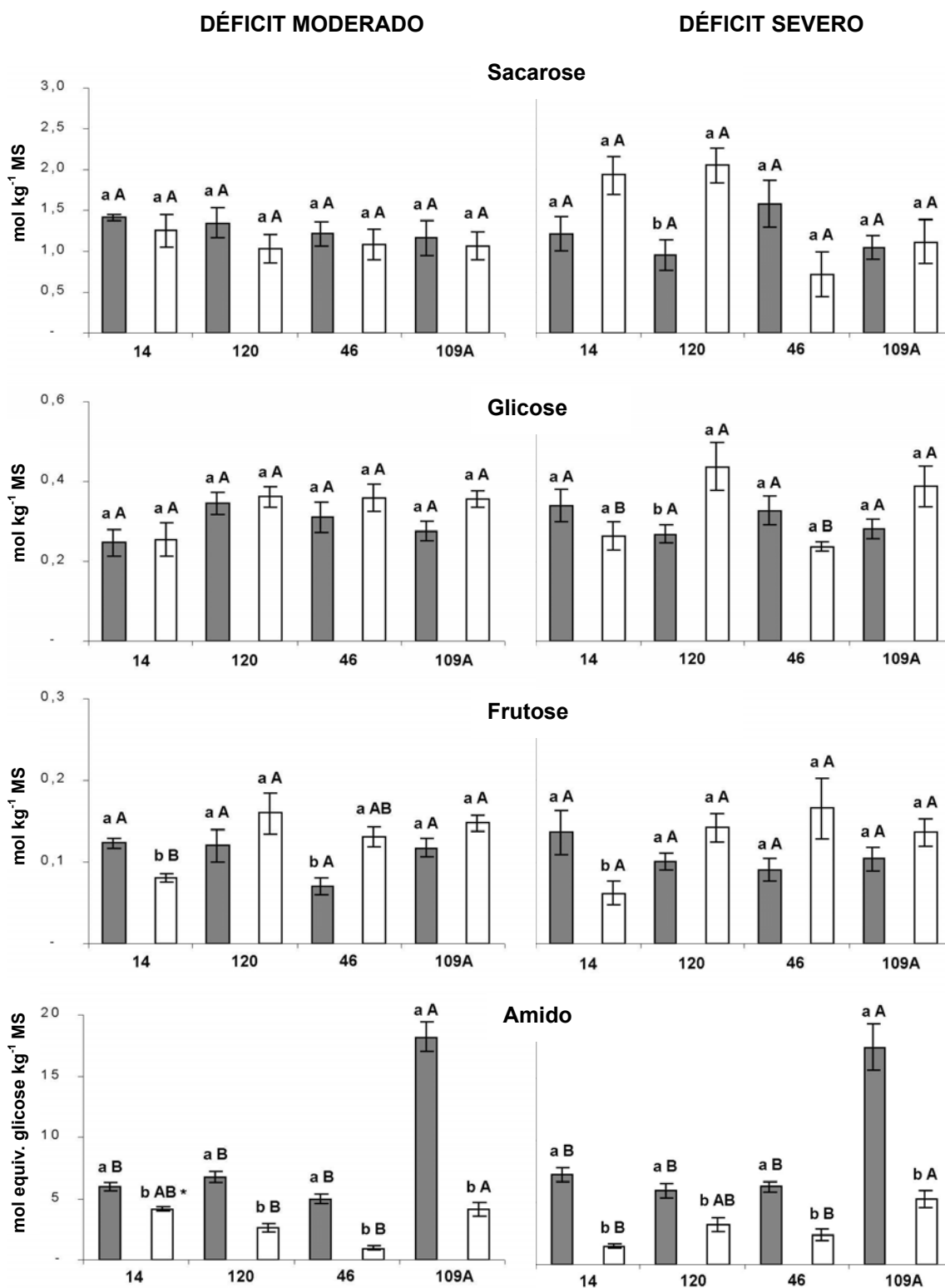
81%, nos clones 109A, 120, 14 e 46, respectivamente (Figura 1). Tem-se descrito que, em plantas submetidas a estresse hídrico, pode ocorrer degradação de amido (Stewart, 1971; Quick *et al.*, 1989), como forma de manter ou aumentar os níveis de açúcares, apesar de uma redução em *A*, permitindo, assim, um ajustamento osmótico (Lawlor e Cornic, 2002), o que contribuiria para evitar decréscimos adicionais em *A*.

É comum, também, o aumento na concentração de aminoácidos em plantas sob déficit hídrico (Gzik, 1996; Hien *et al.*, 2003), utilizando o carbono proveniente da sacarose (Lawlor e Fock, 1977). Foi verificado, sob déficit hídrico moderado, um aumento significativo na concentração de aminoácidos no clone 109A (83%) e tendência de aumento no clone 120 (36%) (Figura 2). Nesses clones, porém, observou-se apenas uma ligeira tendência de redução na concentração de sacarose (Figura 1), o que poderia confirmar a hipótese de redução no transporte de assimilados.

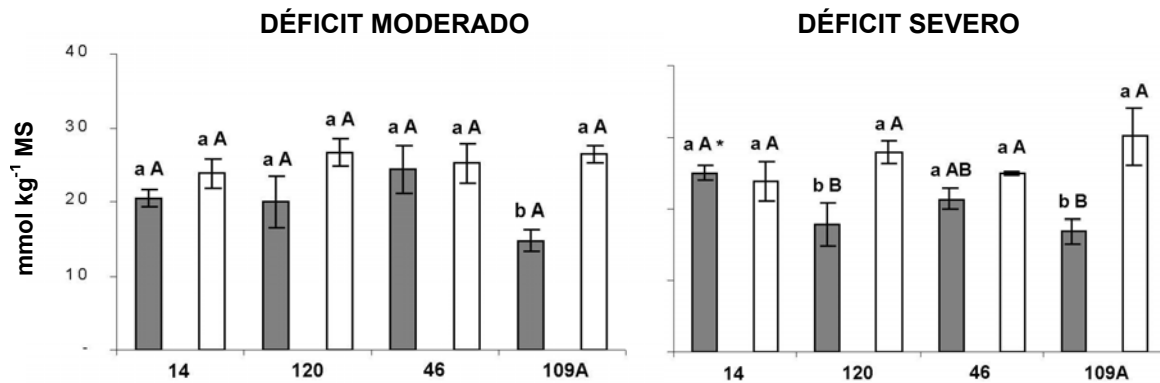
Aumentos significativos nos teores de aminoácidos totais, sob déficit hídrico severo, foram observados somente nos clones 109A (81%) e 120 (73%) (Figura 2), semelhantemente ao observado sob déficit moderado.

Paralelamente ao aumento na concentração de aminoácidos, podemos observar a redução nos níveis de amido e a manutenção nos níveis de sacarose e, em geral, dos níveis de hexoses. Tais fatos podem ser interpretados, em conjunto, como um mecanismo para a manutenção da homeostase metabólica em um processo de aclimatação, alterando a partição de carbono de forma a aumentar o teor de aminoácidos. O aumento no teor de aminoácidos pode indicar também um mecanismo de ajuste osmótico (Rodhes e Hanson 1993; Trossat *et al.* 1998), que poderia estar ocorrendo nos clones 109A e 120.





**Figura 1.** Concentração foliar de sacarose, glicose, frutose e amido em quatro clones de café Robusta irrigados (colunas cinzas) e submetidos a déficit hídrico (colunas brancas) moderado ( $\Psi_w = -2\text{MPa}$ ) ou severo ( $\Psi_w = -3\text{MPa}$ ). Diferenças, dentro de um mesmo clone e nível de estresse, são indicadas por letras minúsculas diferentes (teste  $t$   $P < 0,05$ ) e, entre clones em um mesmo nível de estresse e regime hídrico, por letras maiúsculas (teste de Newman Keuls,  $P < 0,05$ ). Asteriscos indicam diferença entre níveis de estresse, dentro de um mesmo clone e regime hídrico (teste  $t$ ,  $P < 0,05$ ). Valores são a média de 5 repetições, barras representam o erro padrão da média.



**Figura 2.** Concentração de aminoácidos ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS) em quatro clones de café Robusta irrigados (colunas cinzas) e submetidos a déficit hídrico (colunas brancas) moderado ( $\Psi_w = -2\text{MPa}$ ) ou severo ( $\Psi_w = -3\text{MPa}$ ). Detalhes das comparações estatísticas na Figura 1.

Respostas semelhantes àquelas observadas sob déficit moderado também puderam ser observadas sob déficit hídrico severo, com relação à concentração foliar de carboidratos. No entanto, houve aumento significativo de sacarose no clone 120 (97%) e tendência de aumento no clone 14 (56%) (Figura 1). Isso poderia ter sido provocado pela redução na exportação dos assimilados, à medida que o crescimento diminui com o déficit hídrico (Lawlor e Cornic, 2002), indicando que, naqueles clones, a fotossíntese foi menos afetada que o transporte de assimilados, em relação aos clones menos tolerantes à seca.

Embora uma mesma tendência de aumento nos teores de glicose tenha sido observada sob déficit hídrico severo, no clone 109A a diferença não foi significativa, ao passo que o clone 120, ao contrário do que antes havia sido observado sob déficit moderado, apresentou um aumento significativo nos níveis de glicose (Figura 1). Nesse mesmo nível de déficit, apenas o clone 14 apresentou redução significativa no nível de frutose (78%), semelhantemente ao observado sob déficit moderado, enquanto os demais clones tenderam a aumentar os níveis daquele metabólito (Figura 1).

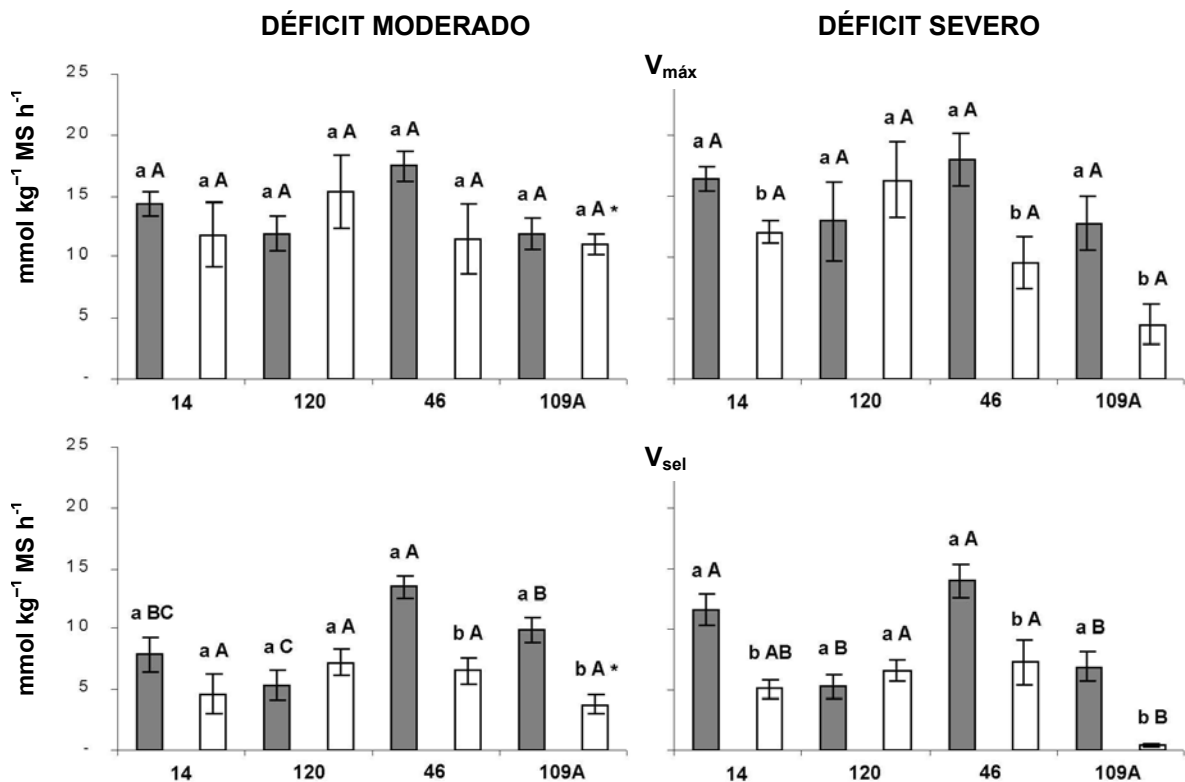
Como observado anteriormente para o déficit hídrico moderado, observou-se também uma redução significativa no teor de amido das folhas para todos os clones estudados (70, 46, 79 e 61% nos clones 109A, 120, 14 e 46, respectivamente) (Figura 1). Entretanto, apenas no clone 14 uma redução adicional no teor de amido foi observado, quando o  $\Psi_w$  passou de  $-2\text{ MPa}$  para  $-3\text{ MPa}$  (Figura 1).

Os resultados sugerem um mecanismo de alteração na partição de carbono e na manutenção da homeostase metabólica é variável entre os clones, e que

provavelmente estaria envolvido na aclimação fotossintética sob déficit hídrico. Entretanto, o aumento na concentração de aminoácidos, tanto em um clone susceptível à seca (109A) como em um tolerante (120), sugere que essa alteração não seria parte de um mecanismo geral de tolerância à seca em café. Visto que também não foi observado o mesmo fenômeno para os clones 14 e 46, pode-se sugerir que outros mecanismos, além da alteração na partição dos fotoassimilados, também possam contribuir para a aclimação fotossintética do cafeeiro sob condições de seca.

#### **4) Enzimas do metabolismo de carboidratos**

Sob déficit hídrico moderado, não se verificou alteração na atividade catalítica máxima da SPS ( $V_{m\acute{a}x}$ ) (Figura 3). A determinação da atividade catalítica de uma enzima, contudo, normalmente baseia-se na determinação da velocidade máxima inicial, ou na velocidade média da fase linear da reação enzimática. Nesses ensaios, utilizam-se concentrações de substratos que, normalmente, aproximam-se de valores 10 vezes superiores ao da constante de afinidade da enzima pelo substrato ( $K_m$ ), de forma que, nessas condições, está-se determinando provavelmente a atividade catalítica máxima da enzima. Esse valor, entretanto, permite apenas inferir sobre a quantidade da enzima presente, e cautela deve ser tomada na inferência da atividade da enzima *in vivo*. Esse cuidado é especialmente importante em enzimas que sofrem regulação alostérica, como a SPS, que pode ser parcialmente inativada ou ter suas constantes de afinidade e inibição alteradas pela fosforilação. De forma a poder inferir-se sobre a atividade *in vivo* da SPS, um ensaio seletivo foi desenvolvido (Winter e Huber, 2000), no qual se pode verificar alterações no seu grau de fosforilação (grau de inativação).



**Figura 3.** Atividade da sintase da sacarose-fosfato (SPS) no ensaio não seletivo ( $V_{m\acute{a}x}$ ) e seletivo ( $V_{sel}$ ) em quatro clones de café Robusta irrigados (colunas cinzas) e submetidos a déficit hídrico (colunas brancas) moderado ( $\Psi_w = -2\text{MPa}$ ) ou severo ( $\Psi_w = -3\text{MPa}$ ). Detalhes das comparações estatísticas na Figura 1.

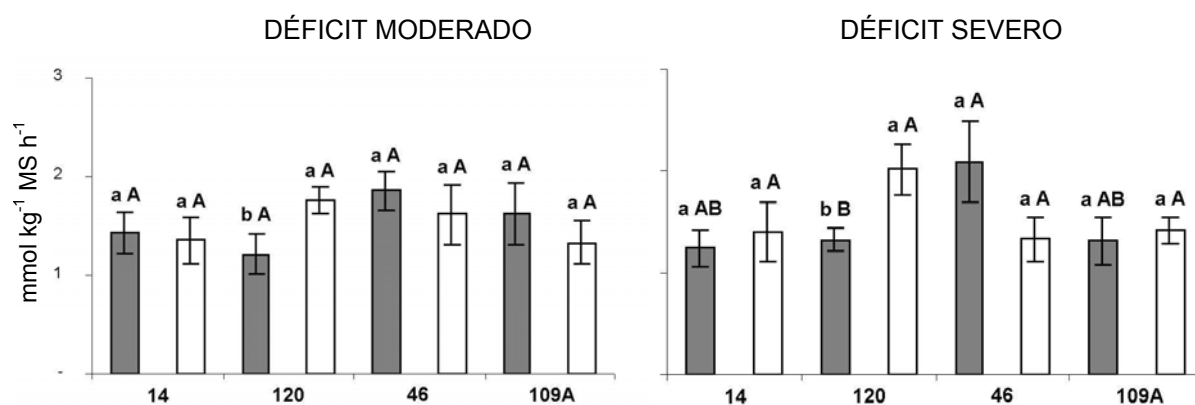
No ensaio seletivo da SPS ( $V_{sel}$ ), sob déficit moderado, observou-se redução em sua atividade somente nos clones mais susceptíveis ao déficit hídrico, 109A (62%) e 46 (51%) (Figura 3). Isso pode indicar que o fluxo de síntese de sacarose tenha sido reduzido *in vivo* nos genótipos mais susceptíveis, ao contrário dos tolerantes. A magnitude dessa redução foi similar sob déficit hídrico severo, porém verificou-se decréscimo na atividade seletiva da SPS no clone 14 (27%), mas não no clone 120 (Figura 3). Salienta-se que, neste clone, observou-se uma maior tendência de aumento nos teores de sacarose, sob déficit hídrico severo (Figura 1).

É comum uma redução na atividade da SPS sob déficit hídrico (Lawlor e Cornic, 2002), que está relacionada à redução em  $C_i$ , em vez do conteúdo relativo de água (Vassey *et al.*, 1991); nesse caso, o  $\text{CO}_2$  atuaria na ativação da enzima (Quick *et al.*, 1989; Zrenner e Stitt, 1991). Esse efeito provavelmente ocorreu neste

experimento, pois, ao mesmo tempo em que se observou redução em  $C_i/C_a$  (Figura 1), observou-se também tendência de redução na atividade da SPS nos clones 109A, 14 e 46 (Figura 3). Ressalta-se, não obstante, que as medições de trocas gasosas e coleta do material foliar foram realizadas em horários diferentes, o que poderia explicar potencialmente a maior variabilidade encontrada nesses resultados.

O comportamento de redução em  $V_{sel}$ , observado sob déficit moderado, foi mais contundente sob déficit hídrico severo. Porém, agora o clone 14 também apresentou redução na atividade seletiva dessa enzima. As reduções em  $V_{sel}$  foram de 94, 56 e 48%, nos clones 109A, 14 e 46, respectivamente (Figura 3). Estes dados permitem inferir que uma maior fosforilação da enzima SPS estaria ocorrendo em resposta ao déficit hídrico. Entretanto, não foi possível observar reduções significativas no teor de sacarose (Figura 1), sugerindo que o fluxo de síntese de sacarose não tenha sido alterado, ao menos nos clones 109A, 120 e 14. Essa constância nos teores de sacarose, apesar das reduções significantes em  $V_{sel}$  e  $V_{máx}$ , nesses clones, permite sugerir que a SPS está presente em excesso em relação à quantidade necessária para a síntese dos teores normais de sacarose. Nesse nível de déficit, novamente apenas o clone 120 não apresentou alterações em  $V_{sel}$  e  $V_{máx}$  (Figura 3). Isso sugere, portanto, que a SPS é diferentemente regulada no clone 120, em resposta ao déficit hídrico, quando comparado em relação aos demais clones. A tendência de não se manter a atividade da SPS nos dois genótipos susceptíveis permite sugerir que a regulação diferencial da SPS poderia contribuir para a tolerância à seca. Entretanto, devido a inexistência de tal comportamento no clone 14, pode-se inferir que, ou essa resposta não é essencial ao mecanismo de tolerância, ou, alternativamente, que diferentes mecanismos possam também estar envolvidos em diferentes clones de café Robusta.

A FBPase é outra enzima-chave na biossíntese de sacarose (Taiz e Zeiger, 2002). Sob déficit moderado, sua atividade manteve-se inalterada em relação à das plantas-controle, exceto no clone 120, com aumento de em 45%, a despeito de ausência de alteração no teor de sacarose (Figura 4). Resultados semelhantes foram observados sob déficit hídrico severo (Figura 4).



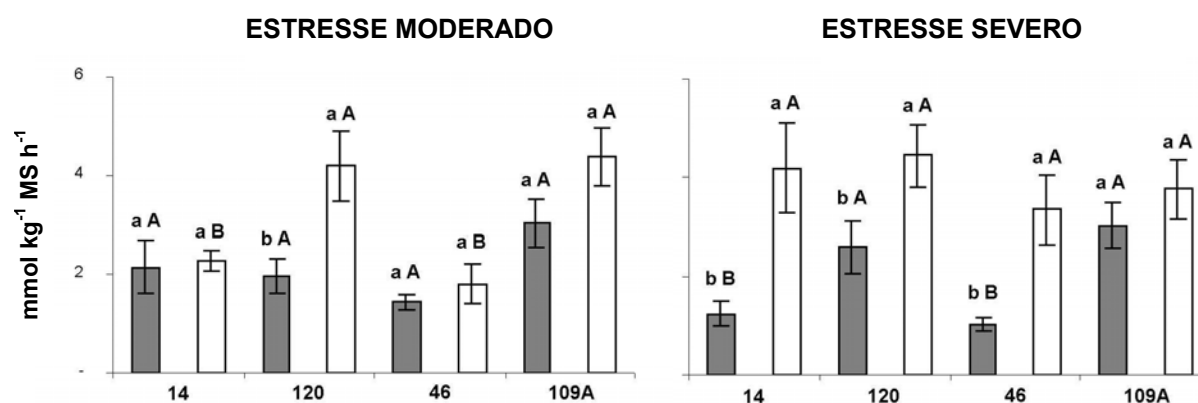
**Figura 4.** Atividade total da fosfatase da frutose-1,6-bisfosfato (FBPase) em quatro clones de café Robusta irrigados (colunas cinzas) e submetidos a déficit hídrico (colunas brancas) moderado ( $\Psi_w = -2$ MPa) ou severo ( $\Psi_w = -3$ MPa). Detalhes das comparações estatísticas na Figura 1.

O aumento ou a manutenção da concentração de carboidratos, mesmo quando  $A$  se reduz sob déficit hídrico, também pode ter importância no ajustamento osmótico. Já foi demonstrado em várias espécies que o acúmulo de açúcares ocorre de forma coordenada entre a síntese e a translocação, de forma a permitir a manutenção ou o aumento das reservas foliares, sendo o segundo caso de importância para a osmorregulação (Lawlor e Cornic, 2002). Isso pode ser uma explicação para o aumento na atividade da FBPase, acompanhado pelo aumento do nível de sacarose, no clone 120, sob déficit hídrico severo. Entretanto, o clone 120 não realizou ajustamento osmótico em trabalho conduzido em casa de vegetação (Pinheiro *et al.*, 2003a). Não se pode descartar, contudo, a hipótese de que aumentos nos níveis da sacarose não estariam contrabalançando o decréscimo nos níveis de outros solutos osmoticamente ativos, naquele clone.

Visto que somente o clone 120 apresenta manutenção dos valores normais de  $V_{máx}$  e aumento na  $V_{sel}$ , em paralelo ao aumento da FBPase, sob déficit hídrico, pode-se sugerir que o fluxo de síntese de sacarose não deve ter sido alterado naquele clone. Uma vez que o teor de sacarose nas folhas é resultante do balanço

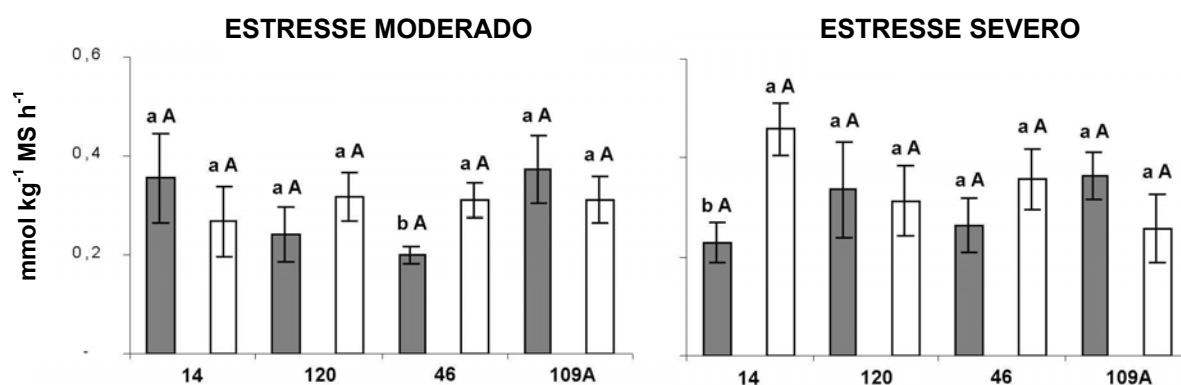
entre a sua síntese e exportação pelo floema, uma possível explicação seria a de que, no clone 120, tenha ocorrido uma manutenção no transporte normal de sacarose, pelo menos sob déficit hídrico moderado. No campo, esse comportamento permitir-lhe-ia explorar uma maior profundidade do solo em busca de água, conferindo uma maior tolerância à seca, no caso de manutenção da translocação da sacarose, o que deve ter ocorrido, pelo menos sob déficit hídrico moderado. De fato, observações de campo indicam que esse clone apresenta sistema radicular mais profundo. Esse comportamento do clone 120 poderia também explicar, em parte, o porquê de ele conseguir apresentar uma produtividade superior aos demais utilizados neste experimento, sob condição de déficit hídrico em campo (Ferrão *et al.*, 2000).

O teor de sacarose pode também ser influenciado pela atividade das invertases. Observou-se uma tendência de aumento da atividade da invertase ácida no clone 109A e aumento significativo no clone 120 (114%), sob déficit hídrico moderado (Figura 5). Isso poderia explicar a tendência de aumento nos níveis de hexoses nesses clones, naquela condição (Figura 1). Todos os clones apresentaram tendência de aumento na atividade da invertase ácida sob déficit hídrico severo, sendo significativo nos clones 120 (72%), 14 (236%) e 46 (226%) (Figura 5).



**Figura 5.** Atividade da invertase ácida em quatro clones de café Robusta irrigados (colunas cinzas) e submetidos a déficit hídrico (colunas brancas) moderado ( $\Psi_w = -2\text{MPa}$ ) ou severo ( $\Psi_w = -3\text{MPa}$ ). Detalhes das comparações estatísticas na Figura 1.

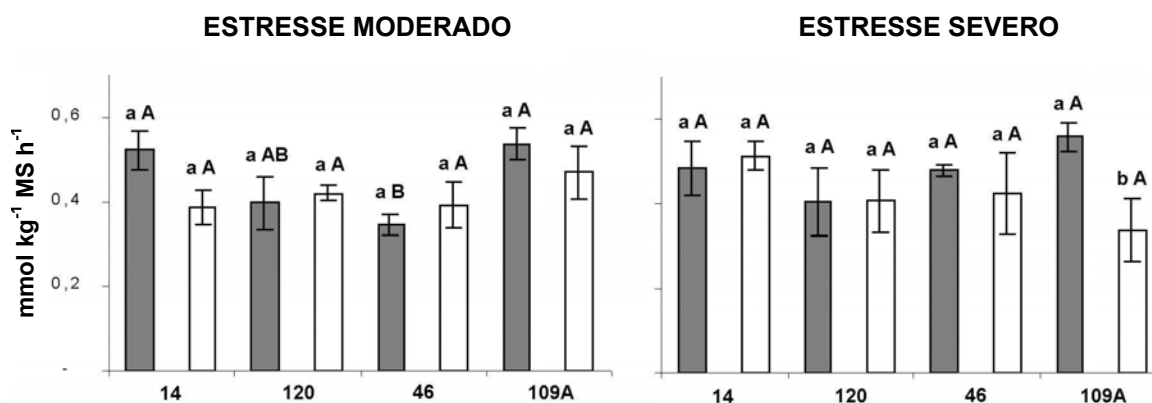
Sob déficit hídrico moderado, observou-se aumento na atividade da invertase alcalina apenas no clone 46 (Figura 6). Entretanto, sob déficit hídrico severo a atividade dessa enzima aumentou no clone 14, além de apresentar tendência de aumento no clone 46 (Figura 6).



**Figura 6.** Atividade da invertase alcalina em quatro clones de café Robusta irrigados (colunas cinzas) e submetidos a déficit hídrico (colunas brancas) moderado ( $\Psi_w = -2\text{MPa}$ ) ou severo ( $\Psi_w = -3\text{MPa}$ ). Detalhes das comparações estatísticas na Figura 1.

Visto que alterações em  $V_{sel}$  da SPS foram detectadas, é importante verificar se a atividade da sintase da sacarose (SuSy), que pode tanto catalisar a síntese como a degradação da sacarose (Taiz e Zeiger, 2002), poderia compensar, pelo menos em parte, as alterações verificadas na SPS. Todavia, não foi observada nenhuma alteração significativa na atividade da SuSy, sob déficit hídrico, à exceção do clone 109A que, sob déficit hídrico severo, mostrou uma redução na atividade da enzima de 40%. (Figura 7)





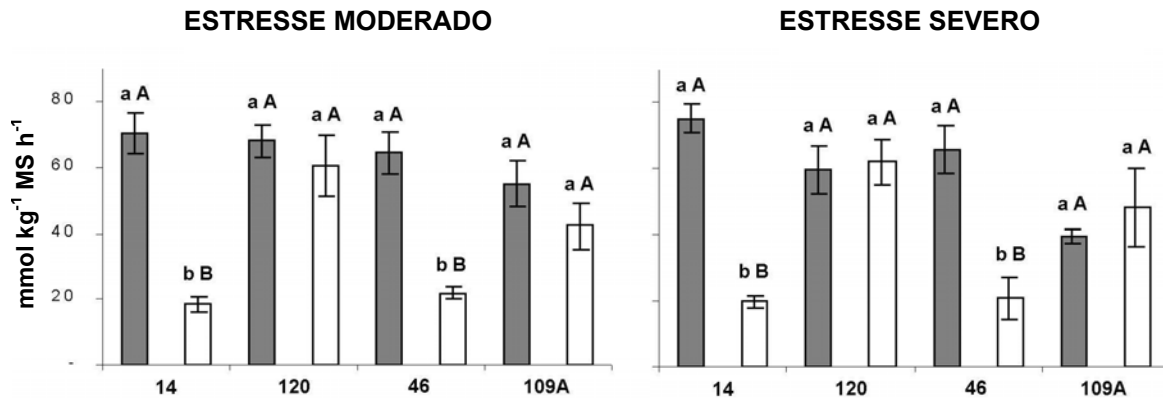
**Figura 7.** Atividade da sintase da sacarose (SuSy) em quatro clones de café Robusta irrigados (colunas cinzas) e submetidos a déficit hídrico (colunas brancas) moderado ( $\Psi_w = -2\text{MPa}$ ) ou severo ( $\Psi_w = -3\text{MPa}$ ). Detalhes das comparações estatísticas na Figura 1.

É provável que o aumento na atividade da SuSy tenha contribuído, juntamente com o da invertase ácida, para a tendência de aumento nos níveis de hexoses, no clone 109A sob déficit hídrico severo (Figura 1), uma vez que não foi observado aumento na concentração de sacarose nesse clone, sob déficit hídrico severo (Figura 1).

De forma geral, verificou-se, na maioria dos clones, uma tendência de aumento dos níveis de hexoses (Figura 1), juntamente com o aumento na atividade da invertase ácida (Figura 5), sendo que a invertase alcalina e SuSy não devem ter desempenhado papel importante no aumento dos níveis de hexoses. Uma exceção foi o clone 14, que não apresentou tendência em acumular hexoses, apesar do aumento significativo na atividade da invertase ácida, sob déficit hídrico severo (Figura 5). Aumento na concentração de hexoses, provavelmente poderia estar relacionado à osmorregulação (Lawlor e Cornic, 2002).

A atividade da AGPase, enzima-chave na síntese de amido (Taiz e Zeiger, 2002), foi determinada, com o objetivo de verificar se a redução na concentração de amido foi provocada pela redução na sua síntese. Uma tendência geral de decréscimo na atividade da AGPase pôde ser observada sob déficit hídrico moderado, mas somente nos clones 14 e 46 tais reduções foram significativas, de 74 e 66%, respectivamente (Figura 8). Este comportamento foi semelhante nas plantas sob déficit hídrico severo, apesar de, nessa condição, terem sido observadas reduções significativas na concentração de amido em todos os clones (Figura 1). Não obstante, ressalta-se que as maiores reduções no amido ocorreram justamente nos clones 14 e 46.

O fato de que reduções nos teores de amido, detectadas em alguns clones



**Figura 8.** Atividade da pirofosforilase da ADP-glicose (AGPase) em quatro clones de café Robusta irrigados (colunas cinzas) e submetidos a déficit hídrico (colunas brancas) moderado ( $\Psi_w = -2\text{MPa}$ ) ou severo ( $\Psi_w = -3\text{MPa}$ ). Detalhes das comparações estatísticas na Figura 1.

(figura 1), não tenha sido acompanhada por reduções na atividade da AGPase, sugere que outros mecanismos possam estar envolvidos, como, por exemplo, via ação das enzimas degradadoras do amido (Fox e Geiger, 1986). Outra possibilidade é a de que, com a inibição da fotossíntese, provocada pelo déficit hídrico, pode ocorrer uma mobilização preferencial do carbono fixado para a síntese de sacarose em detrimento da síntese de amido (Quick *et al.*, 1989; Chaves, 1991). Dessa forma, os resultados aqui apresentados talvez permitam sugerir também que a redução nos teores de amido possa ser atribuída à redução em A.

A enzima cinase da frutose-6-fosfato dependente de ATP (PFK-ATP) é uma enzima importante no metabolismo de carboidratos, catalisando uma reação na interface entre o metabolismo de hexoses e trioses, possuindo importante função regulatória no fluxo glicolítico. Não foi possível observar alterações significativas na atividade dessa enzima em ambos níveis de déficit hídrico aqui estudados (Figura 9). Estes resultados sugerem que o fluxo glicolítico, apesar da redução nos teores de amido e na taxa fotossintética, não tenha sido alterado de forma significativa no presente estudo.

A complexidade dos resultados aqui apresentados ocorre, possivelmente, em função de o déficit hídrico ter sido imposto de forma lenta, o que pode permitir a aclimação do metabolismo dos carboidratos (e.g., via mudança na taxa de crescimento), o que acaba por dificultar a interpretação dos resultados (Quick *et al.*, 1989). É interessante, portanto, que trabalhos em que o déficit hídrico seja imposto de maneira mais rápida também sejam realizados, como por exemplo experimentos com folhas destacadas ou discos foliares. Porém, de um ponto de vista prático, trabalhos como este têm maior relevância, pois simulam melhor o que ocorre sob condições de campo.

Uma inibição da fotossíntese associada ao acúmulo de carboidratos, devida à redução na força-dreno das plantas submetidas a déficit hídrico, não pôde ser claramente estabelecida neste trabalho. Evidências de inibição da fotossíntese pelo acúmulo de carboidratos normalmente estão associadas ao aumento da concentração foliar de amido (Stitt e Quick, 1989). Outros autores discordam da significância do efeito do acúmulo de açúcares solúveis, argumentando que não existem evidências de que seu acúmulo esteja envolvido na inibição da fotossíntese (Chaves, 1991; Lawlor e Cornic, 2002).

Pôde-se observar um comportamento contrastante quanto ao metabolismo de carboidratos nos quatro clones. Resultados na literatura demonstram que, dependendo da espécie, pode haver acúmulo diferencial de sacarose, glicose e frutose (Foyer, 1988; Keller e Ludlow, 1993; Zinselmeier *et al.*, 1995; Pelleschi *et al.*, 1997). Aqui, foi demonstrado que tais diferenças ocorreram dentro de uma mesma espécie, confirmando a grande variabilidade genética existente entre os clones analisados. De acordo com Chaves (1991), a prioridade dada à síntese de sacarose em condições de déficit tem um valor adaptativo, pois ela pode sustentar alguma exportação bem como permitir o ajuste osmótico. Neste trabalho, de forma geral, os clones mais tolerantes acumularam mais açúcares, o que pode também indicar uma maior eficiência fotossintética, sob déficit hídrico. No entanto, não foi possível se estabelecer um comportamento característico dos clones com relação ao metabolismo dos carboidratos relacionado à tolerância à seca.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, A. A. F.; Maestri, M. Photosynthetic oxygen evolution by four *Coffea arabica* genotypes subjected to a dehydration/rehydration cycle. **Journal of Horticultural Science** 72: 593-599. 1997.

Aoki, N.; Ono, K.; Sasaki, H.; Seneweera, S. P.; Sakai, H.; Kobayashi, K.; Ishimaru, K. Effects of elevated CO<sub>2</sub> concentration on photosynthetic carbon metabolism in flag-leaf blades of rice before and after heading. **Plant Production Science** 6: 52-58. 2003.

Bagnall, D. J.; King, R. W.; Farquhar, G. D. Temperature-dependent feedback inhibition of photosynthesis in peanut. **Planta** 175: 348-354. 1988.

Basu, P. S.; Sharma, A.; Garg, I. D.; Sukumaran, N. P. Tuber sink modifies photosynthetic response in potato under water stress. **Environmental and Experimental Botany** 42: 25-39. 1999.

Boyer, J. S. Advances in drought tolerance in plants. **Advances in Agronomy** 56: 187-218. 1995.

Burrell, M. M.; Mooney, P. J.; Blundy, M.; Carter, D.; Wilson, F.; Green, J.; Blundy, K. S.; Rees, T. A. Genetic manipulation of 6-phosphofructokinase in potato tubers. **Planta** 194: 95-101. 1994.

Chaitanya, K. V.; Jutur, P. P.; Sundar, D.; Reddy, A. R. Water stress effects on photosynthesis in different mulberry cultivars. **Plant Growth Regulation** 40: 75-80. 2003.

Chaves, M. M. Effects of water déficit on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany** 42: 1-16. 1991.

Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes para Minas Gerais**, Lavras. 1990.

DaMatta, F. M.; Chaves, A. R. M.; Pinheiro, H. A.; Ducatti, C.; Loureiro, M. E. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. **Plant Science** 164: 111-117. 2003.

DaMatta, F. M.; Loos, R. A.; Silva, E. A.; Ducatti, C.; Loureiro, M. E. Effects of soil water déficit and nitrogen nutrition on water relations and photosynthesis of pot-grown *Coffea canephora* Pierre. **Trees** 16: 555-558. 2002a.

DaMatta, F. M.; Loos, R. A.; Silva, E. A.; Loureiro, M. E. Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. **Journal of Plant Physiology** 159: 975-981. 2002b.

DaMatta, F. M.; Maestri, M.; Barros, R. S.; Regazzi, A. J. Water relations of coffee leaves (*Coffea arabica* and *C. canephora*) in response to drought. **Journal of Horticultural Science** 68: 741-746. 1993.

DaMatta, F. M.; Maestri, M.; Barros, R. S. Photosynthetic performance of two coffee species under drought. **Photosynthetica** 34: 257-264. 1997a.

DaMatta, F. M.; Maestri, M.; Mosquim, P. R.; Barros, R. S. Photosynthesis in coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) as affected by winter and summer conditions. **Plant Science** 128: 43-50. 1997b.

DaMata, F. M.; Silveira, J. S. M.; Ducatti, C.; Loureiro, M. E. Eficiência do uso da água e tolerância à seca em *Coffea canephora*. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 1: 2000, Poços de Caldas – MG. **Resumos expandidos**. Brasília – DF. : Embrapa Café; Belo Horizonte : Minasplan, 2000. 2v. (1490p.), p. 907-910.

Doehlert, D. C.; Huber, S. C. Regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase by glucose-6-phosphate, inorganic phosphate and pH. **Plant Physiology** 73: 989-994. 1983.

Ferrão, R. G.; Fonseca, A. F. A. D.; Ferrão, M. A. G. Avaliação de clones elites de café conilon em condição de déficit hídrico no Estado do Espírito Santo. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 1: 2000, Poços de Caldas – MG. **Resumos expandidos**. Brasília – DF: Embrapa Café; Belo Horizonte: Minasplan, 2000. 2v. (1490p.), p. 402-404.

Ferrario-Méry, S.; Valadier, M.; Foyer, C. H. Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. **Plant Physiology** 117: 293-302. 1998.

Fox, T. C.; Geiger, D. R. Osmotic response of sugar beet leaves at CO<sub>2</sub> compensation point. **Plant Physiology** 80: 239-241. 1986.

Foyer, C. H. Feedback inhibition of photosynthesis through source-sink regulation in leaves. **Plant Physiology and Biochemistry** 26: 483-492. 1988.

Foyer, C. H.; Lescure, J. C.; Lefebvre, C.; Morot-Gaudry, J. F.; Vicentz, M.; Vaucheret, H. Adaptation of photosynthetic electron transport, carbon assimilation, and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to change in nitrate reductase activity. **Plant Physiology** 104: 171-178. 1994.

Geigenberger, P.; Stitt, M. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. **Planta** 189: 329-339. 1993.

Geiger, D. R. Understanding interactions of source and sink regions in plants. **Plant Physiology and Biochemistry** 25: 659-666. 1987.

Goldschmidt, E. E.; Huber, S. Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. **Plant**

**Physiology** 99: 1443-1448. 1992.

Gzik, A. Accumulation of proline and pattern of  $\alpha$ -amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress. **Environmental and Experimental Botany** 36: 29-38. 1996.

Herold, A. Regulation of photosynthesis by sink activity. The missing link. **New Phytologist** 86: 134-144. 1980.

Herold, A.; McGee, E. E.; Lewis, D. H. The effect of orthophosphate concentration and exogenously supplied sugars on the distribution of newly fixed carbon in sugar beet leaf discs. **New Phytologist** 85: 1-13. 1980.

Hien, D. T.; Jacobs, M.; Angenon, G.; Hermans, C.; Thu, T. T.; Van Son, L.; Roosens, N. H. Proline accumulation and  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance. **Plant Science** 165: 1059-1068. 2003.

Kanechi, M.; Uchida, N.; Yasuda, T.; Yamaguchi, T. Non-stomatal inhibition associated with inactivation of Rubisco in dehydrated coffee leaves under unshaded and shaded conditions. **Plant and Cell Physiology** 37: 455-460. 1996.

Keller, F.; Ludlow, M. M. Carbohydrate metabolism in drought-stressed leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan*). **Journal of Experimental Botany** 44: 1351-1359. 1993.

Krapp, A.; Hofmann, B.; Schäfer, C.; Stitt, M. Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink regulation' of photosynthesis? **Plant Journal** 3: 817-828. 1993.

Krapp, A.; Quick, P.; Stitt, M. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase, other Calvin-cycle enzymes, and chlorophyll decrease when glucose is supplied to mature spinach leaves via the transpiration stream. **Planta** 186: 58-69. 1991.

Lawlor, D. W.; Fock, H. Water stress induced changes in the amounts of some photosynthetic assimilation products and respiratory metabolites of sunflower leaves. **Journal of Experimental Botany** 28: 329-337. 1977.

Lawlor, D. W.; Cornic, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment** 25: 275-294. 2002.

Li, C. R.; Liang, Y. H.; Hew, C. S. Responses of Rubisco and sucrose-metabolizing enzymes to different CO<sub>2</sub> in a C3 tropical epiphytic orchid *Oncidium goldiana*. **Plant Science** 163: 313-320. 2002.

Lima, A. L. S.; DaMatta, F. M.; Pinheiro, H. A.; Totola, M. R.; Loureiro, M. E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany** 47: 239-247, 2002.

Morcuende, R.; Péres, P.; Martínez-Carrasco, R. Short-term feedback inhibition of photosynthesis in wheat leaves supplied with sucrose and glycerol at two temperatures. **Photosynthetica** 33: 179-188. 1997.

Müller-Röber, B.; Sonnewald, U.; Willmitzer, L. Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to a sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. **EMBO Journal** 11: 1229-1238. 1992.

Munns, R.; Pearson, C. J. Effect of water déficit on translocation of carbohydrates in *Solanum tuberosum*. **Australian Journal of Plant Physiology** 1: 529-537. 1974.

Palleschi, S.; Rocher, J. P.; Prioul, J. L. Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signalling nitrogen deficiency through source-sink imbalance. **Plant, Cell and Environment** 20: 110-116. 1997.

Pereira, J. S.; Chaves, M. M. Plant water déficits in Mediterranean ecosystems. In: Smith, J. A. C.; Griffiths, H. (Eds), **Water Déficits: plant responses from cell to community**. BIOS Scientific Publishers: Oxford, p. 237-251. 1993.

Pinheiro, H. A.; Chaves, A. R. M.; Moraes, G. A. B. K.; Batista, K. D.; Ducatti, C.; Loureiro, M. E. ; DaMatta, F. M. Water relations in four clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. In: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 9.: 2003, Atibaia. **Anais**. Campinas: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 2003a. (446p.), p. 381.

Pinheiro, H. A.; DaMatta, F. M.; Chaves, A. R. M.; Batista, K. D.; Moraes, G. A. B. K.; Loureiro, M. E. Trocas gasosas, fluorescência da clorofila e status hídrico em clones de *Coffea canephora* submetidos à seca. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil e Workshop Internacional de Café & Saúde, 3.: 2003, Porto Seguro. **Anais**. Brasília – DF: Embrapa Café, 2003b. (447p.), p. 80.

Plaut, Z.; Mayoral, M. L.; Reinhold, L. Effect of altered sink:source ratio on photosynthetic metabolism of source leaves. **Plant Physiology** 85: 786-791. 1987.

Quick, P.; Chaves, M. M.; Wendler, R.; David, M.; Rodrigues, M. L.; Passaharinho, J. A.; Pereira, J. S.; Adcock, M. D.; Leegood, R. C.; Stitt, M. The effect of water on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. **Plant, Cell and Environment** 15: 25-35. 1992.

Quick, P.; Siegl, G.; Neuhaus, E.; Feil, R.; Stitt, M. Short-term water stress leads to a stimulation of sucrose synthesis by activating sucrose-phosphate synthase. **Planta** 177: 535-546. 1989.

Rodhes, D.; Hanson, A. D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 44: 357–384, 1993.

Schreiber, U.; Rocher, J. P.; Prioul, J. L. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive

indicator for rapid assessment of in vitro photosynthesis. In: Schulze, E. D.; Caldwell, M. M. (Eds), **Ecophysiology of photosynthesis**, Springer: Berlin, p. 49-70. 1995.

Sharkey, T. D.; Vassey, T. L.; Vanderveer, P. J.; Vierstra, R. D. Carbon metabolism enzymes and photosynthesis in transgenic tobacco having excess phytochrome. **Planta** 185: 287-296. 1991.

Sheen, J. Metabolic repression of transcription in higher plants. **Plant Cell** 2: 1027-1038. 1990.

Shi, L.; Guttenger, M.; Kottke, I.; Hampp, R. The effect of drought on mycorrhizae of beech (*Fagus sylvatica* L.): Changes in community structure and the content of carbohydrates and nitrogen storage bodies of the fungi. **Mycorrhiza** 12: 303-311. 2002.

Stewart, C. R. Effect of wilting on carbohydrates during incubation of excised bean leaves in the dark. **Plant Physiology** 48: 792-794. 1971.

Stitt, M.; Quick, W. P. Photosynthetic carbon partitioning: its regulation and possibilities for manipulation. **Physiologia Plantarum** 77: 633-641. 1989.

Taiz, L.; Zeiger, E. **Plant Physiology**. 3. ed. Sinauer Associates: Sunderland, 690p. 2002.

Trethewey, R. N.; Geigenberger, P.; Riedel, K.; Hajirezaei, M.-R.; Sonnewald, U.; Stitt, M.; Riesmeier, J. W.; Willmitzer, L. 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. 1998.

Trossatt, C.; Rathinasabapathi, B.; Weretilnyk, A.; Shen, T.; Huang, Z.; Gage, D. A.; Hanson, A. D. Salinity promotes accumulation of 3-dimethylsulfoniopropionate and its precursor S-Methylmethionine in chloroplasts. **Plant Physiology** 116: 165–171, 1998.

Vassey, T. L.; Quick, W. P.; Sharkey, T. D.; Stitt, M. Water stress, carbon dioxide, and light effects on sucrose phosphate synthase activity in *Phaseolus vulgaris*. **Physiologia Plantarum** 81: 37-44. 1991.

Widodo, W.; Vu, J. C. V.; Boote, K. J.; Baker, J. T.; Allen Jr, L. H. Elevated growth CO<sub>2</sub> delays drought stress and accelerates recovery of rice leaf photosynthesis. **Environmental and Experimental Botany** 49: 259-272. 2003.

Winter, H.; Huber, S. C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Plant Science** 19: 31-67. 2000.



Zinselmeier, C.; Westgate, M. E.; Schussler, J. R.; Jones, R. J. Low water potential disrupts carbohydrate metabolism in maize (*Zea mays* L) ovaries. **Plant Physiology** 107: 385-391. 1995.

Zrenner, R.; Stitt, M. Comparison of the effects of rapidly and gradually developing water-stress on carbohydrate metabolism in spinach leaves. **Plant, Cell and Environment** 14: 939-946. 1991.