

LEANDRO ELIAS MORAIS

**CURSO DIÁRIO DO BALANÇO DE CARBONO E DO
METABOLISMO PRIMÁRIO FOLIAR EM TRÊS ESPÉCIES
LENHOSAS TROPICAIS CULTIVADAS**

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
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M827c
2014
Morais, Leandro Elias, 1983-
Curso diário do balanço de carbono e do metabolismo
primário foliar em três espécies lenhosas tropicais cultivadas /
Leandro Elias Moraes. – Viçosa, MG, 2014.
viii, 46f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Fábio Murilo DaMatta.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Fisiologia vegetal. 2. Plantas lenhosas. 3. Carbono.
4. Metabolismo primário. 5. Fotossíntese. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa
de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 571.2

LEANDRO ELIAS MORAIS

**CURSO DIÁRIO DO BALANÇO DE CARBONO E DO
METABOLISMO PRIMÁRIO FOLIAR EM TRÊS ESPÉCIES
LENHOSAS TROPICAIS CULTIVADAS**

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: 08 de Agosto de 2014.

Wagner L. Araújo
Coorientador

Adriano Nunes Nesi

Kelly da Silva Coutinho Detmann

Diolina Moura Silva

Fábio Murilo DaMatta
Orientador

Ofereço

aos meus pais, Ana Rocha e Geraldo Filho, e meus irmão, Geano e Samuel Rocha, que me deram uma infância maravilhosa e me mostraram o valor da verdadeira fraternidade.

Dedico

a Natália por todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Biologia Vegetal e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, por todo suporte, auxílio e também pela oportunidade.

A CAPES e CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Fábio, por toda amizade, ensinamentos, orientação, pela competência exemplar, comprometimento e toda atenção.

Aos professores Wagner Araújo, Adriano Nunes-Nesi, Diolina Moura, e a Dr^a Kelly Coutinho, pelas valiosas sugestões e colaboração para melhoria deste trabalho.

Aos amigos do grupo café/arroz: Paulo Silva, Kelly, Paulo Cavatte, Mariela, Aline, Gustavo, Alice, Samuel, Lílian, Medina, Josimar, Lucas, Rodrigo, Matheus, Leandro, Felipe, pela cumplicidade, companheirismo e enorme colaboração na execução deste trabalho.

Aos professores, funcionários e estudantes do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.

Aos amigos de república Leandro Vieira, Alexandre Capucho, André Rodrigues e Zé Adécio e também da “pelada de 4^a feira”, por tornar a vida mais descontraída.

Aos meus amigos de infância em Ibiá, do ensino médio em Uberaba, da graduação em Juiz de Fora e do mestrado em Viçosa.

A todos aqueles que contribuíram para realização deste trabalho, recebam meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE	
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	7
2.1 Material vegetal e aspectos gerais.....	7
2.2 Avaliações	7
2.2.1 Trocas gasosas, fluorescência da clorofila a, estimativa da fotorrespiração e fluxo de elétrons associado à fotossíntese e à fotorrespiração.....	7
2.2.2 Atividades enzimáticas.....	9
2.2.3 Determinação de hexoses, sacarose, malato, fumarato, amido, proteínas aminoácidos e fenóis solúveis totais.....	9
2.2.4 Determinação dos níveis de nucleotídeos e hexoses-fosfato	10
2.2.5 Perfil de metabólito.....	10
2.2.6 Gel proteico unidimensional de eletroforese.....	11
2.3 Análise estatística.....	11
3 RESULTADOS.....	12
3.1 Trocas gasosas e variáveis da fluorescência da clorofila a.....	12
3.2 Curso diário de metabólitos.....	15
3.3 Perfil de metabólitos	18
3.4 Atividades enzimática.....	21
4 DISCUSSÃO.....	27
4.1 Variações diurnas da fotossíntese respondem, preponderantemente, a fatores.... difusivos.....	27
4.2 Variabilidade interespecífica na alocação diária de fotoassimilados.....	30
4.3 Metabolismo noturno: respiração, degradação do amido foliar e crescimento vegetal.....	33
5 CONCLUSÃO.....	36
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

RESUMO

MORAIS, Leandro Elias, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2014. **Curso diário do balanço de carbono e do metabolismo primário foliar em três espécies lenhosas tropicais cultivadas.** Orientador: Fábio Murilo DaMatta. Coorientador: Wagner L. Araújo.

A maioria dos estudos envolvendo variações diurnas do metabolismo vegetal tem-se concentrado em espécies herbáceas em condições controladas. Tem-se questionado a validade de extrapolação de modelos de alocação de carbono em plantas herbáceas para espécies lenhosas/perenes. Neste estudo, procurou-se explorar o curso diário de carboidratos e de outros metabólitos importantes quanto ao balanço energético em espécies lenhosas tropicais com taxas de crescimento (e origem evolutiva quanto à disponibilidade de irradiância) e capacidades fotossintéticas contrastantes, em condições de campo, na estação de crescimento ativo. Para tanto, utilizaram-se três espécies lenhosas, sendo duas evoluídas em ambientes de sombra e com baixa taxa de crescimento: café (*Coffea arabica* ‘IAC44’) e laranja (*Citrus sinensis* ‘Natal’); e outra espécie evoluída em ambiente a pleno sol e com elevada taxa de crescimento, eucalipto (*Eucalyptus grandis* x *urophylla* Clone 3336). As plantas foram cultivadas em Viçosa, sudeste do Brasil, a pleno sol, sob práticas agrônômicas usuais. Foram realizadas avaliações diárias de trocas gasosas, fluorescência da clorofila a, teores de metabólitos e atividades enzimáticas. Observaram-se decréscimos consistentes, ao longo do dia, nos valores de vários parâmetros fotossintéticos (e.g., condutância estomática, taxa de assimilação líquida de CO₂, taxa de transporte de elétrons e coeficiente de dissipação fotoquímico), particularmente em citrus e café, cujas taxas fotossintéticas foram grandemente limitadas por fatores difusionais. Essas espécies também exibiram os maiores incrementos diurnos nos parâmetros relacionados aos processos não assimilativos de CO₂ (e.g., fotorrespiração e coeficiente de dissipação não fotoquímico) e as menores taxas de respiração noturna. Em eucalipto, foi observado um padrão típico de turnover de carboidratos, isto é, acúmulo de amido (e outros carboidratos como sacarose) ao longo do dia, seguido de degradação noturna, mas este padrão não foi observado em café. Citrus, aparentemente, apresentou um padrão intermediário de turnover de carboidratos, caracterizado por um giro de sacarose e polióis, mas não de amido. Ao longo do dia, não se verificou alteração nas concentrações de glicose-6-fosfato, glicose-1-fosfato, frutose-6-fosfato, proteínas e aminoácidos. Em café, houve

aumento significativo nas concentrações diurnas de fenóis solúveis totais, seguido por um decréscimo ao longo da noite. Nas três espécies, foram observados acréscimos na concentração de isocitrato e, em eucalipto, observou-se acúmulo de succinato e níveis não detectáveis de malato. Esse ácido orgânico não variou ao longo do dia em café e citrus, entretanto, nessas espécies, houve acúmulo de piruvato e de glicina. A atividade catalítica das enzimas envolvidas no ciclo de Calvin não variou ao longo do dia em todas as espécies. Comparada a café ou citrus, em eucalipto, observou-se maior conteúdo relativo e também maior atividade total da rubisco; em adição, constatou-se a maior atividade catalítica da pirofosforilase da ADP-glicose, β -amilase e fosforilase do amido. Em eucalipto, também se observou maior atividade das invertases, e semelhantemente a citrus, observou-se acréscimo diurno na atividade da sintase da sacarose-fosfato. Em suma, as espécies aqui estudadas apresentaram divergências nos mecanismos associados à capacidade de manter o equilíbrio entre os processos fotoquímicos/bioquímicos acoplados com a variação diária das condições ambientais. Discutem-se essas divergências num contexto de fornecimento de carbono e energia para a otimização do ganho de carbono e do acúmulo de biomassa.

ABSTRACT

MORAIS, Leandro Elias, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2014. **Daily course of carbon balance and leaf primary metabolism in three tropical crop woody species.** Advisor: Fábio Murilo DaMatta. Co-advisor: Wagner L. Araújo.

Most studies dealing with diurnal variations in plant metabolism have focused on herbaceous species under controlled conditions. It has been invoked to what extent extrapolations from carbon allocation models based on herbaceous species can be valid for evergreen/woody species. In this study, I aimed to investigate the diurnal course of carbohydrates and other important metabolites in relation to the energetic balance in tropical woody species with contrasting growth rates (and evolutionary origin regarding irradiance availability) and photosynthetic capacities, under field conditions and during the active growth season. For these purposes, three woody species were examined: two that evolved under shade environments and display slow growth rates, coffee (*Coffea arabica* ‘IAC44’) and citrus (*Citrus sinensis* ‘Natal’); and the other species that evolved under full sun conditions presenting a fast growth rate, eucalypt (*Eucalyptus grandis* x *urophylla* Clone 3336). The plants were grown in Viçosa, southeastern Brazil, under open field conditions and standard agronomic practices. Diurnal measurements of gas exchanges, chlorophyll a fluorescence, metabolite contents and enzymatic activities were performed. Over the course of the day, consistent decreases in the values of several photosynthetic parameters (e.g., stomatal conductance, CO₂ net assimilation rate, electron transport rate and photochemical quenching) were observed, particularly in citrus and coffee, in which photosynthetic rates were largely limited by diffusive constraints. These species also displayed the highest diurnal increments in the parameters not related to carbon gain (e.g., photorespiration and non-photochemical quenching) and the lowest dark respiration rates. In eucalypt, it was observed a unique pattern of carbohydrate turnover, i.e., starch accumulation (and other carbohydrates such as sucrose) along the day, followed by nocturnal degradation, which did not happen in coffee. Citrus, apparently, presented an intermediate pattern of carbohydrate turnover, as evidenced by the cycling of sucrose and polyols, but not starch. Changes in the concentrations of glucose-6-phosphate, glucose-1-phosphate, fructose-6-phosphate, proteins and amino acids were not detected over the course of the day. In coffee, total soluble phenolic pools increased significantly along the diurnal period, followed by

decreases in phenolic pools during the night. In the three species, increases in isocitrate concentration (and, in eucalypt, succinate accumulation) paralleled to undetectable malate levels were observed. Malate levels did not change along the day in coffee and citrus, however these species exhibited pyruvate and glycine accumulation. The enzymatic activities associated with the Calvin cycle did not change along the day in all species studied. In comparison with coffee or citrus, eucalypt showed the highest Rubisco relative content and total Rubisco activity; additionally, ADP-glucose pyrophosphorylase, β -amylase and starch phosphorylase enzymatic activities were also higher in eucalypt. This species also displayed a higher invertase activity, and, similar to citrus, showed diurnal increases in the sucrose-phosphate synthase activity. In summary, the species herein studied demonstrably showed divergent mechanisms associated with their capacities for keeping a balance between photochemical/biochemical processes coupled with diurnal variations in environmental conditions. Such divergences are discussed in the context of carbon and energy supply for the optimization of carbon gain and biomass accumulation.

1 – INTRODUÇÃO

A síntese de amido e sacarose, principais produtos da fotossíntese em plantas, é responsável pela maior parte do consumo de equivalentes redutores oriundos da etapa fotoquímica (Stitt et al, 2010). A maior parte da sacarose sintetizada durante o dia é exportada das folhas para suportar o crescimento de órgãos-dreno (e.g., raiz, caule, novas folhas), enquanto o amido se acumula nas folhas. Durante a noite, esse amido é degradado para prover esqueletos de carbono e energia para manutenção e o crescimento. Assim, em tecidos fotossintéticos, o amido é denominado de “amido transitório”, por ser sintetizado/armazenado nos cloroplastos durante dia, em função da fotossíntese, e degradado à noite.

A síntese de amido transitório garante que, durante o dia, a fotossíntese ocorra a taxas superiores às de formação/exportação de produtos finais, como sacarose, sendo uma válvula para o “extravazamento” de carbono, evitando ou mitigando a retroinibição por acúmulo de produtos finais (Geiger e Servaites, 1994; Ludewig et al, 1998; Zeeman e ap Rees, 1999). À noite, produtos oriundos da degradação do amido transitório fornecem suprimento contínuo de carbono, mantendo o floema ativo e garantindo, assim, sua funcionalidade (Dinant e Lemoine, 2010). Além disso, respostas a modificações no metabolismo do amido foliar podem ser causadas por alteração da razão fonte:dreno (Wünsche et al, 2005; Nebauer et al, 2011), ou por fatores ambientais, tais como temperatura (Sicher, 2011; Pyl et al, 2012), concentração de CO₂ (Walter et al, 2005), fotoperíodo (Graf e Smith, 2011) e intensidade de luz (Walters et al, 2004).

Plantas deficientes na síntese ou degradação do amido apresentam um retardamento severo no crescimento, que pode ser revertido sob iluminação contínua (Smith e Stitt, 2007). Gibson et al (2011) sugerem que a manipulação do metabolismo do amido foliar é uma estratégia viável para aumentar a fotossíntese, de modo a resultar em maior crescimento e produtividade das culturas. O esgotamento do amido foliar, causado por um prolongamento da noite, por exemplo, acarreta depleção de açúcares e uma inibição do crescimento; se persistente, essa depleção de carbono torna-se crônica e o crescimento é prejudicado, em longo prazo (Smith e Stitt, 2007). Ademais, as taxas de síntese/degradação do amido foliar exibem forte correlação positiva com crescimento (Sulpice et al, 2014). A grande importância do metabolismo do amido foliar, no que respeita ao acúmulo de biomassa, está altamente associada com a mobilização das reservas de amido transitório para fornecer energia para o crescimento noturno.

Portanto, o manejo eficiente dessas reservas é essencial para que a planta otimize suas taxas de crescimento e alcance o sucesso reprodutivo (Smith e Stitt, 2007; Weise et al, 2011; Andriotis et al, 2012;. Stitt e Zeeman, 2012).

Em tecidos fotossintéticos, a frutose-6-fosfato (intermediário do ciclo de Calvin-Benson) é convertida a ADP-glicose (ADPG) que, por seu turno, é substrato para a síntese de amido, processo mediado pelas enzimas fosfoglicoisomerase (PGI), fosfoglicomutase (PGM) e pirofosforilase da ADP-glicose (AGPase), sendo esta última considerada a enzima-chave para síntese de amido (Zeeman et al, 2007). O substrato ADPG atua como doador glicosil para diferentes classes de sintase do amido (SS), que, junto com enzimas ramificadoras e desramificadoras, interferem na composição e estrutura dos grânulos de amido (Zhang et al, 2005).

A degradação do amido, em cloroplastos, difere daquela observada em amiloplastos. Inicialmente, o grânulo de amido é adequadamente fosforilado, com gasto de ATP, pelas enzimas dicinase hídrica de glicano, dicinase hídrica de fosfoglicano e fosfatases, que removem excesso de fosfato. A hidrólise do grânulo de amido é catalisada principalmente pelas enzimas β -amilase (BAM), fosforilase do amido e enzima desramificadora (ISA). A associação entre fosfato inorgânico e amido transitório leva a uma maior hidratação do grânulo, acarretando em maior atividade de BAM e ISA e, portanto, aumentando a taxa de degradação do amido (Kötting et al, 2010). O principal produto da atividade combinada de BAM e ISA é a maltose, seguido por glicose, maltotriose e maltoligossacarídeos (Lu e Sharkey, 2006). Maltose e glicose são transportadas para o citosol, onde são convertidas em hexoses fosfatadas, enquanto maltotrioses são metabolizadas no cloroplasto pela enzima desproporcionadora, que converte duas unidades de maltotrioses em uma de maltopentose (substrato para BAM) e uma de glicose (exportada para o citosol) (Zeeman et al, 2007). Durante a noite, a conversão de amido em sacarose, juntamente com a exportação de sacarose, constituem-se nos processos com maior requerimento energético na folha, consumindo, em média, 29% do ATP produzido na respiração noturna (Bouma et al, 1995; Noguchi et al, 2001). Com efeito, em *Arabidopsis*, a taxa de degradação do amido é positivamente correlacionada com as taxas de respiração noturna (Gibon et al, 2009; Pilkington et al, 2014).

O nível de transcritos de enzimas da síntese de amido sofre pouca ou nenhuma alteração diária; por outro lado, o nível de transcritos de muitas enzimas associadas à degradação atinge seu pico durante o dia e torna-se menos abundante ao final da noite,

sugerindo forte regulação pós-transcricional, uma vez que a atividade das enzimas de degradação do amido é inversamente proporcional ao nível de transcritos (Smith et al, 2004; Usadel et al, 2008). Enzimas de degradação do amido podem ser retroinibidas pelo acúmulo de glicanos liberados do grânulo (Critchley et al, 2001) ou reguladas por fosforilação (Niittyla et al, 2006). Enzimas de síntese, como a AGPase, sofrem forte regulação alostérica pelo 3-fosfoglicerato (3PGA) e fosfato inorgânico, os quais atuam como ativador e inibidor, respectivamente, da enzima citada (Geigenberger et al, 2005; Geigenberger, 2011). Isso pode servir para ajustar a taxa de síntese de amido com o balanço entre a fixação de CO₂ e a síntese/exportação de sacarose.

Em plantas, a luz regula o metabolismo do amido transitório por meio do sistema ferredoxina/tiorredoxina dependente (NTRC) e independente (TRXS) de NADPH. Dessa forma, enzimas da degradação, como dicinase hídrica de glicano (Mikkelsen et al, 2005), fosfatase do amido (Sokolov et al, 2006) e BAM (Sparla et al, 2006; Valerio et al, 2011), são ativadas pela redução de resíduos de cisteínas por meio de TRXS. NTRC e TRXS promovem a ativação da AGPase durante o dia (quando o amido é sintetizado), tornando-a mais sensível à ativação alostérica pelo 3PGA, ao passo que, à noite (quando o amido é degradado), a atividade da AGPase diminui (Hendricks et al, 2003). O nível de regulação da atividade da AGPase em resposta ao estado redox do cloroplasto, em função da luz, é o principal mecanismo regulatório de acúmulo de amido transitório em folhas (Michalska et al, 2009, Kötting et al, 2010; Geigenberger, 2011).

Mecanismos regulatórios da síntese e degradação do amido foliar permitem que o acúmulo de amido ocorra a uma taxa praticamente constante ao longo do dia, como verificado em *Arabidopsis*; à noite, cerca de 95% do amido é degradado, também a uma taxa aproximadamente linear (Graf e Smith, 2011). Esse mesmo padrão tem sido observado em diversas culturas, como soja (Chatterton e Silvius, 1979), batata (Lorenzen e Ewing, 1992), beterraba (Fondy e Geiger, 1982) e tomate (Magaña et al, 2009; Araújo et al, 2011). Semelhantemente a *Arabidopsis*, mutantes de tabaco sem PGM plastidial alteram esse padrão de giro do amido foliar, desencadeando acentuada redução no crescimento (Huber e Hanson, 1992). Por outro lado, mutantes de ervilha e *Lotus japonicus* são aparentemente normais em seu crescimento (Harrison et al, 1998; Vriet et al, 2010), demonstrando diferenças na regulação de síntese do amido transitório entre as espécies. Além disso, o conteúdo de amido foliar, ao final do dia, é inversamente correlacionado com o acúmulo de biomassa em *Arabidopsis* (Sulpice et

al, 2009), ou seja, acessos com rápido crescimento acumulam menos amido na folha durante o período de luz; ressalta-se, contudo, que esse padrão deve diferir de acordo com as condições de crescimento (e.g., intensidade de luz, comprimento do dia, temperatura) (Gibson et al, 2011; Pilkington et al, 2014).

Em espécies o amido é a principal forma de carboidrato armazenado na folha (Fondy et al, 1989; Zeeman e ap Rees, 1999), contudo, as plantas também podem apresentar diferentes formas de reserva de carbono transitório. Em algumas plantas C₃, como *Arabidopsis*, ácidos orgânicos, como malato e fumarato, também podem assumir papel fisiológico de reservas de carbono transiente, atuando como fonte alternativa de energia (Zell et al, 2010). Além disso, espécies de crescimento rápido, quando comparadas com as de crescimento lento, podem acumular maiores concentrações de ácidos orgânicos (mas não de açúcares solúveis) (Araújo et al, 2011). Em outras plantas, como algumas gramíneas, a sacarose sintetizada durante o dia pode ser exportada ou armazenada em vacúolos (juntamente com frutanos), provendo carbono reduzido para sustentar a contínua demanda noturna (Gordon et al, 1980). Assim, é plausível sugerir que espécies com estratégias diferentes de sobrevivência (e.g., espécies lenhosas/perenes contrastantes quanto ao desempenho de crescimento) ou história evolutiva distinta, possuam padrões de giro de carboidratos foliar diferente do observado em *Arabidopsis* (Graf e Smith, 2011; Stitt e Zeeman, 2012).

As taxas de crescimento variam consideravelmente entre espécies vegetais (Lambers e Poorter, 1992). Essa variação pode estar associada a fatores bióticos e abióticos, mas também é reflexo de um arranjo de vários processos fisiológicos (e.g., taxa de respiração foliar, eficiência do uso do nitrogênio, taxa de assimilação líquida de CO₂, longevidade foliar) (Lambers e Poorter, 1992). Em adição, o metabolismo do amido foliar é também considerado um desses processos funcionais, vez que pequenos distúrbios no giro desse metabólito podem acarretar impactos consideráveis no crescimento (Stitt e Zeeman, 2012). Além disso, o amido é considerado um metabólito integrador do crescimento em *Arabidopsis thaliana* (Sulpice et al, 2009). Portanto, o crescimento vegetal parece ser, em grande extensão, coordenado com o metabolismo do amido foliar (Sulpice et al, 2009).

Estudos realizados em café (*Coffea arabica*), uma espécie lenhosa evoluída à sombra e com baixa taxa de crescimento, evidenciam, de forma bastante recorrente, que as concentrações diurnas de amido foliar e de açúcares solúveis pouco variam, tanto em

plantas adultas cultivadas a pleno sol quanto em plantas jovens cultivadas em casa de vegetação, sob condições controladas (Batista et al, 2012), indicando um padrão diferente daquele observado em *Arabidopsis*. Por outro lado, em *Eucalyptus* sp., espécie lenhosa evoluída a pleno sol e de crescimento rápido, o padrão de giro do amido foliar assemelha-se ao de *Arabidopsis*, ou seja, ao longo do dia observa-se síntese/acúmulo de amido e sua degradação à noite (Lewis et al, 2011). Concomitantemente, esses dados sugerem haver padrões distintos no metabolismo do amido foliar entre espécies lenhosas e podem ser o reflexo da origem evolutiva distinta quanto à disponibilidade de luz, com consequências diretas sobre a magnitude de crescimento.

A taxa de assimilação líquida do CO₂, ao longo do dia, segue o curso diurno da irradiância durante as primeiras horas. No entanto, a quantidade de carbono fixado por fóton incidente diminui ao meio-dia (Valentin et al, 1995; Muraoka et al, 2000). Esse processo é, em grande parte, consequência do fechamento estomático ao meio-dia, em função de maior déficit de pressão de vapor, o que desencadeia diminuição da concentração de CO₂ na câmara subestomática (C_i) e também aumento da temperatura foliar, diminuindo a razão CO₂/O₂, sem decréscimos consistentes na taxa de transporte de elétrons. Por outro lado, em algumas espécies, o acúmulo de amido e de outros carboidratos, ao longo do dia, pode levar a uma inibição da fotossíntese associada ao acúmulo de produtos finais (Stitt et al, 2010). Potencialmente, isso contribui ainda mais para reduzir a utilização de poder redutor e acarretar fotoinibição da fotossíntese. Para evitar a ocorrência da fotoinibição, as plantas ajustam a partição do fluxo de elétrons entre processos assimilativos e não assimilativos de CO₂, de modo a dissipar o excesso de energia. Esses ajustes podem ser atribuídos aos aumentos de vias de dissipação de poder redutor, como fotorrespiração (Valentin et al, 1995; Muraoka et al, 2000; Franco e Lüttge, 2002; Shirke e Pathre, 2004) e ciclo água-água (Asada, 1999). Além disso, pode ocorrer reprogramação metabólica do tecido foliar, por meio de estímulo da via do xiquimato, resultando em acúmulo de metabólitos secundários, como flavonóides, atuando como dreno de esqueletos de carbono e, ainda, como válvula de dissipação de energia, por consumir ATP e NADPH (Hernández e Breusegem, 2010), como ocorre com o cafeeiro (Martins et al, 2014).

A maioria dos trabalhos envolvendo variações diárias na concentração do amido foliar tem sido centrada em espécies herbáceas cultivadas em câmaras de crescimento ou casa de vegetação. Em plantas lenhosas, a grande maioria dos trabalhos tem avaliado

o giro do amido (e de carboidratos não estruturais) de maneira sazonal e não diária (Sala et al, 2012). Neste estudo, procurou-se avaliar se o padrão recorrentemente observado em café, em termos de variações diárias da concentração de carboidratos, é mantido em espécies com a mesma origem evolutiva e padrão semelhante de acúmulo de biomassa, ou seja, espécies evoluídas à sombra com baixa taxa de crescimento, como é o caso do citrus (DaMatta, 2010).

Este trabalho visou elucidar os mecanismos de regulação do metabolismo do amido transitório em espécies lenhosas, com diferentes estratégias de acúmulo de biomassa e distinta origem evolutiva, quanto à disponibilidade de luz. Em particular, objetivou-se (i) investigar as variações diurnas da capacidade fotossintética e os mecanismos pelos quais o metabolismo do amido transitório é regulado em espécies evoluídas à sombra (café e citrus) e a pleno sol (eucalipto); (ii) avaliar alterações nos teores de amido, açúcares solúveis e ácidos orgânicos em tecidos foliares; (iii) identificar, por meio de perfil metabólito, alterações de concentrações de metabólitos associados direta ou indiretamente com a reserva energética, que poderiam potencialmente compensar a pouca ou nenhuma variação nos teores de carboidratos foliar em café; (iv) analisar o padrão de atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo do amido transitório e da sacarose.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material vegetal e aspectos gerais

Utilizaram-se três espécies lenhosas, sendo duas evoluídas em ambientes de sombra e com baixa taxa de crescimento: café (*Coffea arabica* 'IAC44') (com aproximadamente quatro anos de idade) e laranja (*Citrus sinensis* 'Natal', porta-enxerto limoeiro cravo) (cinco anos); e outra espécie evoluída em ambiente a pleno sol e com elevada taxa de crescimento: eucalipto (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* clone 3336) (dois anos). Os experimentos foram conduzidos em Viçosa (20°45'S, 42°15'W, 650 m de altitude), Minas Gerais, região de clima subtropical, com temperatura e precipitação média anual de 19°C e 1200 mm, respectivamente. As plantas (uma planta por cova) foram cultivadas em campo e submetidas a práticas agronômicas usuais (incluindo adubações periódicas e controle de pragas, doenças e plantas invasoras), sem irrigação, a pleno sol.

2.2 – Avaliações

As avaliações/coletas foram realizadas ao longo de um dia (21/03, 17/04 e 24/04/2013 em café, citrus e eucalipto, respectivamente) na estação de crescimento, época caracterizada por distribuição regular da precipitação, em folhas completamente expandidas, inseridas em ramos vegetativos e expostas ao sol. Em café e laranja utilizaram-se folhas localizadas no terço superior da copa, enquanto em eucalipto as avaliações foram realizadas em folhas localizadas no terço médio. As medições de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a foram realizadas ao longo do dia (9:00, 12:00, 15:00 h) e 21:00 h (± 30 min), e as coletas para avaliações bioquímicas foram realizadas às 6:00, 9:00, 12:00, 15:00, 18:00, 21:00, 24:00, 3:00 e 6:00 h (± 15 min). Para as análises bioquímicas, o material coletado foi imediatamente imerso em nitrogênio líquido e, então, transportado para o laboratório, onde foi armazenado a -80 °C, até ser analisado.

2.2.1 - Trocas gasosas, fluorescência da clorofila a, estimativa da fotorrespiração e fluxo de elétrons associado à fotossíntese e fotorrespiração

Foram avaliadas a condutância estomática (g_s), a taxa fotossintética líquida (A) e a concentração interna de CO_2 (C_i), utilizando-se de um analisador portátil de gás a

infravermelho (LI-6400, LI-COR Biosciences Inc., Nebraska, EUA) equipado com uma fonte de luz azul/vermelho (modelo LI-6400-02B, LI-COR). As medições foram realizadas sob irradiância de $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e press\u00e3o parcial de CO_2 de 40 Pa, sem qualquer controle de temperatura da c\u00e2mara foliar.

Na antemanh\u00e3, foi obtida a fluoresc\u00eancia m\u00ednima (F_0) via excita\u00e7\u00e3o dos tecidos foliares por luz vermelha modulada de baixa intensidade ($0,03 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A fluoresc\u00eancia m\u00e1xima (F_m) foi obtida pela aplica\u00e7\u00e3o de um pulso de 0,8 s de luz act\u00ednica saturante ($8000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A fluoresc\u00eancia vari\u00e1vel (F_v) foi determinada pela diferen\u00e7a entre F_0 e F_m e, a partir desses valores, foi calculado o rendimento qu\u00e2ntico potencial do fotossistema II (van Kooten e Snel, 1990), conforme a equa\u00e7\u00e3o:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

As folhas foram aclimatadas \u00e0 luz act\u00ednica ($1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 60 s, a fim de se obter a fluoresc\u00eancia transiente (F_s), seguido por um pulso de luz saturante ($8000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0,8 s) para estimar-se a fluoresc\u00eancia m\u00e1xima \u00e0 luz (F_m') e, por \u00faltimo, aplicou-se um pulso de luz vermelho-distante, para obter-se a fluoresc\u00eancia m\u00ednima ap\u00f3s aclima\u00e7\u00e3o \u00e0 luz act\u00ednica (F_0'). Com esses par\u00e2metros, foram calculados os coeficientes de extin\u00e7\u00e3o fotoqu\u00edmica (q_p) e n\u00e3o-fotoqu\u00edmica (NPQ) e a efici\u00eancia fotoqu\u00edmica do transporte de el\u00e9trons associado ao fotossistema II (Φ_{FSII}), conforme Maxwell e Johnson (2000). A taxa aparente de transporte de el\u00e9trons (J_t) foi calculada seguindo procedimentos descritos por Genty et al. (1989), como sendo $J_t = \Phi_{\text{FSII}} \times \beta \times \alpha \times RFA$, em que RFA \u00e9 a radia\u00e7\u00e3o fotossinteticamente ativa, α \u00e9 a absorv\u00eancia da folha (0,84) e β reflete o particionamento dos pacotes de energia entre os fotossistemas I e II (0,5).

A respira\u00e7\u00e3o mitocondrial durante o dia (R_L) foi estimada de acordo com Bai et al. (2008), usando a respira\u00e7\u00e3o noturna ou a taxa de assimila\u00e7\u00e3o l\u00edquida de CO_2 antes do amanhecer (R_n). R_L foi estimada a diferentes temperaturas usando o $Q_{10}=2,2$ (Larcher 1983) como a seguir:

$$R_L = R_n Q_{10}^{(T_d - T_n)/10};$$

em que T_n \u00e9 a temperatura foliar no qual a R_n foi medida, e T_d \u00e9 a temperatura foliar na qual a R_L foi calculada.

O fluxo de el\u00e9trons usado para carboxila\u00e7\u00e3o (J_c) e oxigena\u00e7\u00e3o (J_o) da RuBP, bem como a taxa de fotorrespira\u00e7\u00e3o da rubisco (P_R) foi obtida usando as seguintes f\u00f3rmulas (Epron et al, 1995; Valentini et al, 1995):

$$J_c = 1/3 [J_t + 8 (A + R_L)];$$

$$J_o = 2/3[J_t + 4 (A + R_L)];$$

$$R_p = 1/12 [J_t - 4 (A + R_L)];$$

2.2.2 - Atividades enzimáticas

A atividade da β -amilase foi determinada segundo Zeeman et al (1998). Para tanto, o extrato enzimático foi extraído a partir de amostras de tecido foliar em acetato de sódio (50 mM, pH 6.0), EDTA (5 mM) e DTT (5mM). O extrato foi colocado em um meio de reação contendo 10 mg mL⁻¹ de amido solúvel de batata. A reação foi paralisada a 100°C, por 5 min. A maltose oriunda da reação foi hidrolisada por incubação com 2 unidades de maltase (de levedura) por 2 h, a 37°C, e a glicose foi determinada segundo Fernie et al (2001). Para as análises das seguintes enzimas, os extratos vegetais foram preparados exatamente conforme descrito por Nunes-Nesi et al (2007). Foram quantificadas a desidrogenase do malato dependente de NAD⁺ (MDH-NAD⁺), sintase da sacarose no sentido de síntese (SuSy), fosfoglicomutase (PGM) (Nunes-Nesi et al, 2005); rubisco (Sulpice et al. 2007); desidrogenase da ADP-glicose (AGPase) (Gibon et al, 2004); desidrogenase do isocitrato dependente de NADP⁺ (ICDH-NADP⁺), isomerase da triose-fosfato (TPI), hexocinase (HK), Enolase (ENO), desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato dependente de NADPH (GA3PDH-NADPH) (Fernie et al, 2001); aldolase (ALD), cinase do fosfoglicerato (PGK), cinase do piruvato, sintase do citrato (CS), carboxilase do fosfoenolpiruvato (PEPcase), desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato dependente de NADH (GA3PDH-NADH), fosfofrutocinase (PFK) (Gibon et al, 2004); aconitase (ACO) (MacDougall e ap Rees 1991), transaldolase (Debnam e Emes, 1999), desidrogenase da glicose-6-fosfato (G6PDH-NAD⁺) (Graeve et al, 1994), fosforilase do amido (STase) (Harada e Ishizawa, 2003), invertases ácida e alcalina (Praxedes et al, 2006; Ronchi et al, 2006) e sintase da sacarose-fosfato (SPS) (Jenner et al, 2001). O estado de ativação (%) das enzimas SPS e rubisco foi calculado pela razão entre a atividade inicial e total dessas enzimas.

2.2.3 - Determinação de hexoses, sacarose, malato, fumarato, amido, proteína, aminoácidos e fenóis solúveis totais

Amostras foliares liofilizadas foram submetidas à extração etanólica, a quente, determinando-se, na fração solúvel em etanol, os teores de glicose, frutose e sacarose (Ferne et al, 2001), aminoácidos totais (Gibon et al, 2004) e malato e fumarato (Nunes-Nesi et al, 2007). Na fração insolúvel, determinaram-se os teores de amido e proteína total (Ferne et al, 2001; Gibon et al, 2004). A extração/determinação de fenóis solúveis totais foi realizada de acordo com Abou Aziz et al (1976), empregando-se o reativo de Follin-Ciocalteau e, como padrão, o ácido pirogálico.

As concentrações de carboidratos totais não-estruturais (CNE) foi estimada pela soma das concentrações de glicose, frutose, sacarose e amido.

2.2.4 - Determinação dos níveis de nucleotídeos e hexoses-fosfato

Amostras de folhas liofilizadas foram submetidas à extração em 300 µL de ácido tricloroacético-éter (16%) a frio, agitadas em vórtex e depois incubadas por 3 h, a 4°C. Ao material em suspensão adicionou-se ácido tricloroacético/água (16%) contendo EGTA (5mM), seguido por centrifugação (12000 g, 5 min, 4°C). O sobrenadante (aproximadamente 200 µL) foi transferido para um novo tubo onde foi lavado três vezes com 300 µL de solução de éter saturado por água, com subsequente centrifugação a 12000 g, por 5 min, a 4°C. O sobrenadante contendo éter foi descartado e a fase aquosa final foi neutralizada com 2,5M KOH/1M trietanolamina (TEA). O pH foi determinado com papel-fita indicador de pH e ajustado para 6,5. O extrato foi utilizado para determinação de glicose-6-fosfato, glicose-1-fosfato e frutose-6-fosfato, conforme descrito por Carrarri et al (2003).

Amostras liofilizadas de folhas foram extraídas a frio em HClO₄ (0,1 M) para determinação de NAD⁺/NADP⁺ e em KOH (0,1M), para determinação de NADH/NADPH, segundo Queval e Noctor (2007). Em seguida, os extratos ácidos e alcalinos foram incubados em meios de reação apropriados para a quantificação subsequente dos nucleotídeos (Gibon e Larher, 1997; Schippers et al, 2008).

2.2.5 - Perfil metabólico

As amostras vegetais liofilizadas foram maceradas em moinho de bolas. Os metabólitos foram quantificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), exatamente como descrito por Lisec et al (2006). O cromatograma e o espectro de massa foram avaliados usando o programa TAGFINDER (Luedemann et al,

2008). Os metabólitos foram identificados em comparação com banco de dados criados a partir de padrões autênticos (Kopka et al, 2005; Schauer et al, 2005). A identificação e a anotação dos picos detectados seguiram as recomendações descritas em Fernie et al (2011).

2.2.6– Gel proteico unidimensional de eletroforese

Para verificar o padrão de expressão da rubisco foi realizado a análise em gel proteico unidimensional. Primeiramente, foi feito a extração de proteínas totais de folhas coletadas às 12:00 h por meio do método proposto por Wang et al (2003). Em seguida, determinou-se a concentração de proteínas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). As amostras proteicas foram desnaturadas a 95°C por 5 min e resolvidas em gel SDS-PAGE 12% (Laemmli, 1970), aplicando-se 200 µg de proteína por linha. O gel SDS-PAGE foi corado com azul de comassie R-250. As análises de imagem foram realizadas utilizando-se ImageMaster 2D platinum (GE - Healthcare)

2.3 - Análise estatística

Os experimentos foram montados em delineamento em blocos casualizados, com sete repetições, tendo como unidade experimental uma planta. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas entre si pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade, utilizando-se do Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG-UFV, 2007).

3 – RESULTADOS

Os resultados abaixo descritos referem-se a experimentos conduzidos em 2013 (vide material e métodos). Salienta-se, contudo, que o mesmo padrão de resposta de algumas variáveis (trocas gasosas, fluorescência da clorofila a, conteúdo de carboidratos, malato e proteínas) foi observado num experimento conduzido em 2012, sob condições muito similares às do presente estudo. Estes resultados (dados não mostrados) reforçam, pois, a consistência dos dados que se descreve a seguir.

3.1 - Trocas gasosas e variáveis da fluorescência da clorofila a

Das três espécies avaliadas, o eucalipto, que possui relativamente maiores taxas de crescimento e evoluiu em ambientes a pleno sol, exibiu, ao longo do dia, maiores valores de A associados com maiores valores de g_s e C_i (Fig. 1A-C). Comparando-se citrus e café, espécies de mais lento crescimento, a magnitude dos valores daqueles parâmetros foi maior em citrus. Em todo o caso, nas três espécies, os valores de A reduziram-se ao longo do dia, especialmente em citrus e café, fato pelo menos aparentemente associado a fortes limitações difusivas (estomáticas) à fotossíntese, conforme se depreende das (i) altas correlações positivas entre A e g_s (Fig. 1D), (ii), dos decréscimos diurnos de C_i (Fig. 1C) e (iii) e das reduções proporcionalmente maiores em g_s que em A (Fig. 1A e B). Comparando-se, por exemplo, os valores de A medidos às 15:00 h em relação àqueles medidos às 09:00 h, houve decréscimos da ordem de 75% em café, 65% em citrus e 26% em eucalipto, enquanto as reduções em g_s , nessa mesma ordem, foram de 82, 75 e 50%. Estes dados indicam limitações difusivas bem menos expressivas nessa espécie que em citrus ou café. Essas menores limitações difusivas em eucalipto, juntamente com as maiores quantidades de rubisco (Fig. 3) (a despeito das menores concentrações absolutas de proteínas), explicam em grande parte o maior potencial fotossintético dessa espécie.

Observaram-se incrementos, ao longo do dia, nos valores de R_p (Fig. 1E) e na razão R_p/A_b (Fig. 1F), particularmente em citrus e em café. Enquanto essa razão foi da ordem de 0,25 no início da manhã, independentemente da espécie, valores elevados, superiores a 0,50, foram observados em café e citrus, às 15h00. Em consonância com os maiores valores de A e R_p em eucalipto e citrus, os valores de J_t (Fig. 2A) foram maiores nessas duas espécies em relação aos do cafeeiro. Analisando-se a partição do fluxo de elétrons entre os processos carboxilativo e oxigenativo, observaram-se

variações diurnas muito mais expressivas nas razões J_c/J_t , J_o/J_t e J_o/J_c , e em citrus e café (Fig. 2B-D), reforçando o fato de que, ao longo do dia, há um aumento relativo nas taxas de fotorrespiração possivelmente associado, pelo menos em parte, ao incremento das limitações difusionais à fotossíntese nessas espécies em relação ao observado em eucalipto (Fig. 1D).

Em consonância com os maiores requerimentos energéticos para sustentar maiores taxas de A e R_p em citrus e em eucalipto, em relação ao cafeeiro, observaram-se maiores valores de q_p (Fig. 1F) nessas espécies, enquanto os valores de NPQ (Fig. 1E) foram maiores em café, sugerindo uma maior necessidade de dissipação da energia radiante na forma de calor. Registre-se, ainda, que em citrus e em café, mas não em eucalipto, os valores de NPQ após o meio-dia foram maiores que os da manhã, o que está em conformidade com a maior dissipação de poder reductor em função da menor utilização da energia radiante, tendo-se em vista os fortes decréscimos diurnos observados em A (Fig. 1A). Em todo o caso, nenhum sinal evidente de fotoinibição pôde ser observado em quaisquer das espécies avaliadas, a julgar-se pelos valores da razão F_v/F_m , que se mantiveram em torno de 0,80 ao meio-dia (Fig. 2G). Por fim, saliente-se que os valores de R_n foram aproximadamente a metade em citrus e café em relação aos observados em eucalipto, cuja magnitude girou em torno de $2,0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 1G).

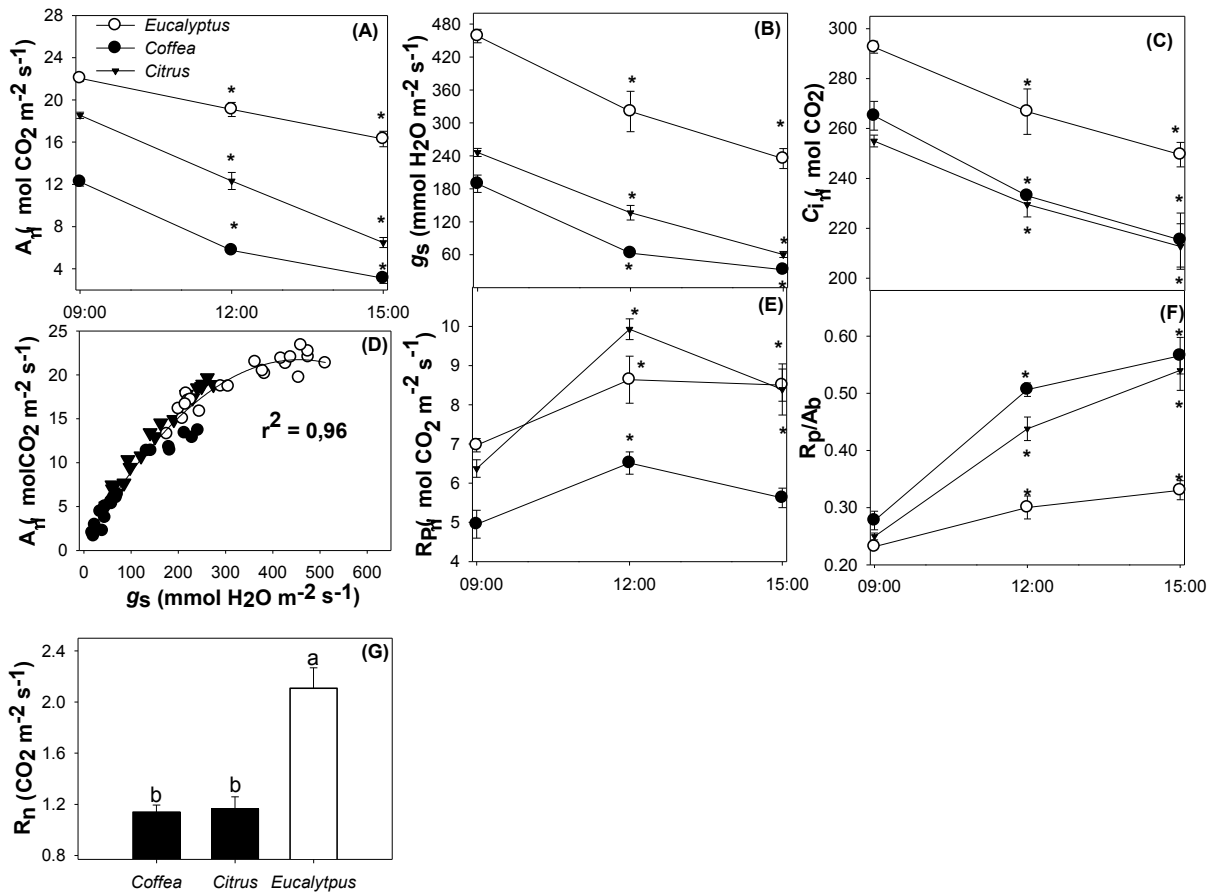


Figura 1 – Curso diurno da taxa de assimilação líquida de carbono (A) (A), condutância estomática (g_s) (B), concentração interna de CO₂ (C_i) (C), correlação entre $A \times g_s$ (C) em Coffea, Citrus e Eucalyptus (D) taxa de fotorrespiração (R_p) (E), razão entre R_p e a fotossíntese bruta (A_b) (F) e respiração noturna (R_n) (G). Valores são médias (\pm erro padrão) de 7 repetições. O asterisco indica diferença estatística da média obtida num determinado horário em relação àquela obtida as 9:00h, dentro de cada espécie, pelo teste de Student (Teste t; $P \leq 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies (Newman- Keuls, $P \leq 0,05$).

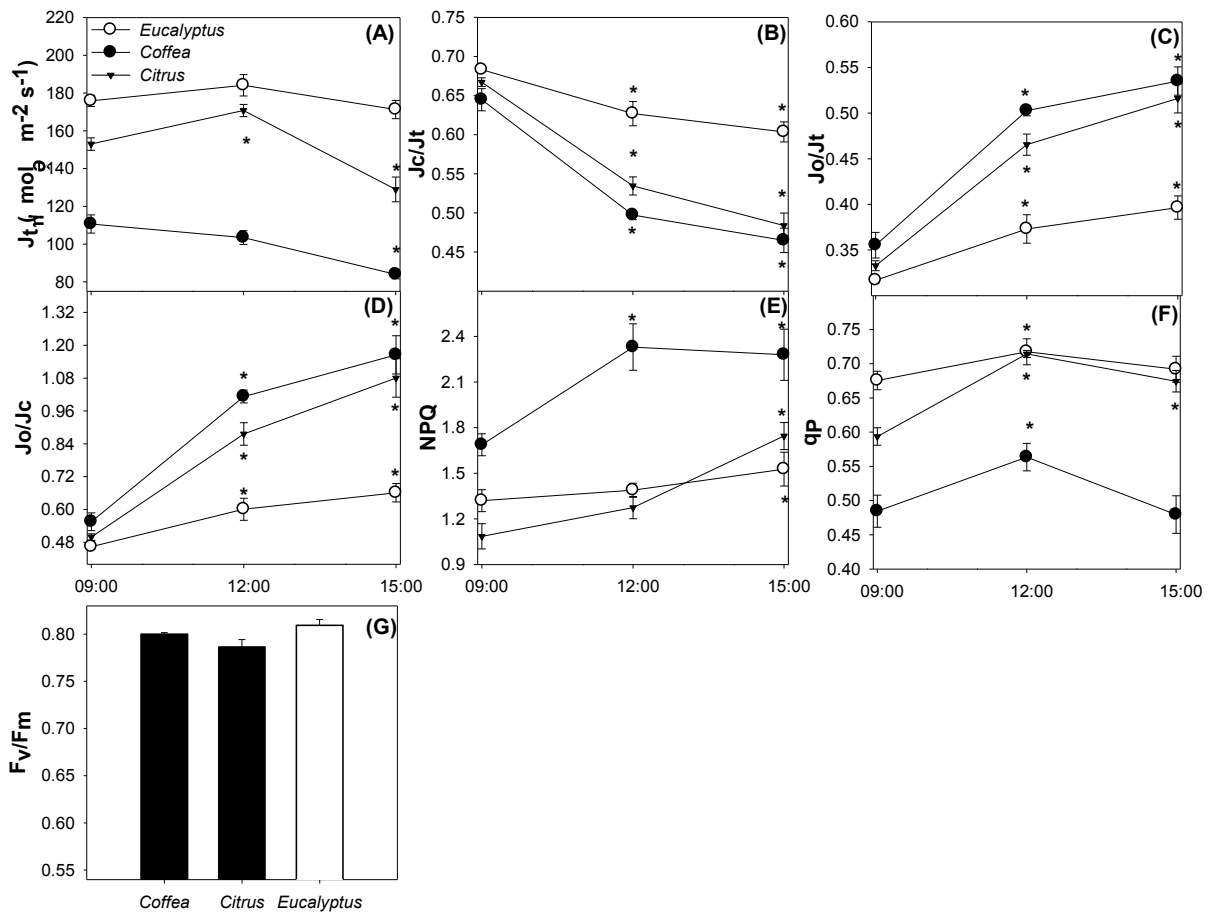


Figura 1 – Taxa de transporte de elétrons (J_t) (A), razão entre fluxo de elétrons destinados carboxilação (J_c) da rubisco e J_t (B), razão entre fluxo de elétrons destinado oxigenação (J_o) da rubisco e J_t (C), razão J_o/J_t (D), coeficiente de dissipação não fotoquímico (NPQ) (E) e fotoquímico (q_p) (F), eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) (G). Valores são médias (\pm erro padrão) de 7 repetições. O asterisco indica diferença estatística da média obtida num determinado horário em relação àquela obtida as 9:00h, dentro de cada espécie, pelo teste de Student (Teste t; $P \leq 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$).

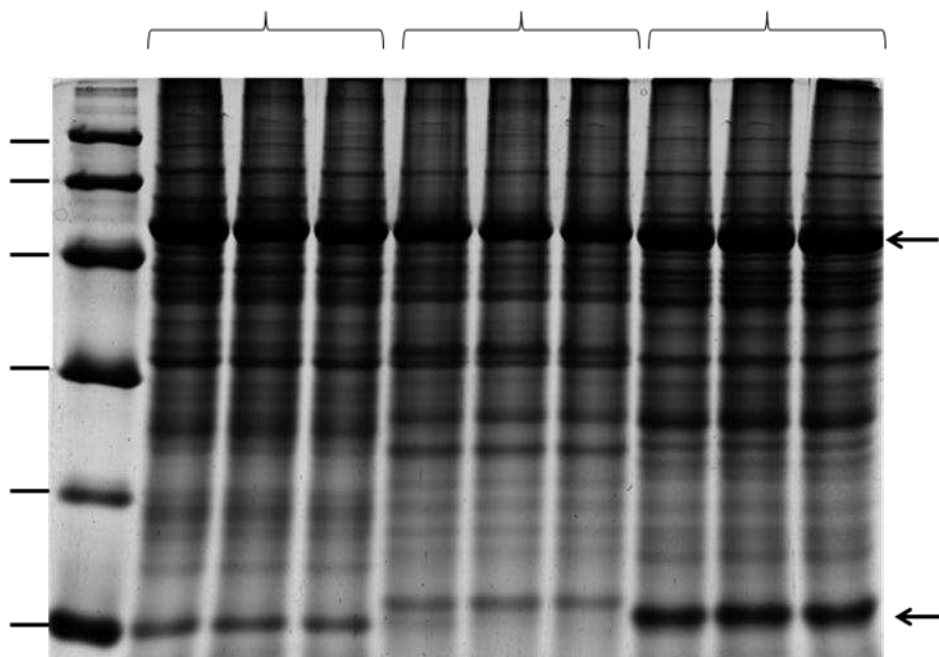


Figura 2 – Perfil proteico unidimensional do extrato proteico (200 μ g de proteína) total de folhas de café, citrus e eucalipto, coletadas às 12:00h em gel de poliacrilamida 12%, corado com azul de comassie. MM – Marcador molecular. 1, 2 e 3 indicam repetições de cada espécie. As setas indicam a subunidade maior (rbcL) e menor (rbcS) da rubisco.

3.2 - Curso diário de metabólitos

Em eucalipto, observou-se um giro (razão entre a concentração de metabólito as 18:00h/6:00h) diário acentuado no estoque de carboidratos (Fig. 4A-E): 80% para amido, 25% para glicose e 80% para sacarose; em citrus, observaram-se variações diárias significativas apenas para sacarose, em torno de 80%; em café, as concentrações diárias desses carboidratos mantiveram-se virtualmente inalteradas. Nas três espécies, não se detectaram alterações diárias no pool de frutose (Fig. 4C). Como um todo, observaram-se variações significativas diárias nas concentrações de CNE em citrus e eucalipto, com um giro aproximado de 30 e 70%, respectivamente (Fig. 4E). No cafeeiro, não se notou qualquer variação diária no pool de CNE (Fig. 4E), mas deve-se enfatizar que a magnitude, em média, das concentrações de CNE foi nitidamente maior no café, seguido pelo eucalipto e, por fim, pelo citrus. Registre-se que a razão entre as concentrações de sacarose e hexoses totais (12:00h) e a razão entre concentrações de sacarose e amido (0:00h) (Fig. 4J e K) foram substancialmente menores em eucalipto que nas outras duas espécies.

Conquanto o fumarato e especialmente o malato podem ser usados como fonte alternativa de energia, esses metabólitos foram também analisados. Nas três espécies, não se conseguiu detectar o fumarato, enquanto o malato foi detectado em citrus e em café (Fig. 4F). Não obstante, não se observou variação diária significativa nas concentrações de malato. Deve-se ainda enfatizar que não se verificaram alterações diárias significativas nas concentrações de amino ácidos totais e proteínas (Fig. 3G e H). Por fim, registre-se que, no cafeeiro, houve uma variação significativa nas concentrações de fenóis solúveis totais (Fig. 4I), com valores mais elevados às 15h00 e 18h00, quando então decresceram paulatinamente à noite, com um giro em torno de 25%; nas outras duas espécies, as concentrações de fenóis mantiveram-se virtualmente constantes ao longo do dia.

Foram também analisados os cursos diários das concentrações de hexoses-fosfato (G6P, G1P e F6P), que podem ter fortes implicações no metabolismo de carboidratos. Em todo o caso, não se verificaram quaisquer variações significativas no pool dessas hexoses (registre-se que não se detectou G1P em eucalipto) (Fig. 5A-C). Foram adicionalmente analisados os pools de nucleotídeos. Nas três espécies, as concentrações de NADH e NADPH não variaram ao longo do dia, enquanto as concentrações de NAD^+ foram reduzidas em citrus e mantiveram-se constantes em café e eucalipto, ao passo que as concentrações de NADP^+ foram significativamente maiores após o meio-dia em relação às observadas às 09h00 em todas as espécies (Fig. 5D-I). Tais alterações resultaram em variações discretas na razão NADH/NAD^+ , enquanto os valores da razão $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ tenderam a ser menores nas medições conduzidas após o meio-dia em relação àquelas da manhã, nas três espécies avaliadas (Fig. 5I).

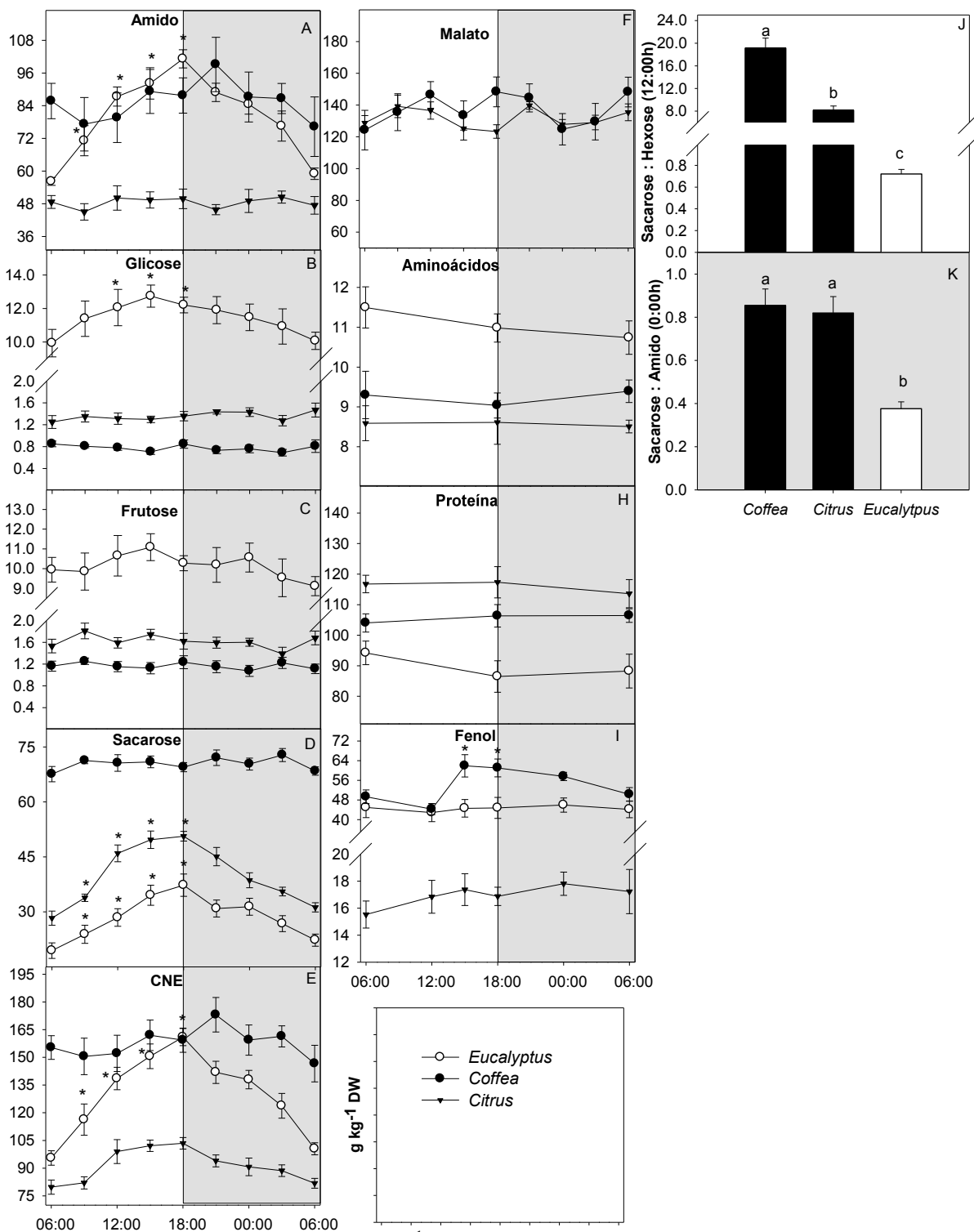


Figura 4 – Curso diurno da concentração (g kg^{-1} massa seca) foliar de amido (A), glicose (B), frutose (C), sacarose (D), carboidratos não estruturais totais (CNE) (E), malato (F), proteína (G), aminoácidos (H), fenóis solúveis totais (I), razão entre a concentração de sacarose e hexoses totais (glicose + frutose) (J) e razão entre a concentração de sacarose e amido (K). Valores são médias (\pm erro padrão) de 7 repetições. O asterisco indica diferença estatística da média obtida num determinado horário em relação àquela obtida as 6:00h, dentro de cada espécie, pelo teste de Student (Teste t; $P \leq 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$).

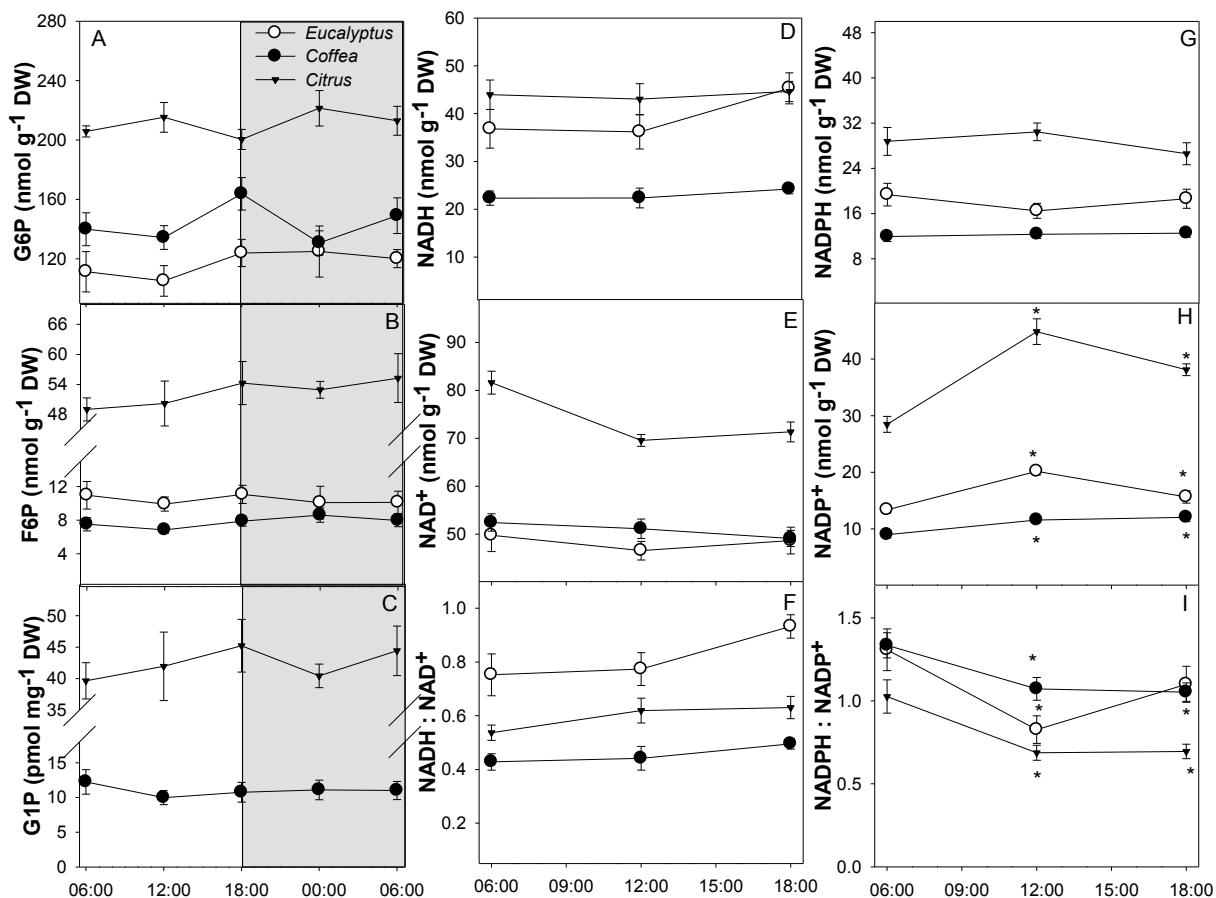


Figura 5 – Curso diário da concentração foliar de glicose 6 fosfato (G6P) (A), frutose 6 fosfato (F6P) (B), glicose 1 fosfato (G1P) (C) e curso diurno da concentração foliar de NAD(H) (D e E), NADP(H) (G e H) e razão NAD:NADH (F) e NADP:NADPH (I). Valores são médias (\pm erro padrão) de 7 repetições. O asterisco indica diferença estatística da média obtida num determinado horário em relação àquela obtida as 6:00h, dentro de cada espécie, pelo teste de Student (Teste t; $P \leq 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$).

3.3 - Perfil de metabólitos

O padrão de variação diurno de vários compostos do metabolismo primário central demonstrou claras diferenças entre as espécies estudadas. Para tal, analisou-se o perfil metabólico, via CG-MS, às 06h00 e 18h00, e os resultados estão expressos como uma razão das concentrações relativas obtidas às 18h00 em relação àquelas medidas às 06h00. Essa razão (6h00/18h00) demonstra proporcionalidade direta com as mudanças diurnas das concentrações de metabólitos. Em citrus, por exemplo, mas não em café ou eucalipto, verificou-se um acúmulo significativo nas concentrações de sorbose e de polióis como sorbitol, eritról e galactinol (Fig. 6), sugerindo que tais compostos possam ter função de destaque no que tange à reserva energética acumulada ao longo do

dia. Outros açúcares, como rafinose, trealose, manose e xilose, não se acumularam nas três espécies (Fig. 6). Por outro lado, o pool de maltose (não detectada em citrus) reduziu-se ao longo do dia em café e eucalipto (Fig. 6). Não obstante, as concentrações absolutas de maltose foram sete e 15 vezes maior em eucalipto que em café, às 06h00 e 18h00, respectivamente (dados não mostrados).

Em citrus, houve aumentos substanciais nos pools de compostos associados com a fotorrespiração, a exemplo da glicina e glicerato, acoplados a reduções nas concentrações de serina (Fig. 6). Dentre esses três compostos, verificaram-se, em café, aumentos nas concentrações de glicina em paralelo a reduções de serina e glicerato, enquanto em eucalipto houve manutenção do pool de glicina e decréscimos em serina e glicerato (Fig. 6). Ressalte-se, também, acúmulo de piruvato (intermediário-chave da glicólise) em citrus e café, mas sem variações significativas em eucalipto, associado a incrementos nas concentrações de lactato e alanina naquelas espécies (Fig. 6).

Enfatize-se que houve, nas três espécies, acúmulo de isocitrato associado a uma invariabilidade nas concentrações de citrato (Fig. 6). Em eucalipto, observou-se ainda um acúmulo diurno de succinato e níveis não detectados de malato, enquanto em citrus e café as concentrações desses ácidos orgânicos mantiveram-se inalteradas ao longo do dia, sugerindo a operação de rotas “acíclicas” do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Fig. 6).

Dos dois compostos aromáticos detectados neste estudo, observou-se acúmulo de benzoato em café e redução deste metabólito em eucalipto e invariabilidade em citrus, enquanto a concentração de quinato não variou significativamente em citrus e eucalipto, não sendo detectado em café (Fig. 6).

No cafeeiro, em particular, é notável a redução concomitante nas concentrações de importantes amino ácidos associados ao metabolismo do nitrogênio, como o glutamato, o aspartato e a asparagina, além da redução da concentração do amino ácido de cadeia ramificada valina (como também em eucalipto) (Fig. 6). Registre-se, por fim, que, em café e eucalipto, houve aumento e redução, respectivamente, dos níveis diurnos de prolina, enquanto em citrus não foram detectadas alterações na concentração desse aminoácido (Fig. 6).

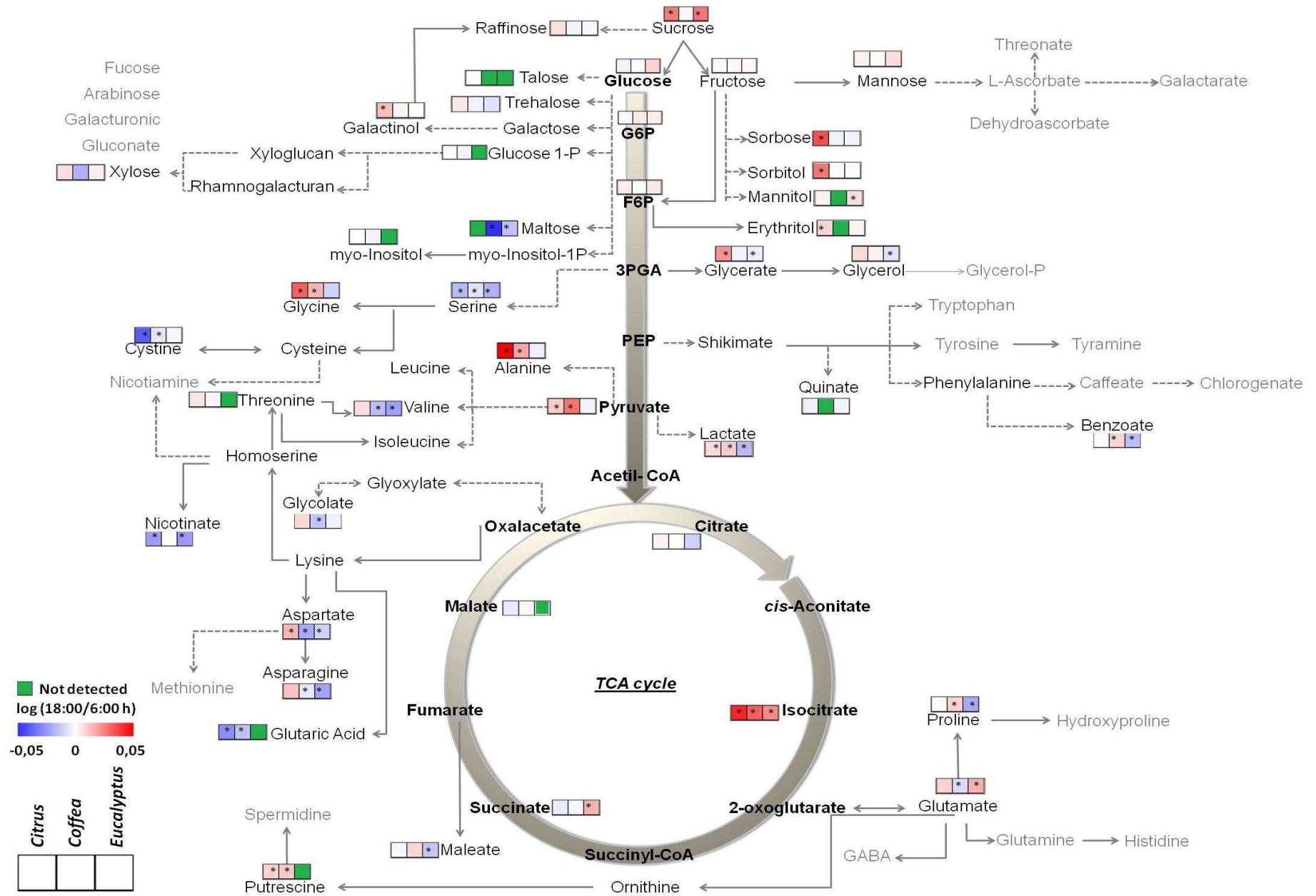


Figura 6 - Mapa de cores da variação diurna dos níveis de metabólitos em café, citrus e eucalipto. Os dados são da transformação logarítmica da razão entre a concentração dos níveis de metabólitos às 18:00 e 6:00 h (log 18:00h/6:00h). O asterisco indica diferença estatística entre o horário de 06:00 e 18:00h, dentro da mesma espécie, pelo teste de Student (Teste t; $P \leq 0,05$).

3.4 - Atividade enzimática

De maneira geral, as atividades catalíticas das enzimas envolvidas no Ciclo de Calvin (rubisco, isomerase da triose-fosfato, desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato) não variaram ao longo do dia em todas as espécies (Fig. 7A-H). A atividade total da rubisco foi maior em eucalipto, porém com menor estado de ativação, em comparação com o que foi observado em citrus e café (Fig. 7A). De modo geral, as atividades catalíticas das enzimas envolvidas no metabolismo do amido (AGPase, β -amilase e fosforilase do amido) foram maiores em eucalipto que nas demais espécies (Fig. 7H-J). Ressalte-se que o curso diurno da atividade da AGPase manteve-se inalterado, independentemente da espécie avaliada (Fig. 7H).

Durante o dia, houve aumento de atividade das enzimas de degradação (invertase ácida e alcalina) (Fig. 8B e C) apenas em eucalipto, enquanto a atividade das enzimas de síntese (atividade inicial da SPS) aumentou em citrus e eucalipto, mantendo-se constante em café (Fig. 7E). Não se detectaram variações diurnas na atividade da SuSy (Fig. 8A), bem como na atividade total da SPS (Fig. 8D) e no seu estado de ativação (Fig. 8F) nas três espécies, como também não se observaram diferenças interespecíficas no que respeita à atividade da PGM (Fig. 8M e N). À noite, a atividade da invertase ácida foi marcadamente maior em eucalipto e menor em citrus, com valores intermediários em café (Fig. 8H e I). A atividade da invertase alcalina foi similar em citrus e eucalipto, e significativamente maior que em café (Fig. 8H e I). Em contraste, a atividade noturna da SuSy foi relativamente menor em eucalipto e maior em citrus (Fig. 7G). A atividade catalítica noturna da SPS (atividades inicial e total e estado de ativação) não variou entre as espécies (Fig. 8J-L), enquanto a atividade noturna da PGM foi substancialmente maior em café que em citrus e eucalipto, cujas atividades diurnas da PGM foram similares entre si (Fig. 8M e N).

Das seis enzimas avaliadas associadas com a glicólise (Fig. 9A-H), observaram-se menores atividades em três delas (enolase (atividade diurna e noturna), PEPcase e PFK dependente de ATP) em eucalipto em relação a citrus e café. As atividades da

hexocinase (Fig.8C) e da GAPDH dependente de NAD^+ (Fig. 9G) foram similares nas três espécies. Saliente-se, ainda, que a atividade da cinase do piruvato (Fig. 9A e B) (atividades diurna e noturna) foi menor em citrus, enquanto a atividade da PFK dependente de ATP (Fig. 9F) foi maior nessa espécie, em comparação com café e eucalipto. Em adição, as atividades noturnas das enzimas G6PDH dependente de NADP^+ e transaldolase, associadas à via oxidativa das pentoses-fosfato (Fig. 9I e J), foram sempre menores em eucalipto que em citrus e café. A atividade da G6PDH dependente de NADP^+ foi maior em citrus que em café, enquanto a atividade da transaldolase não variou entre essas duas espécies.

Dentre as enzimas avaliadas associadas ao metabolismo de ácidos orgânicos, observaram-se valores similares para a atividade da sintase do citrato entre café e citrus, que foram maiores que em eucalipto, observando-se um padrão inverso para a aconitase, cuja atividade foi muito maior em eucalipto e menor em café, com valores intermediários em citrus (Fig. 10D e E). A atividade diurna da desidrogenase do malato dependente de NAD^+ foi similar nas três espécies, porém a atividade noturna dessa enzima foi significativamente menor em citrus que em café e eucalipto, que não diferiram entre si (Fig. 10A e B). A atividade da desidrogenase do isocitrato dependente de NADP^+ foi maior em eucalipto após o meio-dia em relação àquela da manhã, não se verificando alterações na atividade dessa enzima, ao longo do dia, nas outras duas espécies (Fig. 10C).

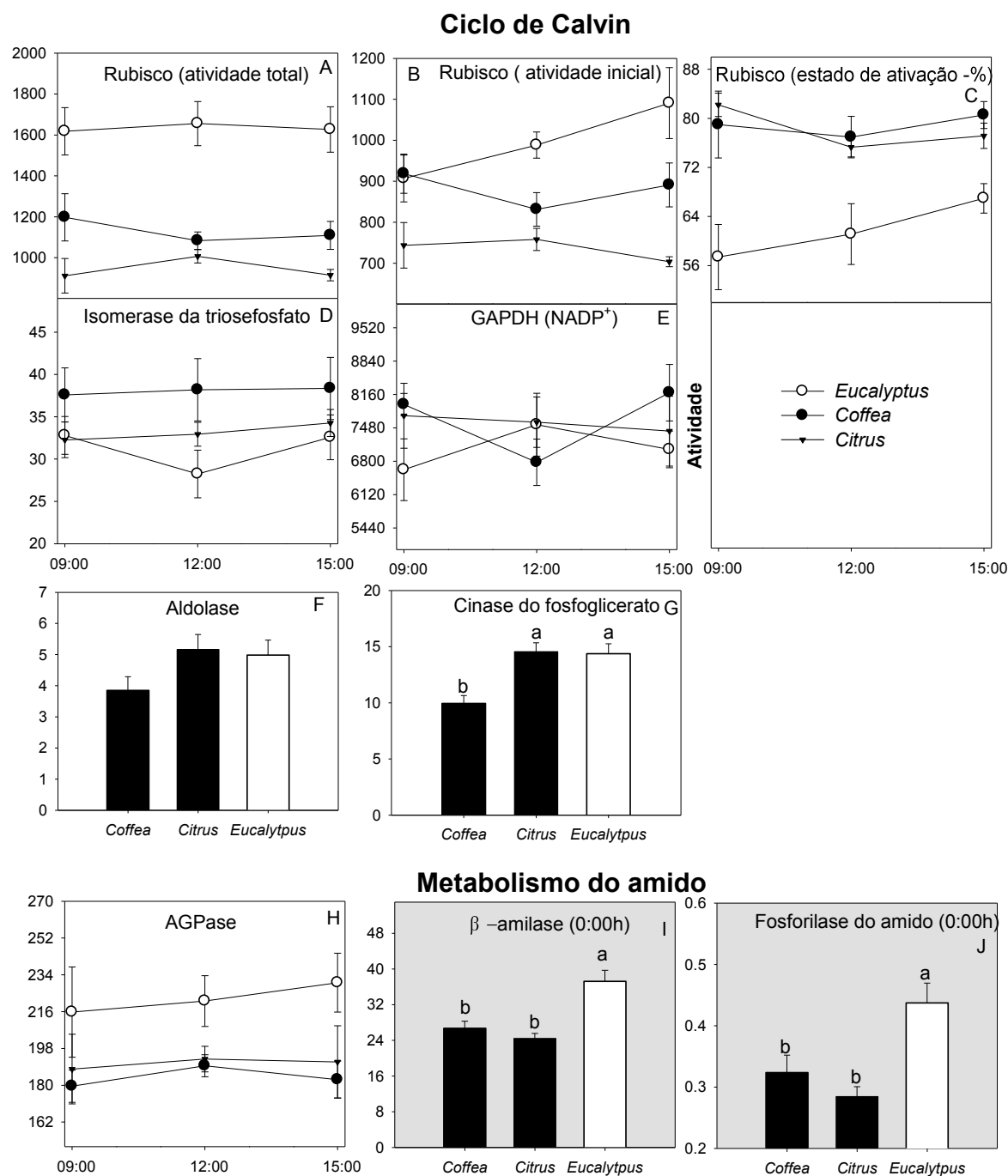


Figura 7 – Curso diurno da atividade rubisco (total (A), inicial (B) e estado de ativação (C)), isomerase da triose fosfato (D), desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato dependente de NADP⁺ (GAPDH-NADP⁺) (E), pirofosforilase do ADP-glicose (AGPase) (H), Atividade diurna da aldolase (F), cinase do fosfoglicerato (G), e atividade noturna da β-amilase (I) e da fosforilase do amido (J). Valores são médias (± erro padrão) de 7 repetições. O asterisco indica diferença estatística da média obtida num determinado horário em relação àquela obtida as 9:00h, dentro de cada espécie, pelo teste de Student (Teste t; P ≤ 0,05). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies (Newman-Keuls, P ≤ 0,05).

Metabolismo da Sacarose

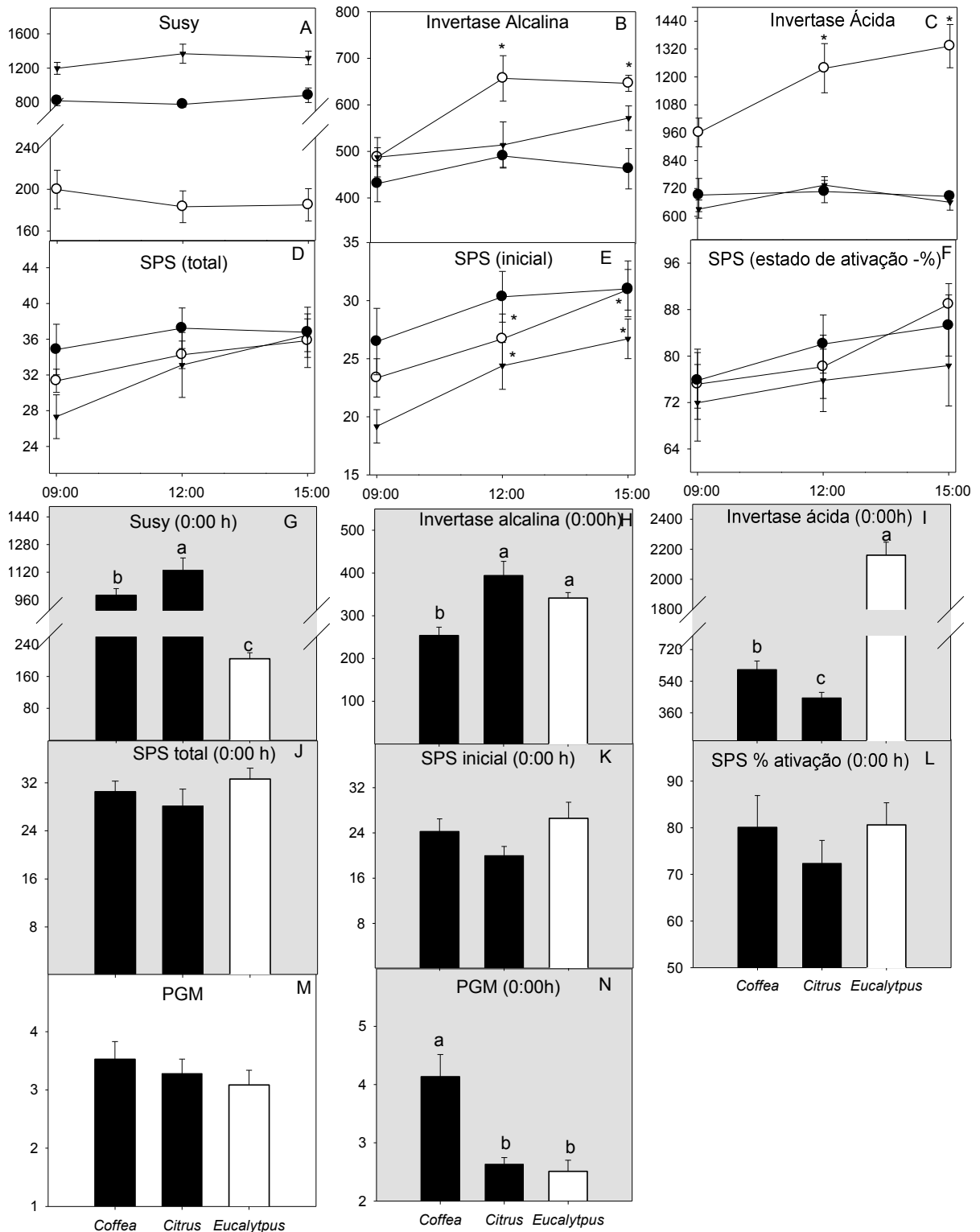


Figura 8 – Curso diurno da atividade da sintase da sacarose (SuSy) (A), invertase alcalina (B) e ácida (C), sintase da sacarose-fosfato (SPS; total (D), inicial (E) e estado de ativação (F)), fosfoglicomutase (PGM) (M). Atividade noturna da sintase da sacarose (G), invertase ácida (H), invertase alcalina (I), sintase da sacarose-fosfato (SPS; total (J), inicial (K) e estado de ativação (L)) e fosfoglicomutase (PGM) (N). Valores são médias (\pm erro padrão) de 7 repetições. O asterisco indica diferença estatística da média obtida num determinado horário em relação àquela obtida as 9:00h, dentro de cada espécie, pelo teste de Student (Teste t; $P \leq 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies (Newman-Keuls, $P \leq 0,05$).

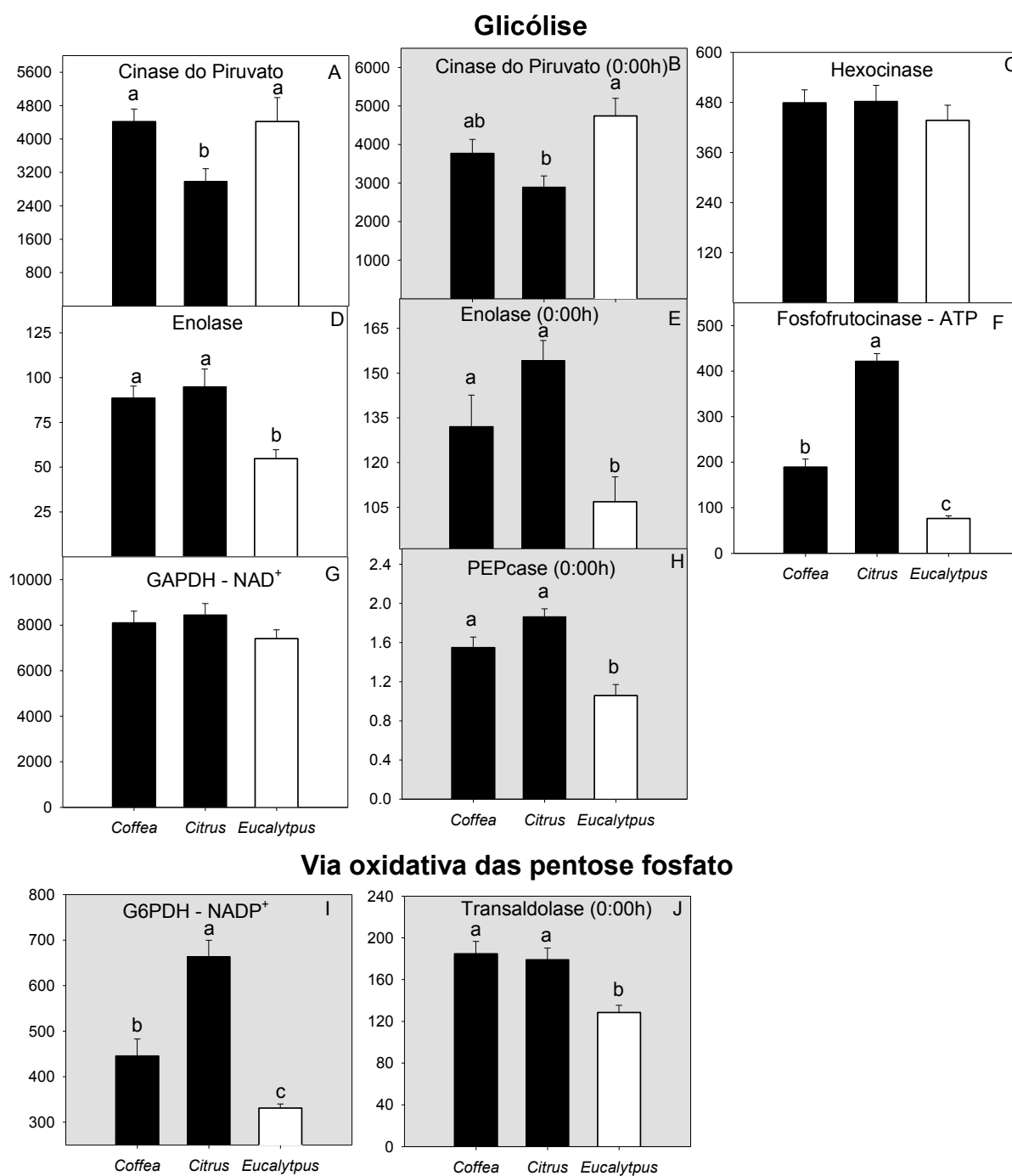


Figura 9 – Atividade da cinase do piruvato (diurna (A) e noturna (B)), hexocinase (C), enolase (diurna (D) e noturna (E)), fosfofrutocinase dependente de ATP (Fosfofrutocinase-ATP) (F), desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato dependente de NAD⁺ (GAPDH-NAD₊) (G), carboxilase do fosfoenolpiruvato (PEPcase) (H), desidrogenase da glicose-6-fosfato dependente de NADP⁺ (G6PDH-NADP₊) (I), transaldolase (J). Valores são médias (± erro padrão) de 7 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies (Newman-Keuls, P ≤ 0,05).

Metabolismo de Ácidos Orgânicos

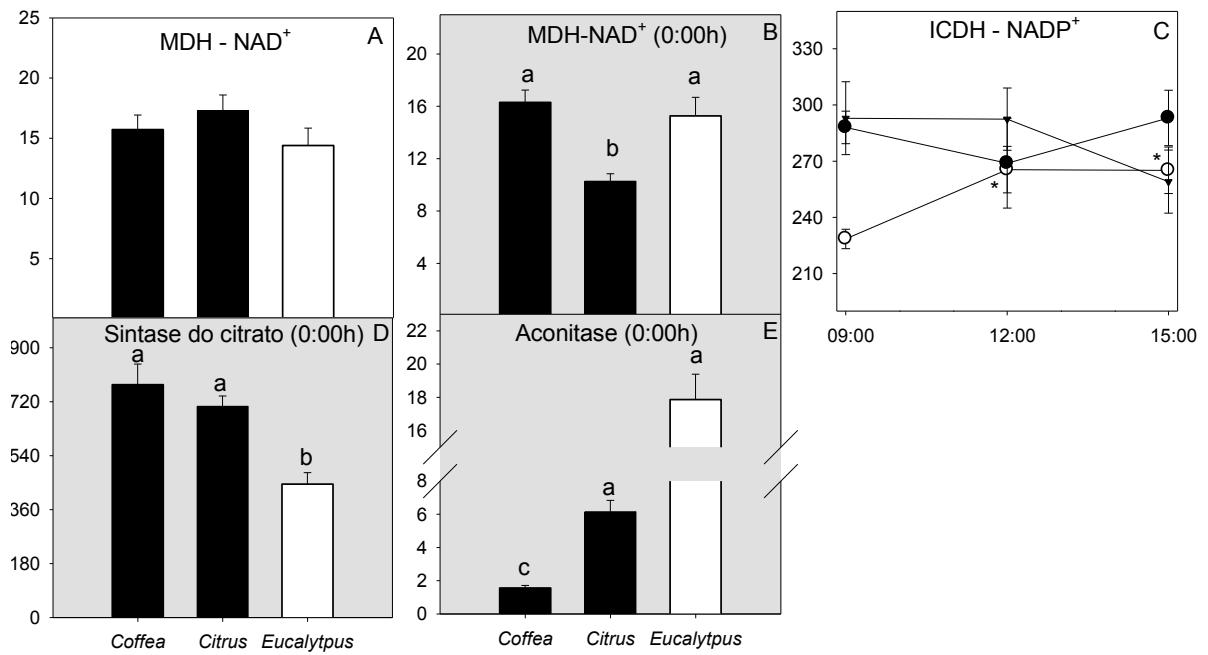


Figura 10 – Atividade da desidrogenase do malato dependente de NAD⁺ (MDH-NAD₊) (diurna (A) e noturna (B)), desidrogenase do isocitrato dependente de NADP⁺ (ICDH-NADP⁺) (B), sintase do citrato (D) e aconitase (E). Valores são médias (± erro padrão) de 7 repetições. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as espécies (Newman-Keuls, P ≤ 0,05).

4 - DISCUSSÃO

O curso diário do metabolismo de carboidratos em geral e do amido transitório em particular tem sido exaustivamente investigado avaliando-se plantas anuais herbáceas, notadamente *Arabidopsis thaliana*, cultivadas em condições controladas e ordinariamente sob baixas intensidades lumínicas (e.g., Gibon et al, 2009; Pilkington et al, 2014). Resultados dessas investigações explicam importantes questões acerca da regulação do crescimento, destacando-se o papel do amido como um importante modulador do crescimento (Sulpice et al, 2009, 2014; Pilkington et al, 2014;). Não obstante, alguns autores (e.g., Dietze et al, 2014; Palacio et al, 2014) têm questionado a validade da extrapolação de modelos de alocação de carbono em plantas herbáceas para espécies lenhosas/perenes. Neste estudo, procurou-se, pela primeira vez, comparar entre espécies lenhosas o curso diário de carboidratos e de outros metabólitos importantes quanto ao balanço energético em espécies lenhosas tropicais com taxas de crescimento (e origem evolutiva quanto à disponibilidade de irradiância) e capacidades fotossintéticas contrastantes, em condições de campo, na estação de crescimento ativo, sem qualquer estresse aparente. Demonstrou-se que o padrão típico do giro de carboidratos, isto é, acúmulo de amido (e outros carboidratos como sacarose) ao longo do dia seguido de degradação noturna, ocorreu com o eucalipto, mas este padrão, inequivocamente, não foi observado em café, porquanto não se observou nenhum giro de qualquer tipo de carboidrato, dentre aqueles analisados. Citrus, aparentemente, apresentou um padrão intermediário, caracterizado por um giro de sacarose e polióis, mas não de amido. Discutem-se, ao longo desta seção, as causas das variações diurnas da fotossíntese nas três espécies supracitadas e as implicações fisiológicas e funcionais do curso diário de carboidratos e outros compostos associados com o balanço de carbono, tendo-se por base os atuais modelos de regulação fotossintética.

4.1 - Variações diurnas da fotossíntese respondem, preponderantemente, a fatores difusivos

Desde que 90 a 95% da massa seca das plantas derivam-se direta ou indiretamente da fotossíntese (Kruger & Volin, 2006), espécies com maiores taxas de crescimento ordinariamente exibem maiores valores de A , conforme aqui evidenciado. Em todo o caso, independentemente da espécie, o padrão de trocas gasosas foi associado com fortes limitações difusivas, especialmente em café e citrus, à tarde. Essas espécies têm baixas densidades de venação ($\sim 4,0 \text{ mm mm}^{-2}$ no caso de citrus

(Raimondo et al, 2013) e $\sim 5,5 \text{ mm mm}^{-2}$ no caso do café (Martins et al, 2014)) e baixas condutividades hidráulicas (Mohotti e Lawlor 2002; Martins et al, 2014), o que impõem forte restrição à manutenção da abertura estomática, particularmente quando o déficit de pressão de vapor é alto, como ocorre usualmente à tarde. Nesse contexto, deve-se ressaltar, adicionalmente, que a densidade de venação (como também a condutividade hidráulica) correlaciona-se significativamente com a máxima capacidade fotossintética em uma gama de espécies (Sack e Frole, 2006; Brodribb et al, 2007; Brodribb et al, 2013). Ressalte-se, ainda, que outros estudos têm demonstrado o papel das limitações difusivas no controle da fotossíntese em café (Araújo et al, 2008; Batista et al, 2012; Martins et al, 2014), citrus (Mohotti e Lawlor, 2002; Ribeiro et al, 2010) e em outras espécies tropicais cultivadas (Balasinha et al, 1991; De Costa et al, 2010).

Em eucalipto, a manutenção de elevados valores de A ao longo do dia, em adição aos maiores conteúdos relativos de rubisco, conforme aqui evidenciado, pode também ser atribuída à conservação de alta g_s , fato possivelmente associado à alta densidade de venação dessa espécie ($9,4 \text{ mm mm}^{-2}$; Boyce et al, 2009), valor bem superior aos relatados para citrus e café. A alta densidade de venação pode suportar uma maior capacidade de suprimento de água para a planta responder à demanda evaporativa, fato essencial para manutenção da abertura estomática. Além disso, a maior densidade de venação, conforme discutir-se-á a seguir, também está associada com a maior capacidade de exportação de carboidratos.

No caso particular do café, a redução em A ao longo do dia não pode ser diretamente atribuída à retroinibição metabólica, posto que a fotossíntese variou independentemente da concentração de sacarose e amido, principais produtos da fotossíntese. Esse mesmo padrão foi observado por Batista et al, (2012), em condições de campo e de casa de vegetação. Em citrus, embora tenha ocorrido acúmulo de sacarose ao longo do dia, é muito provável que, semelhantemente ao observado em café, as variações diurnas em A tenham sido também governadas preponderantemente por fatores difusivos, como relatado em outros trabalhos (Mohotti e Lawlor, 2002; Brakke e Allen, 1995; Ribeiro et al, 2010). Além disso, a manutenção de maiores magnitudes e menores reduções diurnas de A em citrus, comparado ao café, pode ser resultante da contribuição do giro de sacarose ao longo do dia. Com efeito, o giro de amido observado em eucalipto é também funcionalmente importante na manutenção de elevados valores de A nessa espécie, pois garantiria que, durante o dia, a fotossíntese

ocorra a taxas superiores às de formação/exportação de produtos finais, como sacarose, e sendo assim uma via dissipadora do sobrefluxo de produtos da fotossíntese, evitando ou mitigando a retroinibição de A por acúmulo de produtos finais (Geiger e Servaites, 1994; Ludewig et al, 1998; Zeeman e ap Rees, 1999). A manutenção de elevadas A em eucalipto, provavelmente associadas com uma alta capacidade de exportação de carboidratos, poderia sustentar, em grande parte, as altas taxas de crescimento dessa espécie.

Nas três espécies estudadas, a quantidade de carbono fixado por fóton incidente diminui ao longo do dia, em grande parte consequência da redução de g_s , resultando na diminuição de C_i , especialmente em café e citrus. A redução de C_i acompanhada de aumento da irradiância pode ocasionar efeitos deletérios, levando a fotoinibição da fotossíntese. Os aumentos nas razões R_p/Ab , Jo/Jt e Jo/Jc , associados com aumentos relativos nas concentrações de glicina em relação às de serina, sugerem um maior direcionamento de fluxo de elétrons para processos não assimilativos de CO_2 , especificamente a fotorrespiração (R_p), em detrimento de processos assimilativos (Jc/Jt), conforme particularmente evidenciado em citrus e café. Por outro lado, as menores razões R_p/Ab observadas em eucalipto poderiam suportar um balanço de carbono mais favorável, acarretando, em última instância, em maior produção líquida de carboidratos. Em todo o caso, os presentes dados reforçam o papel da R_p na proteção da maquinaria fotossintética, uma vez que a fotorrespiração pode dissipar o excesso de equivalentes redutores, promovendo a manutenção do balanço redox e, ainda, suportando um pool interno de CO_2 (Voss et al, 2013). Em outros estudos (Valentini et al, 1995; Muraoka et al, 2000; Franco e Luttge, 2002; Shirke e Pathre, 2004, Martins et al, 2014) é também atribuída à fotorrespiração a função de mecanismo fotoprotetor, assegurando proteção e manutenção à fotossíntese durante o dia quando, sob alta irradiância, há limitação de CO_2 ao Ciclo de Calvin. Além da R_p , o aumento do NPQ observado em todas as espécies aqui estudadas também contribuiu para evitar fotoinibição da fotossíntese. Em café, a redução e acúmulo da concentração de glutamato e prolina, respectivamente, sugere que ao longo do dia houve estímulo da via de síntese de prolina a partir do glutamato (Szabados and A. Savouré, 2010). Esta via é considerada uma forte dissipadora de poder redutor, o que contribui, junto com a R_p e o NPQ, para manutenção do balanço do estado redox em café, evitando fotoinibição da fotossíntese (Szabados and A. Savouré, 2010). Registre-se que todas as espécies

avaliadas foram observados valores de F_v/F_m superiores a 0,78 (obtidos ao meio-dia), indicando ausência de dano fotoinibitório (Bjorkman e Demmig, 1987).

4.2 - Variabilidade interespecífica na alocação diária de fotoassimilados

Em eucalipto, o amido sintetizado ao longo do dia acumula-se em paralelo com glicose e frutose, formando uma reserva de energia para que, durante a noite, esses carboidratos sejam consumidos, de modo a suportar o metabolismo noturno. Este padrão é muito semelhante ao encontrado em *Arabidopsis thaliana*, em outras espécies herbáceas (Weise et al, 2011; Graf e Smith, 2011) e arbóreas (Davey et al, 2006; Lewis et al, 2011). A manutenção da elevada atividade da AGPase ao longo do dia, o aumento diurno da atividade das invertases e da SPS, associada à elevada A, podem, em conjunto, ter contribuído ativamente para o consistente acúmulo de CNE em eucalipto.

Ao final da noite, em eucalipto, 60% do conteúdo de CNE permaneceu alocado na forma de amido. Baseando-se em modelos construídos com plantas herbáceas, esse amido residual, que não foi degradado à noite, tem sido caracterizado como “carbono sequestrado não-produtivo”, uma vez que ele está indisponível ao metabolismo noturno (Stitt e Zemann, 2012). Se, por um lado, a degradação noturna do amido contribuiria significativamente para sustentar as elevadas taxas de crescimento nessa espécie, por outro lado, a incompleta remobilização do amido levaria ao sequestro de carbono reduzido que, de outro modo, poderia ser investido para maximizar as taxas de crescimento. Nesse contexto, esse carbono sequestrado na forma de amido residual imporia uma restrição ao acúmulo de biomassa em eucalipto, a despeito das elevadas taxa de crescimento do eucalipto. Portanto, o aumento da capacidade de uso do amido residual poderia prover um meio para aumentar o potencial de ganho de biomassa nessa espécie. Em todo o caso, é provável que hajam profundas diferenças no controle da alocação de carboidratos entre os processos de armazenamento e uso para crescimento e metabolismo geral entre plantas herbáceas e lenhosas perenes, e os controles fisiológicos de tais processos estão, ainda, longe de serem elucidados em espécies perenes (Dietze et al, 2014).

O papel de carbono transitório em citrus pode ser atribuído ao acúmulo de sacarose durante o dia e consumo a noite. Este padrão é observado em outras espécies como feijão e beterraba (Stitt et al, 1983; Fondy et al, 1989). O acúmulo diurno de sacarose é consistente com o aumento da atividade diurna da SPS e a elevada atividade

da Susy juntamente com a baixa atividade das invertases (Huber, 1983; Rufty et al, 1983). Neste estudo, também se observou que outros carboidratos (e.g., sorbose) e polióis (e.g., sorbitol, galactinol e galactinol) se acumulam em citrus ao longo do dia, e poderiam também atuar como forma de carbono transitório, provendo energia para o metabolismo noturno. Entretanto, a magnitude do giro de CNE observada em citrus está muito aquém daquela observada em eucalipto, evidenciando diferença na intensidade e no padrão de alocação de fotoassimilados ao longo do dia. Ressalta-se que, semelhantemente ao observado em café, a concentração de amido não varia ao longo do dia. Assim, a ausência de giro de amido nessas duas espécies se traduziria numa reserva de carbono indisponível, fato que poderia explicar, em parte, as suas baixas taxas de crescimento. Com efeito, as taxas de crescimento são severamente restringidas em mutantes nos quais o metabolismo de amido foliar é bloqueado (Streb et al, 2012).

Em café, a concentração de CNE manteve-se virtualmente inalterada ao longo do dia, não se observando, adicionalmente, nenhum acúmulo evidente de outros compostos (e.g., polióis, conforme observado em citrus) que pudessem, a priori, atuar como reserva energética. Apesar de os níveis de maltose no fim do período noturno terem aumentado, a magnitude do pool desse composto foi muito baixa, comparada com eucalipto, sugerindo, de fato, uma baixíssima taxa de degradação noturna do amido. Se nenhum giro consistente de carboidratos foi observado, poder-se-ia especular, de antemão, que esse padrão estaria associado com os baixíssimos valores de A , conforme observado à tarde. Entretanto, mantendo-se artificialmente uma baixa demanda evaporativa da atmosfera, a magnitude das variações diurnas de A foi muito baixa (devido, pelo menos em grande parte, à manutenção de g_s) em café, observando-se decréscimos de apenas 20% nos valores de A às 16h00 em relação aos máximos valores obtidos na manhã, conforme reportado por Batista et al. (2012). Esses autores também observaram, em paralelo, que não houve qualquer variação significativa nas concentrações de amido, sacarose ou hexoses, como tampouco houve alteração da magnitude da partição de $^{14}\text{CO}_2$ recém-fixado entre síntese de amido, açúcares, proteínas e componentes de parede celular. Essas informações constituem-se num forte argumento contra a especulação de que a falta de acúmulo de carboidratos estaria de alguma forma relacionada com a magnitude das taxas de fotossíntese no cafeeiro. Considerando-se, pois, os resultados de Batista et al. (2012) com os deste estudo, pergunta-se: qual seria o destino da produção fotossintética diurna excedente do

cafeeiro e como essa espécie suportaria o seu metabolismo noturno? Trata-se de uma pergunta complexa e a resposta a ela não é a priori evidente. Em todo o caso, numa tentativa de se avançar sobre a questão suscitada, verificou-se o curso diário da concentração de fenóis solúveis totais, haja vista que algumas espécies acumulam fenóis durante o dia e o cafeeiro os acumula quando cultivado a pleno sol (Cavatte et al, 2012; Martins et al, 2014). A síntese de compostos fenólicos está envolvida em respostas a condições de grande pressão oxidativa (e.g., estresse luminoso, seca), e seu acúmulo pode atuar como dreno de esqueletos de carbono e, ainda, como válvula de dissipação de energia, por consumir grandes quantidades de ATP e NADPH (Hernández e Breusegem, 2010; Martins et al, 2014). Interessantemente, neste estudo, não se verificou qualquer acúmulo de fenóis na manhã, em oposição ao verificado a partir das 15h00 (quando os valores de A são substancialmente baixos), com um pico de concentração no fim do dia, seguido de decréscimo gradual ao longo da noite, caracterizando, destarte, um giro dessa classe de compostos. Portanto, a síntese de fenóis (processo energeticamente muito custoso) à tarde, quando a pressão oxidativa é maior, poderia indiretamente consumir grandes quantidades de assimilados, o que poderia circunstancialmente evitar o acúmulo de outros compostos relacionados com a reserva energética da planta. A degradação noturna desses fenóis poderia ser um meio de fornecer esqueletos carbonados para o metabolismo noturno. Essas asserções devem ser vistas com reservas, porquanto especulativas. Em todo o caso, evidências recentes sugerem que ubiquinonas (fenóis) poderiam atuar como substrato para o processo respiratório, conforme sugerido por Tohge et al. (2014). Resta investigar, em profundidade, a integração dos metabolismos primário e secundário em café como forma de aprofundar a compreensão da partição e o uso de assimilados ao longo do período diário nessa espécie.

Sumariando, as espécies lenhosas aqui estudadas mostraram fortes diferenças nas estratégias de alocação dos seus fotoassimilados. As diferenças entre as espécies na razão amido:sacarose ou sacarose:hexoses ou o giro negligenciável de amido nas espécies de baixo crescimento reforçam esse padrão de alocação diferenciada de carbono. Isso tem um forte impacto, uma vez que as altas concentrações de açúcares encontradas em citrus e café, em particular sacarose, podem sinalizar para o crescimento, entretanto, isso não acontece, indicando, possivelmente, uma limitação do dreno (Smith e Stitt, 2007; Stitt e Zeeman, 2012). Em contrapartida, maiores

concentrações de açúcares podem inibir a atividade das enzimas de degradação do amido (fosforilase do amido e β -amilase) e, portanto, bloqueando a degradação do amido ao longo da noite (Smith et al, 2005; Martins et al, 2013). Desse modo, a variação interespecífica no uso de fotoassimilados entre as espécies aqui estudadas pode explicar, em parte, as diferenças nas suas taxas de crescimento.

4.3 - Metabolismo noturno: respiração e degradação do amido foliar e implicações para o crescimento vegetal

Os menores valores de R_n em café e citrus, bem inferiores aos de eucalipto, são típicos de espécies evoluídas em ambientes sombreados e com baixas taxas de crescimento (Noguchi et al, 1996; Noguchi et al, 2005; Craine e Reich, 2005), o que pode contribuir, não obstante, para produzir um balanço positivo de carbono. A baixa R_n naquelas espécies pode ser uma das causas que explicaria a provável inibição do giro de amido, na medida em que haveria uma menor disponibilidade de ATP derivado da respiração para sustentar o custoso (em termos energéticos) processo de degradação do amido (Bouma et al, 1995; Noguchi et al, 2001). Por outro lado, a baixa taxa de crescimento em espécies tolerantes à sombra (Gommers et al, 2012) não seria consequência de baixa R_n (e baixa produção de ATP), mas sim de uma capacidade intrinsecamente baixa de crescimento que, por sua vez, limitaria o consumo de ATP e R_n (Noguchi et al, 1995; Noguchi et al, 1997; Noguchi et al, 2001). Uma vez que se observou alta concentração de açúcares solúveis em café e citrus, especialmente sacarose, sugere-se que a R_n não tenha sido limitada pela disponibilidade de carbono reduzido, e sim pela baixa demanda do dreno. Essa ideia é reforçada em diversos outros trabalhos (Lawor e Mitchel, 1991; Grimmer et al, 1999; Hadrich et al, 2012; Pilkington et al, 2014), em que o amido foliar é remobilizado parcialmente durante a noite quando a força ou o tamanho dos drenos é limitante (e.g., alta irradiância, enriquecimento atmosférico de CO_2). Todavia, especificamente no caso do café, as análises foram conduzidas num período (início de março) de altíssima demanda de assimilados, uma vez que os frutos se encontravam na fase de ganho linear de ganho de biomassa (DaMatta et al. 2008). Isso posto, sugere-se que uma reduzida capacidade intrínseca de exportação poderia (Ainsworth e Bush, 2011), em parte, explicar o giro noturno negligenciável de carboidratos. Nesse contexto, a baixa densidade de venação do café e do citrus poderia limitar substancialmente a capacidade de exportação de

fotoassimilados, aumentando a concentração de produtos da degradação do amido e assim contribuindo indiretamente, para a retroinibição da degradação do amido por acúmulo de produtos (Zeeman, et al, 2001; Martins et al; 2013; Lunn et al; 2014), fato consistente com a menor atividade da fosforilase do amido e da β -amilase.

A indução da alta atividade da cinase do piruvato, aconitase e MDH-NAD⁺ à noite, em eucalipto, é consistente com seus maiores valores de R_n . Nessa espécie, maior R_n parece estar fundamentalmente associada com o suprimento/ consumo de carboidratos, uma vez que o eucalipto exibiria elevada demanda por produtos da respiração relacionada com as suas altas taxas de crescimento. Assim, a degradação do amido foliar em eucalipto proveria substrato para a síntese de sacarose via atividade catalítica da SPS. Esse carboidrato pode ser exportado para tecidos-dreno ou, então, devido à elevada atividade das invertases, poderia ser hidrolisado, de modo que os produtos resultantes dessa hidrólise sejam utilizados como substrato para suportar os altos valores de R_n . Com efeito, em espécies evoluídas a pleno sol, as taxas de respiração parecem reguladas pela capacidade de uso de substrato em vez da demanda por ATP e equivalentes reduzidos (Noguchi et al, 2001). Em paralelo, elevada R_n provê ATP e NADH para subsidiar o dispendioso processo de degradação do amido, síntese e exportação de sacarose, e assim, contribuir para manutenção do giro de amido e outros carboidratos, sustentando as altas taxas de crescimento do eucalipto.

5 - CONCLUSÃO

Os resultados apresentados sugerem que as grandes reduções diurnas de A não podem ser atribuídas a limitações não-estomáticas, como a retroinibição metabólica associada ao acúmulo de produtos finais da fotossíntese. Com efeito, especialmente em café e citrus, houve uma forte restrição difusiva, limitando a fotossíntese particularmente à tarde. Além disso, embora o conteúdo de proteína tenha sido muito similar entre as espécies, o maior conteúdo aparente da rubisco pode estar associado com a maior magnitude das taxas de fotossíntese em eucalipto. A variação interespecífica na alocação de fotoassimilados possui fortes implicações fisiológicas e funcionais. Em espécies tolerantes à sombra, quando cultivadas a pleno sol, não se verificou qualquer giro aparente de amido foliar, em contraste com o que vem sendo exaustivamente relatado em espécies herbáceas e muito pouco relatado em arbóreas. O giro de compostos fenólicos exibido pelo cafeeiro sugere ajustes na alocação de carbono entre metabolismo primário e secundário, com possíveis implicações no seu estado redox. A alta concentração de CNE ao final do dia, em citrus e café, pode indicar uma limitação da capacidade de exportação de carboidratos, o que limitaria a atividade de tecidos-dreno, com possíveis reflexos no potencial de acúmulo de biomassa dessas espécies. Em eucalipto, a maior R_n provê energia para processos importantes como degradação do amido, síntese e exportação de sacarose, como forma de sustentar elevadas taxas de crescimento nessa espécie. Tomados em conjunto, os resultados deste trabalho demonstram que, entre espécies lenhosas, ocorre grande variabilidade no uso de carbono assimilado pela fotossíntese o que explica, em grande parte, as diferenças no acúmulo de biomassa. Compreender os mecanismos e motivos que provocam acúmulo de CNE ao final da noite é uma alternativa promissora para que se consiga aumentos na produtividade.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou-Aziz AB, El-Nataway SM, Adel-Wahab FK, Kader AA (1976) The effect of storage temperature on quality and decay percentage of 'Pairi' and 'Taimour' mango fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **5**:65-72.

Ainsworth EA, Bush DR (2011) Carbohydrate export from the leaf: a highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiology* **155**:64-69.

Andriotis VME, Pike MJ, Schwarz SL, Rawsthorne S, Wang TL, Smith AM (2012) Altered starch turnover in the maternal plant has major effects on Arabidopsis fruit growth and seed composition. *Plant Physiology* **160**:1175-1186.

Araujo WL, Dias PC, Moraes GABK, Celin EF, Cunha RL, Barros RS, DaMatta FM (2008) Limitations to photosynthesis in coffee leaves from different canopy positions. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**:884-890.

Araújo WL, Nunes-Nesi A, Osorio S, Usadel B, Fuentes D, Nagy R, Balbo I, Lehmann M, Studart-Witkowski C, Tohge T, Martinoia E, Jordana X, DaMatta FM, Fernie AR (2011) Antisense inhibition of the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase enhances photosynthesis and growth in tomato via an organic acid-mediated effect on stomatal aperture. *Plant Cell* **23**:600-627.

Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 601-639.

Bai J, Xu DH, Kang HM, Chen K, Wang G (2008) Photoprotective function of photorespiration in *Reaumuria soongorica* during different levels of drought stress in natural high irradiance. *Photosynthetica* **46**:232-237.

Balasingh D, Daniel EV, Bhat PG (1991) Influence of environmental factors on photosynthesis in cocoa trees. *Agricultural and Forestry Meteorology* **55**:15-21.

Batista KD, Araújo WL, Antunes WC, Cavatte PC, Moraes GABK, Martins SCV, DaMatta FM (2012) Photosynthetic limitations in coffee plants are chiefly governed by diffusive factors. *Trees* **26**:459-468.

Bjorkman, O, Demmig, B (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**:489-504

Bouma TJ, Visser R de, Van Leeuwen PH, Kock MJ de, Lambers H (1995) The respiratory energy requirements involved in nocturnal carbohydrate export from starch-storing mature source leaves and their contribution to leaf dark respiration. *Journal of Experimental Botany* **46**:1185-1194.

Boyce CK, Brodribb TJ, Field TS, Zwieniecki MA (2009) Angiosperm leaf vein evolution was physiologically and environmentally transformative. *Proceedings of the Royal Society* **276**:1771-1776.

Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254.

Brakke M, Allen Jr LH (1995) Gas exchange of Citrus seedlings at different temperatures, vapor-pressure deficits, and soil water content. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **120**:497-504.

Brodribb TJ, Feild TS, Jordan GJ (2007) Leaf maximum photosynthetic rate and venation are linked by hydraulics. *Plant Physiology* **144**:1890-1898.

Brodribb TJ, Jordan GJ, Carpenter RJ (2013) Unified changes in cell size permit coordinated leaf evolution. *New Phytologist* **199**:559-570.

Carrari F, Nunes-Nesi A, Gibon Y, Lytovchenko A, Ehlers Loureiro M, Fernie AR (2003) Reduced expression of aconitase results in an enhanced rate of photosynthesis and marked shifts in carbon partitioning in illuminated leaves of wild species tomato. *Plant Physiology* **133**:1322-1335.

Cavatte PC, Oliveira AAG, Morais LE, Martins SCV, Sanglard LMVP, DaMatta FM (2012) Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee? A morphophysiological analysis. *Physiologia Plantarum* **114**:111-122.

Chatterton NJ, Silvius JE (1979) Photosynthate partitioning into starch in soybean leaves. I. Effects of photoperiod versus photosynthetic period duration. *Plant Physiology* **64**:749-753.

Craine JM, Reich PB (2005). Leaf level light compensation points in shade-tolerant woody seedlings. *New Phytologist* **166**:710-713.

Critchley JH, Zeeman SC, Takaha T, Smith AM, Smith SM (2001) A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **26**:89-100.

DaMatta FM, Cunha RL, Antunes WC, Martins SCV, Araújo WL, Fernie AR, Moraes GABK (2008) In field-grown coffee trees source-sink manipulation alters photosynthetic rates, independently of carbon metabolism, via alterations in stomatal function. *New Phytologist* **178**:348-357.

Davey PA, Olcer H, Zakhleniuk O, Bernacchi CJ, Calfapietra C, Long SP, Raines CA (2006) Can fast-growing plantation trees escape biochemical down-regulation of photosynthesis when grown throughout their complete production cycle in the open air under elevated carbon dioxide? *Plant, Cell and Environment* **29**:1235-1244.

Dietze MC, Sala A, Carbone MS, Czimczik CI, Mantooth JA, Richardson AD, Vargas R (2014) Nonstructural carbon in woody plants. *Annual Review of Plant Biology* **65**:667-687.

Dinant S, Lemoine R (2010) The phloem pathway: new issues and old debates. *Comptes Rendus Biologies* **333**:307-319.

Epron D, Godard D, Cornic G, Genty B (1995) Limitation of net CO₂ assimilation rate by internal resistances to CO₂ transfer in the leaves of two tree species (*Fagus sylvatica* L. and *Castanea sativa* Mill.). *Plant, Cell and Environment* **18**:43-51.

Fernie AR, Aharoni A, Willmitzer L, Stitt M, Tohge T, Kopka J, Carroll AJ, Saito K, Fraser PD, DeLuca V (2011) Recommendations for reporting metabolite data. *Plant Cell* **23**:2477-2482.

Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* **212**:250-263.

Fondy BR, Geiger DR (1982) Diurnal pattern of translocation and carbohydrate metabolism in source leaves of *Beta vulgaris* L. *Plant Physiology* **70**:671-676.

Fondy, B. R., Geiger, D. R. and Servaites, J. C. (1989) Photosynthesis, carbohydrate metabolism and export in *Beta vulgaris* L. and *Phaseolus vulgaris* L. during square and sinusoidal light regimes. *Plant Physiology* **89**:396-402.

Franco AC, Lüttge U (2002) Midday depression in savanna trees: coordinated adjustments in photochemical efficiency, photorespiration, CO₂ assimilation and water use efficiency. *Oecologia* **131**:356-365.

Geigenberger P (2011) Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiology* **155**:1566-1577.

Geigenberger P, Kolbe A, Tiessen A (2005) Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *Journal of Experimental Botany* **56**:1469-1479.

Geiger DR, Servaites JC (1994) Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C₃ plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**:235-256.

Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Höhne M, Hendriks JHM, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M (2004) A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell* **16**:3304-3325.

Gibon Y, Larher F (1997) Cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotides: NaCl precipitation and ethanol solubilization of the reduced tetrazolium. *Analytical Biochemistry* **251**:153-157.

Gibon Y, Pyl ET, Sulpice R, Lunn J, Höhne M, Günther M, Stitt M (2009) Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when *Arabidopsis* is grown in very short photoperiods. *Plant, Cell and Environment* **32**:859-874

Gibson K, Parkc JS, Nagaia Y, Hwanga SK, Chod YC, Rohc KH, Leec SM, Kimc DH, Choie SB, Ito H, Edwardsa GE, Okitaa TW (2011) Exploiting leaf starch

synthesis as a transient sink to elevate photosynthesis, plant productivity and yields. *Plant Science* **181**:275-281.

Gommers CM, Visser EJ, St Onge KR, Voeselek LA, Pierik R (2012) Shade tolerance: when growing tall is not an option. *Trends in Plant Science* **18**:65-71.

Gordon AJ, Ryle GJA, Powell CE, Mitchell D (1980) Export, mobilization, and respiration of assimilates in unicultm barley during light and darkness. *Journal of Experimental Botany* **31**:461-473.

Graf A, Smith AM (2011) Starch and the clock: the dark side of plant productivity. *Trends in Plant Science* **16**:169-175.

Grimmer C, Bachfischer T, Komor E (1999) Carbohydrate partitioning into starch in leaves of *Ricinus communis* L. grown under elevated CO₂ is controlled by sucrose. *Plant, Cell and Environment* **22**: 1275-1280.

Hadrich N, Hendriks JH, Kotting O, Arrivault S, Feil R, Zeeman SC, Gibon Y, Schulze WX, Stitt M, Lunn JE (2012) Mutagenesis of cysteine 81 prevents dimerization of the APS1 subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase and alters diurnal starch turnover in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Journal* **70**:231-242.

Harrison CJ, Hedley CL, Wang TL (1998) Evidence that the *rug3* locus of pea (*Pisum sativum* L.) encodes plastidial phosphoglucomutase confirms that the imported substrate for starch synthesis in pea amyloplasts is glucose-6-phosphate. *Plant Journal* **13**:753-762.

Hendriks JH, Kolbe A, Gibon Y, Stitt M, Geigenberger P (2003) ADPglucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Physiology* **133**:838-849.

Hernández I, van Breusegem F (2010) Opinion on the possible role of flavonoids as energy escape valves: Novel tools for nature's Swiss army knife? *Plant Science* **179**: 297-301.

Huber SC (1983) Role of sucrose-phosphate synthase in partitioning of carbon in leaves. *Plant Physiology* **71**:818-821.

Huber SC, Hanson KR (1992) Carbon partitioning and growth of a starchless mutant of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiology* **99**:1449-1454.

Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmuller E, Dormann P, Weckwerth W, Gibon Y, Stitt M, Willmitzer L, Fernie AR, Steinhauser D (2005) The Golm metabolome database. *Bioinformatics* **21**:1635-1638.

Kötting O, Kossmann J, Zeeman SC, Lloyd JR (2010) Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment? *Current Opinion in Plant Biology* **13**:321-329.

Kötting O, Santelia D, Edner C, Eicke S, Marthaler T, Gentry MS, Comparot-Moss S, Chen J, Smith AM, Steup M, Ritte G, Zeeman SC (2009) STARCH-

EXCESS₄ is a laforin-like phosphoglucan phosphatase required for starch degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **21**:334-346.

Kruger EL, Volin JC (2006) Reexamining the empirical relation between plant growth and leaf photosynthesis. *Functional Plant Biology* **33**:421-429.

Lambers H, Poorter H (1992) Inherent variation in growth rate between higher plants: A search for physiological causes and ecological consequences. *Advances in Ecology Research* **23**:187-261.

Larcher W (1983) *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag, Berlin.

Lawlor DW, Mitchell RAC (1991) The effects of increasing CO₂ on crop photosynthesis and productivity: a review of field studies. *Plant, Cell and Environment* **14**:807-818.

Lawlor DW, Mitchell RAC (1991). The effects of increasing CO₂ on crop photosynthesis and productivity: a review of field studies. *Plant, Cell and Environment* **14**:807-818.

Lewis JD, Phillips NG, Logan BA, Hricko CR, Tissue DT (2011) Leaf photosynthesis, respiration and stomatal conductance in six Eucalyptus species native to mesic and xeric environments growing in a common garden. *Tree Physiology* **31**:997-1006.

Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* **1**:387-396.

Lorenzen JH, Ewing EE (1992) Starch accumulation in leaves of potato (*Solanum tuberosum* L.) during the first 18 days of photoperiod treatment. *Annals of Botany* **69**:481-485.

Lu Y, Sharkey TD (2006) The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant, Cell and Environment* **29**:353-366.

Ludewig F, Sonnewald U, Kauder F, Heineke D, Geiger M, Stitt M, Müller-Rober BT, Gillissen B, Kuhn C, Frommer WB (1998) The role of transient starch in acclimation to elevated atmospheric CO₂. *FEBS Letters* **429**:147-151.

Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J (2008) TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* **24**:732-737.

Lunn JE, Delorge I, Figueroa CM, Van Dijck P, Stitt M (2014) Trehalose metabolism in plants. *Plant Journal*. doi: 10.1111/tpj.12509.

Magaña RH, Adamowicz S, Pagès L (2009) Diel changes in nitrogen and carbon resource status and use for growth in young plants of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Annals of Botany* **103**:1025-1037.

Martins MCM, Hejazi M, Fettke J, Steup M, Feil R, Krause U, Arrivault S, Vosloh D, Figueroa CM, Ivakov A, Yadav UP, Piques M, Metzner D, Stitt M, Lunn JE

(2013) Feedback inhibition of starch degradation in Arabidopsis leaves mediated by trehalose 6-phosphate. *Plant Physiology* **163**:1142-1163.

Martins SCV, Wagner L, Araújo WL, Tohge T, Fernie AR, DaMatta FM (2014) In high-light-acclimated coffee plants the metabolic machinery is adjusted to avoid oxidative stress rather than to benefit from extra light enhancement in photosynthetic yield. *Plos One* DOI: 10.1371/journal.pone.0094862

Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**: 659-668.

Michalska J, Zauber H, Buchanan BB, Cejudo FJ, Geigenberger P (2009) NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:9908-9913.

Mikkelsen R, Mutenda KE, Mant A, Schürmann P, Blennow A (2005) α -Glucan, water dikinase (GWD): a plastidic enzyme with redox regulated and coordinated catalytic activity and binding affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:1785-1790.

Mohotti AJ, Lawlor DW (2002) Diurnal variation of photosynthesis and photoinhibition in tea: effects of irradiance and nitrogen supply during growth in the field. *Journal of Experimental Botany* **53**:313-322.

Muraoka H, Tang Y, Terashima I, Koizumi H, Washitani I (2000) Contributions of diffusional limitation, photoinhibition and photorespiration to midday depression of photosynthesis in *Arisaema heterophyllum* in natural high light. *Plant, Cell and Environment* **23**:235-250.

Nebauer SG, Renau-Morata B, Guardiola JL, Molina RV (2011) Photosynthesis down-regulation precedes carbohydrate accumulation under sink limitation in Citrus. *Tree Physiology* **31**:169-177.

Niittyla T, Comparot-Moss S, Lue WL, Messerli G, Trevisan M, Seymour MDJ, Gatehouse JA, Villadsen D, Smith SM, Chen JC, Zeeman SC, Smith AM (2006) Similar protein phosphatases control starch metabolism in plants and glycogen metabolism in mammals. *Journal of Biological Chemistry* **281**:11815-11818.

Noguchi K, Go CS, Miyazawa SI, Terashima I, Ueda S, Yoshinari T (2001) Costs of protein turnover and carbohydrate export in leaves of sun and shade species. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**:37-47.

Noguchi K, Sonoike K, Terashima I (1996). Acclimation of respiratory properties of leaves of *Spinacea oleracea* L., a sun species, and of *Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don., a shade species, to changes in growth irradiance. *Plant, Cell and Physiology* **37**:377-384.

Noguchi K, Taylor NL, Millar AH, Lambers H, Day DA (2005). Response of mitochondria to light intensity in the leaves of sun and shade species. *Plant, Cell and Environment* **28**:760-771.

Noguchi K, Terashima I (1997) Different regulation of leaf respiration between *Spinacia oleracea*, a sun species, and *Alocasia odora*, a shade species. *Physiologia Plantarum* **101**:1-7.

Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant Journal* **50**:1093-1106.

Nunes-Nesi A, Carrari F, Lytovchenko A, Smith AMO, Loureiro ME, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2005) Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiology* **137**:611-622.

Palacio S, Hoch G, Sala A, Körner C, Millard P (2014) Does carbon storage limit tree growth? *New Phytologist* **201**:1096-1100.

Pilkington SM, Encke B, Kronh N, Höhne M, Stitt M, Pyl E-T (2014) Relationship between starch degradation and carbon demand for maintenance and growth in *Arabidopsis thaliana* in different irradiance and temperature regimes. *Plant, Cell and Environment* DOI: 10.1111/pce.12381.

Praxedes SC, DaMatta FM, Loureiro ME, Ferrão MAG, Cordeiro AT (2006) Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. kouillou) leaves. *Environmental and Experimental Botany* **56**:263-273.

Pyl ET, Piques M, Ivakov A, Schulze W, Ishihara H, Stitt M, Sulpice R (2012) Metabolism and Growth in *Arabidopsis* Depend on the Daytime Temperature but Are Temperature-Compensated against Cool Nights. *Plant Cell* **24**:2443-2469.

Queval G, Noctor G (2007) A plate-reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione and ascorbate in tissue extracts. Application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Analytical Biochemistry* **363**:58-69.

Raimondo F, Trifilò P, Gullo MAL (2013) Does citrus leaf miner impair hydraulics and fitness of citrus host plants? *Tree Physiology* **33**:1319-1327.

Ribeiro RV, Machado EC (2007) Some aspects of citrus ecophysiology in subtropical climates: re-visiting photosynthesis under natural conditions. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **19**:393-411.

Ronchi CP, DaMatta FM, Batista KD, Moraes GABK, Loureiro ME, Ducatti C (2006) Growth and photosynthetic down-regulation in *Coffea arabica* in response to restricting root volume. *Functional Plant Biology* **33**:1013-1023.

Rufty TW, Kerr PS, Huber SC (1983) Characterization of diurnal changes in activities of enzymes involved in sucrose biosynthesis. *Plant Physiology* **73**:428-433.

Sack L, Frole K (2006) Leaf structural diversity is related to hydraulic capacity in tropical rain forest trees. *Ecology* **87**:483-491.

Sala A, Woodruff DR, Meinzer FC (2012) Carbon dynamics in trees: feast or famine? *Tree Physiology* **32**:764-775.

Schauer N, Steinhauser D, Strelkov S, Schomburg D, Allison G, Moritz T, Lundgren K, Roessner U, Forbes MG, Willmitzer L, Fernie AR, Kopka J (2005) GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Letters* **579**:1332-1337.

Schippers JHM, Nunes-Nesi A, Apetrei R, Hille J, Fernie AR, Dijkwel PP (2008) The Arabidopsis onset of leaf death5 mutation of quinolinate synthase affects nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and causes early ageing. *Plant Cell* **20**:2909-2925.

Shirke PA, Pathre UV (2004) Influence of leaf-to-air vapour pressure deficit (VPD) on the biochemistry and physiology of photosynthesis in *Prosopis juliflora*. *Journal of Experimental Botany* **55**:2111-2120.

Sicher R (2011) Carbon partitioning and the impact of starch deficiency on the initial response of Arabidopsis to chilling temperatures. *Plant Science* **181**:167-176.

Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas, SAEG (1993) versão 5.0, Fundação Arthur Bernardes, Viçosa.

Smith AM, Stitt M (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell and Environment* **30**:1126-1149.

Smith AM, Zeeman SC, Smith SM (2005) Starch degradation. *Annual Review of Plant Biology* **56**:73-98.

Sokolov LN, Dominguez-Solis JR, Allary AL, Buchanan BB, Luan S (2006) A redox-regulated chloroplast protein phosphatase binds to starch diurnally and functions in its accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:9732-9737.

Sparla F, Costa A, Schiavo FL, Pupillo P, Trost P (2006) Redox regulation of a novel plastid-targeted β -amylase of Arabidopsis. *Plant Physiology* **141**:840-850.

Stitt M, Lunn J, Usadel B (2010) Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism – more than the icing on the cake. *Plant Journal* **61**:1067-1091

Stitt M, Zeeman SC (2012) Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Current Opinion in Plant Biology* **15**:1-11.

Stitt, M, Gerhardt R, Kürzel B, Heldt HW (1983) A role for fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of sucrose synthesis in spinach leaves. *Plant Physiology* **72**:1139-1141.

Streb S, Eicke S, Zeeman SC (2012) The Simultaneous Abolition of Three Starch Hydrolases Blocks Transient Starch Breakdown in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **287**:41745-41756.

Sulpice R, Flis A, Ivakov AA, Apelt F, Krohn N, Encke B, Abel C, Feil R, Lunn JE, Stitt M (2014). Arabidopsis coordinates the diurnal regulation of carbon allocation and growth across a wide range of photoperiods. *Molecular Plant* **7**:137-155

Sulpice R, Pyl ET, Ishihara H, Trenkampa S, Steinfath M, Witucka-Wall H, Gibon Y, Usadel B, Poree F, Piques MC, Korff MV, Steinhauser MC, Keurentjes JJB, Guenther M, Hoehne M, Selbig J, Fernie AR, Thomas Altmann, Stitt M (2009) Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:10348-10353.

Sulpice R, Tschoep H, von Korff M, Bussis D, Usadel B, Hohne M, Witucka-Wall H, Altmann T, Stitt M, Gibon Y (2007) Description and applications of a rapid and sensitive non-radioactive microplate-based assay for maximum and initial activity of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant, Cell and Environment* **30**:1163-1175.

Szabados L, Savouré A (2010) Proline: A Multifunctional Amino Acid. *Trends in Plant Science* **15**: 89-97.

Usadel B, Bläsing OE, Gibon Y, Retzlaff K, Hoehne M, Gunther M, Stitt M (2008) Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during progressive exhaustion of carbohydrates in Arabidopsis rosettes. *Plant Physiology* **146**:1834-1861

Valentini R, Epron D, De Angelis P, Matteucci G, Dreyer E (1995) In situ estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant, Cell and Environment* **18**:631-640.

Valerio C, Costa A, Marri L, Issakidis-Bourguet E, Pupillo P, Trost P, Sparla F (2011) Thioredoxin-regulated β -amylase (BAM1) triggers diurnal starch degradation in guard cells, and in mesophyll cells under osmotic stress. *Journal of Experimental Botany* **62**:545-555.

van Kooten O, Snel JFH (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research* **25**:147-150.

Voss I, Sunil B, Scheibe R, Raghavendra AS (2013) Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. *Plant Biology* **15**:713-722.

Vriet C, Welham T, Brachmann A, Pike M, Pike J, Perry J, Parniske M, Sato S, Tabata S, Smith AM, Wang TL (2010) A suite of *Lotus japonicus* starch mutants reveals both conserved and novel features of starch metabolism. *Plant Physiology* **154**:643-655.

Walter A, Christ MM, Barron-Gafford A, Grieve KA, Murthy R, Rascher W (2005) The effect of elevated CO₂ on diel leaf growth cycle, leaf carbohydrate content and canopy growth performance of *Populus deltoids*. *Global Change Biology* **11**:1207-1219.

Weise SE, van Wijk KJ, Sharkey TD (2011) The role of transitory starch in C3, CAM, and C4 metabolism and opportunities for engineering leaf starch accumulation. *Journal of Experimental Botany* **62**:3109-3118.

Wünsche JN, Dennis HG, Laing WA, Palmer JW (2005) Physiological and biochemical leaf and tree responses to crop load in apple. *Tree Physiology* **25**:1253-1263.

Zeeman SC, ap Rees T (1999) Changes in carbohydrate metabolism and assimilate partitioning in starch-excess mutants of *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* **22**:1445-1453.

Zeeman SC, Northrop F, Smith AM, ap Rees T (1998). A starch-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in a starch-hydrolysing enzyme. *Plant Journal* **15**:357-365.

Zeeman SC, Seteven MS, Smith AM (2007) The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochemical Journal* **401**:13-28.

Zeeman SC, Umemoto T, Lue WL, Yeung PA, Martin C, Smith AM, Chenb J (1998) A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytyglycogen. *Plant Cell* **10**:1699-1711.

Zell MB, Fahnenstich H, Maier A, Saigo M, Voznesenskaya EV, Edwards GE, Andreo C, Schleifenbaum F, Zell C, Drincovich MF, et al. (2010) Analysis of *Arabidopsis* with highly reduced levels of malate and fumarate sheds light on the role of these organic acids as storage carbon molecules. *Plant Physiology* **152**: 1251-1262.

Zhang X, Myers AM, James MG (2005) Mutations affecting starch synthase III in *Arabidopsis* alter leaf starch structure and increase the rate of starch synthesis. *Plant Physiology* **138**:663-674.