

ESTUDO SOBRE REGIME DE ÁGUA, INTERCEPETAÇÃO DE LUZ E COMPOSTOS METABÓLICOS EM FOLHAS DE CV. 'CATUAÍ'¹

Guilherme Luiz Scheel²; Ieda Spacino Scarminio³; Miroslava Rakocevic⁴

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

² Bolsista CAPES, MSc, UEL, Londrina - PR, guilhermescheel@hotmail.com

³ Professora, PhD, UEL, Londrina - PR, ieda@uel.br

⁴ Bolsista Consórcio Pesquisa Café, PhD, CNPTIA, Campinas - SP, miroslava.rakocevic@colaborador.embrapa.br

RESUMO: A arquitetura vegetal, disponibilidade de água e condições meteorológicas podem causar impactos sobre a fisiologia de folhas de cafeeiros e como consequência, muitos compostos do metabolismo das folhas são fortemente modificados. O objetivo deste trabalho foi entender os impactos de déficit hídrico e de condições de luz extremas (expostas à luz alta e autossombreamento) nas folhas de cafeeiros e em seus compostos metabólicos. Para esta finalidade usaram-se modelagem arquitetural, métodos quimiométricos de planejamento experimental e análise estatística associada a dados espectrofotométricos. Para as análises espectrofotométrica e estatística foram preparados extratos de folhas de plantas irrigadas (IRR) e não irrigadas (NI) em diferentes alturas: camada inferior (<40 cm, autossombreadas) e superior (> 80 cm, expostas à luz alta) de cafeeiros Arábica (*Coffea arabica* L.). Na modelagem arquitetural usou-se o software VPlants e o programa VegeSTAR, enquanto na quimiometria aplicaram-se o modelo simplex centróide, a análise dos extratos na região ultravioleta-visível (200 – 800 nm) e a análise de componentes principais. Apesar de grande variabilidade entre as respostas de plantas de mesmo tratamento do regime hídrico, particularmente destas sob a irrigação, a área foliar das plantas foi significativamente reduzida mostrando que a água foi um fator limitante no crescimento de cafeeiros. A distribuição da folhagem bem como a área foliar distribuídas nas diferentes camadas permitiu maior interceptação de luz pelos cafeeiros não irrigados, com maior acesso de radiação solar até a camada intermediária. Pela análise de componentes principais dos dados espectrofotométricos na região ultravioleta-visível, observou-se a separação de grupos devido suas constituições metabólicas. Alguns solventes extratores foram mais eficientes para discriminar os extratos de folhas de cultivo IRR daqueles NI, por apresentarem absorvâncias em comprimentos de onda relacionados a pigmentos tetrapirrólicos, como clorofilas. Os resultados demonstraram que submeter cafeeiros do cultivar 'Catuai' a regimes de água distintos (com ou sem irrigação) afetam a distribuição da folhagem e o tamanho de área foliar, comprometendo a interceptação luminosa e a composição metabólica.

PALAVRAS-CHAVE: análise de componentes principais, clorofilas, *Coffea arabica*, maquetes 3D, modelo simplex centróide.

STUDY OF WATER REGIME, LIGHT INTERCEPTION AND THEIR METABOLIC COMPOUNDS IN LEAVES OF CV. 'CATUAÍ'

ABSTRACT: The plant architecture, water availability and microclimate conditions can cause the impacts on the physiology of coffee leaves and, as a result, many leaf metabolic compounds could be strongly modified. The aim of this study was to estimate the impacts of drought and extreme light conditions (high light exposure and self-shading) in metabolic compounds of coffee leaves. The architectural modeling, chemometric methods of experimental design and statistical analysis associated with spectrophotometric data were applied. For spectrophotometric and statistical analyzes, leaf extracts were prepared comparing the irrigated (IRR) and non-irrigated (NI) plants and leaf origin from the lowest (< 40 cm, self-shaded) and highest layers (> 80 cm, high light exposed) of coffee Arabica (*Coffea arabica* L.) trees. In architectural modeling, the VPlants software and VegeSTAR program were used; in chemometrics, the simplex centroid model, analysis of extracts in the ultraviolet-visible region (200-800 nm) and principal component analysis were applied. Despite the great variability between the responses of plants cultivated under the same water regime, particularly under irrigation, leaf area of plants was significantly reduced indicating that the water was the limiting factor in the growth of coffee. The different distribution of foliage by layers and different leaf area size affected the light interception of irrigated and non-irrigated coffee plants. Relatively higher interception was calculated for medium and lowest layers in non-irrigated coffee than in irrigated coffee cultivation. By the principal component, analyses of UV-vis spectra, some groups were separated by their metabolic constitutions. Several extracting solvents were more efficient to discriminate IRR extracts from NI, presenting higher absorbance at wavelengths related to pigments. The results showed that subjecting coffee cultivar 'Catuai' to different water regimes (with or without irrigation) affect the foliage distribution and the leaf area size, compromising the light interception and the metabolic composition.

KEYWORDS: principal components analyses, chlorophylls, *Coffea arabica*, 3D mock-ups, simplex centroid model.

INTRODUÇÃO

A arquitetura vegetal, disponibilidade de água e microcondições luminosas podem causar impactos sobre a fisiologia e morfologia de folhas de cafeeiros e como a consequência, muitos compostos do metabolismo de folhas são fortemente modificados. Em condições de limitações de água e luz, as restrições de fotossíntese líquida são ligados a fatores bioquímicos, tais como a concentração de prolina que aumenta em folhas de cafeeiros Arábica (*Coffea arabica* L.) que sofrem com a seca, particularmente aquelas cultivadas em pleno sol. As maiores concentrações de lipídios, fenóis totais, ligninas, açúcares solúveis e totais encontram-se em folhas sob a luz alta em comparação com as condições de sombra, com efeito oposto sobre as concentrações de celulose e hemicelulose (Cavatte et al., 2012).

A alta eficiência de interceptação luminosa pode ser de alto custo para a planta, considerando os investimentos necessários para construção de sistema fotossintético, especialmente considerando os custos de nitrogênio para proteínas e clorofilas (Niinemets & Sack, 2006). Por esta razão, a interceptação real sempre estará menor do que a máxima (Valladares et al., 2002). Em geral, o sombreamento não atenua os impactos negativos da seca no cafeeiro e a plasticidade fenotípica mostra-se muito mais elevada em resposta à luz do que ao abastecimento de água (Cavatte et al., 2012). O objetivo geral deste trabalho foi entender os impactos de déficit hídrico e de condições de luz extremas (expostas à luz alta e autossombreamento) em mesmas plantas nos compostos metabólicos em folhas de cafeeiros. Para esta finalidade usaram-se modelagem arquitetural, métodos quimiométricos de planejamento experimental e análise estatística associada a dados espectrofotométricos.

MATERIAL E MÉTODOS

As medições ecofisiológicas e o 'fingerprint' metabolômico foram relacionados ao cafezal experimental estabelecido no IAPAR, Londrina (-23° 18' 37" S, 51° 09' 46" W, 585 m altitude), Paraná. Mudanças de cultivar Catuaí IAC 99 originadas de sementes (2009) foram plantadas no campo em 2010, em arranjo de 2,5 m na distância entre as linhas e 0,5 m em linha. As linhas tinham orientação Leste-Oeste. Quatro plantas do genótipo foram cultivadas sob dois tratamentos de recurso hídrico – com (IRR) e sem irrigação (NI). A irrigação foi aplicada aleatoriamente, quando foi estimado que o estresse hídrico poderia ocorrer. O sistema de irrigação foi por gotejamento com a intensidade 3,5 L h⁻¹ em cada gotejador. Gotejadores foram distribuídos linearmente a cada meio metro do tronco dos cafeeiros.

Os cálculos e estimativas pelo programa VegeSTAR (Adam et al., 2006) permitem as extrações referentes a distribuição de folhagem pelos estratos verticais e horizontais de plantas, simulações e estimativas de interceptação luminosa e de fotossíntese. Para começar a estimativa de interceptação de luz em VegeSTAR, precisa-se primeiro construir a sequência agrometeorológica em tempo diário de medição (possível precisão na sequência de cada dois minutos), considerando a intensidade de radiação fotossintética ativa direta e difusa ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), junto com o posicionamento solar (azimute e elevação solar). A rota solar pode ser calculada no próprio programa, informando coordenadas de local, data e precisão temporal desejada. A interceptação luminosa foi calculada em VegeSTAR para Catuaí IAC 99 irrigada e não irrigada na época depois de florescimento, em 9 de Outubro de 2012, com a precisão temporal de 30 minutos.

Para as análises espectrofotométrica e estatística foram preparados extratos de folhas de plantas IRR e NI de camada inferior (40 cm, autossombreadas) e superior (> 80 cm, expostas à luz alta), coletadas em 9 de Outubro de 2012. Aproximadamente foram pesados 2,0 g de amostra em cada frasco para a extração por solvente, 60 mL, utilizando o modelo simplex centróide, consistindo de etanol (e), diclorometano (d) e hexano (h) para solventes puros, três misturas binárias, três misturas ternárias axiais e uma ternária equitativa em sextuplicata (Tabela 1). O processo de extração/remaceração foi repetido quatro vezes com intervalo de 24 horas. Os extratos foram analisados na região ultravioleta-visível (200 – 800 nm) e submetidos à análise de componentes principais. Para análise ultravioleta-visível (UV-Vis), 3,0 mg de cada extrato bruto foram solubilizados em 1 mL de seu respectivo solvente ou mistura de solventes de acordo com o planejamento mostrado na Tabela 1. Uma alíquota de 100 μL dessa solução foi diluída em 1900 μL do solvente extrator. Os espectros dos extratos foram registrados na região de 200 – 800 nm. A análise estatística nos espectros em UV-Vis foi realizada no programa Statistica 7.0. Os dados dos espectros foram dispostos numa matriz de dados 60 x 601, autoescalados e sujeitos a análise de componentes principais onde cinco fatores permitiram explicar 98,54% da variância dos dados.

Tabela 1. Proporções dos solventes para cada amostra segundo planejamento de misturas.

Amostra	Etanol (e)	Diclorometano(d)	Hexano (h)
e	1	0	0
d	0	1	0
h	0	0	1
ed	1/2	1/2	0
eh	1/2	0	1/2
dh	0	1/2	1/2
Edh	2/3	1/6	1/6
eDh	1/6	2/3	1/6
edH	1/6	1/6	2/3
edh	1/3	1/3	1/3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A codificação de cafeeiros considera três escalas de decomposição - plantas, eixos e metâmeros (Rakocevic & Androcioli-Filho, 2010). Com os procedimentos de reconstrução topológica e geométrica de cafeeiros, seja que as plantas foram medidas inteiras na escala de metâmeros ou as informações foram coletadas pela amostragem na escala de metâmeros, conseguem-se criar as maquetes de plantas em 3D (Figura 1), com uso de plataforma OpenAlea e software VPlants (Pradal et al. 2008), junto com os módulos especificamente programados para os cafeeiros Arábica (Matsunaga et al., 2015).

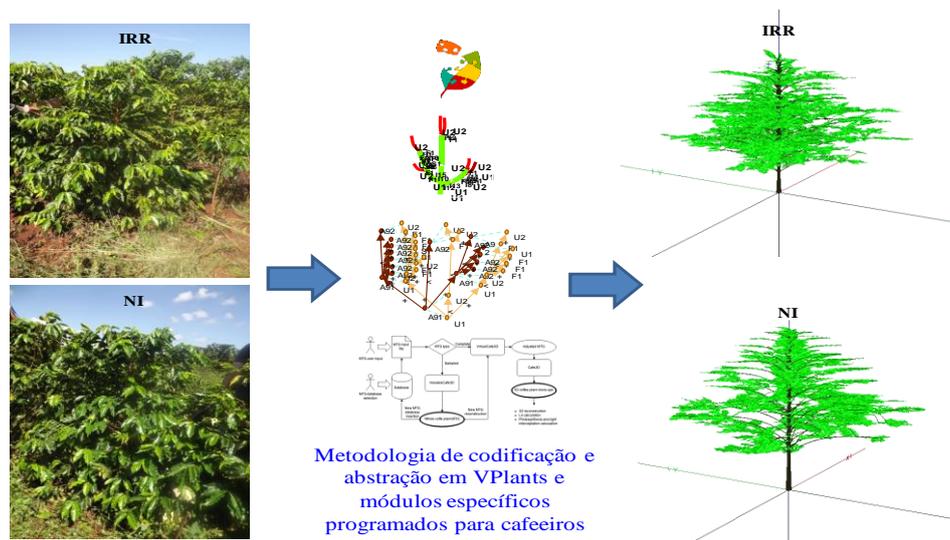


Figura 1. Codificação e abstração de 'Catuaí IAC 99' irrigado (IRR) e não irrigado (NI) até reconstrução das maquetes em 3D.

As folhas para análise de compostos metabólicos foram coletadas em cafeeiros de cultivar 'Catuaí IAC 99' no dia 9 Outubro de 2012 e para esta data realizou-se a reconstrução de oito plantas, IRR e NI (Figura 2), com a estimacão de sua área foliar total por planta (Figura 2A) e pelas camadas (Figura 2B) em programa VegeSTAR (Adam et al., 2006). Apesar de grande variabilidade entre as respostas de plantas no mesmo tratamento de regime hídrico, particularmente destas sob a irrigação, a área foliar de plantas foi significativamente reduzida quando a água foi o fator limitante para o crescimento de cafeeiros (Figura 2A).

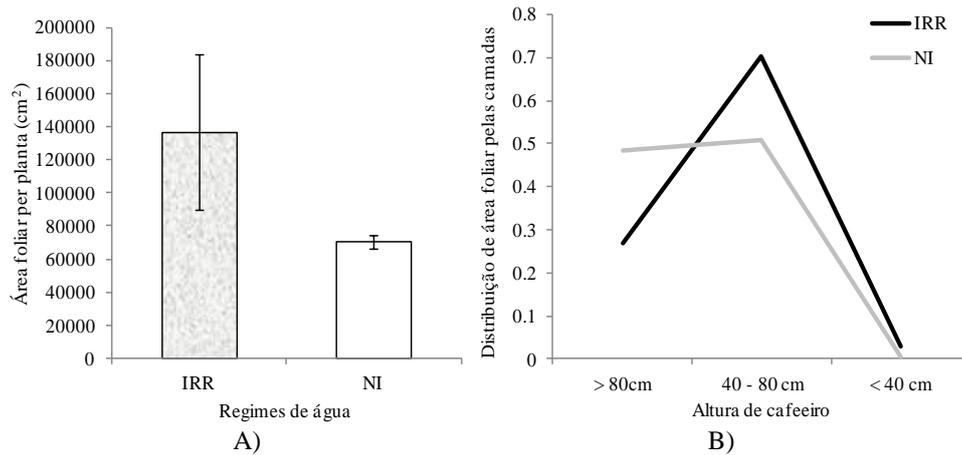


Figura 2. A) Área foliar por planta e B) a sua distribuição pelas camadas de Catuaí IAC 99 sob dois regimes hídricos, irrigado (IRR) e não irrigado (NI). Os cálculos e estimativas foram realizados a partir das maquetes 3D e do programa VegeSTAR.

A diferente distribuição de área foliar pelas camadas (Figura 2B) ocasionou maior interceptação das plantas NI (Figura 3B) do que das IRR (Figura 3A), também permitindo o maior acesso de radiação solar até a camada intermediária e a camada inferior nessas plantas do que em plantas irrigadas (Figura 3). Mesmo assim, por causa de impactos de seca, a camada inferior foi quase extinta em condições de NI (Figuras 2B e 3B). A interceptação de luz em pouca folhagem de camada inferior (autossombreada) de plantas NI apresentou-se maior no início e no fim do dia, por causa de dispersão foliar das duas camadas superiores (Figura 3B) e elevação foliar (resultados não apresentados).

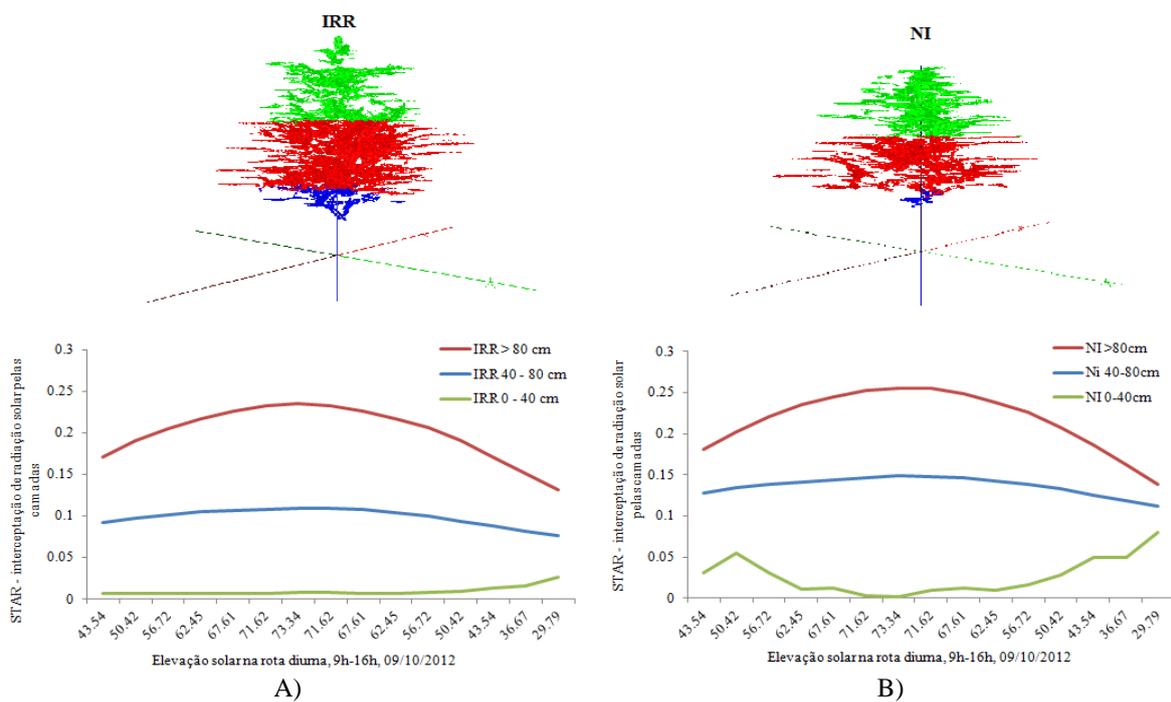


Figura 3. Interceptação de luz pelas camadas Catuaí IAC 99 A) sob irrigação (IRR) e B) no regime hídrico do campo (NI) para a rota solar de 09 Outubro de 2012.

Considerando a distribuição de folhas e elevação foliar (em cafeeiros tende ser entre -55° e -10° o que diferencia entre plantas irrigadas e não irrigadas - resultados não apresentados), a interceptação total de cafeeiros encontra-se entre abaixo de 0,3 na rota diurna (Figura 3), menor do que em algumas outras espécies, especialmente em C_4 espécies gramíneas, onde os valores atingem 0,5-0,75 (Jørgensen et al., 2003). Neste sentido, em condições de monocultura e campos abertos, a arquitetura de cafeeiros apresenta a estratégia de posicionamento foliar eficiente para maior refletância foliar na faixa de radiação fotossinteticamente ativa (resultados não apresentados), com a finalidade de proteção de sistema fotossintético de excesso de radiação.

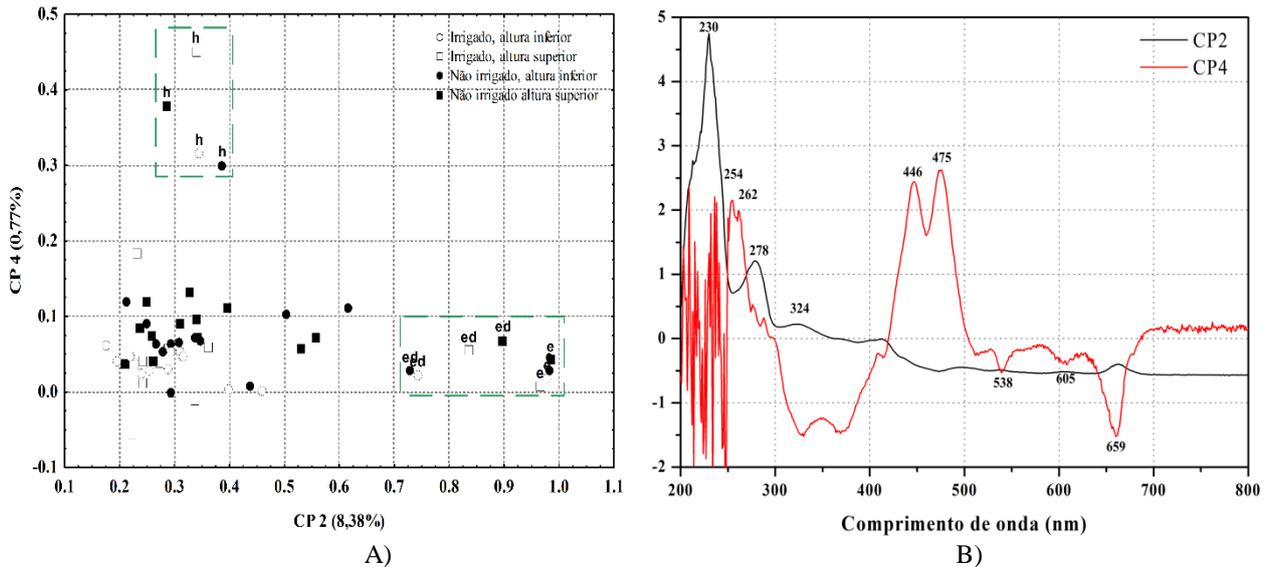


Figura 4. Representação gráfica em ultravioleta-visível para extratos de plantas irrigadas e não irrigadas dos A) escores e B) 'loadings' das CP2 e CP4.

A projeção da CP2 *versus* CP4 permitiu separar os grupos distintos (Figura 4A), demarcados pela área tracejada. A CP2 separou os extratos preparados com etanol e a mistura binária etanol: diclorometano, localizados na região mais positiva. A CP4 diferenciou os extratos preparados com hexano, também na região mais positiva e discretamente o restante dos extratos originados de folhas das plantas IRR e do restante das plantas NI. A representação gráfica dos 'loadings' das CP2 e CP4 (Figura 4B) mostrou as variáveis com maior influência na discriminação dos extratos. Estes resultados sugerem que existem diferenças nas composições químicas das amostras em relação ao solvente extrator e em relação a condições hídricas. Observa-se que os valores positivos para a CP2 estavam localizados nos comprimentos de onda de 230, 278 e 324 nm, agindo na separação dos grupos de extratos obtidos em etanol e mistura binária etanol: diclorometano. O grupo de extratos obtidos com hexano, posicionados na parte positiva da CP4, foram mais influenciados por metabólitos com absorção nos comprimentos de onda de 254, 262, 446 e 475 nm. Na CP4 observaram-se também os valores negativos, nos comprimentos de onda de 538, 605 e 659 nm. Estes podem estar relacionados à região de absorção de pigmentos tetrapirrólicos, sugerindo que esta foi a discreta discrepância entre os extratos de folhas de cultivos IRR e NI que não se separaram por solvente.

Pelos espectros na região UV-Vis dos extratos foi possível determinar, a partir das informações dos escores e 'loadings', quais sinais de absorbância os diferem dos demais. Os espectros dos extratos obtidos com etanol e mistura binária etanol: diclorometano, exibiram altos valores de absorbância nas regiões de comprimento de onda de 230 nm e 278 nm (Scheel, 2015), possivelmente provenientes de um acúmulo de compostos metilxantínicos, devido formação e degradação da cafeína. Em folhas de *Coffea arabica*, as concentrações de cafeína variam de 0,8% a 1,9%, em peso seco (Ashihara et al., 2008). Os extratos analisados também apresentaram picos de absorção na região de 324 nm (extratos das plantas não irrigadas mais do que irrigadas), podendo ser um indício de compostos fenólicos, como ácidos clorogênicos (Marshall, 1998).

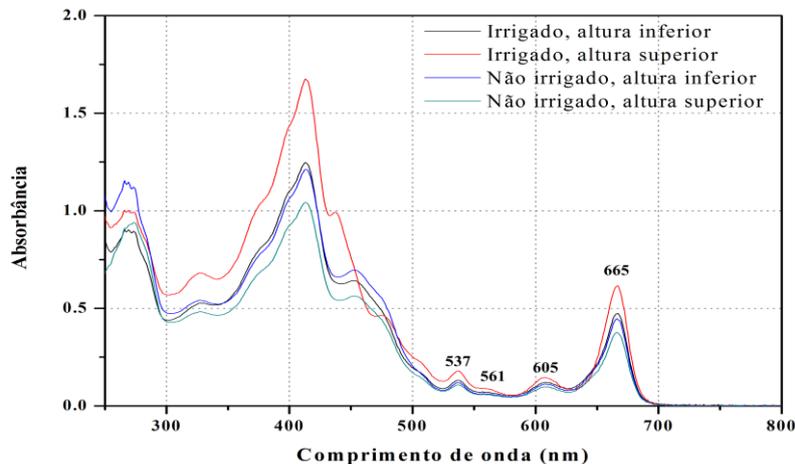


Figura 5. Projeção gráfica dos espectros em radiação ultravioleta-visível dos extratos obtidos com mistura ternária equitativa etanol: diclorometano: hexano como solvente.

Nos extratos obtidos com hexano, na região de 250 - 270nm, apresentou-se elevada absorvidade em 254 nm e 263 nm, que corresponde a dienos conjugados e a trienos, respectivamente. O pico largo em torno de 290 - 500 nm sugere a presença de carotenóides, que conferem coloração alaranjada, agindo como um dos sistemas foto-protetores de plantas nestes extratos (Schoefs, 2002; Solovchenko et al., 2008). Para os extratos discretamente separados por condições hídricas, exemplificado por espectros da mistura ternária equitativa etanol: diclorometano: hexano (Figura 5) observou-se que os extratos de folhas de cultivo IRR apresentaram maiores absorvâncias nos comprimentos de onda relatados na representação gráfica dos 'loadings', quando comparados a seus respectivos extratos NI. Este conjunto de sinais espectroscópicos se assemelha ao de pigmentos tetrapirrólicos, como clorofilas e seus derivados. Em época antes de florescimento, de mesmo ano 2012, as folhas de cv. 'Catuaí' em um cultivo IRR apresentam maior absorção de clorofilas do que as em cultivo NI (Soares et al., 2014), apoiando as discriminações relatadas. A reação ao tratamento de irrigação foi oposta para as regiões de absorção de antocianinas, sugerindo o seu papel na proteção de aparelho fotossintético, ainda mais em condições de água limitada.

CONCLUSÕES

- Submeter cafeeiros do cultivar 'Catuaí' a regimes de água distintos (com ou sem irrigação) foi fundamental para determinar que a água é um fator limitante no crescimento do cafeeiro.
- Tanto a diferente distribuição da folhagem quanto o diferente tamanho de área foliar nas camadas do cultivar comprometem a interceptação luminosa dos cafeeiros. Nos cafeeiros não irrigados há maior acesso de radiação solar até a camada intermediária e a camada inferior do que em cafeeiros irrigados.
- Perfis espectroscópicos de pigmentos foram identificados e por eles foi possível discriminar os extratos foliares de cultivo irrigado e não irrigado. Os extratos de cultivo irrigado apresentaram maiores absorvâncias do que os não irrigados.

AGRADECIMENTOS

Ao IAPAR que disponibilizou o campo experimental e a logística experimental no campo. A CAPES pela bolsa de Mestrado de Química para Guilherme Luiz Scheel, ao CNPq e Consórcio Pesquisa Café pelo financiamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, B.; DONES, N.; SINOQUET, H. VegeSTAR: software qui calcule l'interception lumineuse et la photosynthèse. Version 3.2, INRA, Clermont-Ferrand. (2006)
- ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry* 69:841-856. (2008)
- CAVATTE, P. C.; OLIVEIRA, A. A. G.; MORAIS, L. E.; MARTINS, S. C. V.; SANGULAR L. M. V. P.; DaMATTA, F. M. Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee? A morphophysiological analysis. *Physiologia Plantarum* 144:111-122. (2012)
- JØRGENSEN, U.; MORTENSEN, J.; OHLSSON, C. Light interception and dry matter conversion efficiency of miscanthus genotypes estimated from spectral reflectance measurements. *New Phytologist* 157:263-270. (2003)
- MARSHALL, J. Fourier transform infrared spectra of freshly isolated β - carotene. *Asian Journal of Chemistry* 10:29-34. (1998)
- MATSUNAGA, F. T.; TOSTI, J. B.; ANDROCIOLI-FILHO, A.; BRANCHER, J. D.; COSTES, E.; RAKOCEVIC, M. Reconstructions of 3D plant structure are efficient for comparing berry distribution in *Coffea arabica* L. cultivated under different planting designs. *International Journal of Plant Sciences*, in press. (2015)
- PRADAL, C.; BOUDON, F.; NOUGUIER, C.; CHOPARD, J.; GODIN, C. PlantGL: A Python-based geometric library for 3D plant modelling at different scales. *Graphical Models* 71:1-21. (2008)
- RAKOCEVIC, M.; ANDROCIOLI-FILHO, A. Morphophysiological characteristics of *Coffea arabica* L. in different arrangements: Lessons from a 3D virtual plant approach. *Coffee Science* 5:54-166. (2010)
- SCHEEL, G. Comparação da impressão digital cromatográfica e espectroscópica do genótipo Catuaí IAC 99 em diferentes solventes: relação do déficit hídrico e os principais metabólitos, Mestrado em Química, UEL, 2015, 70p.
- SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology* 3:361-371. (2002)
- SOARES, D. X.; SCARMINIO, I. S., RAKOCEVIC, M.; CORAL, G.; BRUNS, R. E. Factorial design of leaf spectral properties of four *Coffea arabica* genotypes. In: ASIC 2014 - 25th International Conference on Coffee Science, 2014, Armenia-Colombia, p.139.
- SOLOVCHENKO, A. E.; MERZLYAK, M. N. Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants. *Russian Journal of Plants Physiology* 55:719 - 737. (2008)
- VALLADARES, F.; SKILLMAN, J. B.; PEARCY R. W. Convergence in light capture efficiencies among tropical forest understory plants with contrasting crown architectures: a case of morphological compensation. *American Journal of Botany* 89:1275-1284. (2002).