

# INCORPORAÇÃO DE $^{14}\text{CO}_2$ EM FOLHAS INTACTAS DE CAFEIEIRO

MARO RAN-IR SØNDAHL  
Engº Agrônomo

Pesquisador-Assistente da Seção de Genética  
do Instituto Agrônomo, Secretaria da  
Agricultura, Estado de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Otto J. Crocomo

Tese apresentada à Escola  
Superior de Agricultura  
"Luiz de Queiroz" para a  
obtenção do título de Mes-  
tre.

PIRACICABA  
Estado de São Paulo, Brasil  
1974

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. OTTO J. CROCOMO pela orientação e facilidades na execução deste trabalho.

Aos Doutores L. SODEK, L. C. MAGALHÃES e L. C. MONACO pela paciente discussão dos resultados e sugestões apresentadas.

Ao Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> A. CARVALHO pelo incentivo durante a execução deste trabalho.

Ao Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> L. G. SANTORO pelo auxílio e sugestões na construção do equipamento de incorporação.

A Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup> D. M. MEDINA pela colaboração nos estudos de estômatos e a Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup> V. NAGAI pela orientação na parte estatística.

Aos Srs. A. S. NOGUEIRA e A. MARION pelo auxílio dedicado na condução das plantas em solução nutritiva.

Aos Srs. O. MALUF, J. CRIVELLANI e M. A. CASTILHA pela prestimosa colaboração na execução dos trabalhos de laboratório.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pelas facilidades de laboratório oferecidas.

Ao Instituto Agronômico de Campinas.

## Sumário

	Pag.
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
MATERIAL E MÉTODOS	7
1. Material vegetal	7
2. Câmara de crescimento	8
3. Área foliar	8
4. Contagem e medida dos estômatos	8
5. Determinação de clorofila	9
6. Medidas de abertura estomática e transpiração	9
7. Medidas de fixação de $^{14}\text{CO}_2$	10
7.1. Sistema de incorporação	10
7.2. Sistema para carregar o aparelho	12
7.3. Operação de carregar o cilindro-estoque	12
7.4. Uso do equipamento	16
7.5. Características do equipamento	16
7.6. Digestão dos discos de folha	18
7.7. Cálculo do $\text{CO}_2$ total fixado	19
RESULTADOS E DISCUSSÃO	
1. Detecção de atividade de $^{14}\text{C}$ nas folhas	21
1.1. Digestão por via úmida	21
1.2. Detecção sólida dos discos de folha- $^{14}\text{C}$	22
1.3. Digestão por via seca	23
1.4. Contagem dos discos de folhas na solução cintiladora	26
2. Estabilidade da nova mistura de cintilação	28
3. Teste do fluxo e do tempo de digestão	30
4. Local da folha a ser incorporado com $^{14}\text{CO}_2$	30
5. Comparação entre os cultivares de café estudados	33

	Pag.
5.1. Dados de crescimento dos cafeeiros estudados	33
5.2. Medidas dos estômatos	36
5.3. Dosagem de clorofila	36
5.4. Medida de abertura estomática e transpiração	39
6. Incorporação de $^{14}\text{CO}_2$	46
6.1. Fotossíntese aparente	46
6.2. Fixação de $\text{CO}_2$ expresso em teor de clorofila	50
6.3. Fixação de $\text{CO}_2$ por estômato	52
6.4. Efeito da concentração de $\text{O}_2$	54
6.5. Estimativa da fotorespiração e do ponto de compensação para $\text{CO}_2$	57
<b>CONCLUSÕES</b>	62
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	63
- Resumo	69
- Summary	70
- Figura 1	11
"    2	13
"    3	14
"    4	40
"    5	60

## I. INTRODUÇÃO

No melhoramento de plantas, a produção nas condições naturais de cultivo constitui um dos principais objetivos de todo programa. Nos últimos anos além da averiguação da produção total vem-se também procurando identificar os principais componentes dessa produção. Muitas informações vêm se acumulando sobre vários aspectos relacionados com a eficiência biológica. Algumas diferenças na capacidade potencial ligada à produção, como os mecanismos de transferência de energia, taxa de assimilação aparente, translocação e utilização dos fotossintetizados, absorção e uso dos nutrientes, substâncias de crescimento e resposta a condições extremas de temperatura e água, vêm sendo estudadas.

Em cafeeiros tem-se assinalado que a produção de grãos está correlacionada com o desenvolvimento vegetativo. Essa característica tem sido usada para seleção precoce de progênies de café. Estimativas da capacidade de produção de matéria seca ou da taxa fotossintética nas condições naturais podem oferecer importante subsídio ao estudo da adaptabilidade ecológica dos diversos cultivares de café. Poder-se-ia assim estimar, em relação à produção, a interação de três fatores principais macroecológicos: intensidade de luz, temperatura e umidade do solo. Tais informações seriam de real proveito junto a programas de melhoramento genético, principalmente no caso de culturas perenes.

Todavia, a avaliação do comportamento de novos cultivares exige vários anos e a mobilização de grandes áreas, o que às vezes, limita o estudo simultâneo de mui

tas progênies ou seleções. Determinações de incremento de matéria seca exigem delineamentos especiais, os experimentos são de longa duração e com o inconveniente de estarem sujeitos a fenômenos meteorológicos incontroláveis.

Por esse motivo procura-se estimar parâmetros fisiológicos ligados à produção em condições controladas para posterior avaliação em condições de campo. Avaliações de fotossíntese aparente são usualmente realizadas, utilizando-se um analisador de gás por infravermelho / (IRGA). No entanto a sua utilização em condições naturais acarreta algumas dificuldades de operação e mobilidade de todos os acessórios dentro de uma cultura.

O emprego de  $^{14}\text{CO}_2$  para medir a fixação de  $\text{CO}_2$  pelas plantas tem sido largamente utilizado. Este método oferece as vantagens de precisão e facilidade de operação, o que permitiria o seu uso dentro de uma cultura em condições naturais. A utilização de um equipamento de fácil manejo para as condições de campo, utilizando  $^{14}\text{CO}_2$  foi apresentado por Shimshi (1969).

O objetivo do presente trabalho foi a construção de um equipamento semelhante àquele proposto por Shimshi e a sua utilização em cafeeiros, visando uma avaliação precoce do potencial de produção como informação complementar ao programa de melhoramento genético desta espécie. As características da metodologia foram avaliadas utilizando-se cultivares de café geneticamente conhecidos, em condições controladas de temperatura e luz. Após o conhecimento de sua variação e a comparação dos resultados obtidos de fotossíntese aparente com aqueles existentes na literatura, trabalhos em condições de campo poderão ser desenvolvidos visando estabelecer critério adicional para seleção de plantas mais eficientes.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

O  $^{14}\text{C}$  tem sido bastante empregado nos estudos de fotossíntese nos últimos 30 anos, permitindo identificar produtos e esclarecer vias metabólicas a partir da incorporação de  $^{14}\text{CO}_2$ . A translocação dos fotossintetizados também tem sido acompanhada, utilizando-se este isótopo como traçador (Calvin & Bassham 1962).

Por outro lado, as estimativas de taxas fotossintéticas usando  $^{14}\text{C}$  são ainda pouco frequentes na literatura. Este fato se deve provavelmente às dificuldades instrumentais e limitações técnicas para interpretação dos resultados. Duas principais limitações são apontadas: discriminação isotópica entre  $^{12}\text{C}$  e  $^{14}\text{C}$  e diluição do  $^{14}\text{C}$  fixado, em experimentos de longa duração (Voznesenskii et al. 1971).

Avaliações de taxas fotossintéticas podem ser feitas a partir de medidas de fixação de determinada quantidade de  $^{14}\text{CO}_2$  assimilada, ou pelo decréscimo da atividade de uma mistura gasosa contendo  $^{14}\text{CO}_2$  mantida em torno da folha. Incluindo-se no primeiro caso, Shimshi (1969) apresentou um método conveniente de avaliar fotossíntese em condições de campo, baseando-se no trabalho de Austin & Langdon (1967). Aquele autor propôs uma digestão ácida total da área da folha incorporada e a atividade do  $^{14}\text{CO}_2$  fixado era detectado por cintilação líquida.

Patterson & Greene (1965) propuseram uma mistura de cintilação utilizando tolueno e triton X-100 2/1 (v/v) para amostras aquosas. Turner (1968) fez um estudo crítico desta solução, comparando com a solução de Bray (Bray 1960). Concluiu que a mistura de cintilação de

tolueno/triton X-100 era excelente para amostras ácidas e relativamente eficiente para amostras alcalinas. O triton X-100 agiu como um eficiente agente de solubilização, permitindo que uma série de sais de alta polaridade, normalmente insolúveis em solvente orgânicos, pudesse ser usada. Madson (1969) utilizou 1 ml de NaOH 1N misturado com 15 ml de tolueno/triton X-100, neutralizado com 0,1 ml HCl conc. para medir a radioatividade de extratos proteicos.

Obrenski (sem data) apresentou a possibilidade de digestão e fixação de todo o CO<sub>2</sub> gerado a partir de amostras orgânicas relativamente grandes (250 mg), utilizando bases absorventes orgânicas. Duncombe & Rising (1969) apresentaram um estudo crítico de algumas dessas bases orgânicas.

Slyke et al. (1951) propuseram uma eficiente mistura de reagentes para combustão ácida de amostras orgânicas. Watson & Williams (1969) propuseram um equipamento e reagentes específicos para combustão por via úmida de amostras vegetais contendo <sup>14</sup>C. Smith (1969) sugeriu altas temperaturas e sob fluxo de oxigênio para digestão de <sup>14</sup>C em amostras biológicas.

Estudos fisiológicos do cafeeiro tiveram início há cerca de 30 anos, porém o número de contribuições apresentadas nem sempre corresponde à importância econômica desta espécie. Nutman (1937a) apresentou os primeiros estudos relevantes sobre o curso diário da abertura de estômatos de C.arabica em condições naturais. Franco (1938) apresentou os primeiros dados fisiológicos em C.arabica nas condições brasileiras. Mostrou a reação dos estômatos à luz e ao escuro, assinalando que o início da resposta estomática era bastante rápida: 2-5

minutos. Este mesmo autor apresentou uma comparação entre o número de estômatos e nível de ploidia em Coffea (Franco 1939). A avaliação do número de estômatos em Coffea e outras espécies é bastante facilitada pelo emprego de molde em acetado de celulose (Medina 1961).

Alvim (1965) apresentou um novo tipo de porômetro de fácil manejo, possibilitando a medida rápida da abertura dos estômatos. Bierhuizen et al. (1965) e Shimshi (1967) propuseram modificações ao modelo originalmente apresentado.

Franco (1941) fez um estudo comparado em cafeeiros sob diferentes condições de sombreamento a fim de avaliar o efeito sobre o teor de clorofila das folhas.

O efeito da radiação incidente sobre o curso diário da transpiração em C.arabica, em condições naturais foi estudado por Nutman (1941). Mais recentemente, o efeito da umidade do solo na transpiração de C.arabica foi apresentado por Bierhuizen et al. (1969), Nunes & Duarte (1969) e Nunes (1970).

Um método preciso de medir a transpiração de plantas, em termos de resistência da folha à difusão do vapor de água para o meio externo foi proposto inicialmente por van Bavel et al. (1964) e modificado por Kanemasu et al. (1969). Franco & Magalhães (1965) apresentaram um engenhoso sistema para medir simultaneamente a transpiração, abertura estomática e a temperatura da folha.

Os primeiros dados de fotossíntese em café (C.arabica) foram apresentados por Nutman (1937b). As medidas foram realizadas em condições de campo, em cafeeiros adultos de Tangaiica, utilizando como método a variação da condutividade de uma solução de hidróxido de bário.

A seguir, apareceram os dados de Tió (1962), que estudou o efeito da intensidade de luz sobre a fotossíntese aparente de Bourbon (C.arabica) pelo analisador de gás por infravermelho (IRGA). Nunes et al. (1968) realizaram um estudo bastante completo sobre o efeito de luz, temperatura e concentração de CO<sub>2</sub> em C.arabica. A comparação entre a fotossíntese aparente de cultivares da espécie C.arabica e C.canephora foram também apresentados por Nunes et al. (1969). Estes estudos foram realizados em condições controladas sempre utilizando o IRGA para avaliar as taxas de fotossíntese aparente.

Desde 1946 quando o laboratório de Calvin iniciou os estudos dos passos metabólicos do <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> durante a fotossíntese, muitas informações têm sido apresentadas. Revisões recentes sobre o assunto são fornecidas por Hatch & Slack (1970) e Black (1973).

O efeito do oxigênio na fotossíntese, apontado inicialmente por Warburg (1920), tem sido exaustivamente estudado (Turner & Bristain 1962, Forrester et al. 1966 a,b, Hew & Krotkov 1968, Downton & Tregunna 1968, Ogren & Bowes 1971, D'Aouste & Canvin 1973).

Recentemente Jackson & Volk (1970) e Goldsworthy (1970) apresentaram revisões sobre a fotorespiração. Decker & Tió (1959) foram uns dos primeiros pesquisadores a utilizar o termo "fotorespiração" em seu sentido atual. Vários métodos têm sido utilizados para medir a fotorespiração em plantas (Decker 1959, Samish & Koller 1968, Hew et al. 1969, Heath & Orchard 1968, Ludwig & Canvin 1971). Todavia, diferenças entre as estimativas de fotorespiração ocorrem, dependendo do método utilizado (Jackson & Volk 1970).

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. Material Vegetal

As sementes foram obtidas na Seção de Genética do Instituto Agronômico, Campinas, São Paulo. Foram utilizados os seguintes cultivares: (a) Coffea arabica ( $2n=44$ ) Mundo Novo, CP 464-6; Catuaí, H 2077-2-5-81; Seleção 1130-13, H<sub>1</sub> (PI 205.936); e H 6586-2; (b) C.canephora ( $2n=22$ )-Guariní. O 'Mundo Novo' é um cultivar de alta produtividade, selecionado a partir de um cruzamento natural entre Sumatra x Bourbon Vermelho. O 'Catuaí' também de alta produtividade, é um cultivar obtido na Seção de Genética pelo cruzamento de Caturra Amarelo x Mundo Novo. A seleção 1130-13 original da Tanzânia, apresenta os fatores de resistência à ferrugem do café (Hemileia vastatrix) SH<sub>5</sub>SH<sub>5</sub>, SH<sub>2</sub>SH<sub>2</sub>. O híbrido H 6586-2, originário do cruzamento de 1181-1 x 1177-1-1, apresenta o fator angustifolia ag ag, que afeta a forma da folha e diminui a sua área. O 'Guariní', material originário de Java apresenta resistência alta a H.vastatrix pertencendo algumas de suas plantas ao grupo fisiológico com resistência a todas as raças conhecidas deste fungo (Centro Inv. Fer. Caf. 1965).

A semeadura foi feita em areia lavada e a emergência ocorreu em 20/12/1972; dois meses depois, as plantas foram transferidas para solução nutritiva (Hoagland nº 1) e mantidas em estufa. Foram usados vasos plásticos de 2,5 litros com uma planta por vaso. A aeração foi mantida constante por um sistema de ar comprimido. Uma semana antes do início do experimento, oito plantas de cada cultivar foram transferidas para câmara de crescimento,

regulada com 20°C durante o dia e 15°C à noite e 12 horas de fotoperíodo. No início do experimento as plantas estavam com 13 meses de idade, sendo que os cultivares M.Novo, Catuaí e 1130-13 já apresentavam ramos laterais.

## 2. Câmara de crescimento

A câmara de crescimento (construída por A.C. Magalhães, Seção de Fisiologia do IA, Campinas) tem 3,60 m de comprimento por 1,30 m de largura por 2,20 m de altura. O controle de temperatura ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) é feito por um compressor de ar refrigerado de 30.000 BTU acionado por dois termostatos e relógio elétrico. A entrada de ar é indireta de forma a não causar turbulência. A iluminação é controlada por relógio elétrico, através de lâmpadas fluorescentes (GE power-groove 110W) e incandescentes na proporção de 2:1 Watts. A radiação obtida a 1,10 m de altura é de  $0,14 \text{ cal. cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$  (ca 9.800 lux). A câmara não possui controle de umidade do ar, a qual oscila entre 35-60%. A energia radiante foi medida por um radiômetro Eppley Pyranometer, modelo 8-48 A de quartzo para 280-2800 nm.

## 3. Área foliar

As cinco plantas utilizadas no presente experimento tiveram sua área foliar avaliada por um integrador de área (Automatic Area Meter, Type AAM-S, Hayashi Denko Co., Tokyo, Japan).

## 4. Contagem e medida dos estômatos

A contagem dos estômatos foi feita segundo a téc-

nica de molde de acetato de celulose (Medina 1961), usando-se uma ocular 12,5, objetiva 40, op 1. A área do campo ( $0,083 \text{ mm}^2$ ), foi medida com uma lâmina micrométrica (nº 4274752). A medida dos estômatos foi feita pela observação da epiderme das folhas em objetiva 40 e ocular 7 (uma divisão igual a  $2,5 \mu$ ) e op. 1,6.

##### 5. Determinação de clorofila

Foram tomados oito discos de 1,0 cm de diâmetro das mesmas folhas incorporadas, evitando-se as nervuras e obtendo-se aproximadamente 100 mg peso fresco. As pesagens foram feitas logo em seguida a retirada dos discos e após a incorporação de cada planta. Ao término do experimento os discos de folha foram macerados em graal com 1 ml de solução tampão fosfatado 0,05M pH 7,4. Deste macerado foi tomado 0,2 ml e completado o volume a 5 ml com acetona 80%. Após agitação os frascos eram mantidos no escuro por 15 minutos e em seguida feita a centrifugação a 1000 g durante 2 minutos. O teor de clorofila (a+b) foi dosado em espectrofotômetro (Spetronic-20), conforme Arnon (1949).

##### 6. Medidas de abertura estomática e transpiração

A abertura estomática foi medida por meio do porômetro de Alvim (Alvim 1965) modificado por Labouriau et al. (1964) para o qual se construiu uma nova reta de calibração. Usou-se a faixa de 120-80 mmHg no esfingomanômetro e o tempo de queda de pressão foi cronometrado / (sec). Para a avaliação da transpiração dos cafeeiros foi usado o "Diffusive Resistance Meter" modelo LI-60 que mede a resistência que as folhas apresentam à di-

fusão do vapor de água no ar atmosférico (Bavel et al. 1964, Kanemasu et al. 1969).

## 7. Medidas de fixação de $^{14}\text{CO}_2$

Usou-se o método de Shimshi (1969) com algumas mo dificações.

### 7.1. Sistema de incorporação

O equipamento usado que aparece em esquema na Fig. 1, consta de: (a) cilindro-estoque, utilizado um frasco próprio de  $\text{CO}_2$ , de ferro, com 481,11 ml e no qual foram adaptados uma válvula de gás ( $a_1$ ) e um manômetro ( $a_2$ ) de  $15 \text{ kg/cm}^2$  ( $1 \text{ kg/cm}^2 \approx 1 \text{ atm}$ ); (b) sub-estoque, de vidro espesso, com 265 ml, equipado com duas torneiras para gás; (c) esfingomanômetro, de 300 mmHg; (d) cilindro de expansão, de vidro espesso, com 265 ml, com duas torneiras de vidro esmerilhado; (e) condutos: a parte que se prende ao cilindro-estoque é de cobre ( $e_1$ ), um tubo plástico ( $e_2$ ) com  $\emptyset 1,0 \text{ cm}$  faz as conexões com o sub-estoque, esfingomanômetro e o cilindro de expansão; outro tubo plástico ( $e_3$ ) com  $\emptyset 0,1 \text{ cm}$  de 2 m liga o cilindro de expansão com a câmara de incorporação; (f) câmara de incorporação, montada em "plexiglass" de 7 mm de espessura, com diâmetro aproximado de 15 mm; o orifício central tem  $\emptyset 6,0 \text{ mm}$  e 3,7 mm de altura, o que dá uma área de  $28,27 \text{ mm}^2$  e  $39,58 \text{ mm}^3$  de volume; outra câmara idêntica foi também construída de tal forma que ambas se justapõem integralmente; (g) pinça cirúrgica; (h) divisor de fluxo, antes da entrada na câmara de incorporação existe um divisor de fluxo de "plexiglass", fazendo com que parte da mistura se dirija para a câmara superior e parte para a câmara inferior de modo a permi

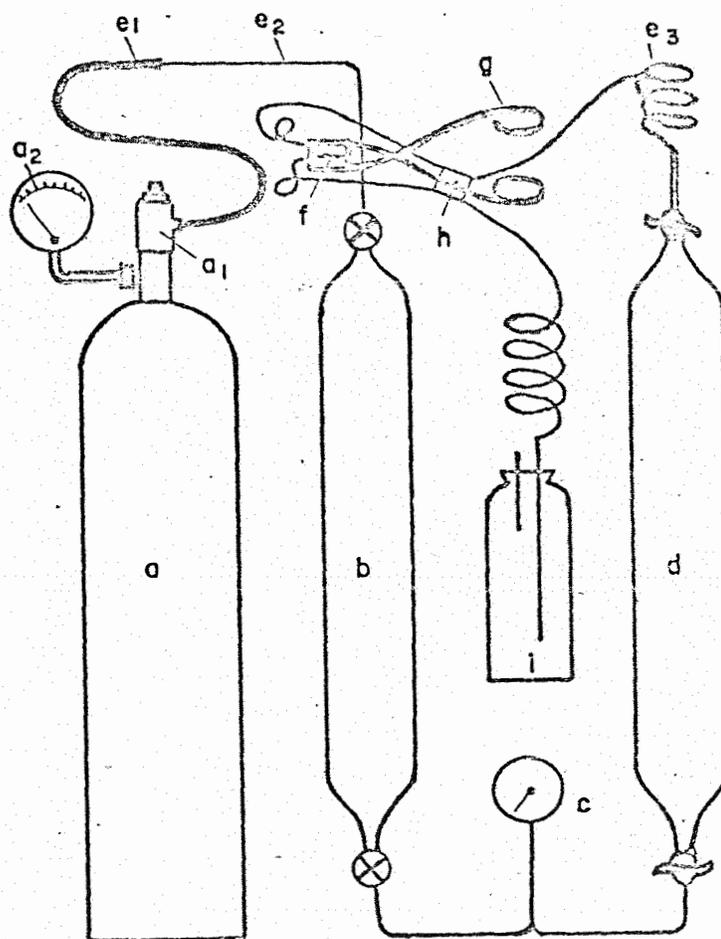


FIG. 1. Esquema do aparelho de incorporação de  $^{14}\text{CO}_2$ .

tir que a mistura gasosa passe pelas duas faces da folha; os dois condutos que saem das câmaras de aplicação são então reunidos novamente em um único tubo plástico, que leva o excesso de mistura gasosa para (i) frasco de NaOH. Entre o sub-estoque e o esfingomanômetro, bem como na saída do cilindro de expansão existem tubos capilares de vidro. Este conjunto está montado em material isolante (isopor) e dentro de mala de couro de 42 x 33 cm. Na Fig. 2 aparecem com maiores detalhes o divisor de fluxo (I) e a câmara de incorporação (II), sendo  $\underline{a}_1$  e  $\underline{a}_2$  os condutos de entrada na câmara e  $\underline{b}_1$  e  $\underline{b}_2$  as respectivas saídas.

### 7.2. Sistema para carregar o aparelho

Utiliza-se um tubo de gás (a) de 6,0 m<sup>3</sup> (Fig. 3) contendo uma mistura gasosa segundo as especificações desejadas; ao manômetro (b) deste cilindro se adapta uma câmara de reação (c), conectada por um condutor de cobre (d) de 1,0 cm de diâmetro, o qual apresenta a forma em "U" entre o cilindro e a câmara de reação. Na extremidade em "U" próximo do cilindro foi adaptada uma torneira (e). Todas as junções têm conexões próprias para gás. Na tampa da câmara de reação existe uma agulha de metal soldada (f). A este sistema conecta-se o cilindro-estoque (g).

### 7.3. Operação de carregar o cilindro-estoque

Abre-se ligeiramente a válvula do tubo de gás (Fig. 3) contendo a mistura gasosa desejada, isenta de CO<sub>2</sub>. Faz-se as conexões da câmara de reação com o conduto em "U"; introduz-se dentro da câmara de reação um tubo de ensaio com a solução de Na<sub>2</sub><sup>14</sup>CO<sub>3</sub> com a ativi

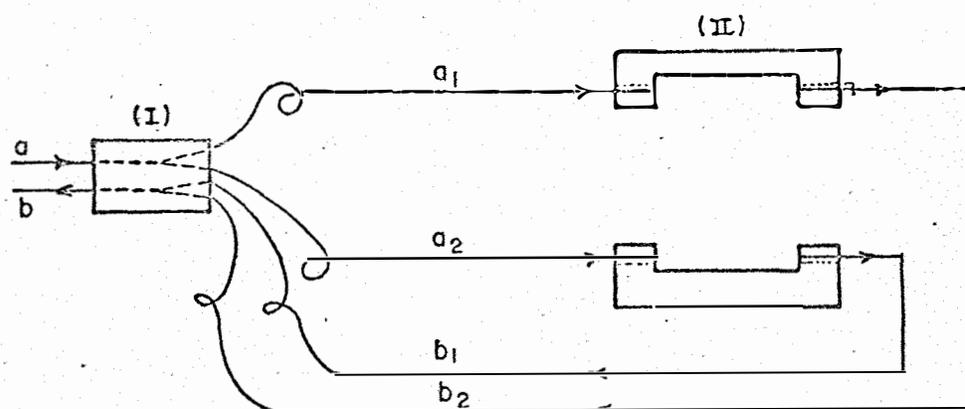


FIG. 2. Esquema do divisor de fluxo (I) e da câmara de incorporação de  $^{14}\text{C}$ . (II).

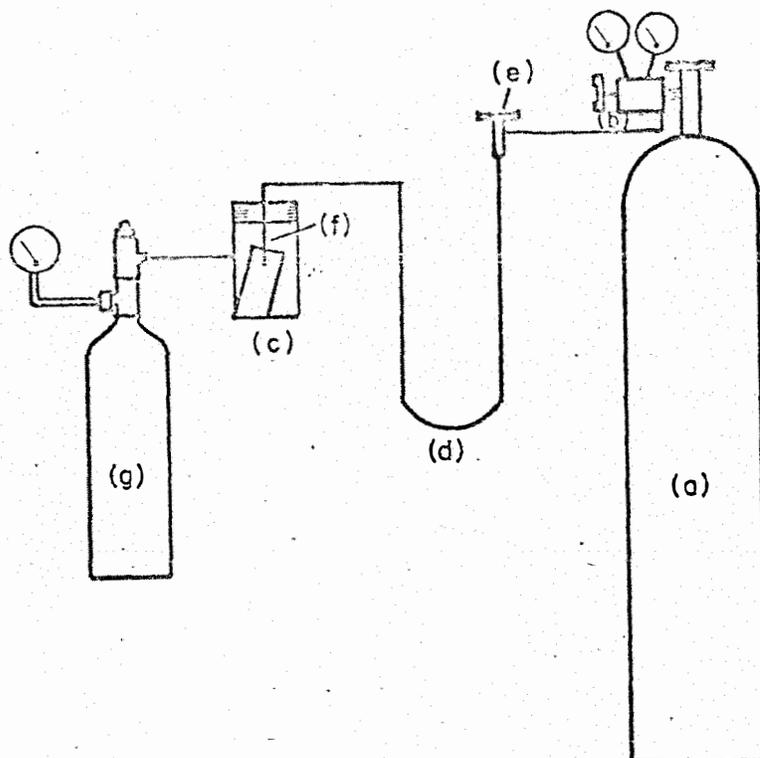


FIG. 3. Sistema para carregar o cilindro-estoque (g) com  $^{14}\text{CO}_2$ .

dade total e atividade específica desejadas. No presente trabalho procurou-se manter a atividade total de 50 mCi/atm e a atividade específica de 8,33 mCi/mM de carbonato. Para o nosso equipamento foi calculado que era necessário 6,1 mM de carbonato para cada atmosfera de pressão usada a fim de se obter a concentração de 300 ppm  $\text{CO}_2$  (20°C). Variando-se a atividade específica foram obtidas outras concentrações de  $\text{CO}_2$  na mistura gasosa. Fecha-se a câmara de reação de forma que a agulha de metal fique dentro do tubo de ensaio. Por fim conecta-se a câmara de reação com o cilindro-estoque de radioisótopo (sempre passando um pequeno fluxo de gás isento de  $\text{CO}_2$ ). Abre-se a válvula do cilindro-estoque, introduzindo-se 4 ml de ácido sulfúrico 0,25N no conduto em "U", através de uma seringa cirúrgica, pela torneira do conduto em "U". Fecha-se a torneira do conduto em "U". Como a mistura gasosa isenta de  $\text{CO}_2$  está continuamente passando, a pressão do gás vai arrastar o ácido sulfúrico pelo conduto em "U" até a câmara de reação, caindo dentro do tubo de ensaio pela agulha de metal. Em seguida, abre-se lentamente a válvula do cilindro que contém a mistura isenta de  $\text{CO}_2$  até atingir a pressão desejada no cilindro-estoque. Quando esta for atingida, fecha-se a válvula do cilindro-estoque, depois a do tubo de gás e desconecta-se o cilindro-estoque. Foi calculado que cada atmosfera de pressão no cilindro-estoque dá 18,2 doses, na prática porém, obtem-se em torno de 15 doses. Carrega-se o cilindro-estoque com tantas atmosferas quantas forem as doses desejadas. No caso da primeira carga, faz-se esta operação três vezes, sem usar o radioisótopo, a fim de remover do cilindro-estoque o  $\text{CO}_2$  existente. Após carregado, o cilindro-estoque é novamente conectado ao sub-estoque, no sistema de incorporação da Fig. 1.

#### 7.4. Uso do equipamento

Abre-se a válvula do cilindro-estoque e transfere-se 1 atmosfera de gás para o sub-estoque. Abre-se a torneira do sub-estoque de forma a obter-se 120 mmHg no cilindro de expansão. Prende-se a câmara de incorporação na parte média de uma folha jovem e plenamente desenvolvida, de preferência em região sem nervuras salientes. Como esta situação nem sempre é possível de ser conseguida, usa-se um disco de borracha ultra-mole na superfície da câmara inferior. Abre-se a saída do cilindro de expansão e deixa-se a pressão cair de 120 a 60 mmHg, o que ocorre em 20 segundos. Este volume de gás corresponde a 26,3 ml, que passa a uma velocidade de 279,1 cm.min<sup>-1</sup> (fluxo de 78,9 ml.min<sup>-1</sup>). Com um furador de rolha bem afiado de 1,0 cm de diâmetro remove-se a área incorporada e imobiliza-se imediatamente com nitrogênio líquido (durante ca 20 sec). Os discos de folha incorporados são mantidos em gelo seco até o momento da digestão. Como a área incorporada tem  $\varnothing$  0,8 cm e o disco removido  $\varnothing$  1,0 cm fica assim assegurado que toda a área foi removida. Para marcar a área incorporada, passa-se um giz nas bordas da câmara superior de incorporação. Foram usados dois discos por folha, um de cada lado da nervura principal na parte média das folhas e duas folhas por planta.

#### 7.5. Características do equipamento

As características do presente equipamento são fornecidas a seguir comparando-se com o aparelho de Shimshi (1969), cujos valores correspondentes são apresentados entre parentesis:

- (a) Atividade específica: 8,2 mCi/mM (4,14 mCi/mM);
- (b) Atividade total por atmosfera: 50  $\mu$ Ci (33,53  $\mu$ Ci).
- (c) Concentração de carbonato por atmosfera para 300 ppm CO<sub>2</sub> (20°C): 6,1  $\mu$ M (8,1  $\mu$ M).
- (d) Volume do cilindro-estoque (de campo): 488ml (980ml); aqui se observa uma discrepância, possivelmente um erro de impressão; a utilização de 8,1  $\mu$ M NaHCO<sub>3</sub> em 980ml (20°C) dá uma concentração de 198,53 ppm CO<sub>2</sub>; cremos que o verdadeiro valor do volume seja de 648,7 ml.
- (e) Câmara de incorporação: 28,27mm<sup>2</sup> (100mm<sup>2</sup>) e 39,58 cm<sup>3</sup> (100 cm<sup>3</sup>).
- (f) Volume do sistema de incorporação: 285,42ml (500ml).
- (g) Faixa de operação no esfingomanômetro: 120-60 mmHg (200-160 mmHg).
- (h) Volume de mistura gasosa por dose (20°C): 26,3 ml (28,65ml).
- (i) Velocidade do gás: 279 cm.min<sup>-1</sup> (390 cm.min<sup>-1</sup>)
- (j) Contaminação com ar externo e tempo de substituição: 6% (<1%) e 1,3 sec (0,4 sec).
- (l) Relação entre teor CO<sub>2</sub> fixado e o teor total de uma dose: 0,8% (<10%).

A principal diferença em relação ao equipamento descrito por Shimshi (1969) foi a utilização de uma menor área de incorporação no presente equipamento. Quanto ao carregamento do cilindro-estoque de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, a utilização de tubos de gás com misturas gasosas de concentrações previamente selecionadas, nos pareceu mais interessante.

### 7.6. Digestão dos discos de folha

Para a oxidação total do disco de folha ( $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ ), usou-se uma digestão por via seca, utilizando-se o "Biological Material Oxidizer (BMO)", Beckamn, Fullerton, Califórnia. A digestão ácida foi tentada, porém não se mostrou eficiente. Para o caso de folhas de café não se obteve uma digestão total. Este digestor consta, essencialmente, de um tubo de quartzo, parte do qual está a  $900^\circ\text{C}$  e parte a  $700^\circ\text{C}$ . Nesta segunda parte existem catalizadores que removem compostos voláteis de enxofre, fósforo e halogênios. A atmosfera orgânica é introduzida na região a  $900^\circ\text{C}$  onde é queimada e arrastada por um fluxo de oxigênio. O  $\text{CO}_2$  liberado é retido na extremidade final do tubo de quartzo por um "trap", contendo uma base absorvente e a solução cintiladora. Após a digestão (4 min) a solução do "trap" é transferida para um frasco de cintilação e a atividade é medida em um cintilador líquido (Nuclear Chicago). Como solução cintiladora usou-se duas partes de tolueno ( $0,4\% \text{PPO}^* + 0,01\% \text{POPOP}^{**}$ ) para uma parte triton X-100 (Scintillation Grade, Amersham/Searle Co.). No presente trabalho usou-se 2ml de uma solução de NaOH 0,5N como base absorvente.

O disco de folha de café utilizado tinha aproximadamente 7mg de peso seco. No início de cada série de combustão no BMO, três frascos eram preparados: (a) blanck, combustão de 10mg de manitol, para testar uma possível contaminação de  $^{14}\text{C}$  no tubo de quartzo; (b) dpm adicionado, 0,1ml de solução padrão de lisina- $^{14}\text{C}$  / (Ca 12.000 cpm) + 10ml da solução cintiladora + 1,5ml de

\* 2,5 difenil oxazole;      \*\* 1,4 - bis-2-(5-feniloxazolil) benzeno.

NaOH 0,5N + 0,5ml de solução de carbonato 0,33N e (c) dpm recuperado, combustão de 10mg de manitol dissolvido em 0,1 ml de lisina-<sup>14</sup>C. A relação entre dpm adicionado e dpm recuperado dá um "fator de correção", pelo qual são multiplicados todos os valores (em dpm) das amostras desta série de análise. Quando se tratar de mais de 50 análises por vez, sugere-se uma segunda determinação deste fator no fim das análises.

Nas análises realizadas, obteve-se em média 91,31% de recuperação entre dpm recuperado e dpm adicionado. No decorrer das análises estimou-se que a transferência da solução do "trap" para os frascos de cintilação correspondeu a 96,35% da atividade total e portanto esta correção foi também considerada na contagem final das amostras.

#### 7.7. Cálculo de CO<sub>2</sub> total fixado

Utilizou-se a fórmula proposta por Shimshi (1969), sendo que com o presente equipamento ficou sendo:

$$\text{CO}_2 \text{ fix. (mg.dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{44 \cdot 180 \cdot K \cdot X}{0,2827 \cdot 10^{-2} \cdot S} = 2,6 \cdot 10^6 \frac{K \cdot X}{S} \quad (\text{I})$$

O fator K corresponde à correção proposta por Austin & Langdon (1967) uma vez que a fixação de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> varia de acordo com a atividade específica (Van Norman & Brown 1952). Na concentração isotópica natural a fixação é de 85% e portanto o fator é 1,18 (100/85) e na atividade específica máxima (62,73 mCi/mM) é de 1,38 (100/72,5). Sendo assim este fator deve ser calculado para cada atividade específica de trabalho, sendo igual a 1,2066 no caso do presente equipamento, usando-se 50

$\mu\text{Ci/atm}$  e a 300 ppm de  $\text{CO}_2$  (atividade específica de 8,2 mci/mM, ou seja, 50  $\mu\text{Ci}/6,1 \mu\text{M}$  para cada atmosfera de carga). O valor 44 corresponde a 1 mM de  $\text{CO}_2$ ; o valor 180, a fração da hora (20 segundos) enquanto que  $0,2827 \cdot 10^{-2}$  é o valor de área ( $\text{dm}^2$ ) incorporada. O X é o valor das contagens (dpm) das amostras e S é o valor (dpm) correspondente a 1 mM de  $\text{CO}_2$ , ( $^{12}\text{CO}_2 + ^{14}\text{CO}_2$ ) usado no cilindro-estoque. Portanto deve ser também calculado pa ra cada atividade específica utilizada.

#### IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 1. Detecção de atividades de $^{14}\text{C}$ nas folhas

###### 1.1. Digestão por via úmida

Inicialmente tentou-se o método apresentado por Shimshi (1969) pelo qual os discos de folha após imobilização eram transferidos para tubo de ensaio ( $\emptyset$  1,1 cm e altura 4,0 cm) e colocados dentro de um frasco de cintilação contendo 2 ml NaOH 0,2N. Logo após ter sido pipetado 1 ml da mistura digestora (solução saturada de  $\text{CrO}_3$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc.) dentro do tubo de ensaio, o frasco de cintilação era bem fechado e levado para autoclave,  $120^\circ\text{C}$ , durante 30 minutos. Desde o início esta digestão não apresentou resultados satisfatórios para os discos de folhas de café. Tentaram-se algumas variações do método: (a) melhor vedação da tampa do frasco de cintilação; (b) uso de solução sulfocrômica saturada ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7/\text{H}_2\text{SO}_4$ ); (c) diferentes tempos e duas temperaturas na autoclave; (d) resfriamento dos frascos a  $8^\circ\text{C}$  durante aproximadamente duas horas após autoclavagem. Alguns dados de atividade (dpm) obtidos por esta digestão com folhas de café são apresentados a seguir:

<u>Amostra</u> nº	<u>Tratamento</u>	<u>Atividade</u> dpm
1	Folha café - $^{14}\text{C}$	277
2	"	397
3	"	677
4	"	1 319
5	"	1 727
6	"	105
7	Folha café controle	39

Conforme pode-se verificar, além de grande variação nas amostras a recuperação da atividade foi muito baixa, uma vez que a dose calculada para cada disco foi de 2,7  $\mu\text{Ci}$ . Foi observada a presença de grânulos de material vegetal na solução digestora, mostrando que a digestão não era total. Na realidade os discos de folhas de café continham alta atividade, pois que em outro ensaio, quando foram contados diretamente na solução cintiladora de Bray, (Bray 1960) apresentaram os seguintes resultados:

<u>Amostra</u> nº	<u>Tratamento</u>	<u>Discos de</u> <u>folha</u> (cpm)	<u>Solução</u> <u>cintiladora</u> (dpm)
1	Disco folha café $^{14}\text{C}$	2.643	12.464
2	"	2.490	19.051
3	"	4.231	31.647
4	"	2.017	14.436
5	"	1.811	17.291

A atividade detectada na digestão por via úmida dos discos de folhas foi somente de 22% daquela presente nos discos não digeridos, apesar do efeito "quenching". Este fato mais uma vez mostrou a ineficiência desta recuperação.

### 1.2. Detecção sólida dos discos de folha- $^{14}\text{C}$

Tentativas foram feitas visando estabelecer a possibilidade de detecção sólida do  $^{14}\text{CO}_2$  fixado. Os discos após imobilização em  $\text{N}_2$  líquido foram secos em estufa a  $80^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Foram usados dois tipos de detectores, o GM 186 - A (Nuclear Chicago) e o GM a gás (a 1.200 volts), cujos dados aparecem a seguir:

<u>Amostra</u> nº	<u>Tratamento</u>	<u>GM 186-A</u> (2% efic.)	<u>GM a gás</u> (22% efic.)
1	Folha café - $^{14}\text{C}$	45	377
2	"	100	554
3	"	80	582

A utilização do GM a gás seria possível, desde que se tratasse de pequeno número de amostras. Apresentou boa repetibilidade, sendo porém necessário aumentar um pouco a atividade do  $^{14}\text{C}$  por dose. No entanto, como no presente trabalho o objetivo era acertar o método para um grande número de determinações, o emprego do GM a gás, como rotina, não poderia ser recomendado. Este equipamento só permite a detecção de três discos de cada vez e a contagem é sempre manual.

### 1.3. Digestão por via seca

Um digestor para amostras orgânicas especialmente contruído para recuperação da atividade de  $^{14}\text{C}$  e  $^3\text{H}$  em material biológico foi usado (Biological Material Oxidizer-BMO, Beckman). Inicialmente procurou-se acertar a quantidade de amostra orgânica possível de ser queimada, uma vez que as soluções cintiladoras são muito sensíveis a soluções alcalinas e portanto somente pequenos volumes e baixas concentrações de NaOH (ou KOH) formam misturas homogêneas. Conseguiu-se uma boa mistura usando 2 ml NaOH 0,25N com a solução de Bray, estável a temperatura ambiente e a  $4^{\circ}\text{C}$  e com uma eficiência média aproximada de 50%. No entanto esta solução suportou quantidades muito baixas de carbonato.

Turner (1968) fez um estudo crítico da solução

cintiladora tolueno/triton X-100 (2:1), inicialmente proposta por Petterson & Greene (1965) para amostras aquosas. Turner apresenta diferentes volumes e concentrações de soluções ácidas e alcalinas, miscíveis com 10 ml da solução de tolueno/triton X-100. No caso de soluções alcalinas sugere 1 ml NaOH 0,2N e 1 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,02N, a 4°C.

A utilização de bases orgânicas, como etanolamina, hiamina, fenetilamina, etc., oferece a vantagem de serem facilmente miscíveis com as soluções cintiladoras, mesmo em volumes relativamente elevados. Obremski (sem data) sugere a adição de EGME (ethylene glycol monomethyl ether) às soluções de tolueno com etanolamina para facilitar a solubilização do carbamato formado. Com estas bases orgânicas pode-se usar amostras relativamente grandes (250 mg), porém deve-se considerar o aspecto do custo para um grande número de amostras e a eficiência de absorção do CO<sub>2</sub> de cada uma delas. Comparações entre soluções absorventes são mencionadas por Duncombe & Rising (1967) e Obremski (sem data).

No presente trabalho os discos de folhas apresentavam cerca de 7 mg de peso seco; procurou-se, portanto, encontrar uma mistura de cintilação apropriada para esta quantidade de amostra vegetal. No Quadro 1 aparece um resumo das diferentes misturas tentadas, sempre usando NaOH como base absorvente em 10 ml solução tolueno/triton X-100 e a homogeneidade das mesmas em quatro temperaturas. Como amostras orgânicas utilizaram-se 10 mg de manitol + 0,1 ml lisina-<sup>14</sup>C queimadas por 4 minutos no BMO. Como se pode observar existe uma estreita faixa de miscibilidade em tolueno/triton X-100 da mistura de NaOH + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. O aspecto das soluções

QUADRO 1. Característica da mistura de 10 ml da solução cintiladora e da combustão de amostras de 10 mg de manitol + 0,1 ml de lisina- $^{14}\text{C}$ , em quatro temperaturas. A avaliação foi feita em três categorias: leitosa (ℓ), turva (t) e translúcida (Tr)

Amostra Nº	Tratamento	Temperatura			
		4-5°C	9-10°C	14-15°C	27°C
1	1/15 <sup>(a)</sup> ml NaOH 0.5N	ℓ	ℓ	Tr <sup>(b)</sup>	t
2	2/15 ml NaOH 0.5N	ℓ	ℓ	Tr <sup>(b)</sup>	t
3	1/10 ml NaOH 0.5N	t	ℓ	t	t
4	2/10 ml NaOH 0.5N	ℓ	ℓ	Tr	t
5	1/15 ml NaOH 0.5N	ℓ	ℓ	t	t
6	2/5 ml NaOH 0.5N	t	t	Tr	t
7	3 ml NaOH 0.5N	ℓ	ℓ	t	t
8	2 ml NaOH 0.5N	t	Tr	Tr	ℓ
9	1/15 ml NaOH 0.33N	ℓ	t	t	t
10	2/15 ml NaOH 0.33N	ℓ	ℓ	t	Tr
11	1/10 ml NaOH 0.33N	t	t	t	t
12	2/10 ml NaOH 0.33N	ℓ	ℓ	t	Tr
13	1/5 ml NaOH 0.33N	ℓ	ℓ	t	t
14	2/5 ml NaOH 0.33N	ℓ	ℓ	t	Tr
15	3 ml NaOH 0.33N	ℓ	ℓ	ℓ	Tr
16	2 ml NaOH 0.33N	t	Tr	Tr	Tr
17	1/15 ml NaOH 0.25N	t	t	t	Tr
18	2/15 ml NaOH 0.25N	ℓ	ℓ	t	Tr
19	1/10 ml NaOH 0.25N	t	t	t	Tr
20	2/10 ml NaOH 0.25N	ℓ	ℓ	t	Tr
21	1/5 ml NaOH 0.25N	t	t	t	t
22	2/5 ml NaOH 0.25N	ℓ	ℓ	t	Tr
23	3 ml NaOH 0.25N	ℓ	ℓ	ℓ	Tr
24	2 ml NaOH 0.25N	t	t	t	Tr

(a) A representação das amostras na forma de fração indica o volume da alíquota tomada sobre o volume total da amostra.

(b) Presença de precipitados finos na solução.

foi classificado em leitoso (l, solução branca intensa e densa), turvo (t, solução não translúcida) e translúcida (Tr, solução translúcida). Somente quatro misturas homogêneas e possíveis de serem utilizadas foram encontradas: n<sup>o</sup>s 4, 6, 8 e 16. Destas foi selecionada a de número 8 (2ml NaOH 0,5N + 10 ml de solução cintiladora) na temperatura de 9-10°C. As de números 4 e 6 exigiam retirada de alíquotas, o que introduziria mais um erro de amostragem. A de n<sup>o</sup> 16 contém um número de moles (0,75 mM) muito próximo do total de CO<sub>2</sub> gerado (10 mg manitol, P.M.182, 18 g, precisa de 0,66 mM NaOH). A mistura de cintilação n<sup>o</sup> 8, depois de permanecer 20 minutos a 9-10°C fica translúcida, após agitação. Essa mistura permite a fixação de 1,5 vezes o número de mM de CO<sub>2</sub> gerados na combustão de 10 mg de manitol. Ela tem uma capacidade de fixação 5 vezes maior do que a mistura sugerida por Turner (1968) e apresentou uma eficiência de contagem média de 79% (Data 850 V e Gate 1 300 V). Para a contagem de padrão de lisina-<sup>14</sup>C usou-se uma mistura de: 0,1 ml do padrão + 10 ml tolueno/triton X-100 + 1,5 ml NaOH 0,5N + 0,5 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,33N. Esta mistura apresentou uma eficiência de contagem média de 80,36%.

#### 1.4. Contagem dos discos de folhas na solução cintiladora

A possibilidade da contagem dos discos diretamente na solução cintiladora foi também tentada (Quadro 2). Os discos de folhas -<sup>14</sup>C foram imobilizados em gelo seco e colocados dentro de um frasco de cintilação contendo 10 ml de tolueno/triton X-100. Após a contagem, os discos foram submetidos a uma digestão total no BMO e novamente contados. A solução cintiladora com os

QUADRO 2. Atividade (dpm) de discos de folhas após incorporação com  $^{14}\text{CO}_2$  em solução cintiladora, da digestão destes mesmos discos no "Biological Material Oxidizer" e da solução cintiladora após remoção dos discos

Tratamento	Atividade das amostras (cpm)					$\bar{x}$	CV
	1	2	3	4	5		
Disco na solução cintiladora	4.762 (15,1%) <sup>a</sup>	3.489 (13,8%)	5.939 (18,2%)	2.977 (13,8%)	7.127 (17,4%)	4.859 (16,0%)	766 35,25
Digestão dos discos	31.527	25.318	32.608	21.638	40.831	30.384	3.298 24,27
Solução cintiladora	1.208 (25,4%) <sup>b</sup>	1.546 (44,3%)	2.538 (42,7%)	1.049 (35,2%)	3.010 (42,2%)	1.870 (38,5%)	385 46,01

(a) Percentagem em relação à atividade obtida após a digestão.

(b) Percentagem da atividade remanescente na solução cintiladora após remoção dos discos.

discos de folhas  $^{-14}\text{C}$  foi também contada após a remoção dos mesmos. O objetivo seria obter um fator que permitisse avaliar a atividade dos discos de folhas  $^{-14}\text{C}$  diretamente, evitando-se, assim, a digestão total de um grande número de amostras. No entanto, a variação encontrada foi muito alta e talvez esse fator somente possa ser definido em um estudo mais amplo.

## 2. Estabilidade da nova mistura de cintilação

Com o intuito de verificar a estabilidade da nova mistura de cintilação, cinco discos de folhas após digestão no BMO receberam 0,1 ml do padrão de lisina- $^{-14}\text{C}$  e foram deixados 20 minutos a  $10^{\circ}\text{C}$  para formar solução homogênea e a seguir agitados. Após 30 minutos no escuro foram feitas contagens de 10 em 10 minutos na primeira hora e depois de 2 em 2 horas durante 20 horas. Mais três contagens foram ainda efetuadas, 48, 64 e 96 horas. O Quadro 3 mostra a eficiência média de contagem destas amostras durante 96 horas, cujos valores foram corrigidos para as oscilações de voltagem (baseada no padrão de tolueno com "quenching" número 5). Durante o período de 96 horas não ocorreu nenhuma eficiência abaixo de 77,42% que seria o valor significativamente menor da eficiência inicial (80,37%). No entanto, em duas contagens, 40 minutos e 48 horas, a eficiência da mistura de cintilação usada foi significativamente maior do que a inicial. Estes resultados mostram que essa mistura de cintilação pode ser usada até 96 horas.

QUADRO 3. Eficiência de contagem da mistura de 10 ml da solução cintiladora com 2 ml NaOH 0,5N após digestão de discos de folhas de cafeeiro e adição de 0,1 ml de lisi- $^{14}C$ . Os frascos foram mantidos a 10°C e as contagens iniciaram 50 min. após a digestão

Tempo	Média	$s_{\bar{x}}$	C V
h			%
0	80,37	0,44	1,22
0:10	80,94	0,49	1,36
0:20	82,75	0,77	2,09
0:30	83,10	0,67	1,79
0:40	<u>83,61</u>	0,95	2,53
0:50	82,99	0,80	2,16
1	81,50	0,73	1,99
2	82,21	0,54	1,48
4	81,19	0,48	1,32
6	81,21	0,31	0,86
8	80,80	0,21	0,58
10	78,86	0,51	1,44
12	81,41	0,39	1,06
14	80,52	0,77	2,13
16	78,39	0,35	0,98
18	80,27	0,25	0,70
20	80,71	0,32	0,89
48	<u>84,52</u>	0,67	1,76
64	82,47	0,62	1,68
96	77,69	0,31	0,88
Teste F		8,65**	
Dms (Tukey 5%)		2,95	

### 3. Teste do fluxo e do tempo de digestão

O fluxo recomendado pelas instruções do BMO (300 ml/min) leva a um borbulhamento muito intenso. Por esta razão dois outros fluxos de oxigênio (120 e 60 ml/min), usando 10 mg manitol + 0,1 ml lisina-<sup>14</sup>C foram testados. Não houve diferença entre estes três fluxos estudados (Quadro 4). Adotou-se nas digestões posteriores sempre o menor fluxo (60 ml/min) por causar menos borbulhamento e assim permitir maior tempo de contacto da mistura gasosa com a solução absorvente.

O tempo de combustão de uma amostra no BMO foi também testado. Usaram-se os tempos de 1, 2, 3, 3,5, 4 e 5 minutos, sendo que em cada tempo foram queimadas duas amostras de 10 mg manitol + 0,1 ml lisina-<sup>14</sup>C. O Quadro 5 revela que só houve diferença significativa para um (1) minuto de digestão. O tempo de 4 minutos de digestão foi então utilizado nas digestões posteriores assegurando-se, assim, uma combustão total do material analisado.

### 4. Local da folha a ser incorporado com <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>

Em um experimento preliminar procurou-se verificar uma possível variação de local de incorporação de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> na folha do cafeeiro. Usou-se uma planta de Mundo Novo com 9 meses de idade, em vaso. Foram escolhidas duas folhas jovens, opostas e plenamente desenvolvidas. De cada folha foram selecionadas três posições: base (3 cm da inserção do pecíolo), centro (7 cm da inserção do pecíolo) e ápice (3 cm da extremidade apical). Em cada posição foi tomada uma amostra de cada nervura principal.

QUADRO 4. Atividade (dpm) da combustão de 10 mg de manitol + 0,1 ml da solução de lisina- $^{14}\text{C}$  no "Biological Material Oxidizer", em três fluxos de oxigênio

Fluxo oxigênio	Contagem das amostras (dpm)					Média
	1	2	3	4	5	
ml/min		*				
60	14.274	14.131	14.417	13.565	13.995	14.076
120	12.268	12.269	13.942	14.239	13.815	13.307
300	13.196	13.401	13.179	14.049	12.512	13.267
Teste F						2,34 <sup>ns</sup>
C V %						4,91

QUADRO 5. Atividade (dpm) da combustão no "Biological Material Oxidizer" de 10 mg de manitol + 0,1 ml de lisina-<sup>14</sup>C, usando-se diferentes tempos de digestão

Tempo digestão min.	Atividade das amostras (dpm)			S- x
	1	2	Média	
1	3.425	3.240	3.333	92
2	9.119	8.594	8.856	262
3	8.395	8.615	8.505	109
3,5	7.671	8.233	7.952	281
4	8.939	8.392	8.666	273
5	8.609	8.167	8.388	221
Teste F	92,45**			
Dms (Tukey 5%)	1.240			
C V %	4,1			

Como a posição de incorporação não mostrou diferença significativa (Quadro 6) adotou-se a posição central, sempre que possível, como norma de trabalho. Por estes resultados tem-se uma idéia da variação do presente método utilizado, que apresenta um coeficiente de variação de 15,27%.

## 5. Comparação entre os cultivares de café estudados

### 5.1. Dados de crescimento dos cafeeiros estudados

Para as cinco plantas de cada cultivar utilizadas nas medidas de fotossíntese foram anotados os valores da altura, crescimento médio de ramos laterais e área foliar (Quadro 7).

As plantas tinham aproximadamente o mesmo porte, com exceção do híbrido H 6586-2. Este cultivar apresentou um desenvolvimento vegetativo extremamente deficiente na solução nutritiva, uma vez que, em condições naturais, ele tem porte maior do que o Catuaí. O Catuaí, como esperado, apresentou altura menor do que o Mundo Novo e o 1130-13.

Somente três cultivares, Mundo Novo, Catuaí e 1130-13, dos cinco em estudo, apresentavam ramos laterais aos 13 meses de idade. O desenvolvimento médio dos ramos laterais foi semelhante. O desenvolvimento precoce de ramos laterais em cafeeiros é um índice útil para as primeiras produções, pois só nas axilas das folhas dos ramos laterais é que ocorre a floração.

Quanto à área foliar, o Catuaí apresentou o maior valor. Segue-se o Mundo Novo, 1130-13 e H 6586-2 entre os arábicas. Interessante notar que o 1130-13 é o

QUADRO 6. Atividade (dpm) de folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*, Mundo Novo), incorporadas com  $^{14}\text{CO}_2$ , sob luz artificial em laboratório, em três posições e em duas folhas opostas da mesma planta

Local incor- pora- ção folha	Folha I		Folha II		Média	$\frac{s}{x}$	C V
	1	2	1	2			
							%
Base	14.656	17.855	15.843	24.462	18.204	2.188	24,0
Centro	16.775	16.775	15.814	18.324	16.922	519	6,1
Ápice	17.420	16.303	17.326	19.119	17.542	583	6,6
Teste F					0,2284 <sup>ns</sup>		
C V %					15,27		

QUADRO 7. Altura, comprimento médio dos ramos laterais de *Coffea arabica* (M. Novo, Catuaí, 1130-13 e H 6586-2) e *C. canephora* (Guarini). Plantas com 13 meses de idade, mantidas em solução nutritiva. Dados médios de cinco plantas

Cultivar	Altura cm	Ramos laterais cm	Área foliar dm <sup>2</sup>
Mundo Novo	45,10 (+ 0,64) <sup>a</sup>	15,39 (+ 1,44)	18,24 (+ 1,68)
Catuaí	32,90 (+ 0,40)	12,75 (+ 0,72)	21,20 (+ 0,81)
1130-13	41,30 (+ 2,65)	14,18 (+ 1,74)	13,64 (+ 1,64)
H 6586-2	14,30 (+ 0,62)	-	1,23 (+ 0,13)
Guarini	40,70 (+ 1,22)	-	9,92 (+ 0,98)

(a) Desvio padrão da média.

cultivar de porte mais próximo ao Mundo Novo, porém, com uma intensidade de folha bem baixa. O Guarini (C.canephora) mostrou o quarto valor em área foliar, coincidindo com sua característica de desenvolvimento inicial mais lento.

### 5.2. Medidas dos estômatos

No Quadro 8 aparecem os valores obtidos do número por  $\text{mm}^2$ , do comprimento ( $\mu$ ) e largura ( $\mu$ ), dos estômatos dos cinco cultivares utilizados. Conforme já foi descrito por Franco (1939), a espécie tetraplóide C.arabica apresenta maior número de estômatos por  $\text{mm}^2$  do que as espécies diplóides (C.canephora). Por outro lado C.arabica apresenta estômatos maior do que o C.canephora.

### 5.3. Dosagem de clorofila

Os teores de clorofila para os cultivares em estudo dosados segundo Arnon (1949) aparecem no Quadro 9. Observa-se que dentro de C.arabica, Mundo Novo e Catuaí apresentaram o mesmo teor de clorofila, enquanto 1130-13 e H 6586-2 mostraram pequena diferença entre si. O Guarini foi o que se destacou, apresentando teor mais elevado.

Os resultados estão bastante próximos dos valores obtidos por Franco (1941), nas mesmas condições de luminosidade. Este autor fez um estudo comparativo do teor de clorofila em plantas (C.arabica) submetidas a diversos tipos de sombreamento, em condições naturais, cujos resultados foram os seguintes:

QUADRO 8. Número (por mm<sup>2</sup>), comprimento (μ) e largura (μ) de estomatos *Coffea arabica* (M.Novo, Catuaí, 1130-13 e H 6586-2) e *C.canephora* (Guarini). Dados médios de 10 campos de observação e em duas folhas

Cultivar	Estomatos por mm <sup>2</sup>	$\bar{s}_x$	CV	Comprimento	$\bar{s}_x$	CV	Largura	$\bar{s}_x$	CV
M.Novo	197,59	4,14	9,36	15,9	0,37	7,5	24,7	0,76	9,7
Catuaí	206,63	4,89	10,58	16,7	0,33	6,3	26,7	0,53	6,3
1130-13	219,88	4,27	8,68	16,7	0,33	6,3	26,5	0,40	4,9
H 586-2	185,54	3,08	7,41	17,0	0,50	9,3	28,2	0,84	9,4
Guarini	282,53	5,13	8,12	14,6	0,65	14,0	22,2	0,45	6,4

QUADRO 9. Clorofila ( $\mu\text{g}$ ) em Coffea arabica (M.Novo, Catuaí, 1130-13 e H 6586-2) e C.canephora (Guarini), com 13 meses de idade, mantidas em solução nutritiva e condições controladas (a)

Cultivar	$\mu\text{g}$ clorofila/mg p.fresco						$\frac{s}{\bar{x}}$	CV
	Pl.1	Pl.2	Pl.3	Pl.4	Pl.5	Média		
M.Novo	2,85	2,66	2,75	2,60	2,74	2,72	0,04	3,5
Catuaí	2,54	2,43	2,88	2,89	2,74	2,70	0,09	7,6
1130-13	2,88	3,14	2,96	2,96	2,97	2,98	0,04	3,2
H6586-2	2,45	2,78	2,67	2,53	2,70	2,63	0,06	5,1
Guarini	3,40	2,94	3,37	2,81	3,38	3,18	0,13	8,9
Teste F							8,60**	
Dms (Tukey 5%)							0,33	

(a) Temperatura do ar  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $0,14 \text{ cal.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ , UR 35-60%, fotoperíodo de 12 h.

<u>Luminosidade</u> (lux)	<u>Teor clorofila</u> ( $\mu\text{g}/\text{mg p.f.}$ )
26.396	1,76
9.746	2,48
3.655	3,19
3.574	3,92
2.843	3,38
Dms (1%)	0,33

Note-se que a luminosidade na câmara de crescimento no presente experimento era em torno de 9.800 lux, semelhante à segunda condição de luz usada por aquele autor.

#### 5.4. Medida de abertura estomática e transpiração

Com o objetivo de se conhecer o comportamento diário da abertura e fechamento dos estômatos das plantas de café, dentro da câmara de crescimento (temp. ar  $20^{\circ}\text{C}$ , UR 35-60%,  $0,14 \text{ cal.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ , fotoperíodo de 12 horas) usou-se o porômetro de Alvim modificado (Labouriau et al. 1964). Num primeiro dia foram feitas determinações de uma em uma hora, começando 30 minutos após o início da iluminação. Nestas determinações foi usado somente o cultivar Mundo Novo (Fig. 4). Observou-se que os estômatos permaneceram abertos durante todo o período de iluminação (12 horas), selecionando-se seis períodos para as medidas dos demais cultivares, sendo sempre o último período 30 minutos após o término do fotoperíodo.

O Quadro 10 mostra os resultados destas medidas ( $\text{cm}^3 \text{ ar.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ ) para os cinco cultivares em estudo. O cultivar Mundo Novo foi o que apresentou o maior valor de abertura estomática (3:30 h de iluminação). Observa-se

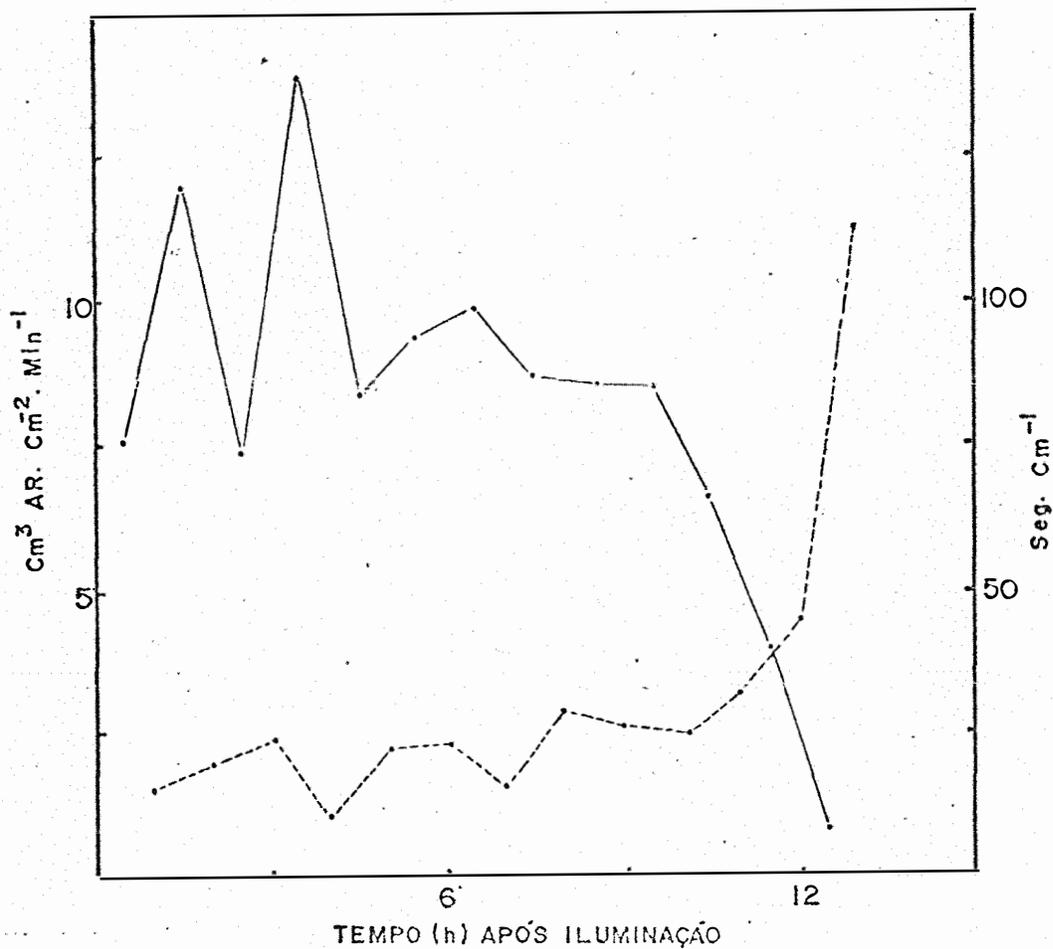


FIG. 4. Abertura estomática (—•—, em  $\text{cm}^3 \text{ar. cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ ) e resistência à transpiração (---•---, em  $\text{seg. cm}^{-1}$ ) em Coffea arabica (Mundo Novo).

QUADRO 10. Abertura dos estomatos ( $\text{cm}^3 \text{ ar. cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ ) utilizando um porômetro em plantas de Coffea arabica (M. Novo, Catuaí, 1130-13 e H 6586-2) e C. canephora (Guarini) com 13 meses de idade, mantidas em solução nutritiva e condições controladas (a)

Cultivar	Horas após o início da iluminação							
	0:30	3:30	6:30	9:30	11:30	12:30		
M. Novo	7,57	13,94	9,91	7,53	3,98	0,81		
Catuaí	10,29	11,98	10,67	8,24	8,53	1,09		
1130-13	5,82	11,17	11,12	10,02	12,20	1,12		
H 6586-2	7,77	6,97	5,45	5,17	5,35	4,14		
Guarini	10,21	9,28	12,67	10,38	8,03	4,73		

(a) Temperatura do ar  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $0,14 \text{ cal. cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ , UR 35-60%, fotoperíodo de 12h

que o Mundo Novo apresentou uma tendência à diminuição de abertura estomática depois de 9:30 h de iluminação / (42% a menos). Tal comportamento, com menor intensidade foi observado no Catuaí (24%), enquanto que os demais cultivares mostraram-se muito regulares durante todo o período de iluminação. O Catuaí apresentou um valor bem elevado logo nos primeiros 30 minutos de iluminação. O cultivar 1130-13 não teve uma resposta rápida de abertura dos estômatos, pois aos 30 minutos só apresentou um valor de cerca de 50% do valor médio do período. O híbrido H 6586-2 foi o que apresentou os menores valores de abertura estomática, cerca de 68% da média das demais plantas, porém com abertura máxima já no início da iluminação. O cultivar Guarini apresentou um valor elevado já aos 30 minutos e em média tem 12% a mais do que o Mundo Novo e o Catuaí. Após 30 minutos de escuro, os cultivares Mundo Novo, Catuaí e 1130-13 apresentaram a abertura estomática reduzida em 90%, 89% e 89%, respectivamente. No entanto, o Guarini só reduziu a abertura estomática de 53% e o híbrido H 6586-2 em 33%.

As medidas de abertura estomática ( $\text{cm}^3 \text{ ar. cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ ) em cafeeiros, foram em média sempre menores do que os valores obtidos por Labouriau et al. (1964) em Cybistax antyphilitica Mart., planta de cerrado, que mantém os estômatos abertos durante a noite.

Franco (1938) usando C. arabica, 'Tipica' verificou que folhas a pleno sol fecham os estômatos das 10 às 13:30 horas e quando sombreadas permanecem abertas durante o dia todo, porém com abertura máxima às 11:30 horas. Ao passar da luz para a obscuridade os estômatos levavam 42 minutos para atingir o fechamento máximo. No retorno

da obscuridade para a luz a abertura máxima se dava após 35 minutos. Em todos os casos o início da reação dos estômatos deu-se entre 2 e 5 minutos.

Nutman (1937a), usando um porômetro de Knight (Knight 1922) acoplado a um registrador, estudou o curso diário de abertura estomática de C.arabica em condições naturais (Tanganica). Concluiu que a abertura estomática estava diretamente correlacionada com a intensidade de luz até  $0,7 \text{ cal.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$  e inversamente correlacionada acima de  $0,9 \text{ cal.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$ . Notou ainda que a resposta ao estímulo de luz ocorre dentro de 3 minutos.

Shimshi (1967), utilizando o porômetro de Alvim modificado, observou diferenças no comportamento estomático nas três espécies estudadas. Atribuiu este comportamento a uma interrupção no suprimento de água pela pressão exercida nas nervuras e ao sombreamento da região da folha sob o porômetro. No presente trabalho ambas as situações foram evitadas ao usar-se uma câmara de "plexiglass" no porômetro e evitando-se as nervuras de primeira e segunda ordem.

As medidas de resistência à transpiração ( $r_{H_2O}$ ) foram feitas simultaneamente com as de abertura estomática. Para o Mundo Novo foi estimado de uma em uma hora (Fig. 4) e em seis períodos para os demais cultivares (Quadro 11). Acompanhando o comportamento da abertura estomática, o Mundo Novo mostrou maior resistência à transpiração após 11 e 12 horas de iluminação (74% a mais); sendo que a menor resistência ocorreu às 4 horas de iluminação. O Catuaí também mostrou esta tendência oferecendo 38% a mais de resistência à transpiração a partir das 10 horas de iluminação. Este cultivar foi o

QUADRO 11. Resistência à transpiração ( $\text{sec. cm}^{-1}$ ), medidos pelo "Diffusive Resistance Meter", em folhas de Coffea arabica (M.Novo, Catuaí, 1130-13 e H 6586-2) e C.canephora (Guarini), com 13 meses de idade, mantidas em solução nutritiva e em condições controladas (a)

Cultivar	Horas após o início da iluminação						
	1	4	7	10	12	13	
M. Novo	15,60 <sup>b</sup> (25.5)	10,20 (25.4)	15,72 (26.2)	25,34 (28.0)	45,30 (25.4)	113,05 (22.1)	
Catuaí	14,59 (24.1)	23,58 (26.4)	14,32 (23.1)	20,91 (24.8)	27,30 (25.4)	95,11 (25.4)	
1130-13	21,33 (24.6)	10,90 (26.9)	21,97 (25.9)	33,90 (25.9)	40,40 (25.4)	205,12 (24.6)	
H 6586-2	38,33 (25.1)	33,37 (25.8)	39,44 (26.6)	59,58 (25.4)	105,66 (25.4)	-	
Guarini	19,38 (26.2)	17,87 (26.2)	15,96 (25.8)	23,20 (27.1)	29,60 (26.2)	-	

(a) temperatura do ar 20°C, 0,14 cal.cm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>, UR 35-60%, fotoperíodo de 12h

(b) temperatura das folhas no instante das medidas em °C

que apresentou, em média, o menor valor de  $r_{H_2O}$ , seguindo depois o Guarini, Mundo Novo, 1130-13 e H 6586-2. O híbrido H 6586-2 foi o que apresentou os maiores valores de  $r_{H_2O}$ , aumentando também a partir das 10 horas de iluminação (123% a mais). O Guarini mostrou-se bastante regular durante todo tempo luminoso. Após 1 hora de escuro, a resistência à transpiração aumentou de 405%, 372% e 798%, respectivamente para o M.Novo, Catuaí e 1130-13. Para os dois outros cultivares a transpiração foi praticamente nula, ou seja, uma resistência infinitamente grande.

Os dados de abertura estomática e resistência à transpiração, de um modo geral, mostraram sempre a mesma tendência, com exceção do H 6586-2 que apresentou um grande aumento na  $r_{H_2O}$  às 12 horas de iluminação. Esta tendência não foi acompanhada por um fechamento relativo da abertura estomática. Como as medidas não foram simultâneas, é possível que tenha ocorrido um rápido fechamento dos estômatos no intervalo entre as duas medidas (ca. 30 minutos).

A diminuição relativa da abertura estomática e da transpiração ao fim do período de iluminação, sugere algum controle ritmico endógeno, uma vez que todas as condições ambientais eram constantes.

Nutman (1941) estudou a taxa de transpiração de C.arabica em condições naturais (Tanganica), concluindo que a transpiração, da mesma forma que a abertura estomática, varia com níveis de baixa radiação solar e é afetada por grandes deficits de água. Birhuizen et al. (1969) concluíram que os estômatos de C.arabica fazem um controle eficiente de transpiração em condições de deficit de

água no solo, ocorrendo um fechamento mais brusco no início. Diferenças quanto ao comportamento da abertura estomática e transpiração entre os cultivares de C.arabica são esperadas (Nunes & Duarte 1969, Nunes 1970).

## 6. Incorporação de $^{14}\text{CO}_2$

### 6.1. Fotossíntese aparente

Cinco plantas de cada cultivar receberam  $^{14}\text{CO}_2$  conforme o método já descrito. As incorporações iniciaram-se 1 hora após o início da iluminação e terminaram 5 horas depois. Este primeiro experimento teve maior duração pois as amostras para dosagem de clorofila foram colhidas simultaneamente. Os estômatos estavam plenamente abertos durante todo o período de duração do experimento como mostram os dados de abertura estomática (Quadro 10).

Os valores de fotossíntese aparente ( $\text{mgCO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ) mostraram-se significativamente diferentes ao nível de 1% (Quadro 12). Os cultivares M.Novo e Catuaí apresentaram os mesmos valores de fotossíntese aparente. Os cultivares 1130-13 e H 6586-2 não chegaram a diferir do M.Novo, porém foram inferiores ao Catuaí. O cultivar Guarini apresentou uma fixação aparente bem menor do que os cultivares C.arabica. É possível que as condições de temperatura e radiação do presente experimento não tenham sido as melhores para esta espécie.

A escolha de  $20^\circ\text{C}$  para a temperatura do ar foi baseada nos resultados de Nunes et al. (1968) no qual foi medida a fotossíntese aparente de quatro cultivares

QUADRO 12. Fotossíntese aparente ( $\text{mgCO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ) a 320 ppm  $\text{CO}_2$  e 20%  $\text{O}_2$ . Plantas de Coffea arabica (M. Novo, Catuaí, 1130-13 e H 6586-2) e C. canephora (Guarini) com 13 meses de idade, mantidas em solução nutritiva e condições controladas (a)

Cultivar	$\text{mgCO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$					Média	$\frac{s}{\bar{x}}$	CV
	Pl.1	Pl.2	Pl.3	Pl.4	Pl.5			
M. Novo	7,78	6,44	6,18	6,71	4,99	6,42	0,45	15,64
Catuaí	7,43	7,75	7,88	7,89	6,26	7,40	0,30	9,04
1130-13	4,93	6,41	4,93	5,19	5,41	5,37	0,27	11,40
H6586-2	5,23	5,79	5,20	5,75	4,82	5,36	0,18	7,64
Guarini	3,53	3,76	4,87	3,96	3,69	3,96	0,23	13,27
Teste F						18,24	**	
Dms (Tukey 5%)						1,28		

(a) Temperatura do ar  $20^\circ\text{C}$ ,  $0,14 \text{ cal} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ , UR 35-60%, fotoperíodo de 12 h.

(dois de C.arabica e dois de C.canephora), utilizando um analisador de gás infravermelho (IRGA). A temperatura de 20°C foi a temperatura ótima e 0,11 cal.cm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup> a intensidade de luz saturante. A seleção S 288-23 apresentou o mais alto valor de fotossíntese aparente 6,99mg CO<sub>2</sub>.dm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>, seguida de Gimma 5,57mg CO<sub>2</sub>.dm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>, ambas da espécie C.arabica. A seleção BP 42 Y 809 de C.canephora, apresentou uma fixação de 4,98 mgCO<sub>2</sub>.dm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>. Os valores para fotossíntese aparente são comparáveis aos obtidos para os cultivares Catuaí e M.Novo. Os outros dois cultivares 1130-13 (da Tanzânia) e H6586-2 (do Brasil) apresentaram resultados próximos àqueles obtidos para seleção Gimma (Etiopia). O Guarini (Java) apresentou uma fixação de CO<sub>2</sub> de aproximadamente 1 mg CO<sub>2</sub>.dm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> menor do que aquela medida por Nunes et al. na seleção BP 42 Y 809 (Java). As maiores taxas de fotossíntese aparente (20°C) foram sempre encontradas dentro do grupo C.arabica. Os cultivares do grupo C.canephora apresentaram valores de 35% e 29% a menos, respectivamente, para o Guarini e para a seleção Gimma. A diminuição de fixação de CO<sub>2</sub> com o aumento de temperatura (Nunes et al. 1968) foi bem característica para cada cultivar. Este comportamento evidencia a variabilidade de adaptação ecológica entre os mesmos. A seleção S 288-23, além de ser aquela que apresentou a maior taxa de fotossíntese aparente, foi também relativamente a menos susceptível à elevação de temperatura do ar.

Quanto à produção dos cultivares estudados, o M. Novo e Catuaí são aqueles que apresentam as mais altas produções. O Catuaí, embora seja material de porte menor do que o M.Novo, apresenta as mesmas produções. O cultivar 1130-13 tem apresentado uma produção média de

58% daquela do M.Novo (Carvalho & Monaco 1972). Os cultivares H 6586-2 e Guarini são seleções recentes, ainda em estudo, não tendo portanto dados de produção.

Tiô (1962) estudou o efeito da intensidade de luz sobre a fotossíntese aparente de C.arabica 'Bourbon'. A taxa máxima obtida foi de  $6,14 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  a 20.000 lux, 130 ppm  $\text{CO}_2$  e  $20^\circ\text{C}$ . Este valor de fixação manteve-se na faixa de 20.000 a 60.000 lux, decrescendo em seguida devido efeitos destrutivos dos cloroplastos sob altas iluminações.

Nutman (1937b) mediu a fotossíntese aparente em C.arabica em condições naturais na Tangânia. Os valores obtidos variaram de 0,7 a  $4,5 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ . Foi observada uma estreita dependência de fixação de  $\text{CO}_2$  com as condições de irradiação incidente: as maiores taxas ocorreram às primeiras horas do dia, em dias nublados ou então em plantas sombreadas artificialmente. Em planta exposta a pleno sol, a fotossíntese foi nula no período de 12-14 horas. Este fato foi atribuído ao fechamento temporário dos estômatos. Os valores relativamente menores de fotossíntese aparente encontrados podem ser interpretados pelas condições em que foram realizados os experimentos. As folhas foram mantidas sempre horizontalmente e sob irradiação solar direta, a uma velocidade de ar baixa ( $83 \text{ ml min}^{-1}$ ). Foi encontrado um valor de  $0,75 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  para a respiração noturna.

Shimshi (1969) sugeriu que o presente método fornece valores de fotossíntese real ao invés de fotossíntese aparente. Todavia Austin & Longdon (1967) concluíram que houve boa correspondência dos dados usando  $^{14}\text{CO}_2$  e IRGA, apesar da esperada discriminação para  $^{14}\text{C}$ , nos

estudos de fotossíntese aparente em Beta vulgaris e Phaseolus.

Em C.arabica Nunes et al. (1968) encontraram valores entre 5,57 e 6,99  $\text{mgCO}_2, \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  e Tió (1962) 6,14  $\text{mgCO}_2, \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  (Bourbon), utilizando o IRGA. Estes resultados são próximos às taxas de fixação de  $\text{CO}_2$  em C.arabica obtidas no presente trabalho que oscilaram entre 5,36 e 7,40  $\text{mgCO}_2, \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ . A coincidência destes resultados sugere que o método de  $^{14}\text{CO}_2$  permite avaliar a fotossíntese aparente em café.

O método usado, na realidade deve medir a fotossíntese aparente devido a uma diluição isotópica. O fluxo de gás que passa pela folha durante 20 segundos contém  $^{14}\text{CO}_2 + ^{12}\text{CO}_2$ . Durante este período de tempo não há evolução do  $^{14}\text{CO}_2$  recém-fixado Hew et al. (1969). Como a câmara de incorporação de "plexiglass" é perfeitamente transparente à luz (Shimshi 1969), a área foliar sob incorporação apresenta uma evolução de  $\text{CO}_2$  induzida pela luz (fotorespiração). Este  $^{12}\text{CO}_2$  evoluído vai baixar a atividade específica da mistura gasosa e, com isto, diminuir os valores de fixação de  $\text{CO}_2$  avaliados pela fórmula (I). Acredita-se portanto que os resultados obtidos com o presente método representam na verdade a fotossíntese aparente.

## 6.2. Fixação de $\text{CO}_2$ expresso em teor de clorofila

Os dados coletados permitiram calcular a taxa fotossintética levando em consideração o teor de clorofila (Quadro 13). Os resultados confirmam em linhas gerais àqueles apresentados no Quadro 12. O cultivar

QUADRO 13. Fotossíntese aparente expressa em  $\text{mgCO}_2 \cdot \text{mg clorofila}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  a 320 ppm  $\text{CO}_2$  e 20%  $\text{O}_2$ . Plantas de Coffea arabica (M.Novo, Catuaí,<sup>2</sup> 1130-13 e H 6586-2) e C.canephora (Guarini), com 13 meses de idade, (a) mantidas em solução nutritiva e condições controladas

Cultivar	$\text{mgCO}_2 \cdot \text{mg clorofila}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$						$\frac{s}{\bar{x}}$	CV
	Pl.1	Pl.2	Pl.3	Pl.4	Pl.5	Média		
								%
M. Novo	7,71	6,85	6,35	7,30	5,14	6,67	0,44	14,90
Catuaí	8,27	8,80	7,74	7,72	6,13	7,73	0,45	12,92
1130-13	4,84	5,77	4,71	4,96	5,15	5,09	0,18	8,16
H6586-2	6,03	5,63	5,51	6,42	5,04	5,73	0,23	9,15
Guarini	2,93	3,62	4,08	3,99	3,08	3,54	0,23	14,70
Teste F						23,33 <sup>**</sup>		
Dms (Tukey 5%)						1,39		

(a) Temperatura do ar 20°C, 0,14  $\text{cal} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ , UR 35-60%, fotoperíodo de 12 h.

1130-13 apresentou uma diferença de fixação de  $\text{CO}_2$  em relação ao Mundo Novo. O Guarini manteve-se com uma taxa fotossintética mais baixa em relação ao grupo de C.arabica, pois suas folhas apresentaram teor de clorofila mais elevado.

Sestak et al. (1971) sugere a área foliar como base conveniente para exprimir a taxa fotossintética quando for limitante a energia radiante e a concentração de  $\text{CO}_2$ . O teor de clorofila pode alternativamente ser usado no caso de limitação por radiação. O critério geral a ser usado deve ter como base a característica da planta que mais afete o processo. O mesmo comportamento relativo apresentado pelos cultivares (exceção ao 1130-13) sugere que nas condições do experimento não havia limitação de  $\text{CO}_2$  e de intensidade de luz (Quadros 12 e 13).

### 6.3. Fixação de $\text{CO}_2$ por estômato

Considerando-se o número de estômatos presentes por  $\text{mm}^2$  de superfície foliar e os valores de fotossíntese aparente, foi possível estimar a eficiência da fixação de  $\text{CO}_2$  por estômato em cada cultivar (Quadro 14).

Os cultivares M.Novo e Catuaí apresentaram a mesma eficiência de fixação de  $\text{CO}_2$  por estômato. Esses dois cultivares todavia tiveram 29% a mais de fixação do que 1130-13 e H 6586-2, os quais não diferiram entre si. O Guarini foi o que apresentou a mais baixa fixação por estômato. Este cultivar apresenta maior número de estômatos, por unidade de área, porém menores do que os de C.arabica. No presente trabalho não é possível, com os dados obtidos, avaliar a importância relativa de cada um destes fatores.

QUADRO 14. Fotossíntese aparente, expressa por  $\text{mgCO}_2 \cdot \text{estomato}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  a 320 ppm  $\text{CO}_2$  e 20%  $\text{O}_2$ . Plantas de Coffea arabica (M.Novo, Catuaí, 1130-13, H 6586-2) e C. canephora (Guarini), com 13 meses de idade, mantidas em solução nutritiva e condições controladas (a)

Cultivar	$\text{mgCO}_2 \times 10^{-6} \cdot \text{estomato}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$						$\frac{s}{\bar{x}}$	CV
	Pl.1	Pl.2	Pl.3	Pl.4	Pl.5	Média		
								%
M. Novo	3,94	3,26	3,13	3,40	2,52	3,25	0,23	15,73
Catuaí	3,60	3,75	3,81	3,82	3,03	3,60	0,15	9,20
1130-13	2,24	2,91	2,24	2,36	2,46	2,44	0,12	11,35
H6586-2	2,82	3,12	2,80	3,10	2,38	2,84	0,13	10,53
Guarini	1,25	1,33	1,72	1,40	1,31	1,40	0,08	13,22
Teste F						31,32	**	
Dms (Tukey 5%)						0,64		

(a) Temperatura do ar  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $0,14 \text{ cal} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ , UR 35-60%, fotoperíodo de 12 h.

#### 6.4. Efeito da concentração de $O_2$

Usando-se a mesma metodologia, tentou-se conhecer o efeito da pressão parcial de oxigênio sobre a fixação de  $CO_2$ . O cultivar Catuaí não apresentou qualquer efeito na mudança de pressão parcial de oxigênio de 20 para 5% (Quadro 15), enquanto o Guarini teve um aumento de 29%. Comparando-se o efeito de uma alta pressão parcial de  $O_2$  (52,5%) com a pressão normal (20%) verifica-se que o Catuaí teve uma diminuição na fotossíntese aparente de 34%, enquanto que o Guarini não mostrou redução significativa. Comparando os resultados extremos de uma baixa pressão parcial de  $O_2$  (5%) e de uma alta pressão parcial de  $O_2$  (52,5%), verifica-se que ambos os cultivares foram afetados. No Catuaí ocorreu uma redução de 28% e no Guarini de 37% na fotossíntese aparente.

Resultados semelhantes sobre o efeito do  $O_2$  na fotossíntese aparente têm sido obtidos em espécie de ciclo  $C_3$ . O efeito da variação de pressão parcial do oxigênio na fotossíntese parece ser bastante geral, ocorrendo em vegetais superiores, algas e cloroplastos isolados (Turner & Bristain 1962, Jackson & Volk 1970).

Forrester et al. (1966a) mostraram que, em soja, a fotossíntese aparente era inibida com o aumento da concentração de  $O_2$  de 1 a 100%. Este efeito foi muito mais acentuado em atmosfera de baixa concentração de  $CO_2$ . A fotorespiração era nula a 1%  $O_2$  enquanto que a 100% foi muito maior do que a 21%. Todavia com espécies do ciclo  $C_4$ , como o milho, a fotorespiração e o ponto de compensação são nulos na faixa de 1 a 100%  $O_2$ . Para outras espécies de monocotiledoneas estudadas o ponto de compensação de  $CO_2$  aumentou linearmente com a temperatura (Forrester et al. 1966b).

QUADRO 15. Fotossíntese aparente ( $\text{mgCO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ) a 320 ppm e em três atmosferas de  $\text{O}_2$ : 5, 20 e 52,5%. Plantas de *Coffea arabica* (Catuaí) e *C. canephora* (Guarini), com 13 meses de idade, mantidas em solução nutritiva e condições controladas (a)

Cultivar	Concen- tração $\text{O}_2$	Fotossíntese aparente	$s_{\bar{x}}$	C V
	%	$\text{mgCO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$		%
Catuaí	5	6,79	0,54	17,80
	20	7,40	0,30	9,04
	52,5	4,87	0,39	18,00
Teste F:	5-20,0% $\text{O}_2$	0,99 <sup>ns</sup>		
	20-52,5% $\text{O}_2$	26,27 <sup>**</sup>	(1,14) <sup>b</sup>	
	5-52,5% $\text{O}_2$	8,23 <sup>*</sup>	(1,54) <sup>b</sup>	
Guarini	5	5,14	0,36	15,79
	20	3,96	0,23	13,27
	52,5	3,22	0,28	19,72
Teste F:	5-20,0% $\text{O}_2$	7,33 <sup>**</sup>	(1,00) <sup>b</sup>	
	20-52,5% $\text{O}_2$	4,11 <sup>ns</sup>		
	5-52,5% $\text{O}_2$	17,33 <sup>**</sup>	(1,06) <sup>b</sup>	

(a) Temperatura do ar 20°C, 0,14  $\text{cal} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ , UR 35-60%, fotoperíodo de 12 h.

(b) Valores de dms (Tukey a 5%)

Hew e Krotkov (1968) estudaram o efeito de  $O_2$  em folhas aclorofiladas (mutantes), variegadas e normais de três espécies. As folhas aclorofiladas, diferentemente das folhas normais, não apresentaram efeito de concentração de  $O_2$ , sendo a evolução de  $O_2$  à luz e no escuro sempre a mesma. Concluíram que a evolução de  $CO_2$  à luz nas folhas normais estaria estreitamente ligada à fotossíntese.

Dowton & Tregunna (1968) obtiveram uma inibição completa da fotossíntese e da fotorespiração usando 3-(3,4-diclorofenil)-1,1 dimetil uréia (DCMU), mas sem afetar a respiração noturna. Concluíram ainda que a sensibilidade das plantas ao oxigênio estava ligada à produção de glicolato, sendo portanto compatível a proposição de que glicolato é o substrato da fotorespiração.

Jackson & Volk (1970) mencionaram que a inibição da fotossíntese aparente pelo oxigênio (efeito Warburg), tem sido atribuída a um aumento na fotorespiração, embora existam também outras interpretações. D'Aouste & Canvin (1973), utilizando o método de medidas simultâneas de  $^{12}CO_2$  e  $^{14}CO_2$  em circuito aberto proposto por Ludwig & Canvin (1971), avaliaram que a 21%  $O_2$  a inibição da fotossíntese real era 55% e o estímulo da fotorespiração 45%.

Ogren & Bowes (1971) mencionam a inibição completa de  $O_2$  na incorporação de  $^{14}CO_2$ . Sugerem a possibilidade de que o  $O_2$  substitui o  $CO_2$  na reação de carboxilação. A ribulose-1,5 difosfato é oxidada a 3-fosfoglicerato e fosfoglicolato. Um aumento na pressão parcial de  $O_2$  aumenta a produção de fosfoglicerato, estimulando a fotorespiração e reduzindo a concentração dos intermediários do ciclo de Calvin.

Pelos resultados do abaixamento da pressão parcial de  $O_2$  verifica-se que, nas condições do experimento, o cultivar Catuaí estava com uma baixa competição de  $O_2$  ao nível da ribulose-1,5-difosfato carboxilase, enquanto que para o Guarini esta competição mostrou-se bastante alta. Quando a pressão parcial de  $O_2$  variou de 20 para 52,5% notou-se uma acentuada diminuição na fotossíntese aparente do cultivar Catuaí. Este fato confirma que este cultivar estava sob uma competição de  $O_2$  relativamente baixa nas condições normais (20%  $O_2$ ), pois que a reação de carboxilação apresentou alta sensibilidade à competição com o oxigênio. Sob este aumento da pressão parcial de  $O_2$  a fotossíntese aparente do Guarini não foi significativamente afetada. A enzima carboxilante deste cultivar deveria já estar sob alta competição com o oxigênio na concentração de 20%  $O_2$ .

Como o oxigênio age diretamente sobre a ribulose-1,5-difosfato carboxilase, aumentando o substrato para a fotorespiração, os resultados obtidos sugerem um estudo mais amplo sobre a intensidade da fotorespiração de cultivares de café, em diferentes condições de temperatura e intensidade de luz.

#### 6.5. Estimativa da fotorespiração e do ponto de compensação para $CO_2$

Vários métodos têm sido propostos para estimar a fotorespiração em plantas superiores. Samish & Koller (1968) propuseram uma estimativa de fotorespiração a partir da relação entre fotossíntese aparente e concentração interna de  $CO_2$ .

Hew et al. (1969) realizaram um estudo crítico de três métodos para medir a evolução de  $CO_2$  à luz, utili-

zando folhas de girassol e milho: (a) em sistema fechado, a fixação de  $\text{CO}_2$  foi dosada pelo IRGA e a fase retilínea entre fotossíntese aparente e concentração externa de  $\text{CO}_2$  foi extrapolada para zero ppm  $\text{CO}_2$ ; (b)  $^{14}\text{CO}_2$  foi liberado em um sistema fechado e a fotorespiração foi medida pela queda de atividade específica; (c) o  $\text{CO}_2$  evoluído foi medido diretamente (IRGA) em sistema aberto sob fluxo de ar livre de  $\text{CO}_2$ . Concluíram que os três métodos apresentam idênticos resultados sendo portanto válida a extrapolação sugerida por Decker (1959). Foi notado, no entanto, que as medidas utilizando  $^{14}\text{CO}_2$  só podem ser usadas durante curto espaço de tempo (45 sec) pois que aos 2 minutos já havia evolução de  $^{14}\text{CO}_2$ . No caso do método (c) o fluxo é extremamente importante, sendo necessário mantê-lo sempre acima de 2,5 litros.min<sup>-1</sup>.

A extrapolação da parte retilínea da fotossíntese aparente é feita considerando-se que a fotorespiração não muda à medida que a concentração de  $\text{CO}_2$  é progressivamente diminuída (Jackson & Volk 1970). Em trigo, Heath & Orchard (1968) encontraram que em uma faixa limitada de concentração de  $\text{CO}_2$  há um aumento da fixação de  $\text{CO}_2$  ou uma diminuição na sua evolução para o meio externo. Portanto existiria uma relação sigmóide, com uma curvatura positiva nos valores de fixação de  $\text{CO}_2$  abaixo do ponto de compensação (fotorespiração). Por outro lado Ludwig & Canvin (1971) mostraram que a concentração de  $\text{CO}_2$  na faixa de 53 e 300 ppm não influencia a fotorespiração.

D'Aoust & Canvin (1973) demonstraram que o oxigênio não afeta igualmente a fotossíntese real e a fotorespiração. Concluíram que não seria válida a estimativa da fotorespiração pela diferença entre fixação de  $\text{CO}_2$  a 1%  $\text{O}_2$  (fotossíntese real) e a 21%  $\text{O}_2$  (fotossíntese apar-

rente). No entanto Jackson & Volk (1970) consideram que a fotossíntese real não é alterada em condições de alta fotorespiração, pois que existe suficiente concentração de  $\text{CO}_2$  para o processo.

Em função das informações existentes na literatura, procurou-se no presente trabalho avaliar fotorespiração, utilizando-se o presente equipamento, pelo método da extrapolação proposto originalmente por Decker (1959). Para tanto foram usadas plantas do cultivar Catuaí em condições controladas em câmara de crescimento. O cilindro estoque foi carregado com 8,2, 6,0, 5,2 e 2,7  $\mu\text{M}$  de carbonato ( $\text{Na}_2^{12}\text{CO}_3 + \text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ ), o que corresponde a 411, 320, 260 e 134 ppm de  $\text{CO}_2$ , respectivamente. A pressão parcial de oxigênio foi de 20%.

Os valores de fotossíntese aparente em função da concentração de  $\text{CO}_2$  aparecem na Fig. 5. O valor da fotorespiração estimado pela extrapolação da reta para zero ppm de  $\text{CO}_2$  (Fig. 5b) é de  $2 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ . O ponto em que a reta corta o eixo das abcissas (65 ppm  $\text{CO}_2$ ) corresponde ao ponto de compensação de  $\text{CO}_2$  a  $20^\circ\text{C}$  e  $0,14 \text{ cal} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ , para este cultivar (Fig. 5a).

Medidas de fotorespiração considerando a evolução de  $\text{CO}_2$ , são sempre subestimadas, pois não levam em conta o  $\text{CO}_2$  reciclado (Samish & Koller 1968, Hew et al. 1969, Jackson & Volk 1970).

A declividade da reta obtida entre fotossíntese aparente e concentração de  $\text{CO}_2$  pode ser considerada como a eficiência da carboxilação ou também como o inverso da resistência total para a entrada de  $\text{CO}_2$  (Jackson & Volk 1970).

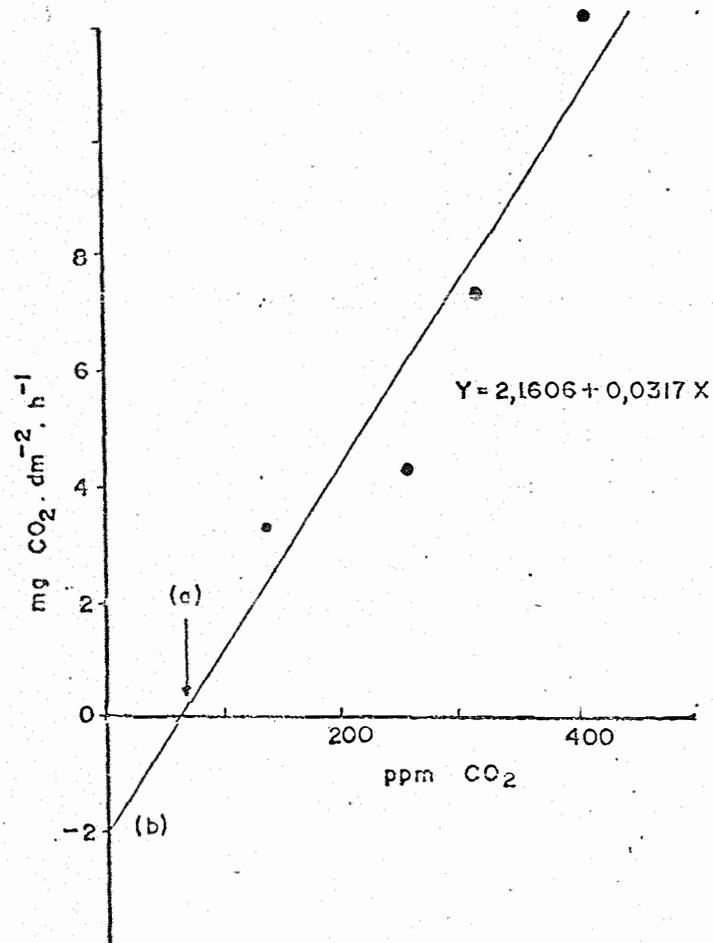


FIG. 5. Taxa de fotossíntese aparente de Coffea arabica (Catuaí) em função da concentração externa de CO<sub>2</sub>: (a) estimativa do ponto de compensação de CO<sub>2</sub> (65 ppm CO<sub>2</sub>) e (b) estimativa da fotôrespiração (2 mgCO<sub>2</sub> · dm<sup>-2</sup> · h<sup>-1</sup>).

Considera-se que para plantas  $C_3$  a temperatura ótima para fixação de  $CO_2$  oscile entre  $15-25^{\circ}C$ , o ponto de compensação para  $CO_2$  entre 30-70 ppm  $CO_2$  e a fotorespiração corresponda a 30-50% da fotossíntese aparente. No presente trabalho, os dados com cafeeiros foram de 65 ppm  $CO_2$  para o ponto de compensação e a fotorespiração, no caso do Catuaí, foi de 37% da fotossíntese aparente. Utilizando-se o valor de  $0,7 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  para a respiração noturna obtido por Nutman (1937), a fotorespiração em cafeeiro seria 2,8 vezes maior do que a respiração noturna. Jones & Mansfield (1970) apresentaram valores de 80 a 100 ppm  $CO_2$  para o ponto de compensação de café a  $20^{\circ}C$ .

## V. CONCLUSÕES

Utilizando-se o método de incorporação de  $^{14}\text{CO}_2$  em folhas intactas, apresentado por Shimshi (1969) e modificado no presente trabalho, para avaliar taxas de fixação de  $\text{CO}_2$  em plantas, concluiu-se que as taxas de fotossíntese oscilaram em torno daquelas já obtidas em cafeeiros, através de outros métodos. Plantas de C. canephora apresentaram taxa fotossintética 35% menor em relação ao material de C. arabica. Os dois cultivares mais produtivos (M. Novo e Catuaí, C. arabica) foram aqueles que apresentaram as mais altas taxas de fixação de  $\text{CO}_2$ .

O efeito da pressão parcial de oxigênio foi distinto para os dois cultivares estudados. O Guarini foi mais sensível do que o Catuaí, apresentando uma diminuição da taxa de fotossíntese aparente de 37% enquanto para o Catuaí esse efeito foi de 28%.

Pelo presente método é possível estimar o ponto de compensação para  $\text{CO}_2$  e a fotorespiração. No caso do Catuaí os valores obtidos foram de 65 ppm  $\text{CO}_2$  e de 2  $\text{mgCO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ , respectivamente. Neste cultivar a taxa de fotorespiração correspondeu a 37% da fotossíntese aparente.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- Alvin, P. de T. 1965. A new type of parameter for measuring stomatal opening and its use in irrigation studies. Symp. Methodology Plant Eco-physiology, UNESCO, Montpellier, p.325-329.
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol. 24:1-15.
- Austin, R.B. & Langdon, P.C. 1967. A rapid method for the measurement of rates of photosynthesis using  $^{14}\text{CO}_2$ . Ann. Bot. 31:245-254.
- van Bavel, C.H.M., Nakayama, F.S. & Ehrlert, W.L. 1965. Measuring transpiration resistance of leaves. Plant Physiol. 40:535-540.
- Bierhuizen, J.F., Slatyer, R.O. & Rose, C.W. 1965. A porometer for laboratory and field operation. J.Exp. Bot. 16:182-191.
- Bierhuizen, J.F., Nunes, M.A. & Ploegman, C. 1969. Acta Bot. Neerl. 18(2):367-374.
- Black Jr., C.C. 1973. Photosynthetic carbon fixation in relation to net  $\text{CO}_2$  uptake. Ann. Rev. Plant Physiol. 24:253-286.
- Bray, G.A. 1960. A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. Analyt. Biochem. 1:279-285.
- Calvin, M. & Bassham, J.A. 1962. The photosynthesis of carbon compounds. W.A.Benjamin, Inc., Publ., N. York, 127p.
- Carvalho, A. & Monaco, L.C. 1972. Adaptação e produtividade de cafeeiros portadores de fatores para a resistência à Hemileia vastatrix. Cien. Cult. 24(10): 924-932.
- Centro Inv. Ferr. Caf. 1965. Progress report of the coffee rust research center. Junta de Investigações do Ultramar, Oeiras, 144p.

- D'Aoust, A.L. & Calvin, D.T. 1973. Effect of oxygen concentration on the rates of photosynthesis and photorespiration of some higher plants. *Can. J. Bot.* 51: 457-464.
- Decker, J.P. 1959. Further evidence of increased CO<sub>2</sub> production accompanying photosynthesis. *J. Solar Energy Sci. Eng.* 1:30-33.
- Decker, J.P. 1970. Early history of photorespiration. *Bioeng. Bull.* Nº 10 Eng.Res.Center, Arizona State University, Tempe, Arizona.
- Downton, W.J.S. & Tregunna, E.B. 1968. Photorespiration and glycolate metabolism: a re-examination and correlation of some previous studies. *Plant Physiol.* 43:923-929.
- Duncombe, W.G. & Rising, T.J. 1969. Scintillation counting of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> from in vitro systems: a comparison of some trapping agents. *Analyt. Biochem.* 30:275-278.
- Forrester, M.L., Krotkov, G. & Nelson, C.D. 1966a. Effect of oxygen on photosynthesis, photorespiration and respiration in detached leaves. I. Soybean. *Plant Physiol.* 41:422-427.
- Forrester, M.L., Krotkov, G. & Nelson, C.D. 1966b. Effect of oxygen on photosynthesis, photorespiration and respiration in detached leaves. II. Corn and other monocotyledons. *Plant Physiol.* 41:428-431.
- Franco, C.M. 1938. Sobre a fisiologia dos estômas do cafeeiro Coffea arabica L. An. 1<sup>a</sup> Reun. Sul-Amer. Bot., Rio de Janeiro, p.293-302.
- Franco, C.M. 1939. Relation between chromosome number and stomata in Coffea. *Bot.Gaz.* 100(4):817-827.
- Franco, C.M. 1941. Teor em clorofila das folhas de cafeeiros diversamente sombreados e a pleno sol. *Rev. Inst. Café* 28(1):296-299.
- Franco, C.M. & Magalhães, A.C. 1965. Techniques for the measurement of transpiration of individual plants. *Symp. Methodology Plant Eco-physiology, UNESCO, Montpellier*, p.325-329.

- Goldsworthy, A. 1970. Photorespiration. *Bot. Rev.* 36 (4):32-340.
- Hatch, M.D. & Slack, C.R. 1970. Photosynthetic CO<sub>2</sub>-fixation pathways. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21:141-162.
- Heath, O.V.S. & Orchard, B. 1968. Carbon assimilation at low carbon dioxide levels. *J. Exp. Bot.* 19 (58): 176-192.
- Hew, C.S. & Krotkov, G. 1968. Effect of oxygen on the rates of CO<sub>2</sub> evolution in light and in darkness by photosynthesizing and non-photosynthesizing leaves. *Plant Physiol.* 43:464-466.
- Hew, C.S., Krotkov, G. & Canvin, D.T. 1969. Effects of temperatures on photosynthesis and CO<sub>2</sub> evolution in light and darkness by green leaves. *Plant Physiol.* 44: 671-677.
- Jackson, W.A. & Volk, R.J. 1970. Photorespiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21:385-432.
- Jones, M.B. & Mansfield, T.A. 1970. A circadian rhythm in the level of the carbon dioxide compensation point in Bryophyllum and Coffea. *J. Exp. Bot.* 21:159-163.
- Kanemasu, E.T., Thurtell, G.W. & Tanner, C.B. 1969. Design, calibration and field use of a stomatal diffusion porometer. *Plant Physiol.* 44:881-885.
- Knight, R.C. 1922. Further observations on the transpiration, leaf water content and wilting of plants. *Ann. Bot.* 36:361.
- Labouriau, L.G., Válio, I.F.M., Magalhães, A.C. & Franco, C.M. 1964. Nota sobre a abertura estomática noturna em plantas dos cerrados. *An. Acad. Bras. Ci.* 36(4):465-477.
- Ludwig, L.J. & Canvin, D.T. 1971. An open gas-exchange system for the simultaneous measurement of the CO<sub>2</sub> and <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fluxes from leaves. *Can. J. Bot.* 49:1299-1313.
- Madsen, N.P. 1969. Use of toluene/triton X-100 scintillation mixture for counting <sup>14</sup>C-protein radioactivity. *Analyt. Biochem.* 29:542-544.

- Medina, D.M. 1961. Uso do acetado de celulose diluído em ácido acético, para tomar impressões dos estômas foliares. *Bragantia* 20:39-41.
- van Norman, R.W. & Brown, A.H. 1952. The relative rates of photosynthesis assimilation of isotopic forms of carbon dioxide. *Am. J. Bot.* 27:691-709.
- Nunes, M.A., Bierhuizen, J.F. & Ploegman, C. 1968. Studies on productivity of coffee. I. Effects of light, temperature and CO<sub>2</sub> concentration on photosynthesis of Coffea arabica. *Acta Bot. Neerl.* 17(2):93-102.
- Nunes, M.A., Bierhuizen, J.F. & Ploegman, C. 1969. Studies on productivity of coffee: III: Differences in photosynthesis between four varieties of coffee. *Acta Bot. Neerl.* 18(3):420-424.
- Nunes, M.A. 1970. Resistência à Secura em Coffea arabica. II. Estudo comparativo das seleções KP, K 7 e Harar. *Garcia de Orta, Lisboa*, 18(1-4):125-130.
- Nunes, M.A. & Duarte, N.T. 1969. Resistência à secura em Coffea arabica. Estudo comparativo de duas seleções. *Garcia de Orta, Lisboa*, 17(1):83-96.
- Nutman, F.J. 1937a. Studies of the physiology of Coffea arabica. II. Stomatal movements in relation to photosynthesis under natural conditions. *Ann. Bot. (NS) I* (4):682-693.
- Nutman, F.J. 1937b. Studies of the physiology of Coffea arabica. I. Photosynthesis of coffee leaves under natural conditions. *Ann. Bot. (NS) I* (4):353-367.
- Nutman, F.J. 1941. Studies of the physiology of Coffea arabica. III. Transpiration rates of whole trees in relation to natural environmental conditions. *Ann. Bot.* 5(17):59-81.
- Obremsky, R.J. (sem data). Sampling in liquid scintillation: trapping <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> from a biological sample oxidizer. *Bioch. Procedures, Sci. Instr. Div., Fullerton, Calif.* 8p.
- Ogren, W.L. & Bowes, G. 1971. Ribulose diphosphate carboxylase regulates soybeans photorespiration. *Nature New Biol.* 230(13):159-160.

- Patterson, M.S. & Greene, R.C. 1965. Measurement of low energy beta emitters in aqueous solution by liquid scintillation counting of emulsions. *Analyt. Chem.* 37: 854-857.
- Samish, Y. & Koller, D. 1968. Estimation of photorespiration of green plants and of their mesophyll resistance to CO<sub>2</sub> uptake. *Ann.Bot.* 32:687-694.
- Sestak, Z., Jarvis, P.G. & Catsky, J. 1971. Criteria for the selection of suitable methods. *In* Plant photosynthetic production. Manual of methods. W.Yunk, N.V. Publ., The Hague. 818p.
- Shimshi, D. 1967. Some aspects of stomatal behaviour as observed by means of an improved pressure-drop porometer. *Israel J.Bot.* 16:19-28.
- Shimshi, D. 1969. A rapid field method for measuring photosynthesis with labelled carbon dioxide. *J. Exp. Bot.* 20(63):381-401.
- van Slyke, D.D., Plazin, J. & Wersizer, J.R. 1951. Reagents for the van Slyke-folch wet carbon combustion. *J.Biol.Chem.* 191:299-304.
- Smith, L.W. 1969. Combustion and liquid scintillation determination of carbon-14 in Biological Samples. *Analyt. Biochem.* 29:223-229.
- Tiō, M.A. 1962. Effect of light intensity on the rate of apparent photosynthesis in coffee leaves. *J. Agric. Univ. Puerto Rico, Rio Piedras*, 46(3):159-166.
- Turner, J.C. 1968. Triton X-100 scintillant for carbon-14 labelled materials. *Int. J. Appl. Radi. Isot.* 19: 557-563.
- Turner, J.S. & Brittain, E.G. 1962. Oxygen as a factor in photosynthesis. *Biol.Rev.* 37:130-170.
- Voznesenskii, V.L., Zalenskii, O.V. & Austin, R.B. 1971. Methods of measuring rates of photosynthesis using carbon-14 dioxide. *In* Plant photosynthetic production. Manual of methods. W.Junk, N.V. Publ., The Hague, 818p.
- Warburg, O. 1920. Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen. *Biochem. J.* 103:188.

Watson, G.R. & Williams, J.P. 1969. Rapid method for wet combustion and scintillation counting of  $^{14}\text{C}$  labelled organic materials. *Analyt. Biochem.* 33:356-365.

Resumo

O estudo da incorporação de  $\text{CO}_2$  em folhas intactas de cafeeiros em cultivares de C.arabica e C.canephora foi realizado pelo emprego de um fluxo de gás, em sistema aberto, contendo  $^{14}\text{CO}_2$  e em condições controladas. A avaliação da taxa de fotossíntese aparente foi feita por digestão total da área incorporada (via seca) e a detecção da atividade do  $^{14}\text{CO}_2$  fixado foi medida em um cintilador líquido. Uma mistura adequada de cintilação contendo  $\text{NaOH}$  como base absorvente, é apresentada. O efeito da pressão parcial do oxigênio sobre a taxa de fotossíntese aparente e estimativas do ponto de compensação de  $\text{CO}_2$  e da fotorespiração são também discutidos.

Os dados obtidos indicam diferenças na taxa de fotossíntese aparente entre os cultivares de C.arabica / ( $6,14 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ) e o cultivar Guarini de C.canephora ( $3,96 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Este cultivar Guarini apresentou a mais baixa taxa de fotossíntese aparente e foram obtidas indicações de que apresenta fotorespiração mais intensa do que o Catuaí (C.arabica). Os valores das taxas de fotossíntese aparente fornecidos pelo presente método foram semelhantes àqueles obtidos por outros autores utilizando o IRGA e permite o seu emprego na avaliação de taxas fotossintéticas em condições de campo.

### Summary

A study was made of the incorporation of  $\text{CO}_2$  in intact leaves of coffee (var. C.arabica and C.canephora) using an open stream of gas containing  $^{14}\text{CO}_2$  under controlled conditions.

An estimate of the net photosynthetic rate was made after dry combustion of the incorporating area and subsequent counting of the  $\text{CO}_2$  fixed in a liquid scintillation counter. A suitable scintillation cocktail, containing NaOH as the absorbent base, is presented. The effect of the partial pressure of oxygen on the net photosynthetic rate and estimates of the  $\text{CO}_2$  compensation point and of photorespiration are also discussed.

The data obtained show differences in the net photosynthetic rate between the varieties C.arabica ( $6,14 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ) and C.canephora ( $3,96 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ). The variety Guarini (C.canephora) gave the lowest net photosynthetic rate and there were indications that this variety has a more intense photorespiratory rate than Catuai (C.arabica). The values for the net photosynthetic rate given by the present method were similar to those obtained by others using the IRGA method, and show its usefulness for the evaluation of photosynthetic rates in the field.