Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Fracionamento de carbono e nitrogênio em café arábica em resposta à carga de
frutos

Marcio Souza da Silva

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2019

Marcio Souza da Silva
Engenheiro Agrônomo

Fracionamento de carbono e nitrogênio em café arábica em resposta à carga de frutos

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **PAULO MAZZAFERA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Silva, Marcio Souza da

Fracionamento de carbono e nitrogênio em café arábica em resposta à carga de frutos / Marcio Souza da Silva. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

103 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Coffea arabica* L. 2. Bionalidade de produção 3. Relação fonte-dreno
4. Fenologia do cafeeiro I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus irmãos Marcelo P. Souza, Maurício S. Silva e Marcos Tiago S. Silva, por serem amigos em todos os momentos, mesmo quando distantes, e por me incentivarem em todas as etapas da vida.

Ao meu pai Domingos P. Souza, por me ensinar a cada dia o significado das palavras humildade, respeito, caráter e perseverança. À minha mãe Anita S. C. Souza, pelo seu amor incondicional, pela sua dedicação com a nossa educação e incentivo intensamente dispensados. Vocês sempre acreditaram no meu potencial, estiveram sempre presentes me apoiando, incentivando nos momentos difíceis, de desespero, mas também nos momentos de alegrias, de vitórias e de conquistas. Somente nós sabemos o quão dura foi a batalha, mas hoje lhes ofereço mais essa conquista.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por ter me ofertado resiliência nos momentos difíceis, como diz na Bíblia Sagrada: “Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus; eu te esforço e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça” (Isaías 41:10).

Aos meus pais, Domingos P. Souza e Anita S. C. Souza; meus irmãos, Marcelo P. Souza, Maurício S. Silva e Marcos Tiago S. Silva, e toda minha família por terem contribuído com a minha educação e formação, além do grande apoio, carinho, esforço e incentivo sempre demonstrados.

À minha namorada Ana Gabriela A. Campos pelo amor, companheirismo, carinho, paciência e apoio presenteados.

Ao meu “irmão” Gustavo R. F. Oliveira (Matias) pelo convívio diário, amizade, união fraterna e auxílio mútuo.

À Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP/ESALQ pela oportunidade concedida para a realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, processo nº 1732573) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 2017/23613-9) pelas bolsas concedidas durante a realização do mestrado.

Ao professor Paulo Mazzafera por me orientar, desafiar e incentivar durante essa etapa da minha formação acadêmica. Agradeço pela confiança no meu trabalho e pelos inúmeros ensinamentos transmitidos.

Ao professor José L. Favarin pelo apoio, paciência e confiança que foram importantes para a execução do experimento.

À Fundação de Estudos Agrários “Luiz de Queiroz” (FEALQ) e Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola (FUNDAG) pelos recursos concedidos para a realização do experimento.

Ao Grupo de Pesquisa em Produção Agrícola da ESALQ/USP pelo apoio concedido. Agradeço especialmente à Marina R. Reis (Marinex) pela cooperação durante o trabalho árduo no experimento de campo.

Ao Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), especialmente aos integrantes do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Estresse de Plantas (NUFEP) por contribuírem para a realização do experimento.

Ao grupo Baú, Fazenda São João (Presidente Olegário – Minas Gerais), por ceder área comercial de cultivo de café arábica para realização do experimento.

Ao Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology (Alemanha), especialmente ao Dr. Alisdair Fernie por conceder a oportunidade para a realização das análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Ao Dr. Adilson P. Domingues-Júnior pelos diversos ensinamentos transmitidos, auxílio durante as análises bioquímicas e de metaboloma, e por compartilhar momentos de descontração.

Aos estagiários Laura M. Bortolato (Batavo) e Giovane Assoni (Forest) pelo auxílio durante as análises de laboratório. Obrigado pelo trabalho árduo e por compartilharem momentos de descontração.

Aos alunos e funcionários do Laboratório Multiusuário de Produção Vegetal da USP/ESALQ, pelos diversos momentos de descontração e companheirismo vivenciados.

À todas as pessoas que de alguma forma colaboraram com a execução deste trabalho e que de forma injusta não foram citadas aqui.

EPÍGRAFE

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo”.

Martin Luther King Jr.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Uma visão geral sobre a bienalidade de produção do cafeeiro	17
1.2. Bienalidade de produção do cafeeiro: o estado da arte	18
1.3. Objetivos	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1. Área experimental e dados climáticos	23
2.2. Cultivo das plantas e instalação do experimento	24
2.3. Biometria do crescimento vegetativo e de frutos	25
2.4. Índice SPAD Minolta, clorofila e carotenóides em folhas	25
2.5. Extração e dosagem de carboidratos	26
2.6. Análise histoquímica: detecção de amido nos ramos	26
2.7. Extração e dosagem de compostos nitrogenados	26
2.8. Determinação de pectina na casca do fruto	27
2.9. Determinação de antocianina na casca do fruto	27
2.10. Extração e dosagem de compostos fenólicos totais nos frutos	28
2.11. Metabolômica: perfil de metabólitos	28
2.12. Delineamento experimental e análise estatística	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
3.1. Crescimento vegetativo e de frutos em resposta à carga pendente	29
3.2. Caracterização do fluxo de carbono e nitrogênio em resposta à carga de frutos	40
3.3. Carboidratos e compostos fenólicos em resposta à carga de frutos	41
3.4. Compostos nitrogenados em resposta à carga de frutos	52
3.5. Perfil dos metabólitos em resposta à carga de frutos	59
4. CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICES	101

RESUMO

Fracionamento de carbono e nitrogênio em café arábica em resposta à carga de frutos

As plantas de café (*Coffea arabica* L.) têm padrão de produção bienal em razão da competição entre o crescimento vegetativo e reprodutivo que ocorrem ao mesmo tempo. A quantificação de compostos de carbono e nitrogênio, bem como o perfil metabólico desses compostos foram investigados a fim de identificar possíveis alterações do crescimento dos tecidos que compõem o ramo produtivo do cafeeiro em resposta à carga de frutos. Os efeitos da carga de frutos foram estudados em quatro estádios fenológicos (expansão inicial, expansão final, granação e maturação de frutos), avaliando-se o crescimento de folhas velhas, maduras e novas; a secção dos ramos em que elas estão inseridas, assim como os frutos. Para isso, manipulações na carga de frutos foram realizadas na planta inteira cultivada em experimento de campo na região de Presidente Olegário, Minas Gerais, Brasil (18° 35' 25" S e 46° 19' 20" O; 1045 m de altitude). Os tratamentos consistiram em reduzir as cargas de frutos em seu estágio inicial de desenvolvimento a 0%, 30%, 60% e controle mantendo 100% do frutos na árvore. Este estudo demonstrou que a alta carga de frutos prejudica principalmente o crescimento da vegetação nova, mas sem nenhum efeito sobre as folhas e ramos já formados. Também foi evidenciado que a alta carga de frutos promove competição entre os frutos afetando o seu tamanho e sua massa unitária. Essa redução do crescimento vegetativo e de frutos se deve principalmente pelo esgotamento de amido nos ramos que contribuem fortemente para o aporte de carbono para os órgãos dreno. A folha velha fornece sacarose para promover o crescimento vegetativo e de frutos, mas esse suprimento de carbono parece não ser suficiente para manutenção do crescimento dos frutos em excesso. Neste caso, o amido é então consumido dos ramos dessas plantas resultando no aumento do teor de sacarose nos ramos e folhas maduras, os quais são os maiores responsáveis por destinar carbono para o crescimento e desenvolvimento dos frutos. Em plantas com carga de frutos reduzida, os órgãos fonte de carbono são diferentes das plantas com alta produção de frutos. Neste caso, o ramo e folha madura fornecem sacarose para o crescimento da vegetação nova e frutos sem gasto aparente do amido acumulado nos ramos. As folhas e os ramos velhos são os principais contribuintes imediatos de nitrogênio, mas os ramos são os principais órgãos fonte desse nutriente tendo grande capacidade de armazenar nitrogênio e de disponibilizá-lo para as plantas sob alta produção de frutos. Assim, o nitrogênio e carbono armazenado nos ramos têm papel fundamental para tamponar a depleção desses nutrientes causada pelo número excessivo de drenos metabólicos. Os frutos das plantas com carga reduzida parecem ter sido sombreados pelo abundante crescimento de folhas e ramos de forma distinta dos frutos oriundos das plantas com carga excessiva de frutos. Esse sombreamento parece ter ocasionado menor grau de maturação dos frutos dessas plantas em razão do aumento dos compostos fenólicos e redução de pectina e antocianina nos frutos e/ou nos seus tecidos. Entretanto, esse efeito sobre a maturação dos frutos é tênue não alterando a quantidade de sacarose e aminoácidos solúveis totais nos frutos e em nenhum dos tecidos que os compõem. Utilizando uma abordagem metabolômica, foi confirmada que os ácidos orgânicos foram influenciados pelo menor grau de maturação dos frutos oriundos das plantas com carga reduzida. Essa evidência também suporta a ideia de que o maior crescimento vegetativo das plantas com carga reduzida pode aumentar o tempo de maturação dos frutos. Analisando o perfil de aminoácidos, foi confirmada que as folhas velhas e maduras são os órgãos fonte principais de nitrogênio para os drenos fisiológicos. A redistribuição de nitrogênio dessas folhas na forma de asparagina, glutamina, tirosina e fenilalanina para os drenos ocorreu em plantas com carga de frutos excessiva. Esse fluxo de nitrogênio para os drenos fisiológicos em conjunto com a degradação de proteínas dos ramos dessas plantas culminaram com aumento de fenilalanina nos grãos, glutamina e aspartato nos frutos e alanina nas folhas novas em comparação com as plantas com carga de frutos reduzida. Houve estímulo da síntese de putrescina nos grãos provavelmente como um mecanismo para reajustar o fluxo de carbono e nitrogênio no organismo vegetal inicialmente perturbado em resposta à carga de frutos. Neste sentido, novas investigações pré e pós traducionais precisam ser desenvolvidas a fim de elucidar a interrelação do metabolismo de carbono e nitrogênio para a homeostase de seus metabólitos em resposta à carga de frutos.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L.; Bienalidade de produção; Relação fonte-dreno; Fenologia do cafeeiro

ABSTRACT

Partition of carbon and nitrogen in coffee arabica in response to fruit load

Coffee plants (*Coffea arabica* L.) have a biennial production pattern because of the competition between vegetative and reproductive growth occurring at the same time. The quantification of carbon and nitrogen compounds as well as the metabolic profile of these compounds were investigated in order to identify possible changes in the growth of the tissues of productive branch of the coffee tree in response to the fruit load. The effects of fruit loading were studied in four phenological stages (initial expansion, final expansion, fruit granulation and maturation), evaluating the growth of old, mature and young leaves; the section of the branches in which they are inserted, as well as the fruits. For this, manipulations in the fruit load were carried out on the whole plant cultivated in a field experiment in the region of Presidente Olegário, Minas Gerais, Brazil (18 ° 35' 25" S and 46° 19' 20" O; 1045 m level). The treatments consisted in reducing the loads of fruits in their initial stage of development to 0%, 30%, 60% and control maintaining 100% of the fruits in the tree. This study showed that the high fruit load mainly impairs the growth of young vegetation, but with no effect on already formed leaves and branches. It was also evidenced that the high fruit load promotes competition among the fruits affecting its size and its unit mass. This reduction of vegetative and fruit growth is mainly due to the depletion of starch in the branches that contribute strongly to the carbon supply to the sink organs. Old leaf provides sucrose to promote fruit and vegetative growth, but this carbon supply does not seem to be sufficient to maintain excess fruit growth. In this case, the starch is then consumed from the branches of these plants resulting in the increase of the sucrose content in the mature branches and leaves, which are the main responsible for allocating carbon for the growth and development of the fruits. In plants with reduced fruit load, the carbon source organs are different from plants with high fruit yield. In this case, the branch and mature leaf provide sucrose for the growth of young vegetation and fruit without apparent expense of starch accumulated in the branches. The old leaves and branches are the main immediate contributors of nitrogen, but the branches are the main source organs of this nutrient having great capacity to store nitrogen and to make it available to the plants under high yield of fruits. Thus, the nitrogen and carbon stored in the branches play a fundamental role in buffering the depletion of these nutrients caused by the excessive number of metabolic sinks. The fruits of the plants with reduced load seem to have been shaded by the abundant growth of leaves and branches of distinct form of the fruits originating from the plants with high fruit load. This shading seems to have caused a lower degree of maturation of the fruits of these plants due to the increase of phenolic compounds and reduction of pectin and anthocyanin in fruits and/or their tissues. However, this effect on fruit maturation is tenuous without altering the amount of sucrose and total soluble amino acids in the fruits and in none of the tissues that compose them. Using a metabolomic approach, it was confirmed that the organic acids were influenced by the lower degree of maturation of fruits from the plants with reduced load. This evidence also supports the idea that the higher vegetative growth of the plants with reduced load can increase the maturation time of the fruits. Analyzing the amino acid profile, it was confirmed that the old and mature leaves are the main source organs of nitrogen for the physiological sinks. The nitrogen redistribution of these leaves as asparagine, glutamine, tyrosine and phenylalanine to the drains occurred in plants with excessive fruit load. This nitrogen flow to the physiological sinks together with the protein degradation of the branches of these plants culminated with increase of phenylalanine in the grains, glutamine and aspartate in the fruits and alanine in the young leaves compared to the plants with reduced fruit load. There was stimulation of putrescine synthesis in the grains probably as a mechanism to readjust the carbon and nitrogen flux in the initially disturbed plant organism in response to the fruit load. Thus, new pre- and post-translational research needs to be developed in order to elucidate the interrelation of carbon and nitrogen metabolism to the homeostasis of its metabolites in response to fruit load.

Keywords: *Coffea arabica* L.; Biennial production; Source-sink relationship; Coffee phenology

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Dados climáticos da área experimental durante a safra 2017/2018. A seta com linha tracejada indica a data que foi realizado o desbaste de frutos e as épocas de avaliação. As épocas de avaliação foram expressas em dias após o desbaste (DAT). 23
- Figura 2.** Esquema da marcação dos ramos localizados no terço médio das plantas de café arábica. OL – folhas velhas; ML – folhas maduras, YL – folhas novas; F - frutos. 24
- Figura 3.** Número de folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C); comprimento do ramo velho, (D), ramo maduro (E) e ramo novo (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$ 30
- Figura 4.** Comprimento de folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C); largura da folha velha (D), largura da folha madura (E) e largura da folha nova (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$ 31
- Figura 5.** Área da folha velha (A), madura (B) e nova (C) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL (%) – carga de frutos; AGV – média. $n = 4$ 32
- Figura 6.** Número de frutos por ramo (A), massa fresca por unidade de fruto (B), massa fresca total de frutos por ramo (C), massa fresca da casca e do grão por unidade de fruto (D) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$ 33
- Figura 7.** Diâmetro (A) e comprimento (B) de frutos em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (C, 34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (D, 61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (E, 143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (F e G, 219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$ 34
- Figura 8.** Processo de variação da idade fenológica dos tecidos durante os estádios de avaliação expressos em dias após o desbaste (DAT). O último par de folhas, do ápice para a base, da secção do ramo foi padronizado para as avaliações biométricas de folhas. 35
- Figura 9.** Clorofila a em folhas velhas (A), folhas maduras (B) e folhas novas (C); clorofila b em folhas velhas (D), folhas novas (E) e folhas novas (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$ 36

Figura 10. Clorofila total em folha velhas (A), folhas maduras (B) e folhas novas (C); carotenóides em folhas velhas (D), folhas novas (E) e folhas novas (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$ 37

Figura 11. Relação da clorofila a/ clorofila b em folha velhas (A), folhas maduras (B) e folhas novas (C); índice spad em folhas velhas (D), folhas novas (E) e folhas novas (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$ 38

Figura 12. Mapa de correlação entre o crescimento vegetativo e de frutos obtidos por meio dos coeficientes de correlação de pearson. As células vazias indicam valores não significativos pelo teste de correlação de pearson ($p > 0,05$). Os círculos vermelhos apresentam correlações negativas e os círculos azuis apresentam correlações positivas ($p < 0,05$). A escala de cores mostra a intensidade das correlações. 39

Figura 13. Açúcar solúvel total em folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C), ramo velho (D), ramo maduro (E) e ramo novo (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$ 42

Figura 14. Sacarose em folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C), ramo velho (D), ramo maduro (E) e ramo novo (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$ 43

Figura 15. Açúcar solúvel total no fruto (A), na casca e no grão (B); sacarose no fruto (C), na casca e no grão (D) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$ 44

Figura 16. Amido em folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C), ramo velho (D), ramo maduro (E) e ramo novo (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$ 45

Figura 17. Teste histoquímico para detecção de amido nas secções transversais do ramo plagiotrópico do cafeeiro no estágio de maturação de frutos. A – ramo velho com 0% de carga de frutos. B – ramo maduro com 0% de carga de frutos. C – ramo novo com 0% de carga de frutos. D – ramo velho com 100% de carga de frutos. E – ramo maduro com 100% de carga de frutos. F – ramo novo com 100% de carga de frutos. Md = medula; xm = xilema; pm = floema; cx = córtex. As setas indicam regiões de armazenamento de amido nos tecidos do caule do cafeeiro. 46

Figura 18. Açúcares redutores em folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C), ramo velho (D), ramo maduro (E) e ramo novo (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. n = 4. 47

Figura 19. Amido no fruto (A), na casca e no grão (B); açúcares redutores no fruto (C), na casca e no grão (D) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. n = 4. 48

Figura 20. Pectina na casca do fruto em razão da carga de frutos no estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). Dados da média $\pm$ erro padrão; n = 4. 50

Figura 21. Antocianina na casca do fruto em razão da carga de frutos no estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). Dados da média $\pm$ erro padrão; n = 4. 50

Figura 22. Compostos fenólicos totais no fruto em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). Dados da média $\pm$ erro padrão; n = 4. 51

Figura 23. Compostos fenólicos totais na casca e no grão em razão da carga de frutos no estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). n = 4. 51

Figura 24. Aminoácidos em folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C), ramo velho (D), ramo maduro (E) e ramo novo (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. n = 4. 53

Figura 25. Proteína solúvel em folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C), ramo velho (D), ramo maduro (E) e ramo novo (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. n = 4. 54

Figura 26. Aminoácidos no fruto (A), na casca e no grão (B); proteína solúvel no fruto (C), na casca e no grão (D) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. n = 4. 55

Figura 27. N-proteico em folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C), ramo velho (D), ramo maduro (E) e ramo novo (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. n = 4..... 56

Figura 28. Nitrato solúvel em folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C), ramo velho (D), ramo maduro (E) e ramo novo (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. n = 4..... 58

Figura 29. Nitrato no fruto (A), na casca e no grão (B); n-proteico no fruto (C), na casca e no grão (D) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. n = 4. 59

Figura 30. Principais compostos polares identificados em amostras de folha velha em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Valores relativos à media de cada composto. GABA - ácido gama-aminobutírico; 4-CQA – ácido-3-cafeoilquínico. Compostos com a coloração cinza não foram identificados. n = 3. 61

Figura 31. Principais compostos polares identificados em amostras de folha madura em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Valores relativos à media de cada composto. GABA - ácido gama-aminobutírico; 4-CQA – ácido-3-cafeoilquínico. Compostos com a coloração cinza não foram identificados. n = 3. 62

Figura 32. Principais compostos polares identificados em amostras de folha nova em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Valores relativos à media de cada composto. GABA - ácido gama-aminobutírico; 4-CQA – ácido-3-cafeoilquínico. Compostos com a coloração cinza não foram identificados. n = 3. 63

Figura 33. Principais compostos polares identificados em amostras de frutos em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Valores relativos à media de cada composto. GABA - ácido gama-aminobutírico; 4-cqa – ácido-3-cafeoilquínico. Compostos com a coloração cinza não foram identificados. n = 3. 64

Figura 34. Principais compostos polares identificados em amostras de casca do fruto em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Valores relativos à media de cada composto. GABA - ácido gama-aminobutírico; 4-CQA – ácido-3-cafeoilquínico. Compostos com a coloração cinza não foram identificados. n = 3. 65

Figura 35. Principais compostos polares identificados em amostras de grão em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Valores relativos à media de cada composto. GABA - ácido gama-aminobutírico; 4-cqa – ácido-3-cafeoilquínico. Compostos com a coloração cinza não foram identificados. n = 3..... 66

Figura 36. Asparagina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. n = 3; *metabólito não identificado para um ou mais tratamentos..... 67

Figura 37. Tirosina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$; *metabólito não identificado para um ou mais tratamentos. 68

Figura 38. Fenilalanina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$ 69

Figura 39. Glutamina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$ 70

Figura 40. Alanina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$; *metabólito não identificado para um ou mais tratamentos. 71

Figura 41. Aspartato em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$ 72

Figura 42. Ornitina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$; *metabólito não identificado para um ou mais tratamentos. 73

Figura 43. Glicina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$ 74

Figura 44. Serina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$ 75

Figura 45. Prolina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$ 76

Figura 46. Valina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$ 77

Figura 47. Leucina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$ 78

Figura 48. Putrescina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$ 79

Figura 49. Papel do glutamato como precursor de vários metabólitos em plantas e interação das vias envolvidas na biossíntese de aminoácidos em plantas. Mohapatra et al. (2009). 81

Figura 50. Malato em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$; *metabólito não identificado para um ou mais tratamentos. 83

Figura 51. Glutarato em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$ 84

Figura 52. Fumarato em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$ 85

Figura 53. Ácido-4-cafeoilquínico (4-CQA) em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$; *metabólito não identificado para um ou mais tratamentos. 86

Figura 54. Chiquimato em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$; *metabólito não identificado para um ou mais tratamentos. 87

Figura 55. Sucinato em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$ 88

Figura 56. Galactinol em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Ns – as cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$ 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise química do solo nas camadas de 0 a 20 cm e 20 a 40 cm.	23
Tabela 2. Descrição dos tratamentos.	25

1. INTRODUÇÃO

1.1. Uma visão geral sobre a bienalidade de produção do cafeeiro

A planta de café pertence à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea* no qual apresenta mais de 100 espécies catalogadas (DAVIS; GOVAERTS; STOFFELEN, 2006). Entretanto, apenas duas espécies apresentam relevância comercial: *Coffea arabica* L. (café arábica), que representa cerca de 64% da produção mundial de café, e *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehmer (café robusta), que representa aproximadamente 35% dessa produção (DAMATTA et al., 2007). A importância econômica do setor cafeeiro é muito expressiva, sendo a segunda maior commodity do mundo, atrás apenas do petróleo (DAVIS et al., 2012; ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

O café arábica é a espécie mais cultivada por apresentar melhor qualidade de bebida em razão de características como baixo amargor, menor quantidade de cafeína e melhor flavor, sabor mais doce e fragância aromática comparado ao café robusta (ROMANO et al., 2014; KEIDEL et al., 2010; LEROY et al., 2006). A espécie *C. arabica* tem como centro de origem e diversidade o sudoeste da Etiópia, região de terras altas tropicais com altitudes entre 1300 a 2800 m com temperatura média diária entre 18 e 22 °C (JHA et al., 2014). No Brasil, os cultivares de café arábica mais cultivados são o “Catuaí” e “Mundo Novo”, mas outros cultivares também apresentam relevância econômica (DAMATTA et al., 2007).

A planta de café é uma árvore perene que apresenta dimorfismo de ramos: ortotrópicos e plagiotrópicos. Os primeiros crescem verticalmente em razão da sua dominância apical, formando, por assim dizer, a arquitetura primária da planta. Já os plagiotrópicos crescem horizontalmente e são responsáveis pela produção de frutos. A partir de gemas localizadas no ramo ortotrópico, denominadas “cabeça de série”, ocorre a emissão do ramo plagiotrópico primário, que também possui gemas “cabeça de série” que originam os ramos plagiotrópicos de maior ordem. Já no ramo ortotrópico primário, estão presentes as “gemas seriadas”, localizadas na axila da folha e responsáveis por originar o ramo ortotrópico secundário (“ramo ladrão”). O crescimento do ramo é tipicamente monopodial, apresentando folhas que crescem em pares opostos dos ramos e na axila dessas folhas estão presentes as “gemas seriadas”, que têm finalidade de originar os órgãos reprodutivos (CANNEL, 1985). Essas gemas desenvolvem inflorescências relativamente distantes do ápice e o processo de florescimento é desencadeado por um curto período de seca, com duração de dois a quatro meses, seguido de um período de chuva consistente (HAARER, 1958).

O crescimento vegetativo e de frutos geralmente ocorrem simultaneamente, o que aumenta a competição entre os dois processos pelos recursos disponíveis (e. g., nitrogênio e carbono fotoassimilado). A competição entre o crescimento vegetativo e de frutos tem sido bem documentada também em outras espécies lenhosas, incluindo citrus (RIVAS; GRAVINA; AGUSTÍ, 2007; IGLESIAS et al., 2002), manga (URBAN; LU; THIBAUD, 2003) e pêssego (DUAN et al., 2007; LI et al., 2008).

As plantas de café enfrentam flutuações anuais de alta e baixa produção de frutos. Essas flutuações na produção de frutos ocorrem porque o processo de competição pelos fotoassimilados e nutrientes disponíveis é dinâmico e varia durante o desenvolvimento vegetal. O carbono que é incorporado em tecidos fotossinteticamente ativos pode ser transportado do local de assimilação para outros órgãos da planta, utilizado para produção de energia, ou armazenado na forma de amido (LEMOINE et al., 2013). O transporte de carbono ocorre principalmente na forma de sacarose que é mediado pela coordenação entre a disponibilidade e a demanda metabólica dos tecidos (LALONDE et al., 1999). Assim, os órgãos fonte são aqueles que possuem capacidade fotossintética acima de sua demanda, e o excedente produzido é transportado para órgãos dreno, que têm produção de fotoassimilados insuficiente ou

inexistente para suprir a sua exigência (LEMOINE et al., 2013). Dessa forma, os órgãos vegetais são hierarquizados de drenos fracos a drenos fortes, com base na sua atividade metabólica e distância dos órgãos fonte (MAZORRA et al., 2003; FISHER et al., 2012).

A relação do fluxo do carbono anteriormente descrita, chamada fonte-dreno, pode sofrer mudanças ao longo do desenvolvimento vegetal, como descrito por Su-May et al. (2015), os quais classificaram a semente como matriz energética inicial e depois sua transformação em plântula a partir de um embrião. Durante o crescimento e desenvolvimento vegetativo, as plantas contam com a energia da fixação de CO₂ em folhas maduras para suprimento de carbono para os órgãos dreno, como as folhas novas. Já no estágio reprodutivo, os fotoassimilados e nutrientes são transportados das folhas maduras para as folhas novas, flores, frutos e sementes. Durante a senescência, as folhas velhas ainda mantêm papel importante como órgãos fontes para o crescimento e desenvolvimento de frutos e outros tecidos que são drenos fisiológicos. O processo de senescência é complexo e, em parte, isto se deve ao maquinário metabólico que tem a função de desconstruir estruturas e moléculas para reutilizar carbono e nitrogênio, direcionando-os para os drenos (FELLER; FISHER, 1994; OSORIO et al., 2014). A proteólise em folhas velhas ocorre de maneira mais intensa concomitantemente à sua senescência e os aminoácidos livres são transportados via xilema e floema a longas distâncias. Para o transporte de nitrogênio, além dos aminoácidos livres, este pode ocorrer também na forma de amida (TEGEDER; RENTSCH, 2010).

O transporte de carboidratos é regulado pela atuação sequencial das enzimas sacarose P-sintase e sacarose-6-P-fosfatase, as quais sintetizam sacarose para ser transportada. Mesmo que diminuta, a biossíntese de sacarose pode também ocorrer pela ação da enzima sacarose sintase. Assim, a regulação da partição de carboidratos pode ocorrer em virtude da atividade dessas enzimas e também pela atuação de invertases que degradam sacarose em hexoses para vias de síntese que demanda grande quantidade de energia celular (HUBER; HUBER, 1996). O metabolismo do carbono apresenta uma relação muito íntima com o metabolismo do nitrogênio, sendo suas vias de assimilação reguladas entre si, o que pode gerar uma cascata de modificações, as quais alteram o padrão do fluxo do carbono fotoassimilado e de nitrogênio nas plantas. O metabolismo do nitrogênio fornece enzimas e pigmentos fotossintéticos para o metabolismo do carbono, enquanto que o carbono fotoassimilado pode ser direcionado para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, onde o 2-oxoglutarato será formado e utilizado no processo de assimilação de nitrogênio (HOFSTRA et al., 1985; WARING et al., 1985; FICHTNER; SCHULZE, 1992; STITT; SCHULZE, 1994; STITT, 1999).

O antagonismo dinâmico entre o crescimento vegetativo e de frutos implica que nos anos de alta produção, o cafeeiro privilegia o direcionamento do carbono fotoassimilado e de nitrogênio para o crescimento e desenvolvimento dos frutos, enquanto que o suprimento de carbono e nitrogênio para o crescimento vegetativo é limitado. No ano seguinte, com menos frutos, a planta investe fotoassimilados e nutrientes para o crescimento de ramos e folhas de modo a recuperar a área foliar anteriormente limitada. Esse fenômeno ocorre porque os frutos de café são drenos prioritários, com aporte de matéria seca que pode ser quatro vezes maior que aquela alocada para o crescimento dos ramos (VAAST et al., 2006; 2005). Na fase de enchimento, os frutos acumulam mais de 95% do nitrogênio, fósforo e potássio absorvidos pela planta (CANNELL, 1985) e isto compromete o aporte de carbono fotoassimilado e nutrientes para a formação de gemas responsáveis pela emissão de novos ramos e folhas. Nos anos de baixa produção de frutos, parte do carbono fotoassimilado é usado para o crescimento vegetativo e o excedente é armazenado na forma de amido, o que garante a produção do ano seguinte, que será um ano de alta produção. Assim, o ciclo se alterna bienalmente (DAMATTA et al., 2007).

1.2. Bienalidade de produção do cafeeiro: o estado da arte

As relações entre a fonte e o dreno são centrais para o crescimento e o desempenho das culturas porque elas mediam o fluxo de carbono no organismo vegetal. Os compostos assimilados produzidos principalmente pelas folhas durante o processo de fotossíntese são translocados por toda a planta para satisfazer a demanda pelo carbono e energia que serão responsáveis pela formação de tecidos novos e em desenvolvimento. Esse transporte ocorre do órgão fonte para o órgão dreno, sendo que o primeiro possui capacidade fotossintética acima de sua demanda e o excedente produzido é transportado para órgãos dreno, que têm produção de fotoassimilados insuficiente ou inexistente para suprir a sua exigência (LEMOINE et al., 2013).

A matéria seca que se divide entre os órgãos dreno de uma planta é regulada principalmente pelos próprios órgãos dreno, sendo a taxa de crescimento potencial (capacidade potencial de acumular fotoassimilados) um parâmetro importante para determinar a força do dreno (MARCELIS, 1996). Dessa forma, os órgãos vegetais são hierarquizados de drenos fracos a drenos fortes, com base na sua atividade metabólica e distância dos órgãos fonte (MAZORRA et al., 2003; FISHER et al., 2012). Algumas espécies arbóreas perenes tendem a florescer e produzir muitos frutos gerando uma competição por fotoassimilados e nutrientes entre os órgãos dreno, como os frutos, ramos e folhas novas. Esse processo de competição ocorre em muitas espécies, como por exemplo, em videira (PETRIE; TROUGHT; HOWELL, 2000), citros (GUARDIOLA; GARCIA-LUIS, 2000), pêra (DUAN et al., 2008), mirtilo (JORQUERA-FONTENA, 2014) e maçã (SAMUOLIENĖ et al., 2016).

Em plantas de café (*Coffea arabica* L.) também ocorre esse fenômeno natural de competição entre o crescimento vegetativo e reprodutivo. A consequência desta competição é o que se chama “bienalidade de produção”, que é caracterizada pelo comprometimento da produção de frutos alternadamente ao crescimento vegetativo. Esse processo ocorre porque os fotoassimilados e nutrientes nos anos de alta produção são destinados para suportar o crescimento e desenvolvimento de frutos que são drenos prioritários, o que poderia, caso contrário, ser usado para fomentar o crescimento vegetativo. No ano seguinte, a planta destina os recursos para aumentar a produção de ramos e folhas visando aumentar a superfície fotossintética em detrimento da produção de frutos. Assim, as plantas de café enfrentam flutuações interanuais de alta e baixa produção de frutos (BOTE; JAN 2016; DAMATTA et al., 2009; VAAST et al., 2006; FRANCK et al., 2006).

Vários trabalhos liderados por Cannell mostraram a bienalidade de produção do cafeeiro (CANNELL; HUXLE, 1969; CANNELL, 1971a; CANNELL, 1971b). Esses estudos evidenciaram principalmente o antagonismo do crescimento vegetativo com a produção de frutos e partição de matéria seca neste processo competitivo, assim como a competição por carboidratos entre os frutos durante os ciclos de produção e seu impacto negativo no tamanho e qualidade da bebida. Embora haja competição por carboidratos, Cannell (1971c) observou que a retirada de flores em plantas de café reduziu a taxa fotossintética líquida em cerca de 30%. Vaast et al. (2006) e Franck et al., (2006) também observaram redução da taxa fotossintética líquida em plantas de café sem frutos comparadas às plantas com carga de frutos. Esses autores afirmaram que o maior acúmulo de carboidratos em plantas desbastadas pode reduzir a atividade fotossintética por retroalimentação negativa – o produto da reação enzimática regula o seu próprio anabolismo. O acúmulo excessivo de amido pode até causar danos ao fotossistema II, e certamente levar à diminuição da difusão de CO₂ e, ou no acúmulo de amido nos cloroplastos (IGLESIAS et al., 2002). Esse processo de regulação, indica que o menor acúmulo de amido em plantas com alta produção pode estimular a atividade fotossintética para suprimimento da alta demanda metabólica e de construção celular dos órgãos dreno (STITT, 1991). Por isso, alguns estudos com cafeeiro não observaram um padrão consistente entre redução do crescimento da parte aérea e limitação de carboidratos armazenados (CHAVES-FILHO et al., 2008; CARVALHO et al., 1993; DAMATTA et al., 2008). De toda maneira, a bienalidade de produção é indesejável para os cafeicultores porque promove instabilidade na produção

e na qualidade dos frutos (BOTE; JAN, 2016). Além disso, o desequilíbrio severo da relação fonte-dreno decorrente da bienalidade de produção pode resultar em morte descendente de ramos (DAMATTA et al., 2007). A regulação da fotossíntese por retroalimentação negativa em resposta ao acúmulo de amido nas folhas controla a fixação e partição de carbono, mas não evita efeitos da competição entre o crescimento vegetativo e a produção de fruto no cafeeiro (DAMATTA et al., 2008). Portanto, fatores adicionais podem contribuir para ocorrência deste processo, como por exemplo, a competição por nitrogênio entre os órgãos dreno. Recentemente, Bote e Jan (2016) revelaram que área foliar, número de folhas e crescimento do ramo foram prejudicados pela carga excessiva de frutos nas plantas de café. Além disso, o tamanho e massa dos frutos, e a qualidade da bebida são reduzidas em plantas de café com alta produção de frutos, assim como redução do teor de nitrogênio foliar (BOTE; JAN, 2017; 2016). Essa redução de nitrogênio foliar em resposta à carga de frutos ocorre porque mais de 95% do nitrogênio absorvido pela planta é acumulada nos frutos (CANNEL, 1985).

Poucas informações foram geradas no sentido de esclarecer os efeitos da manipulação da carga de frutos sobre o fluxo de nitrogênio, e de que maneira esse nutriente contribui para a ocorrência da bienalidade de produção. Além disso, sabe-se que o metabolismo do carbono apresenta uma relação muito íntima com o metabolismo do nitrogênio, sendo suas vias de assimilação reguladas entre si, o que pode gerar uma cascata de modificações, as quais alteram o padrão do fluxo do carbono fotoassimilado e nitrogênio nas plantas (STITT, 1999). O metabolismo do nitrogênio fornece enzimas e pigmentos fotossintéticos para o metabolismo do carbono, enquanto que o carbono fotoassimilado pode ser direcionado para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, onde o 2-oxoglutarato será formado e utilizado no processo de assimilação de nitrogênio (HOFSTRA et al., 1985; WARING et al., 1985; FICHTNER; SCHULZE, 1992; STITT; SCHULZE, 1994; STITT, 1999). Ding et al. (2017) observaram que a baixa e média carga de produção de macieira (*Malus domestica*) resulta em maior teor de nitrogênio e clorofilas nas folhas, mas com diluição desse nutriente nos frutos à medida que se reduz a carga produtiva. Além disso, a taxa de utilização do ^{15}N dos tratamentos com baixa e média carga de produção foram maiores em 1,33 e 1,35 vezes, respectivamente, quando comparadas ao tratamento de carga de alta carga de produção. Ou seja, nos tratamentos com baixa e média produção houve aumento da capacidade de absorção de nitrogênio pelas raízes. Segundo os mesmos autores, isto está relacionado com a competição existente entre a parte aérea e as raízes porque os produtos fotossintéticos são transportados principalmente para os frutos. Assim, as raízes estarão com déficit energético devido aos carboidratos serem insuficientes, restringindo a atividade das raízes para absorção de nutrientes e da água.

Bote e Jan (2016) observaram que houve maior perda de folhas em função do aumento da carga de frutos ao longo do desenvolvimento do cafeeiro. Os mesmos autores verificaram que o crescimento do ramo e o teor de nitrogênio foliar estavam inversamente associados com a carga de frutos. Em uma situação de alta carga de produção, a deficiência de nitrogênio nos órgãos fonte é frequentemente observada (RAMALHO et al., 1998; 2000). Como relatado por Ramalho et al. (1998) e DaMatta et al. (2002), a redução no conteúdo de nitrogênio pode provocar excesso de energia no aparato fotossintético, resultando em estresse oxidativo e danos celulares no cafeeiro, proporcionado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (RAMALHO et al., 1998; 2000; FORTUNATO et al., 2010; POMPELLI et al., 2010). O nitrogênio tem grande participação para atingir alta produtividade e qualidade de frutos (DAMATTA et al., 2002), mas ainda não está esclarecida a dimensão do seu envolvimento na ocorrência da bienalidade de produção do cafeeiro.

Mesmo com diversos trabalhos acerca da bienalidade de produção do cafeeiro citados acima, o assunto ainda carece de informações precisas ou detalhadas sobre o padrão de redistribuição do carbono e, principalmente, do nitrogênio entre os diferentes compartimentos de um ramo em frutificação (fonte, dreno fraco a dreno forte). Pouco

se sabe em café sobre a contribuição metabólica das folhas velhas e maduras para o enchimento dos frutos e como isto afeta o ramo produtivo, em particular a manutenção do crescimento de tecidos novos e em desenvolvimento, e quais compostos fazem parte desta redistribuição.

1.3. Objetivos

Desta maneira, o presente trabalho utilizou técnicas histoquímicas, bioquímicas e metabolômicas para caracterizar o perfil de redistribuição de carbono e nitrogênio entre diferentes tecidos de um ramo em produção (folhas desenvolvidas em nós com frutos, folhas desenvolvidas em nós sem frutos, folhas novas, ramo suportando estas folhas, endosperma/semente e casca dos frutos) em resposta à carga de frutos e ao longo do desenvolvimento do cafeeiro. Acredita-se que a quantidade de informações geradas pelas análises de crescimento e do metabolismo de carbono e nitrogênio poderá servir como base para estudos futuros para maior esclarecimento do processo de competição entre o crescimento vegetativo e de frutos em café arábica, espécie de grande valor econômico para o Brasil e o mundo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área experimental e dados climáticos

O experimento foi realizado entre os meses de novembro de 2017 a junho de 2018 em uma área agrícola comercial localizada no município de Presidente Olegário, Minas Gerais, Brasil ($18^{\circ} 35'25''$ S e $46^{\circ}19'20''$ O; 1045 m de altitude). O solo da área é classificado como Oxisols (US Taxonomy). A análise química do solo foi realizada antes da instalação do experimento nas camadas de 0-20 cm e de 20-40 cm (Tabela 1).

Tabela 1. Análise química do solo nas camadas de 0 a 20 cm e 20 a 40 cm.

Camada do solo (cm)	pH (H ₂ O)	Matéria orgânica g kg ⁻¹	P mg / dm ³	K mg / dm ³	Ca mg / dm ³	Mg mg / dm ³	Al cmolc dm ³	H+Al cmolc dm ³	SB cmolc dm ³	CTC cmolc dm ³	V %	m
00-20	5.57	4.97	13.00	150.30	3.68	0.98	0.017	7.22	5.05	12.27	41.24	3.95
20-40	4.78	----	4.09	45.00	0.46	0.20	1.67	13.27	0.78	14.05	5.52	68.30

O clima, conforme classificação de Koppen, é do tipo Aw, com média pluviométrica anual de 1.600 mm. A temperatura média anual é de 21,2°C, com máxima de $29,1 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ e mínima de $16,1 \pm 2,2^{\circ}\text{C}$. Dados climáticos foram obtidos da estação meteorológica localizada próxima da área experimental (Figura 1).

Figura 1. Dados climáticos da área experimental durante a safra 2017/2018. A seta com linha tracejada indica a data que foi realizado o desbaste de frutos e as épocas de avaliação. As épocas de avaliação foram expressas em dias após o desbaste (DAT).

2.2. Cultivo das plantas e instalação do experimento

As plantas de café arábica (*Coffea arabica* L.) cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 de seis anos de idade estão plantadas com o espaçamento de 3,8 m entrelinhas e 0,55 entre plantas, resultando em 4784 plantas ha⁻¹. As plantas irrigadas por gotejamento, com lâmina de água aplicada em função da evapotranspiração da cultura.

No dia 11/11/2017, quando as plantas apresentavam frutos em estágio inicial de desenvolvimento (“chumbinho”), dois ramos produtivos de cada lado no sentido da entrelinha foram selecionados do terço médio das plantas (Figura 2). A vegetação nova foi identificada com arame encapado com plástico colorido no último par de folhas presentes no ápice dos ramos do terço médio (Figura 2). Já, a vegetação velha foi identificada marcando a região do ramo sem frutos e altamente lignificada (Figura 2).

Figura 2. Esquema da marcação dos ramos localizados no terço médio das plantas de café arábica. OL – folhas velhas; ML – folhas maduras, YL – folhas novas; F - frutos.

O desbaste de frutos foi realizado no estágio inicial de desenvolvimento dos frutos (“chumbinho”) no dia 11/11/2017 e apenas nesta vez. Do número de frutos presentes em cada nó produtivo, realizou-se quatro níveis de desbaste na planta toda, resultando em plantas com carga de frutos de 0%, 30%, 60% e 100% (Tabela 1)

Amostras de frutos, folhas velhas (sem frutos nos nós), maduras (com frutos) e nova, e segmentos de ramos (de cada porção referente às folhas, como: ramo velho, maduro e novo; ver Figura 2) foram coletadas em quatro estádios fenológicos da frutificação: expansão inicial (34 dias após o desbaste), expansão final (61 dias após o desbaste),

granação (143 dias após o desbaste) e maturação (219 dias após o desbaste), que correspondem às coletas realizadas nos dias 14/12/2017, 11/01/2018, 03/04/2018 e 18/06/2018.

Tabela 2. Descrição dos tratamentos.

Tratamento	Desbaste (%)	Frutos na planta (%)
T0	100	0
T30	70	30
T60	40	60
T100	0	100

O desbaste de frutos foi feito na planta inteira.

Após as coletas, as amostras foram colocadas em sacos plástico, transportadas em isopor com gelo até o laboratório, de tal forma que o metabolismo fosse bastante reduzido. No laboratório, as amostras foram congeladas, liofilizadas, moídas em moinho de bolas e armazenadas em dessecador até as análises bioquímicas. No caso de frutos no estágio de maturação (219 dias após o desbaste), antes disso, eles foram processados, separando-se a casca da semente. Após a secagem no liofilizador, essas amostras foram moídas em moinho de bolas e armazenadas em dessecador até as análises bioquímicas.

2.3. Biometria do crescimento vegetativo e de frutos

Nos mesmos dias das coletas foram feitos a biometria do crescimento vegetativo e de frutos.

Crescimento vegetativo: O número de folhas velhas, maduras e novas por ramo foi determinado e essas mesmas folhas foram fotografadas e analisadas no software ImageJ (<https://imagej.net/Welcome>), que permite a integração de áreas com colorações diferentes para determinar a área foliar em centímetros². A largura e comprimento dessas folhas também foram obtidas. O comprimento do segmento do ramo velho, maduro e novo foram determinados com auxílio de uma fita métrica.

Crescimento de frutos: O número de frutos por ramo foi determinado em todas as avaliações. A massa fresca total de frutos por ramo foi determinada em todas as épocas de coleta com auxílio de balança analítica. As massas frescas da casca fruto⁻¹ e do grão fruto⁻¹ foram determinadas apenas no estágio de maturação (219 dias após o desbaste) pela razão entre a massa de cada tecido e o número de frutos presentes no ramo. O comprimento e diâmetro dos frutos também foram determinados com auxílio de um paquímetro graduado em milímetros.

2.4. Índice SPAD Minolta, clorofila e carotenóides em folhas

Em todas as coletas realizadas, a cor verde das folhas de cada segmento do ramo (folha velha, folha madura e folha nova) foi verificada usando o SPAD Minolta. A extração de pigmentos foliares foi realizada no escuro com DMSO (dimetilsulfóxido) utilizando 1 mL por 50 mg de tecido liofilizado. Após extração por 24h no escuro, o sobrenadante foi recuperado por centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. O extrato obtido foi usado para determinar

teor de clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b) e carotenóides (Cx+c). A leitura da absorbância foi realizada com comprimento de onda de 470, 646, 663 nm e os valores foram utilizados nas equações definidas por Lichtenthaler e Wellburn (1983), como segue:

$$\text{Chl a} = 13,95 \times \text{Abs663} - 6,88 \times \text{Abs646}$$

$$\text{Chl b} = 24,96 \times \text{Abs646} - 7,32 \times \text{Abs663}$$

$$\text{Cx+c} = (1000 \times \text{Abs470} - 2,05 \times \text{Chl a} - 114,80 \times \text{Chl b}) / 245$$

2.5. Extração e dosagem de carboidratos

A extração foi realizada com etanol a 70%, utilizando-se 1 mL por 100 mg de tecido liofilizado. A extração prosseguiu durante 10 min a 80 °C em tubos selados com tampa e o sobrenadante foi obtido após centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. Esse processo foi realizado seis vezes com o mesmo volume de etanol e os sobrenadantes combinados foram utilizados para a quantificação de carboidratos. O extrato combinado foi utilizado para dosagem pelo método do fenol sulfúrico de açúcares solúveis totais (DUBOIS et al., 1956) e sacarose (VAN HANDEL, 1968), usando a sacarose como padrão. Os açúcares redutores (AR) foram obtidos pela diferença da concentração de açúcares solúveis totais (AST) e sacarose (SAC), como segue: $\text{AR} = \text{AST} - \text{SAC}$.

Para dosagem de amido, o precipitado foi digerido 2x com 1,2 mL de ácido perclórico a 30% (YEMM; WILLIS, 1954) e o sobrenadante foi obtido após centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. Os extratos combinados foram usados para dosagem de amido pelo método do fenol sulfúrico, usando glicose como padrão (DUBOIS et al., 1956). Todas as leituras de absorbância foram realizadas com espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 490 nm.

2.6. Análise histoquímica: detecção de amido nos ramos

Secções transversais foram realizadas da região correspondente ao ramo velho, ramo maduro e ramo novo. As amostras foram cortadas (0,5 – 1 mm) a fresco, sendo rapidamente submersas em solução aquosa contendo 5 mM de ácido ascórbico para evitar oxidação. Os cortes frescos obtidos foram colocados em lâminas histológicas e submetida a reação com lugol (JOHANSEN, 1940) sendo, em seguida, observadas ao microscópio de luz e as fotomicrografias obtidas com escala em milímetros.

2.7. Extração e dosagem de compostos nitrogenados

A extração foi realizada com etanol a 70%, sob agitação vigorosa por 1 minuto, utilizando-se 1 mL por 100 mg de tecido liofilizado. A extração prosseguiu durante 10 minutos a 80 °C em tubos selados com tampa e o sobrenadante foi obtido após centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. A extração foi realizada seis vezes com o mesmo volume de etanol e os sobrenadantes combinados foram utilizados para a análise de nitrato e aminoácidos solúveis totais.

A dosagem de aminoácidos solúveis totais foi feita com reagente de ninhidrina (YEMM; COCKING, 1955), usando a glutamina e asparagina para construir a reta padrão. A leitura de absorbância foi realizada com espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 570 nm.

O nitrato foi determinado no extrato conforme a metodologia de Cataldo et al. (1975), usando o nitrato de potássio para construir a reta padrão. A leitura de absorbância foi realizada com espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 410 nm.

A dosagem de proteínas solúveis totais foi realizada após extração de 50 mg de material liofilizado com 1 mL tampão fosfato pH 7,0, contendo 10 mM de ácido ascórbico e 20% de PVPP (polivinilpolipirrolidona) mantidos a 4 °C durante 30 minutos com agitação ocasional (MAZZAFERA; ROBINSON, 2000). O sobrenadante recuperado por centrifugação a 10.000 g por 10 minutos foi usado para dosar proteínas solúveis com o reagente de Bradford (BRADFORD, 1976), usando o reagente comercial da BioRad. Ao precipitado obtido, foi adicionado 1 mL de 1M NaOH e, após extração por 24h, o sobrenadante foi recuperado por centrifugação a 10.000 g por 10 minutos e as proteínas foram dosadas com o reagente de Bradford (BRADFORD, 1976). A leitura de absorbância foi realizada com espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 595 nm. A albumina de soro bovino foi utilizada para construir a reta padrão.

Para quantificar nitrogênio proteico (N-proteico), somou-se a quantidade de proteína do sobrenadante (PS) e do precipitado (PP) e usou o fator de conversão para nitrogênio de 6,25 (JONES, 1931). O nitrogênio proteico foi determinado pela seguinte equação: $N\text{-proteico} = (PP + PS) / 6,25$.

2.8. Determinação de pectina na casca do fruto

A determinação de pectina foi obtida por meio da metodologia descrita por Souza et al. (2013) com algumas modificações. Amostras com 50 mg do material liofilizado foi utilizado para o processo de purificação inicial para análise de pectina. A primeira etapa de purificação consiste na remoção de açúcares solúveis e compostos fenólicos pela adição de 50 mL de etanol 80% com agitação vigorosa por 1 minuto. A extração prosseguiu durante 10 minutos a 80 °C em tubos selados com tampa e o sobrenadante, obtido após a centrifugação a 10.000 g por 10 minutos, foi descartado. Após quatro extrações nas mesmas condições, o material decantado foi seco em estufa a 60 °C por 24 horas. A segunda etapa de purificação consistiu na eliminação de amido da amostra. Ao material decantado e seco anteriormente, foi adicionado 1,5 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) a 90% e mantido sob agitação por 24 horas para extração do amido. O sobrenadante, obtido após a centrifugação a 10.000 g por 10 minutos, foi descartado. Após quatro extrações nas mesmas condições, o material decantado foi seco em estufa a 60 °C por 24 horas. Após a segunda etapa, considerou-se o material precipitado obtido como parede celular bruta, que foi pesada com auxílio da balança analítica. Na última etapa da análise, fez-se o fracionamento da parede celular pela adição de 25 mL de sulfato de amônio 0,5%, a pH 7. Após o banho maria a 100 °C por 60 minutos, o extrato foi obtido por centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. O fracionamento com sulfato de amônio a 0,5%, a pH 7 foi realizado duas vezes e os extratos combinados foram usados para dosagem pelo método do fenol sulfúrico, usando glicose como padrão (DUBOIS et al., 1956). A leitura de absorbância foi realizada com espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 490 nm.

2.9. Determinação de antocianina na casca do fruto

A quantificação de antocianinas foi realizada de acordo com Hughes; Neufeld; Burkey (2005) com algumas modificações. A extração foi realizada com 1 mL de HCl a 6 M: água: metanol (7:23:70,v/v/v) por 50 mg de tecido

liofilizado em tubos de tampa de rosca no escuro a 4 °C por 24 h. Após a centrifugação a 10.000 g por 10 minutos, a leitura de absorbância foi realizada nos comprimentos de onda de 530 e 653 nm e a absorbância líquida das antocianinas (C) foi calculada da seguinte maneira: $C = \text{Abs}_{530} - [0,24] \text{Abs}_{653}$.

2.10. Extração e dosagem de compostos fenólicos totais nos frutos

A extração foi realizada no escuro com metanol 70% sob agitação vigorosa por 1 minuto, utilizando-se 1 mL por 100 mg de tecido liofilizado. O sobrenadante foi obtido após centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. A 40 µL de extrato adicionou-se 460 µL de água destilada e 80 µL de reagente Folin Ciocalteu seguido de incubação no escuro em temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida, adicionou-se 80 µL de carbonato de sódio a 10%, continuando-se a extração sob incubação no escuro em temperatura ambiente por 60 minutos (TABATA et al., 2008). Em seguida, a leitura de absorbância foi realizada com comprimento de onda de 650 nm. O ácido clorogênico foi usado para construir a reta padrão.

2.11. Metabolômica: perfil de metabólitos

Os metabólitos foram extraídos de amostras de folhas, frutos casca e grão, e analisados de acordo com o protocolo descrito por Caldana et al. (2013), utilizando-se cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG-MS). Os dados foram normalizados e transformados conforme descrito por Lisec et al. (2006).

2.12. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições por tratamento. Os tratamentos foram constituídos de quatro níveis de carga de frutos (0%, 30%, 60% e 100% de frutos) e quatro repetições por tratamento, sendo cada planta uma repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância e na ocorrência de significância pelo teste F ($<0,05$), as médias foram submetidas ao teste de Tukey a 5%. Esses resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. As análises de correlação foram realizadas pelo teste de Pearson a 5% de probabilidade. A partir dos dados de metaboloma, utilizou-se a análise de componentes principais (PCA), utilizando-se os critérios estabelecidos por Ruprecht et al. (2011). A estatística foi realizada com auxílio do software R versão R 2.1.2.2 (<http://www.r-project.org>).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Crescimento vegetativo e de frutos em resposta à carga pendente

As Figuras 3 a 5 mostram avaliações biométricas de folhas e ramos durante o desenvolvimento do cafeeiro. É importante salientar que as plantas apresentam ramos plagiotrópicos de segunda ordem, o que justifica o elevado número de folhas (Figura 3A, 3B e 3C). É preciso comentar que as plantas amostradas em cada avaliação (34, 61, 143 e 219 dias após o desbaste) eram plantas diferentes, pois as folhas, ramos e frutos das plantas de cada avaliação foram coletados para análise de laboratório. Logo, provavelmente devido à influência anterior do clima (frio limita o crescimento foliar) nas folhas já formadas (velhas e a maior parte das denominadas maduras) e em função da queda de folhas houve variações entre as datas de avaliações, algumas incongruentes.

Por exemplo, a Figura 3B mostra que a primeira avaliação (34 dias após o desbaste de frutos) as plantas com carga 0% possuíam mais folhas maduras que as plantas dos outros tratamentos. Na avaliação aos 61 dias após o desbaste e depois aos 143 dias após o desbaste houve uma redução abrupta do número de folhas maduras de plantas com carga de 0%. Ou seja, se as folhas maduras já existiam anteriormente ao início dos tratamentos, a única explicação seria a queda de folhas. Entretanto, como justificar isso se houve aumento do número de folhas maduras nos tratamentos com 60 e 100% de frutos após a primeira avaliação? A única explicação seria a variação entre plantas, como comentado acima. De qualquer forma, a informação mais importante, relativa ao crescimento da vegetação nova, é consistente, ou seja, as Figuras 3C, 4C, 4F e 5C mostram claramente que o número, a área foliar e as dimensões das folhas novas foram maiores em plantas sem frutos, assim como o crescimento do ramo novo (Figura 3F).

Os dados referentes aos frutos são consistentes, pois os desbastes de todas as plantas foram feitos ao mesmo tempo. A Figura 6A representa o número de frutos por ramo durante o desenvolvimento do cafeeiro. Houve queda natural de frutos em todas as plantas, mas isto não interferiu nos tratamentos e houve diferenças marcantes entre as plantas com 30% de carga de frutos comparada às plantas contendo 60% e 100% de carga de frutos (Figura 6A).

O fato da massa fresca de frutos referente aos tratamentos 60% e 100% se igualarem na última avaliação, provavelmente, deve-se a uma eventual florada que pode ter ocorrido após o desbaste, em 11/11/2017, e que foi feito uma única vez. O menor número de frutos presentes no ramo em plantas com carga de 30% (Figura 6A) resultou em maior massa fresca por unidade de fruto (Figura 6B), da casca e do grão (Figura 6D). De modo semelhante, o diâmetro do fruto foi maior em plantas com carga de frutos de 30% e 60% desde o estágio final de expansão até a maturação dos frutos (Figura 7A). Já o comprimento do fruto foi maior em plantas com carga de 30% de frutos comparado aos demais tratamentos em todos os estágios de avaliação (Figura 7B).

Figura 3. Número de folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C); comprimento do ramo velho, (D), ramo maduro (E) e ramo novo (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

Figura 4. Comprimento de folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C); largura da folha velha (D), largura da folha madura (E) e largura da folha nova (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

Figura 5. Área da folha velha (A), madura (B) e nova (C) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

Figura 6. Número de frutos por ramo (A), massa fresca por unidade de fruto (B), massa fresca total de frutos por ramo (C), massa fresca da casca e do grão por unidade de fruto (D) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

Figura 7. Diâmetro (A) e comprimento (B) de frutos em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (C, 34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (D, 61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (E, 143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (F e G, 219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

A metodologia foi proposta para verificar o crescimento vegetativo e de frutos, assim como o fracionamento de carbono e nitrogênio em diferentes tecidos que compõem um ramo em produção durante os estádios fenológicos da frutificação. Portanto, não seria possível fazer as avaliações na mesma planta porque, após a biometria, as amostras eram coletadas para posterior análises bioquímicas.

Além da variação entre plantas comentada anteriormente, a idade fenológica dos tecidos avaliados variou ao longo das avaliações. Ou seja, a folha inicialmente denominada como “madura” se tornou velha no final da avaliação,

assim como a folha nova, tornou-se madura. A Figura 8 mostra esse processo de variação da idade fenológica dos tecidos durante os estádios de avaliação. Esse processo, em parte, pode também ser uma fonte de variação o qual causou algumas incongruências, mas, de todo modo, também retifica que o crescimento da vegetação nova (Figuras 3C, 4C, 4F e 5C) é o dado de crescimento vegetativo que mais responde aos tratamentos.

Figura 8. Processo de variação da idade fenológica dos tecidos durante os estádios de avaliação expressos em dias após o desbaste (DAT). O último par de folhas, do ápice para a base, da secção do ramo foi padronizado para as avaliações biométricas de folhas.

De maneira geral, o teor de pigmentos foi maior nas plantas com maiores cargas de frutos, especialmente na terceira coleta que corresponde ao estágio de granação de frutos (Figura 9 a 11). Esse aumento no teor de pigmentos fotossintéticos ocorreu porque a alta carga de frutos estimula a atividade fotossintética (VAAST et al., 2006) e isto provavelmente também tem reflexo positivo quanto ao teor de clorofilas e pigmentos acessórios. Os dados dos pigmentos fotossintéticos da folha também ajudam a confirmar a possível variação entre as plantas, pois mesmo as folhas denominadas como “velhas” não apresentaram queda do teor dos pigmentos (Figura 9A, 9D, 10A, 10D 11A e 11D) que é um evento característico do processo de senescência (FELLER; FISCHER, 1994; OSORIO et al., 2011).

Figura 9. Clorofila a em folha velhas (A), folhas maduras (B) e folhas novas (C); clorofila b em folhas velhas (D), folhas novas (E) e folhas novas (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

Figura 10. Clorofila total em folha velhas (A), folhas maduras (B) e folhas novas (C); carotenóides em folhas velhas (D), folhas novas (E) e folhas novas (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

Figura 11. Relação da clorofila a/ clorofila b em folha velhas (A), folhas maduras (B) e folhas novas (C); índice SPAD em folhas velhas (D), folhas novas (E) e folhas novas (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

A bienalidade da produção do cafeeiro é bem conhecida na literatura (BOTE; JAN, 2016; DAMATTA et al., 2007, 2008), mas o detalhamento do crescimento e partição da biomassa entre as folhas com distintas idades fenológicas, ramos e frutos ainda não é bem caracterizado. Estudos para o detalhamento do processo de bienalidade de produção precisam ser mais detalhados para compreensão dos eventos que governam não só a produção de frutos, mas também a sua qualidade, fator que afeta o valor de mercado na comercialização final. Assim, neste estudo, verificamos que o aumento da carga de frutos afeta negativamente o crescimento vegetativo. A Figura 12 deixa em evidência que os aumentos do número, da massa fresca e das dimensões do fruto foram privilegiados em detrimento da área foliar. Observa-se que o incremento do número e das dimensões do fruto prejudica o enfolhamento, sendo que a alta carga de frutos também interfere negativamente no crescimento do ramo (Figura 12).

Abreviações: LL - comprimento da folha, LB - comprimento do ramo, NL - número de folhas, LA - área foliar, WL - largura de folha, NFB - número de frutos por ramo, TFFMB - massa fresca total de frutos por ramo, FMF - massa fresca do fruto, DF - diâmetro do fruto e LF - comprimento do fruto.

Figura 12. Mapa de correlação entre o crescimento vegetativo e de frutos obtidos por meio dos coeficientes de correlação de Pearson. As células vazias indicam valores não significativos pelo teste de correlação de Pearson ($p > 0,05$). Os círculos vermelhos apresentam correlações negativas e os círculos azuis apresentam correlações positivas ($p < 0,05$). A escala de cores mostra a intensidade das correlações.

Houve competição principalmente entre a carga de frutos e a vegetação nova (Figuras 3C, 4C, 4F e 5C), uma vez que folhas maduras e velhas já foram formadas e atingiram seu máximo crescimento e, portanto, são pouco afetadas pelo aumento da carga de frutos. Além disso, os frutos apresentaram maior crescimento em plantas com menor carga (Figura 6B, 6D, 7A e 7B), indicando que houve competição acentuada entre os próprios frutos das plantas com alta produção. Esses resultados referentes à competição entre o crescimento vegetativo e de frutos, e entre os próprios frutos presentes no ramo, são consistentes e semelhantes aos resultados descritos em outras espécies lenhosas, como a videira (PETRIE; TROUGHT; HOWELL, 2000), citros (GUARDIOLA; GARCÍA-LUIS, 2000), pêra

(DUAN et al., 2007), mirtilo (JORQUERA-FONTENA; ALBERDI; FRANCK, 2014) e maçã (SAMUOLIENĖ et al., 2016). Esses trabalhos com alteração da relação fonte-dreno, removendo-se folhas e, ou desbastando frutos, apresentaram nos tratamentos com maior quantidade de frutos uma redução da área e da massa foliar, redução do crescimento de ramos, e redução do tamanho e massa dos frutos.

A carga da produção de frutos é um dos fatores mais importantes que influenciam a relação de fonte-dreno em árvores frutíferas e que tem um grande efeito sobre a produção de matéria seca e seu particionamento em órgãos vegetativos e reprodutivos (MARCELIS, 1996). Em macieira (*Malus domestica*), o incremento da carga de frutos levou ao aumento da produção de matéria seca por unidade de área foliar, mas reduziu o tamanho dos frutos, a porcentagem de matéria seca dos frutos, a quantidade de matéria seca particionada, o espessamento dos tecidos lenhosos e crescimento radicular (PALMER, 1992). O particionamento da matéria seca entre os vários grupos de órgãos depende do número de órgãos por grupo e da sua capacidade competitiva de atrair os fotoassimilados (MARCELIS, 1996). Os frutos são drenos fortes e, por isso, observou-se que o aumento da carga de frutos promoveu redução do crescimento da vegetação nova (Figura Figuras 3C, 4C, 4F e 5C).

A matéria seca que se divide entre os órgãos dreno de uma planta é regulada principalmente pelos próprios órgãos dreno, sendo a taxa de crescimento potencial (capacidade potencial de acumular fotoassimilados) um parâmetro importante para determinar a força do dreno (MARCELIS, 1996). Por isso, muitas vezes, além da competição por fotoassimilados entre os órgãos vegetativos e reprodutivos, a alta carga de frutos também promove competição entre os próprios frutos que afetam fortemente o tamanho e a sua qualidade (VAAST et al., 2005). Semelhantemente, o processo de competição entre os frutos também foi encontrada no presente estudo (Figuras 6B, 6D, 7A e 7B).

Vaast et al. (2005) observaram em plantas de café com alta carga de frutos ocorre redução do crescimento dos ramos e a massa fresca do fruto. Além disso, os mesmos autores observaram queda severa de frutos e maior ocorrência de morte descendente dos ramos. Dessa maneira, os autores atribuíram ao esgotamento de carboidratos como um fator limitante para o crescimento de ramos e de frutos. Em consonância, em um estudo com cafeeiro realizado por Costa, Zambolim e Rodrigues (2006) foi demonstrado que a redução do crescimento vegetativo estava relacionado com diminuição de até 30% de carboidratos armazenados (amido). Em outras espécies, o aumento da quantidade de drenos também provocou a redução do teor de amido acompanhado de menor crescimento vegetativo (JORQUERA-FONTENA; ALBERDI; FRANCK, 2014; QUENTIN et al., 2013; SAMUOLIENĖ et al., 2016).

É bem conhecido na literatura que a fotossíntese é regulada pelo grau de acúmulo de amido foliar (STITT, 1991; FRANK et al., 2006; LONG et al., 2006; MCCORMICK et al., 2006; VAAST et al., 2006, 2005). Esse processo de regulação, indica que o menor acúmulo de amido pode estimular a atividade fotossintética para suprimento da alta demanda metabólica e de construção celular dos órgãos dreno, como os frutos em excesso (STITT, 1991). Por isso, alguns estudos com cafeeiro não foi encontrado um padrão consistente entre redução do crescimento da parte aérea e limitação de carboidratos armazenados (CARVALHO et al., 1993; DAMATTA et al., 2008).

3.2. Caracterização do fluxo de carbono e nitrogênio em resposta à carga de frutos

Em razão da variação entre plantas descrita nos resultados de crescimento, não é preciso avaliar e discutir os resultados bioquímicos durante os estádios fenológicos. Desse modo, a descrição dos resultados e a discussão será apresentada somente da última coleta (219 dias após o desbaste), que se trata das mesmas plantas que foram afetadas pelos tratamentos durante todo o desenvolvimento do cafeeiro. Assim, anula-se o efeito da variação entre as plantas e

torna a apresentação dos resultados e discussão mais precisos. A seguir, são destacadas informações sobre o fracionamento de carbono e nitrogênio em café arábica.

3.3. Carboidratos e compostos fenólicos em resposta à carga de frutos

As Figuras 13 a 19 mostram avaliações de carboidratos nas folhas, ramos, frutos, casca e grão em café arábica. O teor de açúcares solúveis totais na folha e ramo novo foi menor nas cargas de 0% e 30%, enquanto que no ramo maduro, encontrou-se menor teor de açúcares solúveis totais apenas nas plantas sem frutos (Figura 13). As plantas sem frutos apresentaram redução do teor de sacarose na folha e ramo maduro, enquanto que a folha velha apresentou menor teor de sacarose na planta com carga de 100% (Figura 14). Por outro lado, não houve mudanças nos teores de açúcares solúveis totais e sacarose no fruto, na casca e no grão (Figura 15).

Não houve alteração do teor de amido nas folhas e no ramo maduro, mas o ramo velho apresentou aumento do teor amido nas plantas sem frutos, enquanto que o ramo novo acumulou mais amido nas plantas com carga de 0% e 30% (Figura 16). A Figura 18 mostra a análise histoquímica para identificação de amido nas secções do ramo velho, maduro e novo de plantas com as cargas de 0% e 100%. Houve reação positiva mais acentuada para presença de amido no ramo das plantas sem frutos (Figura 17A a 17C) comparada aos ramos das plantas com 100% de frutos (Figura 17D a 17F). O acúmulo de amido no ramo velho de plantas sem frutos ocorreu principalmente na região do xilema e medula (Figura 17A), enquanto que o ramo novo das plantas sem frutos, apresentou acúmulo de amido em todos tecidos, como o córtex, floema, xilema e medula (Figura 17C). Na folha velha e madura houve maior teor de açúcares redutores em plantas sem frutos, e nestes tecidos, observou-se diferenças entre as cargas de frutos, onde as menores cargas resultaram em maiores teores de açúcares redutores. Entretanto nos tecidos novos, como a folha e o ramo, as maiores cargas (60% e 100%) apresentaram aumento do teor de açúcares redutores (Figura 18). Não houve variações dos teores de amido nos frutos inteiros e no grão (Figura 19A e 19B), mas a casca do fruto acumulou mais amido nos tratamentos com carga de 30% e 60% (Figura 19B). O teor de açúcares redutores foi menor nos frutos de plantas com 30% de carga (Figura 19C), mas, mesmo com essa diferença nos frutos, o teor de açúcares na casca e no grão não foram alterados (Figura 19D).

Os resultados do presente estudo indicam que o amido acumulado nos ramos apresentou papel crucial para suprimento de carboidratos para os frutos, folhas e ramos em plantas com carga excessiva (60% e 100%). O amido acumulado nos ramos velhos e novos dessas plantas foi substancialmente consumido (Figura 16D, 16F, 17D, 17E e 17F) e isto permitiu que os teores de sacarose fossem maiores nos tecidos maduros, como folhas e ramos (Figura 14B e 14E) para suprir a alta demanda metabólica dos frutos em excesso sem que a quantidade de carboidratos nos frutos fossem afetadas (Figura 15). Além disso, a folha velha apresentou grande relevância para o suprimento de sacarose para os órgãos dreno em plantas com carga excessiva (Figura 14B).

Figura 13. Açúcar solúvel total em folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C), ramo velho (D), ramo maduro (E) e ramo novo (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

Figura 14. Sacarose em folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C), ramo velho (D), ramo maduro (E) e ramo novo (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

Figura 15. Açúcar solúvel total no fruto (A), na casca e no grão (B); sacarose no fruto (C), na casca e no grão (D) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

Figura 16. Amido em folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C), ramo velho (D), ramo maduro (E) e ramo novo (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. n = 4.

Figura 17. Teste histoquímico para detecção de amido nas secções transversais do ramo plagiotrópico do cafeeiro no estágio de maturação de frutos. A – ramo velho com 0% de carga de frutos. B – ramo maduro com 0% de carga de frutos. C - ramo novo com 0% de carga de frutos. D - ramo velho com 100% de carga de frutos. E – ramo maduro com 100% de carga de frutos. F – ramo novo com 100% de carga de frutos. md = medula; xm = xilema; pm = floema; cx = córtex. As setas indicam regiões de armazenamento de amido nos tecidos do caule do cafeeiro.

Figura 18. Açúcares redutores em folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C), ramo velho (D), ramo maduro (E) e ramo novo (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

Figura 19. Amido no fruto (A), na casca e no grão (B); açúcares redutores no fruto (C), na casca e no grão (D) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

O uso do amido como matriz energética ocorre quando a fotossíntese não pode atender à demanda de energia e suprir esqueletos carbônicos para a biossíntese de tecidos novos e em desenvolvimento (MACNEILL et al., 2017). Por ser a principal forma de transporte de carbono nas plantas (LEMOINE et al., 2013), a sacarose da folha velha (órgão fonte) oriunda dos tratamentos de 60% e 100% reduziu provavelmente para atender a alta demanda

energética dos drenos em excesso (Figura 14B), mas que não foi suficiente para tamponar os efeitos adversos da depleção de carbono induzida pela alta carga de frutos. Assim, quando a sacarose é limitada para a homeostase de carboidratos no vegetal, o amido é então quebrado para liberar o carbono armazenado para o transporte a longa distância (DASGUPTA et al., 2014). Entretanto, o acúmulo de amido na folha é transitório porque é acumulado durante o dia e degradado à noite (PILKINGTON et al., 2015), o que justifica a não alteração de amido nas folhas em razão dos tratamentos (Figura 16A, 16B e 16C). Assim, os ramos do cafeeiro adquirem papel importante para armazenar amido por períodos duradouros como um pool de carboidratos de armazenamento (DAMATTA et al., 2016).

O maior acúmulo de açúcares solúveis totais e açúcares redutores nos tecidos novos de plantas com carga excessiva (Figura 13C, 13F, 18C e 18F) também pode estar relacionado com a contribuição do amido consumido dos ramos (Figura 16D, 16F, 17D, 17E e 17F) para manutenção do crescimento da vegetação nova. Muitos trabalhos descrevem que a fotossíntese é regulada pelo grau de acúmulo de amido foliar (STITT, 1991; 1999; FRANK et al., 2006; LONG et al., 2006; MCCORMICK et al., 2006; FRANK et al., 2006; VAAST et al., 2006; 2005). Esse processo de regulação, indica que o menor acúmulo de amido na folha pode estimular a atividade fotossintética para suprimento da alta demanda metabólica e de construção celular dos órgãos dreno, como os frutos em excesso (STITT, 1991). Entretanto, no presente estudo não houve redução de amido foliar nas plantas com carga alta de frutos (Figura 16A, 16B e 16C) e, portanto, o aumento de açúcares solúveis totais e açúcares redutores não pode estar relacionada ao estímulo da fotossíntese por retroalimentação negativa, como descrito em alguns trabalhos com cafeeiro (CARVALHO et al., 1993; DAMATTA et al., 2008). Dessa maneira, atribui-se aos ramos a função de fornecer grande parte do carbono para os frutos, folhas e ramos novos de plantas com alta produção de frutos (Figura 16D, 16F, 17D e 17F). Entretanto, o amido que foi consumido dos ramos não foi suficiente para evitar o esgotamento de carboidratos que culminou com o menor crescimento vegetativo e de frutos (vide item 3.1).

Observou-se nos resultados do presente trabalho que as fontes de carbono em plantas com carga nula ou reduzida (0% e 30%, respectivamente) são diferentes das plantas com alta produção de frutos. A folha e ramo maduro são os tecidos fonte mais importantes para o crescimento e aporte de carboidratos para os tecidos novos e/ou frutos. A redução do teor de sacarose nas folhas e ramos maduros das plantas com carga nula e reduzida (Figura 14B e 14E) provavelmente ocorreu pelo seu transporte para os sítios de alta demanda, que no caso das plantas sem frutos, são as folhas e ramos novos e, no caso das plantas com carga reduzida são os frutos. A contribuição da folha e ramo maduro fica evidente porque o maior crescimento da vegetação nova em plantas com carga nula e maior crescimento de frutos em plantas com carga reduzida (vide item 3.1) ocorreu em detrimento do teor de sacarose nas folhas e ramos maduros (Figura 14B e 14E), sem gasto aparente de amido armazenado nos ramos (Figura 16A, 16C, 17D e 17F).

Alem disso, observou-se aumento de açúcares redutores em folhas velhas e maduras das plantas com carga nula (Figura 18A e 18B) que podem ter sido induzidas para a sua posterior polimerização e consequente transporte de carbono na forma de sacarose para os tecidos novos e/ou para acúmulo de amido nos ramos. Os açúcares redutores em plantas são representados principalmente por glicose e frutose (HALFORD et al., 2011). Esses açúcares podem ser oriundos da fotossíntese, da degradação de polímeros (e. g. amido, celulose e pectina) ou pelo descarregamento de sacarose via floema de tecidos subjacentes (HOFSTRA et al., 1985; WARING et al., 1985; FICHTNER; SCHULZE, 1992; STITT; SCHULZE, 1994; STITT, 1999). Antes do transporte pelo floema é preciso que a sacarose seja sintetizada (LEMOINE et al., 2013). Portanto, esses açúcares redutores (glicose e frutose) em demasia em folhas velhas e maduras (Figura 18A e 18B) poderão ser utilizados como substratos para a síntese de sacarose e transportada para os tecidos da vegetação nova ou até mesmo para acúmulo de amido nos ramos que garantirá uma alta produção na

safrá seguinte. Essa característica de acumular amido nos ramos pode ser um dos fatores que contribuem para a ocorrência da bienalidade de produção do cafeeiro (DAMATTA et al., 2008).

As Figuras 20 e 21 mostram os teores de pectina e antocianina na casca do fruto maduro, os quais apresentaram menores teores no tratamento de 30% e 60%. O teor de compostos fenólicos totais não foram alterados no fruto inteiro (Figura 22), mas na casca do fruto, observou-se aumento do teor de compostos fenólicos no tratamento de 30% e 60% (Figura 23). No grão, houve aumento do teor de compostos fenólicos apenas nas plantas com carga de 30% (Figura 23).

Figura 20. Pectina na casca do fruto em razão da carga de frutos no estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Dados da média $\pm$ erro padrão; $n = 4$.

Figura 21. Antocianina na casca do fruto em razão da carga de frutos no estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Dados da média $\pm$ erro padrão; $n = 4$.

Figura 22. Compostos fenólicos totais (equivalente de ácido clorogênico) no fruto em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Dados da média $\pm$ erro padrão; $n = 4$.

Figura 23. Compostos fenólicos totais na casca e no grão em razão da carga de frutos no estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). $n = 4$.

Sabe-se que o cafeeiro foi adaptado no Brasil em cultivo a pleno sol, condição esta muito diferente do seu local de origem onde é cultivado em condições de sombreamento por meio da implementação de sistemas agroflorestais (COLTRI et al., 2015). Alguns trabalhos indicam que a maturação do fruto de café é retardada em sistemas sombreados de cultivo (GEROMEL et al., 2008; VAAST et al., 2006). Portanto, o crescimento dos ramos e maior enfolhamento de plantas dos tratamentos com carga de 30% e 60% (vide item 3.1) pode ter ocasionado sombreamento diferenciado nestas plantas, o que provocou redução de antocianina e pectina (Figuras 20 e 21) e, maior teor de compostos fenólicos na casca do fruto dessas plantas (Figura 23).

Pimenta et al. (2000), descreveram que a quantidade de pectina solúvel aumenta durante a maturação dos frutos de café. Os compostos fenólicos são metabólitos secundários que são derivados das vias das pentoses fosfato, chiquimato e fenilpropanóide nas plantas (RANDHIR; LIN; SHETTY, 2004). Dentre eles, estão as antocianinas que são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho, presentes em flores e frutos (KHOO et al., 2017). Os frutos quando maduros geralmente têm maior teor de antocianinas e o menor teor de compostos fenólicos totais (FADDA; MULAS, 2010; ZHANG et al., 2011).

Em *C. arabica* cultivar Catuaí foi relatado que o sombreamento, além de afetar a velocidade de maturação, promove o aumento do teor de sacarose nos frutos (GUYOT et al., 1996), enquanto que uma relação negativa entre sacarose e sombra foi observada para a cultivar Catimor (VAAST et al., 2006) e IAPAR 59 (GEROMEL et al., 2008). Portanto, nossos resultados indicam que os frutos oriundos das plantas com carga de 30% e 60% apresentaram menor grau de maturação. Entretanto, essa diferença de maturação é tênue porque o teor de sacarose foi semelhante nos frutos, na casca e no grão de todos os tratamentos (Figura 15C e 15D) porque o teor de sacarose do fruto está positivamente relacionado com o grau de maturação em café arábica cultivar Catuaí (GUYOT et al., 1996).

3.4. Compostos nitrogenados em resposta à carga de frutos

As Figuras 24 a 29 mostram avaliações de compostos nitrogenados nas folhas, ramos, frutos, casca e grão em café arábica. O teor de aminoácidos totais foi maior no ramo velho de plantas sem frutos, e diferenças entre as cargas de frutos foram encontradas, onde as cargas de 30% e 60% apresentaram maior teor de aminoácidos totais comparado à planta com carga de 100% (Figura 24).

O teor de proteína solúvel na folha velha foi maior nas plantas com 0%, 30% e 60% comparada à carga de 100% (Figura 25A). Já no ramo maduro, as plantas com 30% de carga resultou em menor teor de proteína solúvel comparado aos demais tratamentos (Figura 25E). Os teores de aminoácidos e proteína solúvel não foram alterados nos frutos, na casca e no grão (Figura 26).

O ramo velho, maduro e novo apresentaram maior acúmulo de N-proteico em plantas sem frutos (Figura 27D, 27E e 27F). Houve maior teor de N-proteico em folhas maduras de plantas com carga de 30% e 60% comparada aos demais tratamentos (Figura 27B). Por outro lado, o teor de nitrato foi menor nas folhas novas das plantas sem frutos (Figura 28C). Os teores de nitrato e N-proteico nos frutos, na casca e no grão não foram alterados em razão dos tratamentos (Figura 29).

Figura 24. Aminoácidos em folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C), ramo velho (D), ramo maduro (E) e ramo novo (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

Figura 25. Proteína solúvel em folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C), ramo velho (D), ramo maduro (E) e ramo novo (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

Figura 26. Aminoácidos no fruto (A), na casca e no grão (B); proteína solúvel no fruto (C), na casca e no grão (D) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

Figura 27. N-proteico em folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C), ramo velho (D), ramo maduro (E) e ramo novo (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

Os resultados do presente estudo indicam que houve transporte de aminoácidos dos ramos velhos para os órgãos fonte em plantas com frutos. Essa resposta se confirma porque os aminoácidos são as formas nitrogenadas mais importantes para a redistribuição de nitrogênio para os órgãos fonte (TEGEDER; RENTSCH, 2010) e o teor de aminoácidos nos ramos velhos foi menor em plantas com frutos, independentemente da carga (Figura 24). Além disso, a folha velha constitui uma fonte importante de nitrogênio para os drenos em excesso porque foi observado que houve redução de proteína solúvel nesse tecido em plantas com carga de 100% (Figura 25A). A proteólise em folhas velhas ocorre de maneira mais intensa concomitantemente à sua senescência e os aminoácidos oriundos da quebra de proteínas são transportados via floema a longas distâncias (TEGEDER; RENTSCH, 2010). O processo de redistribuição de nitrogênio dos órgãos fonte para os drenos, deve-se à ativação do maquinário metabólico que desconstrói estruturas e moléculas para reutilizar o nitrogênio, direcionando-o para os drenos (FELLER; FISHER, 1994; OSORIO et al., 2014). Provavelmente, o processo de proteólise em aminoácidos foi estimulado em folhas velhas, permitindo o suprimento de nitrogênio para a carga excessiva de frutos. Os ramos apresentaram grande capacidade de acumular nitrogênio em plantas sem frutos (Figura 27D, 27E e 27F), sugerindo que esse pool de nitrogênio poderá ser utilizado como matriz para suprir a demanda pelo nutriente na safra de alta produção de frutos. Portanto, não somente o acúmulo de amido nos ramos que contribui para a ocorrência da bienalidade de produção do cafeeiro (DAMATTA et al., 2008), mas também o nitrogênio proteico acumulado nos ramos tem papel fundamental para a ocorrência deste processo.

Mazzafera e Gonçalves, (1999) revelaram que as principais compostos nitrogenados transportados via xilema em plantas de café são nas formas de nitrato e aminoácidos, sendo que o nitrato representa mais de 50% e os aminoácidos contribuem com mais de 40% das formas nitrogenadas de transporte. É bem documentado na literatura que o processo de redistribuição de nitrogênio ocorre principalmente na forma de aminoácidos via floema (TEGEDER; RENTSCH, 2010). Entretanto, alguns estudos detectaram 1,9 a 8,1 mM de nitrato inorgânico na seiva do floema de plantas cultivadas (HAYASHI; CHINO, 2017; ALLEN et al., 1986; SMITH; MILBURN et al., 1980). O transporte de nitrato via xilema é mediado pela diferença de potencial existente no continuum solo-planta-atmosfera (MILLER et al., 2007), enquanto que o transporte via floema é mediado pela força do dreno (FAN et al., 2009; HSU; TSAY, 2013). Portanto, em termos de redistribuição, o transporte de nitrato via floema responde melhor às alterações da relação fonte-dreno e este será abordado na discussão desses resultados. A presença de transportadores de nitrato na membrana plasmática, elementos de vaso e células companheiras garantem o transporte de nitrato pelo floema. Portanto, é necessário que o nitrato acumulado no vacúolo seja transportado através do tonoplasto, passe pela membrana plasmática da célula do mesófilo, da célula companheira e do elemento de vaso apoplásticamente até o floema (FAN et al., 2009). O nitrato é carregado entre os compartimentos subcelulares até o floema com auxílio de transportadores de membrana. Alguns desses transportadores como NRT1.7 em *Arabidopsis* (FAN et al., 2009; HSU; TSAY, 2013; TAOCHY et al., 2015) e OsNPF2.4 em arroz (XIA et al., 2015) são importantes para a remobilização de nitrato dos órgãos fonte para os drenos em resposta à limitação de nitrogênio. Assim, além dos aminoácidos, o nitrato inorgânico também pode ser remobilizado de folhas mais velhas para tecidos mais exigentes. Todavia, Fan et al. (2009) sugeriram que o nitrato pode ser convertido em alguma forma orgânica à medida que é transportado de folhas velhas para os drenos fisiológicos.

No presente estudo, foi observado que o teor de nitrato foi menor na folha nova da planta sem frutos (Figura 28C), o que parece ser uma resposta pouco conclusiva porque alguns trabalhos indicam que o transporte de nitrato pelo floema é mediado pela relação fonte-dreno (HSU et al., 2013; FAN et al., 2009). Se os frutos atuam como

uma força motriz necessária para transportar nitrato para tecidos mais exigentes, como as folhas novas, ainda é uma questão em aberto e que necessita de mais estudos.

Figura 28. Nitrato solúvel em folhas velhas (A), folhas maduras (B), folhas novas (C), ramo velho (D), ramo maduro (E) e ramo novo (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

Figura 29. Nitrato no fruto (A), na casca e no grão (B); N-proteico no fruto (C), na casca e no grão (D) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). FL(%) – carga de frutos; AVG – média. $n = 4$.

3.5. Perfil dos metabólitos em resposta à carga de frutos

A partir das mesmas amostras utilizadas para análises colorimétricas de carboidratos e compostos nitrogenados, procederam-se a caracterização de diversos compostos do metabolismo primário em extratos polares

por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GS-MS). Para confirmar a influência da carga de frutos no metabolismo central de café arábica, realizou-se a análise abrangente do perfil de metabólitos usando GC-MS, o que permitiu a detecção de 39 compostos de metabolismo primário. Todos os metabólitos que foram identificados são apresentados juntamente com os resultados dos testes estatísticos das diferenças entre as cargas de frutos (Apêndice A a C).

Ainda não está caracterizado o perfil de metabólitos em café arábica em resposta à carga de frutos, o que confere ao presente estudo o ineditismo. As alterações relativas nos metabólitos individuais após os tratamentos são mostradas nas Figuras 30 a 35. Neste sentido, foram identificados 20 compostos nitrogenados (sendo 19 aminoácidos e 1 poliamina), 12 ácidos orgânicos, 4 carboidratos e 3 açúcares alcoólicos na folha velha, folha madura, folha nova, frutos, casca e grão.

Em análises das alterações relativas, observou-se tendências de variações de compostos nitrogenados, ácidos orgânicos, carboidratos e açúcares alcoólicos nos tecidos. Nas Figuras 30 a 32, observa-se que as folhas velhas, maduras e novas apresentaram tendência de acúmulo de aminoácidos em plantas sem frutos. Nos frutos e na casca, a grande maioria dos aminoácidos identificados tiveram uma tendência de se acumularem nas plantas com carga de 60% e 100% (Figura 33 e 35). No grão, houve uma tendência da grande maioria dos aminoácidos acumularem mais nas plantas com carga de 100% (Figura 35). Em folhas velhas e novas apresentaram maior tendência de acúmulo de ácidos orgânicos no tratamentos com 100% de carga, sendo que as folhas maduras e novas acumularam mais açúcares alcoólicos no tratamento com 100% de carga. Os frutos, casca e grão oriundos das plantas com maiores cargas (60% e 100%) apresentaram uma tendência de maior acúmulo da grande maioria dos ácidos orgânicos, carboidratos e ácidos alcoólicos (Figura 33 a 35).

Essas análises qualitativas são importantes para uma visão geral dos efeitos dos tratamentos sobre os metabólitos, mas as diferenças mostradas na análise qualitativa nem sempre estão em consonância com diferenças significativas estatisticamente. Em análises quantitativas, observou-se que as folhas velhas e maduras apresentaram maior quantidade de aminoácidos em plantas sem frutos. Os aminoácidos como a asparagina (Figura 36), tirosina (Figura 37) e fenilalanina (Figura 38) acumularam mais em folhas velhas, enquanto que a fenilalanina (Figura 38) e glutamina (Figura 39) apresentaram maior quantidade em folhas maduras de plantas sem frutos. Por outro lado, a folha nova acumulou mais alanina em plantas com carga de 100% de frutos (Figura 40), enquanto que fenilalanina apresentou maior quantidade em folhas novas de plantas sem frutos (Figura 38).

O aspartato e glutamina acumularam mais na casca dos frutos dos tratamentos com carga de 60% e 100%, enquanto que no grão não foi identificado aspartato nesses tratamentos e a quantidade de glutamina não foi alterada (Figura 39 e 41). A tirosina apresentou maior quantidade no grão de plantas com carga de 100% (Figura 37). A asparagina, fenilalanina e alanina não apresentou variação nos frutos, na casca e no grão em resposta aos tratamentos (Figura 36, 39 e 41). A ornitina apresentou menor quantidade na casca e no grão oriundos de plantas com carga de frutos de 30% (Figura 42). As quantidades de glicina, serina, prolina, valina e leucina não alteraram em nenhum dos tecidos estudados em resposta aos tratamentos submetidos (Figuras 43 a 47). Também foi identificada a poliamina denominada como putrescina, a qual apresentou maior quantidade nos grãos oriundos de plantas com carga de 60% e 100% (Figura 48).

Figura 30. Principais compostos polares identificados em amostras de folha velha em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Valores relativos à média de cada composto. GABA - ácido gama-aminobutírico; 4-CQA – ácido-3-cafeoilquinico. Compostos com a coloração cinza não foram identificados. n = 3.

Figura 31. Principais compostos polares identificados em amostras de folha madura em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Valores relativos à media de cada composto. GABA - ácido gama-aminobutírico; 4-CQA – ácido-3-cafeoilquinico. Compostos com a coloração cinza não foram identificados. n = 3.

Figura 32. Principais compostos polares identificados em amostras de folha nova em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Valores relativos à média de cada composto. GABA - ácido gama-aminobutírico; 4-CQA – ácido-3-cafeoilquínico. Compostos com a coloração cinza não foram identificados. n = 3.

Figura 33. Principais compostos polares identificados em amostras de frutos em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Valores relativos à media de cada composto. GABA - ácido gama-aminobutírico; 4-CQA – ácido-3-cafeoilquinico. Compostos com a coloração cinza não foram identificados. n = 3.

Figura 34. Principais compostos polares identificados em amostras de casca do fruto em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Valores relativos à média de cada composto. GABA - ácido gama-aminobutírico; 4-CQA – ácido-3-cafeoilquínico. Compostos com a coloração cinza não foram identificados. n = 3.

Figura 35. Principais compostos polares identificados em amostras de grão em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Valores relativos à media de cada composto. GABA - ácido gama-aminobutírico; 4-CQA – ácido-3-cafeoilquinico. Compostos com a coloração cinza não foram identificados. n = 3.

Figura 36. Asparagina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$; *metabólito não identificado para um ou mais tratamentos.

Figura 37. Tirosina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$; *metabólito não identificado para um ou mais tratamentos.

Figura 38. Fenilalanina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$.

Figura 39. Glutamina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$.

Figura 40. Alanina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$;

Figura 41. Aspartato em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$.

Figura 42. Ornitina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. n = 3;

Figura 43. Glicina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$.

Figura 44. Serina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$.

Figura 45. Prolina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$.

Figura 46. Valina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$.

Figura 47. Leucina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$.

Figura 48. Putrescina em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$.

O nitrato e o amônio podem ser transportados no xilema, mediado pelo fluxo de transpiração, das raízes para os tecidos da parte aérea, onde serão utilizados para síntese de aminoácidos (LALONDE et al., 2003; TEGEDER; RENTSCH, 2010). O nitrogênio inorgânico também pode ser reduzido nas raízes em aminoácidos seguido de transporte no xilema para órgãos fonte (SANTIAGO; TEGEDER, 2016). Uma ampla diversidade de aminoácidos em diferentes concentrações são transportados para desenvolver órgãos drenos, como folhas jovens, frutas, e sementes que dependem do nitrogênio para seu crescimento (HUNT et al., 2010; TILSNER et al., 2005). Entretanto, a asparagina e glutamina representam cerca de 90% dos aminoácidos transportados no xilema (MAZZAFERA; GONÇALVES, 1999), enquanto que a glutamina e glutamato representam as formas predominantes de transporte de nitrogênio no floema (SANTIAGO; TEGEDER, 2016).

O presente estudo revelou que houve acúmulo de aminoácidos nos órgãos fonte, como as folhas velhas e maduras, em plantas que foi realizado o desbaste de frutos. Portanto, a quantidade de asparagina e glutamina foi menor em folhas velhas e maduras de plantas com carga de 100% (Figuras 36 e 39), o que indica o transporte desses aminoácidos para suprimento de nitrogênio para folhas novas e frutos. Além disso, houve redução de tirosina e fenilalanina em folhas velhas e maduras, o que indica que esses aminoácidos aromáticos também foram destinados para atender a demanda de nitrogênio dos órgãos dreno (Figuras 37 e 38).

Em contraste, os órgãos dreno como as folhas novas e frutos, apresentaram alguns aminoácidos em maior quantidade em plantas com carga de 60% e/ou 100% quando comparada às plantas com menor carga de frutos. É possível que a grande quantidade de aminoácidos liberados da degradação de proteínas dos ramos dessas plantas (vide item 3.3.2) causou o aumento considerável de fenilalanina nos grãos (Figura 38F), glutamina e aspartato na casca do fruto (Figura 39E e 41E), e alanina na folha nova (Figura 40C). A limitação de aminoácidos nas folhas velhas e maduras em plantas com as maiores cargas de fruto (Figuras 36A, 37A, 38A, 38B, 38C, 39B e 42A) pode ter desencadeado o aumento da atividade de proteases nos ramos que atuaram de modo a tamponar a depleção de nitrogênio causada pelo número excessivo de drenos metabólicos.

Sabe-se que a alta produção de frutos induz a limitação de nitrogênio, podendo em alguns casos acarretar em sintomas de deficiência nutricional (RAMALHO et al., 1998; 2000). Neste cenário, o maquinário metabólico das plantas é estimulado para desconstruir estruturas e moléculas visando reutilizar o nitrogênio, direcionando-o para os órgãos dreno (FELLER; FISHER, 1994; OSORIO et al., 2014). A degradação de proteínas é um processo catabólico muito importante associada à reciclagem endógena de nutrientes, especialmente o nitrogênio (GREGERSEN et al., 2013). Alterações no padrão de expressão temporal de proteases podem ocorrer nos núcleos, cloroplastos e mitocôndrias que asseguram a eficiência do processo de degradação de proteínas em aminoácidos, amidas e de amônio. O amônio produzido é reassimilado em aminoácidos e, assim como as amidas, pode ser exportado via floema para o crescimento e desenvolvimento de folhas novas e frutos (DÍAZ-MENDOZA et al., 2014; ROBERTS et al., 2012).

Os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), como a valina, isoleucina e leucina, estão envolvidos na manutenção dos níveis dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico constantes para fornecer energia para cadeia transportadora de elétrons de plantas sob baixa disponibilidade energética (ARIAS et al., 2014; AVIN-WITTENBERG et al., 2012). No presente estudo, os BCAAs não foram alterados pelas cargas de frutos (Figura 46 e 47), sugerindo o uso de outros mecanismos anteriormente já descritos (vide item 3.3.1) para atender a demanda energética diferenciada em plantas com alta produção de frutos.

O presente estudo revelou também o acúmulo de ornitina nos grãos oriundos de plantas com carga de 60% e 100% (Figura 47F) acompanhado pelo aumento concomitante de putrescina (Figura 48F). Page et al. (2016) descreveram que os níveis mais altos de putrescina estão associados ao aumento do fluxo de glutamato em ornitina.

Esse fluxo ocorre porque a ornitina, assim como a arginina, são aminoácidos precursores de poliaminas, sendo que esses compostos, como a putrescina, espermidina e espermina, desempenham papéis importantes em muitos processos fisiológicos, como o crescimento e desenvolvimento celular, e resposta a estresses ambientais (GILL; TUTEJA, 2010).

O metabolismo de poliaminas faz parte de uma rede de vias altamente interdependentes, que são centrais para o metabolismo de nitrogênio e de carbono (Figura 49). Estudos mostraram que muitas vias são afetadas pela superprodução de poliaminas (MOHAPATRA et al., 2009; PAGE et al., 2016). O glutamato tem grande importância como um intermediário chave para o metabolismo do nitrogênio e ocupa uma posição central no processo de assimilação do nutriente (COOPER; JEITNER, 2016), sendo substrato para síntese de numerosos metabólitos que atuam de modo a manter o equilíbrio de carbono e nitrogênio na célula (Figura 49). O glutamato também é precursor direto para a biossíntese de aminoácidos essenciais, tais como a glutamina e aspartato através de reações de aminotransferase e transaminase (DE LA TORRE et al., 2014), e um precursor do biossíntese de prolina (VERSLUES; SHARMA, 2010) e ornitina (PAGE et al., 2016). A descarboxilação direta de glutamina pela glutamina descarboxilase, EC 4.1.1.15 (BOUCHÉ; FROMM, 2004) e o catabolismo de putrescina produzem o aminoácido não proteico ácido aminobutírico (GABA), um metabólito importante na resposta aos estresses ambientais e sinalização celular (BOUCHÉ; FROMM, 2004; FAIT et al., 2008; MAZZUCOTELLI et al., 2006). O GABA também pode se inserir ao ciclo do ácido tricarboxílico via succinato, reciclando nitrogênio e carbono da glutamina e putrescina (Figura 49) (BOUCHÉ; FROMM, 2004).

Figura 49. Papel do glutamato como precursor de vários metabólitos em plantas e interação das vias envolvidas na biossíntese de aminoácidos em plantas. MOHAPATRA et al. (2009).

Alguns estudos indicam que a assimilação total de nitrogênio e carbono pode ser impactada positivamente pelo aumento da utilização de nitrogênio e carbono durante a biossíntese de poliaminas (ARIAS; CARBONELL;

AGUSTÍ, 2005; MAJUMDAR et al., 2016). Os resultados do presente estudo indicam que houve regulação de carbono e nitrogênio em resposta à carga de frutos mediado pelo estímulo da síntese de poliaminas, visto o envolvimento dessa e outras vias complementares (Figura 49) no balanço de carbono e nitrogênio nas plantas (BOUCHE; FROMM, 2004; FAIT et al. 2008). Esse balanço de nitrogênio e carbono ocorre porque a distribuição de glutamato em diferentes vias concorrentes (Figura 49) devem ser intrinsecamente reguladas para atingir os níveis homeostáticos de vários produtos cuja biossíntese depende desse aminoácido. Por consequência, a assimilação global de nitrogênio, que ocorre inicialmente pela síntese de glutamato, tem grande dependência da disponibilidade de carbono e vice-versa (MANJUDAR et al., 2016).

Assim como o presente estudo, foi observado que a alta carga de frutos promove acúmulo de putrescina nos frutos de tangerina (*Citrus reticulata*) (ARIAS; CARBONELL; AGUSTÍ, 2005). Esses autores sugeriram que as poliaminas podem atuar como fonte de nitrogênio para as plantas com alta produção de frutos. Por outro lado, Manjudar et al. (2016) afirmaram que o aumento da síntese de putrescina resulta no aumento da assimilação de nitrogênio e carbono pelas células em razão dessas vias serem altamente interdependentes e reguladas entre si (Figura 49). Dessa forma, os resultados indicam o grande impacto da carga de frutos sobre diversas vias metabólicas, mas que se reajustaram de modo a regular o fluxo de carbono e nitrogênio no organismo vegetal.

As Figuras 50 a 56 mostram avaliações de ácidos orgânicos e açúcar alcoólico em folhas, frutos, casca e grão em café arábica em resposta à carga de frutos. De maneira geral, as alterações dos ácidos orgânicos no presente estudo foram encontradas no fruto, na casca e no grão. A quantidade de malato foi maior nos frutos das plantas com carga de 30% (Figura 50D), sendo que nas plantas com cargas de 60% e 100%, o metabólito não foi identificado na casca do fruto (Figura 50E). Nos grãos, não houve alteração de malato em resposta aos tratamentos (Figura 50F). O teor de glutarato foi alterado somente nos grãos, sendo que nos tratamentos com cargas de 30% e 60%, observou-se menor teor desse ácido orgânico (Figura 51).

A quantidade de fumarato foi menor em folhas velhas de plantas com carga de 0%. Na casca e no grão, observou-se menor acúmulo de fumarato no tratamento com 30% de carga (Figura 52). A quantidade de ácido-4-cafeoilquínico reduziu nos frutos inteiros e na casca dos frutos oriundos das plantas com carga de 30% (Figura 53D e 53E). Entretanto, no tratamento controle (carga de 100%), o metabólito não foi identificado nos grãos (Figura 53F). Por outro lado, as quantidades de chiquimato, succinato e galactinol não foram afetadas em resposta aos tratamentos (Figura 54 a 56).

As alterações dos ácidos orgânicos no presente estudo foram encontradas nos frutos e nos tecidos que os compõem. Em certos estágios de desenvolvimento, muitas frutas acumulam ácidos orgânicos. O citrato e malato são responsáveis pela maior parte do conteúdo de ácidos orgânicos em frutos (BATISTA-SILVA et al., 2018; ETIENNE et al., 2013). Koshiro et al. (2015) revelaram que os principais ácidos orgânicos em frutos de café são o ácido quínico, ácido málico, ácido cítrico e ácido oxálico. Esses ácidos possuem grupos metabolicamente diversos; por exemplo, o ácido cítrico, oxálico e málico são metabolizados pelo ciclo do ácido tricarboxílico, enquanto que o ácido quínico é sintetizado a partir de ácido 3-desidroquínico, um intermediário da via do ácido chiquímico. O ácido quínico é uma porção cíclica acumulada de forma transitória onde está relacionada à síntese de ácidos clorogênicos que afetam a percepção da acidez da bebida de café (KOSHIRO et al., 2015).

Figura 50. Malato em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$).AVG – média. n = 3; *metabólito não identificado para um ou mais tratamentos.

Figura 51. Glutarato em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$.

Figura 52. Fumarato em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$.

Figura 53. Ácido-4-cafeoilquínico (4-CQA) em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$; *metabólito não identificado para um ou mais tratamentos.

Figura 54. Chiquimate em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$; *metabolito não identificado para um ou mais tratamentos.

Figura 55. Sucinato em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). Dados da média $\pm$ erro padrão; ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. n = 3.

Figura 56. Galactinol em folha velha (A), folha madura (B), folha nova (C), no fruto (D), na casca (E) e no grão (F) em razão da carga de frutos durante o desenvolvimento do cafeeiro. Estádio inicial de expansão do fruto (34 dias após o desbaste), estágio final de expansão do fruto (61 dias após o desbaste), estágio de granação do fruto (143 dias após o desbaste) e estágio de maturação do fruto (219 dias após o desbaste). ns – As cargas de frutos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). AVG – média. $n = 3$.

De modo geral, os ácidos orgânicos do ciclo do ácido tricarboxílico tendem a reduzir no estágio final de maturação de frutos, que tem sido sugerido como sendo causado pelo metabolismo básico aumentado e síntese de açúcar ou compostos secundários em frutos maduros (BATISTA-SILVA et al., 2018; BERÜTER, 2004; DURMAZ et al., 2010; ETIENNE et al., 2013; JIANG et al., 2019; LOMBARDO et al., 2011). Rogers et al. (1999) relataram que as sementes jovens de café tem alta concentração de ácido quínico e os níveis diminuem à medida que o fruto atinge o estágio final do seu desenvolvimento.

Os dados do presente trabalho indicam que o maior enfolhamento em plantas com menor carga pode ter afetado a maturação dos frutos (vide item 3.1). Ou seja, os dados obtidos indicam que os frutos oriundos de plantas com carga de 30% e/ou 60% apresentaram maior acúmulo de ácidos orgânicos do ciclo do ácido tricarboxílico em razão do seu menor grau de maturação comparado aos frutos das plantas controle (Figura 50 e 52). O maior acúmulo de ácido-4-cafeoilquínico nos grãos oriundos de plantas com carga de 30% e 60% também indica que esses frutos apresentaram menor grau de maturação (Figura 53E). A redução do acúmulo de ácidos orgânicos do ciclo do ácido tricarboxílico pode ser associada com o seu uso para a síntese de antocianina na casca do fruto (LOMBARDO et al., 2011; DURMAZ et al., 2010; FAMIANI et al., 2000). De fato, os ácidos orgânicos do ciclo do ácido tricarboxílico podem ter sido utilizados para síntese de antocianina porque a casca do fruto oriundo das plantas com carga de 100% apresentaram maior quantidade desse pigmento (vide item 3.3.1). Segundo Rogers et al. (1999) os grãos de café reduzem o teor de ácido-4-cafeoilquínico durante o processo de maturação, reforçando a ideia de que o maior enfolhamento em plantas desbastadas aumentou o tempo de maturação dos frutos dessas plantas.

Em contraste aos outros ácidos orgânicos do ciclo do ácido tricarboxílico, foi observado que o fumarato se acumulou mais em frutos, casca e grãos oriundos das plantas com carga de 60% e 100%. Neste sentido, sugere-se a existência de fatores diversos não analisados no presente trabalho, desde eventos reguladores pré-traducionais até a atividade de enzimas de interconversão de ácidos orgânicos do ciclo do ácido tricarboxílico, os quais apresentam comunicações com diversas vias metabólicas, como a gliconeogênese, reações de fermentação que produzem etanol, síntese de compostos secundários e síntese de aminoácidos (FAMIANI et al., 2000; LAVAL-MARTIN; FARINEAU; DIAMOND, 2008; RUFFNER, 1982).

4. CONCLUSÕES

Por ser o primeiro trabalho detalhado sobre a bienalidade de produção do cafeeiro, fica clara a complexidade de se estudar o fluxo de compostos de carbono e nitrogênio durante o desenvolvimento da cultura que apresenta crescimento contínuo e variações marcantes entre as plantas cultivadas em campo.

Pelos dados obtidos de biometria e bioquímica, podemos concluir que a alta carga de frutos prejudica principalmente o crescimento da vegetação nova e aumenta competição entre os frutos afetando o seu tamanho e sua massa unitária. Essa redução do crescimento vegetativo e de frutos se deve principalmente pelo esgotamento de amido nos ramos que contribuem fortemente para o aporte de carbono para os órgãos dreno. A folha velha fornece sacarose para promover o crescimento vegetativo e de frutos, mas esse suprimento de carbono parece não ser suficiente para manutenção do crescimento dos frutos em excesso. Neste caso, o amido é então consumido dos ramos dessas plantas resultando no aumento do teor de sacarose nos ramos e folhas maduras, os quais são os maiores responsáveis por destinar carbono para o crescimento e desenvolvimento dos frutos.

Em plantas com carga de frutos reduzida, os órgãos fonte de carbono são diferentes das plantas com alta produção de frutos. Neste caso, o ramo e folha madura fornecem sacarose para o crescimento da vegetação nova e frutos sem gasto aparente do amido acumulado nos ramos. As folhas e os ramos velhos são os principais contribuintes imediatos de nitrogênio, mas os ramos são os principais órgãos fonte desse nutriente tendo grande capacidade de armazenar nitrogênio e de disponibilizá-lo para as plantas sob alta produção de frutos. Assim, o nitrogênio e carbono armazenado nos ramos têm papel fundamental para tamponar a depleção desses nutrientes causada pelo número excessivo de drenos metabólicos.

Os frutos das plantas com carga reduzida parecem ter sido sombreados pelo abundante crescimento de folhas e ramos de forma distinta dos frutos oriundos das plantas com carga alta de frutos. Esse sombreamento parece ter ocasionado menor grau de maturação dos frutos dessas plantas em razão do aumento dos compostos fenólicos e redução de pectina e antocianina nos frutos e/ou nos seus tecidos. Entretanto, esse efeito sobre a maturação dos frutos é tênue não alterando a quantidade de sacarose e aminoácidos solúveis totais nos frutos e em nenhum dos tecidos que os compõem. Utilizando uma abordagem metabolômica, foi confirmada que os ácidos orgânicos foram influenciados pelo menor grau de maturação dos frutos oriundos das plantas com carga reduzida. Essa evidência também suporta a ideia de que o maior crescimento vegetativo das plantas com carga reduzida pode aumentar o tempo de maturação dos frutos.

Analisando o perfil de aminoácidos, foi confirmada que as folhas velhas e maduras são os órgãos fonte principais de nitrogênio para os drenos fisiológicos. A redistribuição de nitrogênio dessas folhas na forma de asparagina, glutamina, tirosina e fenilalanina para os drenos ocorreu em plantas com carga de frutos excessiva. Esse fluxo de nitrogênio para as drenos fisiológicos em conjunto com a degradação de proteínas dos ramos dessas plantas culminaram com aumento de fenilalanina nos grãos, glutamina e aspartato nos frutos e alanina nas folhas novas em comparação com as plantas com carga de frutos reduzida.

Por fim, houve estímulo da síntese de putrescina nos grãos provavelmente como um mecanismo para reajustar o fluxo de carbono e nitrogênio no organismo vegetal inicialmente perturbado em resposta à carga de frutos. Neste sentido, novas investigações pré e pós traducionais precisam ser desenvolvidas a fim de elucidar a interrelação do metabolismo de carbono e nitrogênio para a homeostase de seus metabólitos em resposta à carga de frutos.

REFERÊNCIAS

- ALFONSI, E. L.; FAHL, J. I.; CARELLI, M. L. C.; FAZUOLI, L. C. Crescimento, fotossíntese e composição mineral em genótipos de *Coffea* com potencial para utilização como porta-enxerto. **Bragantia**, v. 64, p.1-13, 2005.
- ALLEN, S.; SMITH, J. A. C. Ammonium Nutrition in *Ricinus communis*: Its Effect on Plant Growth and the Chemical Composition of the Whole Plant, Xylem and Phloem Saps. **Journal of Experimental Botany**, v. 37, n. 184, p. 1599–1610, 1986.
- ARIAS, M. C.; PELLETIER, S.; HILLIOU, F.; WATTEBLED, F.; RENOU, JEAN-PIERRE; HULST, C. From dusk till dawn: the *Arabidopsis thaliana* sugar starving responsive network. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1–9, 2014.
- ARIAS, M.; CARBONELL, J.; AGUSTÍ, M. Endogenous free polyamines and their role in fruit set of low and high parthenocarpic ability citrus cultivars. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 8, p. 845–853, 2005.
- AVIN-WITTENBERG, T.; TZIN, V.; ANGELOVICI, R.; LESS, H.; GALILI, G. Deciphering energy-associated gene networks operating in the response of Arabidopsis plants to stress and nutritional cues. **Plant Journal**, v. 70, n. 6, p. 954–966, 2012.
- BATISTA-SILVA, W.; NASCIMENTO, V. L.; MEDEIROS, D. B.; NUNES-NESE, A.; RIBEIRO, D. M.; ZSOGON, A.; ARAÚJO, W. Modifications in Organic Acid Profiles During Fruit Development and Ripening: Correlation or Causation? **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. November, p. 1–20, 2018.
- BERÜTER, J. Carbohydrate metabolism in two apple genotypes that differ in malate accumulation. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 9, p. 1011–1029, 2004.
- BOTE, A. D.; JAN, VOS. Branch growth dynamics, photosynthesis, yield and bean size distribution in response to fruit load manipulation in coffee trees. **Trees**, v. 30, n. 4, p.1275-1285, 2016.
- BOUCHÉ, N.; FROMM, H. GABA in plants: Just a metabolite? **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 3, p. 110–115, 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 2, p.248-254, 1976.
- CAGLIANI, L. R.; PELLEGRINO, G.; GIUGNO, G.; CONSONNI, R. Quantification of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. robusta in roasted and ground coffee blends. **Talanta**, v. 106, p. 169–173, 2013.
- CALDANA, C.; LI, Y.; LEISSE, A.; ZHANG, Y.; BARTHOLOMAEUS, L.; FERNIE, A.R.; WILLMITZER, L.; GIAVALISCO, P. Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in Arabidopsis thaliana. **The Plant Journal**, v. 73, n. 1, p. 897-909, 2013.
- CANNELL, M. G. R. Production and distribution of dry matter in trees of *Coffea arabica* L. in Kenya as affected by seasonal climatic differences and the presence of fruits. **Annals Applied Biology**, v. 67, n. 1, p.99–120, 1971a.
- CANNELL, M. G. R. Effects of fruiting, defoliation and ring-barking on the accumulation and distribution of dry matter in branches of *Coffea arabica* L. in kenya. **Experimental Agriculture**, v. 7, n. 1, p. 63–74, 1971b.
- CANNELL, M. G. R. Seasonal patterns of growth and development of Arabica coffee in Kenya. Part III. Changes in the photosynthetic capacity of the trees. **Kenya Coffee**, v. 36, p. 68–74, 1971c.
- CANNELL, M. G. R.; HUXLEY, P. A. Seasonal differences in the pattern of assimilate movement in branches of *Coffea arabica* L.. **Annals of Applied Biology**, v. 64, n. 1, p. 345–357, 1969.
- CANNELL, M. G. R. Physiology of the coffee crop. In: Clifford MN, Willson KC (eds), **Coffee - Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage**, p. 108-134, 1985.

- CARVALHO, C. H. S.; RENA, A. B.; PEREIRA, A. A.; CORDEIRO, A. T. Relação entre a produção, teores de N, P, K, Ca, Mg, amido e a seca dos ramos do catimor (*Coffea arabica* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 665–673, 1993.
- CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.6, n.1, p.71–80, 1975.
- CHAVES FILHO, J. T.; OLIVEIRA, R. F. Variação sazonal do amido armazenado em ramos plagiotrópicos do cafeeiro. **A revista Estudos – Vida e Saúde (EVS)**, v. 35, n. 1, p.85–101, 2008.
- COLTRI, P. P.; ZULLO—JÚNIOR, J.; DUBREUIL, V.; RAMIREZ, C. M.; PINTO, S. H.; CORAL, G.; LAZARIM, C. G.. Empirical models to predict LAI and aboveground biomass of *Coffea arabica* under full sun and shaded plantation: a case study of South of Minas Gerais, Brazil. **Agroforestry Systems**, v. 89, n. 4, p. 621–636, 2015.
- COOPER, A. J. L.; JEITNER, T. M. Central role of glutamate metabolism in the maintenance of nitrogen homeostasis in normal and hyperammonemic brain. **Biomolecules**, v. 6, n. 2, 2016.
- COSTA, M. J. N.; ZAMBOLIM, L.; RODRIGUES, F. A. Effect of levels of coffee berry removals on the incidence of rust and on the level of nutrients, carbohydrates and reductor sugar. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 564–571, 2006.
- DAMATTA, F. M.; LOOS, R. A.; SILVA, E. A.; LOUREIRO, M. E. Leaf photosynthetic characteristics of *Coffea canephora* as affected by nitrogen and water availability. **Journal Plant Physiology**, v. 159, n. 5, p.975–981, 2002.
- DAMATTA, F. M.; ROBERTO, L. C.; WERNER, C. A.; SAMUEL, C. V. M.; WAGNER, L. A.; ALISDAIR, R. F.; GUSTAVO, A. B. K. M. In field-grown coffee trees source–sink manipulation alters photosynthetic rates, independently of carbon metabolism, via alterations in stomatal function. **New Phytologist**, v. 178, n. 2, p.348–357, 2008.
- DAMATTA, F. M.; RONCHI, C. P.; MESTRI, M.; BARROS, R. S. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 4, p.485–510, 2007.
- DAMATTA, F. M.; GODOY, A. G.; MENEZES-SILVA, P. E.; MARTINS, S. C. V.; SANGLARD, L. M. V. P.; MORAES, L. E.; TORRE-NETO, A.; GHINI, R. Sustained enhancement of photosynthesis in coffee trees grown under free-air CO₂ enrichment conditions: Disentangling the contributions of stomatal, mesophyll, and biochemical limitations. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 1, p. 341–352, 2016.
- DASGUPTA, K.; KHADILKAR, A. S.; SULPICE, R.; PANT, B.; SCHEIBLE, W. R.; FISAHN, J.; STITT, M.; AYRE, B. G. Expression of Sucrose Transporter cDNAs Specifically in Companion Cells Enhances Phloem Loading and Long-Distance Transport of Sucrose but Leads to an Inhibition of Growth and the Perception of a Phosphate Limitation. **Plant Physiology**, v. 165, n. 2, p. 715–731, 2014.
- DAVIS, A., GOVAERTS, R., BRIDSON, D.; STOFFELEN, P. An annotated taxonomic conspectus of the genus. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, p. 465–512, 2006.
- DAVIS, A. P.; GOLE, T. W.; BAENA, S.; MOAT, J. The Impact of Climate Change on Indigenous Arabica Coffee (*Coffea arabica*): Predicting Future Trends and Identifying Priorities. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 10–14, 2012.
- DE LA TORRE, F.; CANAS, R. A.; PASCUAL, M. B.; AVILA, C.; CÁNOVAS, F. M. Plastidic aspartate aminotransferases and the biosynthesis of essential amino acids in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 19, p. 5527–5534, 2014.

- DÍAZ-MENDOZA, M.; VELASCO-ARROYO, B.; GONZÁLEZ-MELENDI, P.; MARTÍNEZ, M.; DIAZ, I. C1A cysteine protease-cystatin interactions in leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 14, p. 3825–3833, 2014.
- DING, N.; CHEN, Q.; ZHU, Z.; PENG, L.; GE, S.; JIANG, Y. Effects of crop load on distribution and utilization of ^{13}C and ^{15}N and fruit quality for dwarf apple trees. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.
- DUAN, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M.; STOFFELEM, P. Photosynthetic response to low sink demand after fruit removal in relation to photoinhibition and photoprotection in peach trees. **Tree Physiology**, v. 28, n. 1, p. 123–132, 2007.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p.350–356, 1956.
- DURMAZ, G.; ÇAM, M.; KUTLU, T.; HISIL, Y. Some Physical and Chemical Changes during Fruit Development of Five Common Apricot (*Prunus armeniaca* L.) Cultivars. **Food Science and Technology Research**, v. 16, n. 1, p. 71–78, 2010.
- ETIENNE, A.; GENÁRD, M.; LOBIT, P.; MBEGUIÉ-A-MBÉGUIE, D.; BUGAUD, C. What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 6, p. 1451–1469, 2013.
- ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 488–495, 2012.
- FADDA, A.; MULAS, M. Chemical changes during myrtle (*Myrtus communis* L.) fruit development and ripening. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 3, p. 477–485, 2010.
- FAIT, A.; FROMM, H.; WALTER, D.; GALILI, G.; FERNIE, A. R. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 1, p. 14–19, 2008.
- FAMIANI, F.; WALKER, R. P.; TÉCSI, L.; CHEN, Z. H.; PROIETTI, P.; LEEGOOD, R. C. immunohistochemical study of the compartmentation of metabolism during the development of grape (*Vitis vinifera* L.) berries. **Journal Experimental of Botany**, v. 51, n. 345, p. 675–683, 2000.
- FAN, S.-C.; LIN, C. S.; HSU, P. K.; LIN, S. H.; TSAY, Y. F. The Arabidopsis Nitrate Transporter NRT1.7, Expressed in Phloem, Is Responsible for Source-to-Sink Remobilization of Nitrate. **Plant Cell**, v. 21, n. 9, p. 2750–2761, 2009.
- FELLER, U.; FISCHER, A. Nitrogen metabolism in senescing leaves. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 13, n. 3, p.241-273, 1994.
- FICHTNER, K.; CHULZE, E. D. The effect of nitrogen nutrition on annuals originating from habitats of different nitrogen availability. **Oecologia**, v. 92, n. 2, p.236-241, 1992.
- FISCHER, P.; KLEIN, U. Localization of nitrogen-assimilating enzymes in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology**, v. 88, n. 3, p.947-52, 1988.
- FISHER, G.; MERCHÁN-ALMANZA, P. J.; RAMIREZ, F. Source-sink relationships in fruit species: A review. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, v.6, n.2, p. 238-253, 2012.
- FORTUNATO, A.; LIDON, F. C.; BATISTA-SANTOS, P.; LEITÃO, A. E.; PAIS, I. P.; RIBEIRO, A. I.; RAMALHO, J.C. Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of *Coffea* sp. under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. **Journal Plant Physiology**, v. 167, n. 5, p.333–342, 2010.

- FRANK, N.; VAAST, P.; GÉNARD, M.; DAUZAT, J. Soluble sugar mediate sink feedback down-regulation of leaf photosynthesis in field-grown *Coffea arabica*. **Tree Physiology**, v. 34, n. 4, p.517-525, 2006.
- GEROMEL, C.; FERREIRA, L. P.; BOTTCHEER, A.; POT, D.; PEREIRA, L. F. P.; LEROY, T.; VIEIRA, L. G. E.; MAZZAFERA, P.; MARRACHINI, P. Sucrose metabolism during fruit development in *Coffea racemosa*. **Annals of Applied Biology**, v. 152, n. 2, p. 179–187, 2008.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 1, p. 26–33, 2010.
- GREGERSEN, P. L.; CULETIC, A.; BOSCHIAN, L.; KRUPINSKA, K. Plant senescence and crop productivity. **Plant Molecular Biology**, v. 82, n. 6, p. 603–622, 2013.
- GUARDIOLA, J. L.; GARCÍA-LUIS, A. Increasing fruit size in citrus. Thinning and stimulation of fruit growth. **Plant Growth Regulation**, v. 31, n. 1–2, p. 121–132, 2000.
- GUYOT, B.; GUEULE, D.; MANEZ, J. C.; PERRIOT, J. J.; GIRON, J. VILLAIN, L.. Influence de l'altitude et de l'ombrage sur la qualité des cafés Arabica. **Plantations, Recherche, Développement**, v. 3, p. 272–283, 1996.
- HAARER, A. E. **Modern Coffee Production**. Leonard Hill, London. 1958.
- HALFORD, N. G.; CURTIS, T. Y.; MUTTUCUMARU, N.; POSTLES, J.; MOTTRAM, D. S. Sugars in crop plants. **Annals of Applied Biology**, v. 158, n. 1, p. 1–25, 2011.
- HAYASHI, H.; CHINO, M. Nitrate and Other Anions in the Rice Phloem Sap. **Plant and Cell Physiology**, v. 26, n. 2, p. 325–330, 2017.
- HOFSTRA, R.; LANTING, L.; DE-VISSER, R. Metabolism of *Urtica dioica* as dependent on the supply of mineral nutrients. **Physiologia Plantarum**, v. 63, n. 1, p.13-18, 1985.
- HORTENSTEINER, S.; FELLER, U. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. **Journal Experimental Botany**, v. 53, n. 370, p.927-937, 2002.
- HSU, P.-K.; TSAY, Y.-F. Two Phloem Nitrate Transporters, NRT1.11 and NRT1.12, Are Important for Redistributing Xylem-Borne Nitrate to Enhance Plant Growth. **Plant Physiology**, v. 163, n. 2, p. 844–856, 2013.
- HUBER, S. C.; HUBER, J. L. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 47, n. 1, p.431-444, 1996.
- HUGHES, N. M.; NEUFELD, H. S.; BURKEY, K. O. Functional role of anthocyanins in high-light winter leaves of the evergreen herb *Galax urceolata*. **New Phytologist**, v. 168, n. 3, p. 575–587, 2005.
- HUXLEY, P.A.; PATEL, R.Z.; KABAARA, A. M.; MITCHELL, H. W. Tracer studies with P on the distribution of functional roots of Arabica coffee in Kenya. **Annals Applied Biology**. v. 77, p. 159-180, 1974.
- HUNT, E.; GATTOLIN, S.; NEWBURY, J. H.; BALE, J. S.; TSENG, H. M.; BARRET, D. A.; PRITCHARD, J. A mutation in amino acid permease AAP6 reduces the amino acid content of the Arabidopsis sieve elements but leaves aphid herbivores unaffected. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 1, p. 55–64, 2010.
- IGLESIAS, J. D.; LISO, I.; TADEO, F. R.; TALON, M. Regulation of photosynthesis through source:sink imbalance in citrus is mediated by carbohydrate content in leaves. **Physiologia Plantarum**, v. 116, n. 4, p.563-572, 2002.
- JHA, S.; BACON, C. M.; PHILLPOT, S. M.; MENDEZ, E.; LADERACH, P.; RICE, R. A. Shade coffee: Update on a disappearing refuge for biodiversity. **BioScience**, v. 64, n. 5, p. 416–428, 2014.
- JIANG, C. C.; FANG, Z. Z.; ZHOU, D. R.; PAN, S. L.; YE, X. F. Changes in secondary metabolites, organic acids and soluble sugars during the development of plum fruit cv. 'Furongli' (*Prunus salicina* Lindl). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 3, p. 1010–1019, 2019.

- JONES, D.B. Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of protein. **USDA Circ**, v. 183; p. 1-21, 1931.
- JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. **New York: Mcgraw-Hill Book**, 1940. 523 p.
- JORQUERA-FONTENA, E.; ALBERDI, M.; FRANCK, N. Pruning severity affects yield, fruit load and fruit and leaf traits of 'Brigitta' blueberry. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 14, p. 1–12, 2014.
- KHOO, H. E.; AZLAN, A.; TANG, S. T.; LIM, S. M. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food & Nutrition Research**, v. 61, n. 1, p. 13-19, 2017.
- KOSHIRO, Y.; JACKSON, M. C.; NAGAI, C.; ASHIHARA, H. Changes in the content of sugars and organic acids during ripening of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* fruits. **European Chemical Bulletin**, v. 4, n. 8, p. 378–383, 2015.
- KEIDEL, A.; STETTEN, D. V.; RODRIGUES, C.; MÁGUAS, C.; HILDEBRANDT, P. Discrimination of Green Arabica and Robusta Coffee Beans by Raman Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 21, p. 11187–11192, 2010.
- LALONDE, S.; BOLES, E.; HELLMANN, H.; BARKER, L.; PATRICK, J. W.; FROMMER, W. B.; WARD, J. M. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. **Plant Cell**, v. 11, n. 4, p.707-726, 1999.
- LAVAL-MARTIN, D.; FARINEAU, J.; DIAMOND, J. Light versus Dark Carbon Metabolism in Cherry Tomato Fruits: I. Occurrence of Photosynthesis. Study of the Intermediates. **Plant Physiology**, v. 60, n. 6, p. 872–876, 2008.
- LEMOINE, R.; CAMERA, S.; ATANASSOVA, R.; DÉDALDÉCHAMP, F.; ALLARIO, T.; POURTAU, N.; BONNEMAIN, J.; LALOI, M.; COUTOS-THÉVENOT, P.; MAUROUSSET, L.; FAUCHER, M.; GIROUSSE, C.; LEMONNIER, P.; PARRILLA, J.; DURAND, M. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n.272, p.1-21, 2013.
- LEROY, T.; RIBEYRE, F.; BERTRAND, B.; CHARMETANT, P.; DUFOUR, M.; MONTAGNON, C.; MARRACHINI, P.; POT, D. Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 229–242, 2006.
- LI, W. E. I. D.; DUAN, W.; FAN, P. G.; YAN, S. T.; LI, S. H. Photosynthesis in response to sink – source activity and in relation to end products and activities of metabolic enzymes in peach trees. **Tree Physiology**, v. 27, p. 1307–1318, 2007.
- LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v. 11, n. 5, p.591-592, 1983.
- LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, p. 387-396, 2006.
- LOMBARDO, V. A. et al. Metabolic Profiling during Peach Fruit Development and Ripening Reveals the Metabolic Networks That Underpin Each Developmental Stage. **Plant Physiology**, v. 157, n. 4, p. 1696–1710, 2011.
- LONG, S. P.; ZHU, X.; NAIDU, S. L.; ORT, D. R. Can improvement in photosynthesis increase crop yields? **Plant, Cell Environment**, v. 29, n. 3, p.315-330, 2006.
- MACNEILL, G. J.; MEHRPOUYAN, S.; MINOW, M. A. A.; PATTERSON, J. A.; TETLOW, I. J.; EMES, M. J. Starch as a source, starch as a sink: The bifunctional role of starch in carbon allocation. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 16, p. 4433–4453, 2017.

- MAJUMDAR, R.; BARCHI, B.; TURLAPATI, S. A.; GAGNE, M.; MINOCHA, R.; LONG, S.; MINOCHA, S. C. Glutamate, Ornithine, Arginine, Proline, and Polyamine Metabolic Interactions: The Pathway Is Regulated at the Post-Transcriptional Level. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1–17, 2016.
- MARCELIS, L. F. M. Sink strength as a determinant of dry matter partitioning in the whole plant. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. Special_Issue, p. 1281–1291, 1996.
- MAZORRA, M. F.; QUINTANDA, A. P.; MIRANDA, D.; FISHERM, G.; BERNARDO, C. Análisis sobre el desarrollo y la madurez fisiológica del fruto de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en la zona de Sumapaz (Cundinamarca). **Agronomía Colombiana**, v. 21, n. 3, p.175-189, 2003.
- MAZZAFERA, P.; GONÇALVES, K. V. Nitrogen compounds in the xylem sap of coffee. **Phytochemistry**, v. 50, n. 3, p. 383–386, 1998.
- MAZZAFERA, P.; ROBINSON, S. P. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. **Phytochemistry**, v. 55, n. 4, p.285-296, n. 2000.
- MAZZUCOTELLI, E.; TARTARI, A.; CATTIVELLI, L.; FORLANI, G. Metabolism of γ -aminobutyric acid during cold acclimation and freezing and its relationship to frost tolerance in barley and wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 14, p. 3755–3766, 2006.
- MCCORMICK, A. J.; CRAMER, M. D.; WATT, D. A. Sink strength regulates photosynthesis in sugarcane. **New Phytologist**, v. 171, n. 4, p.759-770, 2006.
- MILLER, A. J.; FAN, X.; ORSEL, M.; SMITH, S. J.; WELLS, D. M. Nitrate transport and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 9, p. 2297–2306, 2007.
- MOHAPATRA, S.; MINOCHHA, R. LONG, S.; MINOCHA, S. C. Transgenic manipulation of a single polyamine in poplar cells affects the accumulation of all amino acids. **Amino Acids**, v. 38, n. 4, p. 1117–1129, 2010.
- OSORIO, S.; RUAN, Y. L.; FERNIE, A. R. An update on source-to-sink carbon partitioning in tomato. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 516, p.1-11, 2014.
- PAGE, A. F.; CSEKE, L. J.; MINOCHA, R.; TURLAPATI, S. A.; PODILA, G. K.; ULANOV, A.; LI, Z.; MINOCHA, S. C. Genetic manipulation of putrescine biosynthesis reprograms the cellular transcriptome and the metabolome. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–15, 2016.
- PALMER, J. W. Effects of varying crop load on photosynthesis, dry matter production and partitioning of Crispin/M.27 apple trees. **Tree Physiology**, v. 11, n. 1, p. 19–33, 1992.
- PETRIE, P. R.; TROUGHT, M. C. T.; HOWELL, G. S. Growth and dry matter partitioning of Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.) in relation to leaf area and crop load. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 6, n. 1, p. 40–45, 2000.
- PILKINGTON, S. M.; ENCKE, B.; KROHN, N.; HOHNE, M.; STITT, M.; PYL, E. T. Relationship between starch degradation and carbon demand for maintenance and growth in *Arabidopsis thaliana* in different irradiance and temperature regimes. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, n. 1, p. 157–171, 2015.
- PIMENTA, C. J.; CHAGAS, S. J. R.; COSTA, L. Comunicação pectinas e enzimas pectinolíticas em café (*Coffea arabica* L.) colhido em quatro estádios de maturação. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 4, p. 1079-1083, 2000.
- POMPELLI, M. F.; MARTINS, S. C. V.; ANTUNES, W. C.; CHAVES, A. R. M.; DAMATTA, F. M. Photosynthesis and photoprotection in coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions. **Journal Plant Physiology**, v. 167, n. 13, p.1052–1060, 2010.

- QUENTIN, A. G.; CLOSE, D. C.; HENNEN, L. M. H. P.; PINKARD, E. A. Down-regulation of photosynthesis following girdling, but contrasting effects on fruit set and retention, in two sweet cherry cultivars. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 73, p. 359–367, 2013.
- RAMALHO, J. C.; CAMPOS, P. S.; TEIXEIRA, M.; NUNES, M. A. Nitrogen dependent changes in antioxidant systems and in fatty acid composition of chloroplast membranes from *Coffea arabica* L. plants submitted to high irradiance. **Plant Science**, v. 135, n. 2, p.115–124, 1998.
- RAMALHO, J. D. C.; PONS, T. L.; GROENVELD, H. W.; AZINHEIRA, H. G.; NUNES, M. A. Photosynthetic acclimation to light conditions in mature leaves of *Coffea arabica* L.: role of xanthophylls, quenching mechanisms and nitrogen nutrition. **Australian Journal Plant Physiology**, v. 27, n. 6, p.43–51, 2000.
- RANDHIR, R.; MS, Y. L.; SHETTY, K. Dark Germinated Fenugreek Sprouts in Response To Peptide and Phytochemical Elicitors. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 13, n. 4, p. 295–307, 2004.
- RIVAS, F.; GRAVINA, A.; AGUSTÍ, M. Girdling effects on fruit set and quantum yield efficiency of PSII in two Citrus cultivars. **Tree Physiology**, v. 27, n. 4, p. 527–535, 2007.
- ROBERTS, I. N.; CAPUTO, C.; CRIADO, M. V.; FUNK, C.. Senescence-associated proteases in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 145, n. 1, p. 130–139, 2012.
- ROGERS, W. J.; MICHAUX, S.; BASTIN, M.; BUCHELI, P. Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. **Plant Science**, v. 149, n. 2, p. 115–123, 1999.
- ROMANO, R.; SANTINI, A.; GROTTAGLIE, L. L.; MANZO, N.; VISCONDI, A.; RITIENI, A. Identification markers based on fatty acid composition to differentiate between roasted Arabica and Canephora (Robusta) coffee varieties in mixtures. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 35, n. 1, p. 1–9, 2014.
- RUFFNER, H. P. Metabolism of Tartaric and Malic Acids in Vitis: A Review-Part B. **Vitis**, v. 21, p. 346–358, 1982.
- RUPRECHT, C.; MUTWILL, M.; SAXE, F.; EDER, M.; NIKOLOSKI, Z.; PERSSON, S. Large-Scale Co-Expression Approach to Dissect Secondary Cell Wall Formation Across Plant Species. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, n. 6, p. 1–13, 2011.
- SÁIZ DEL RIO, J. F.; FERNÁNDEZ, C. E.; BELLAVITA, O. Distribution of absorbing capacity of coffee roots determined by radioactive tracers. **Society for Horticultural Science Proceedings**, v. 77, p. 240-244, 1961.
- SAMUOLIENĖ, G.; CEIDAITĖ, A.; SIRTAUTAS, R.; DUCHOVSKIS, P.; KVIKLYS, D. Effect of crop load on phytohormones, sugars, and biennial bearing in apple trees. **Biologia Plantarum**, v. 60, n. 2, p. 394–400, 2016.
- SANTIAGO, J. P.; TEGEDER, M. Connecting Source with Sink: The Role of Arabidopsis AAP8 in Phloem Loading of Amino Acids. **Plant Physiology**, v. 171, n. 1, p. 508–521, 2016.
- SOUZA, A. P.; LEITE, D. C. C.; PATTATHIL, S.; HAHM, M. G.; BUCKERIGDE, M. S. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 2, p. 564–579, 2013.
- SMITH, J. A. C.; MILBURN, J. A. Planta Osmoregulation and the Control of Phloem-Sap Composition. **Planta**, v. 34, p. 28–34, 1980.
- STITT, M. Nitrate regulation of metabolism and growth. **Current Opinion Plant Biology**, v. 2, n. 3, p.178-186, 1999.
- STITT, M. Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. **Plant, Cell and Environment**, v.14, n. 8, p.741-762, 1991.

- STITT, M.; SCHULZE, E. D. Does Rubisco control the rate of photosynthesis and plant growth? An exercise in molecular ecophysiology. **Plant Cell Environment**, v. 17, n. 5, p.465-487, 1994.
- SU-MAY, Y.; SHUEN-FANG, L.; TUAN-HUA, D. H. Source sink communication: regulated by hormone, nutrients, and stress cross-signaling. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 12, p. 844-857, 2015.
- TABATA H, KATSUBE T, TSUMA T, OHTA Y, IMAWAKA N, UTSUMI T. Isolation and evaluation of the radical-scavenging activity of the antioxidants in the leaves of an edible plant, *Mallotus japonicus*. **Food Chemistry**, v. 109, p. 64-71. 2008
- TAOCHY, C.; GAILLARD, I.; IPOTESI, E.; OOWEN, R.; LEONHARDT, N.; ZIMMERMAN, S.; PELTIER, J. B.; SZPONARSKI, W.; SIMONNEAU, T.; SENTENAC, H.; GIBRAT, R.; BOYER, J. C. The Arabidopsis root stele transporter NPF2.3 contributes to nitrate translocation to shoots under salt stress. **Plant Journal**, v. 83, n. 3, p. 466-479, 2015.
- TEGEDER, M.; RENTSCH, D. Uptake and Partitioning of Amino Acids and Peptides. **Molecular Plant**, v. 3, n.6, p.997-1011, 2010.
- TILSNER, J.; KASSNER, N.; STRUCK, C.; LOHAUS, G. Amino acid contents and transport in oilseed rape (*Brassica napus* L.) under different nitrogen conditions. **Planta**, v. 221, n. 3, p. 328-338, 2005.
- URBAN, L.; LU, P.; THIBAUD, R. Inhibitory effect of flowering and early fruit growth on leaf photosynthesis in mango. **Tree**, v. 24, n. 262, p. 387-399, 2003.
- VAAST, P.; ANGRAND, J.; FRANCK, N.; DAUZAT, J.; GÉNARD, M. Fruit load and branch ring-barking affect carbon allocation and photosynthesis of leaf and fruit of *Coffea arabica* in the field. **Tree Physiology**, v. 25, n. 6, p.753-760, 2005.
- VAAST, P.; BERTRAND, B.; PERRIOT, J. J.; GUYOT, B.; GÉNARD, M. Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. **Journal Science Food Agriculture**, v. 86, n. 2, p.197-204, 2006.
- VAN HANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 280-283, 1968.
- VERSLUES, P. E.; SHARMA, S. Proline Metabolism and Its Implications for Plant-Environment Interaction. **The Arabidopsis Book**, v. 8, p. e0140, 2010.
- XIA, X.; FAN, X.; WEI, J.; FENG, H.; QU, H.; XIE, D.; MILLER, A. J.; XU, G. Rice nitrate transporter OsNPF2.4 functions in low-affinity acquisition and long-distance transport. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 1, p. 317-331, 2015.
- WARING, R.H.; MCDONALD, A.J.S.; LARSSON, S.; ERICSSON, T.; WIREN, A.; ARWIDSSON, E., ERICSSON, A., AND LOHAMMAR, T. Differences in chemical composition of plants grown at constant relative growth rates with stable mineral nutrition. **Oecologia**, v. 66, n. 2, p.157-160, 1985.
- YEMM, E. M.; COCKING, E. C. Estimation of amino acids by ninhydrin. **Analyst**, v.80, n. 19, p.209-213, 1955.
- YEMM, E.W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v.57, p. 508-514, 1954.
- ZHANG, J.; WANG, X.; YU, O.; TANG, J. GU, X.; WAN, X.; FANG, C. Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria×ananassa* Duch.) during fruit development and maturation. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 3, p. 1103-1118, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Perfil de compostos nitrogenados em folhas, frutos, casca e grão de plantas de café em resposta à carga de frutos.

Tissue	Fruit load %	Nitrogen compounds (equivalent of ribitol g DM ⁻¹)																			
		Ala	β-ala	Asn	Asp	GABA	Gln	Gly	His	Hse	Ile	Leu	Orn	Phe	Tyr	Pro	Ser	Thr	Tryp	Val	Put
Old leaves	0	11.44a	0.01a	25.90a	3.57a	0.11a	0.03a	0.28a	0.08a	0.02a	0.91a	0.63a	0.15a	1.79a	1.82a	13.11a	7.39a	1.11a	1.72a	1.59a	1.92a
	100	14.86a	0.02a	12.53b	3.17a	0.11a	0.02a	0.13a	0.05a	0.02a	0.56a	0.45a	0.06b	0.76b	0.59b	9.44a	4.11b	0.55a	1.41a	1.10a	3.20a
Mature leaves	0	13.75a	0.02a	13.46a	3.40a	0.13a	0.03a	0.30a	0.09a	0.02a	0.81a	0.64a	0.28a	1.37a	1.14a	13.47a	7.79a	1.00a	1.37a	1.46a	1.76a
	100	12.13a	0.02a	8.39a	2.31a	0.14a	0.01b	0.20a	0.04a	0.02a	0.56a	0.46a	0.03a	0.72b	0.69a	8.18a	5.96a	0.68a	1.39a	1.00a	2.34a
Young leaves	0	11.76b	0.02a	15.14a	3.75a	0.13a	0.02a	0.21a	0.10a	0.02a	1.18a	0.79a	0.12a	2.44a	0.84a	15.94a	9.75a	1.14a	2.27a	2.37a	3.56a
	100	17.82a	0.02a	9.84a	2.58a	0.20a	0.02a	0.23a	0.09a	0.02a	1.06a	0.79a	0.09a	1.81b	1.17a	11.59a	9.01a	0.99a	2.85a	1.92a	4.33a
Fruit	30	28.97a	0.05a	8.56a	5.74b	0.03	0.08a	0.84a	0.15a	0.03a	1.43a	2.24a	0.79b	0.67a	1.67a	35.37a	11.23a	0.50a	1.51a	2.91a	0.13a
	60	30.64a	0.07a	12.91a	9.90a	0.05	0.16a	1.15a	0.21a	0.06a	1.32a	1.76a	1.37a	0.69a	2.19a	33.13a	14.05a	0.72a	1.64a	3.17a	0.22a
	100	34.88a	0.08a	12.71a	8.87a	ND	0.16a	1.13a	0.21a	0.06a	1.49a	2.23a	1.04b	0.65a	1.88a	36.88a	14.03a	0.74a	1.51a	3.25a	0.18a
Pericarp	30	52.80a	0.09a	14.03a	10.70b	0.04a	0.15b	1.25a	0.27a	0.05a	2.27a	2.95a	1.54b	0.96a	2.95a	61.22a	21.69a	0.88a	2.47a	4.74a	0.04a
	60	59.06a	0.13a	18.74a	18.65a	0.09a	0.32a	1.84a	0.38a	0.11a	2.03a	1.99a	2.67a	0.91a	3.94a	64.01a	22.01a	1.31a	2.46a	5.24a	0.05a
	100	64.35a	0.16a	16.89a	16.77a	0.10a	0.32a	1.67a	0.36a	0.11a	2.14a	2.31a	2.02b	0.70a	3.12a	63.28a	27.03a	1.31a	1.95a	5.04a	0.04a
Bean	30	4.13a	0.01a	0.75a	0.79a	0.01	0.01a	0.42a	0.02a	0.01a	0.59a	1.52a	0.04a	0.38a	0.39b	2.10a	0.78a	0.11a	0.56a	1.08a	0.19b
	60	5.18a	0.01a	1.21a	1.15a	0.01	0.01a	0.46a	0.05a	0.01a	0.61a	1.52a	0.06a	0.46a	0.43b	2.23a	1.09a	0.13a	0.81a	1.11a	0.38a
	100	5.42a	0.01a	1.23a	1.18a	ND	0.01a	0.58a	0.06a	0.01a	0.84a	2.15a	0.06a	0.59a	0.64a	2.48a	1.03a	0.17a	1.07a	1.47a	0.33a

Ala – alanina; β-ala – beta-alanina; Asn – asparagina; Asp – aspartato; GABA – ácido gama-aminobutírico; Gln – glutamina; Gly – glicina; His – histidina; Hse – homoserine; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Orn – ornitina; Phe – fenilalanina; Tyr – tirosina; Pro – prolina; Ser – serina; Thr – treonina; Try – triptofano; Val – valina; Put – putrescina. Letras iguais, para cada metabólito em cada tecido, não apresentam diferenças significativas entre as cargas de frutos ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). $n = 3$; ND – Não detectado; Amostras obtidas aos 219 dias após o desbaste.

APÊNDICE B. Perfil ácidos orgânicos em folhas, frutos, casca e grão de plantas de café em resposta à carga de frutos.

Tissue	Fruit load %	Organic acids (equivalent of ribitol g DM ⁻¹)											
		4-CQA	Shikimate	Fumarate	Glutarate	Glycerate	Glycolate	Malate	Nicotinate	Phosphate	Pyruvate	Succinate	Threonate
Old leaves	0	0.01a	4.22a	0.38b	0.05a	0.31a	0.12a	6.61a	6.96a	0.91a	0.01a	0.33a	0.39a
	100	0.01a	3.83a	0.75a	0.06a	0.17a	0.09a	7.16a	7.11a	0.58a	0.01a	0.59a	0.47a
Mature leaves	0	0.01a	4.11a	0.64a	0.04a	0.30a	0.05a	7.99a	6.98a	0.40a	0.01a	0.60a	1.40a
	100	0.01a	3.94a	0.69a	0.06a	0.35a	0.06a	9.34a	6.47a	0.36a	0.01a	0.70a	0.93a
Young leaves	0	0.01a	4.49a	0.74a	0.06a	0.30a	0.05a	7.71a	8.38a	0.48a	0.01a	0.66a	0.88a
	100	0.01a	3.85a	0.82a	0.06a	0.40a	0.07a	9.32a	9.42a	0.51a	0.01a	0.83a	0.71a
Fruit	30	0.01< b	2.11a	0.98a	0.06a	0.25b	0.30a	8.13	5.86b	1.05a	0.03a	2.05a	0.86a
	60	0.01a	2.56a	1.17a	0.10a	0.42b	0.47a	ND	12.94a	1.83a	0.06a	3.72a	1.39a
	100	0.01a	2.33a	1.15a	0.11a	0.69a	0.67a	ND	10.76a	1.90a	0.06a	3.94a	1.64a
Pericarp	30	0.01< c	3.15a	1.33b	0.12a	0.45b	0.58a	15.39	11.71b	2.60a	0.06a	4.05a	1.67a
	60	0.02b	3.85a	2.74a	0.19a	0.77b	0.90a	ND	25.88a	3.53a	0.11a	7.39a	2.72a
	100	0.03a	3.67a	2.24b	0.20a	1.31a	0.89a	ND	21.51a	3.65a	0.10a	7.82a	3.22a
Bean	30	0.01	1.07a	0.01b	0.01b	0.05a	0.03a	1.30a	ND	0.10a	0.01a	0.05a	0.05a
	60	0.01	1.27a	0.05a	0.01b	0.06a	0.04a	2.06a	ND	0.13a	0.01a	0.06a	0.07a
	100	ND	0.99a	0.07a	0.02a	0.07a	0.05a	1.81a	ND	0.16a	0.02a	0.06a	0.06a

Letras iguais, para cada metabólito em cada tecido, não apresentam diferenças significativas entre as cargas de frutos ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$).. n = 3; ND – Não detectado; 0.01< valores menores que 0.01; Amostras obtidas aos 219 dias após o desbaste.

APÊNDICE C. Perfil carboidratos e açúcares alcoólicos em folhas, frutos, casca e grão de plantas de café em resposta à carga de frutos.

Tissue	Fruit load %	Carbohydrates				Alcoholic sugars		
		(equivalent of ribitol g DM ⁻¹)						
		1,6-Anhydro-beta-D-glucose	3,6-anhydro-Galactose	Arabinose	Maltose	Myo-Inositol	Erythritol	Galactinol
Old leaves	0	0.06a	0.08a	0.02a	0.01a	3.76a	0.09a	1.79a
	100	0.07a	0.08a	0.02a	0.01a	3.09a	0.14a	3.19a
Mature leaves	0	0.11a	0.03a	0.03a	4.60a	0.10a	5.30a	1.76a
	100	0.16a	0.03a	0.05a	6.22a	0.10a	9.15a	2.34a
Young leaves	0	0.12a	0.02a	0.03a	4.58a	0.10a	7.76a	3.56a
	100	0.16a	0.04a	0.04a	6.99a	0.12a	9.50a	4.33a
Fruit	30	0.21a	0.37a	ND	5.18a	0.82a	0.19a	0.13a
	60	0.23a	0.54a	0.31	6.72a	1.14a	0.24a	0.22a
	100	0.36a	0.62a	0.35	6.88a	1.25a	0.22a	0.18a
Pericarp	30	0.42a	0.69a	0.43a	8.28a	1.60a	0.21a	0.04a
	60	0.46a	1.02a	0.61a	10.67a	2.23a	0.24a	0.05a
	100	0.70a	1.17a	0.68a	10.85a	2.45a	0.24a	0.04a
Bean	30	0.01a	0.05a	ND	2.08a	0.04a	0.17a	0.22a
	60	0.01a	0.06a	0.01	2.76a	0.05a	0.25a	0.38a
	100	0.01a	0.06a	0.01	2.90a	0.05a	0.20a	0.33a

Letras iguais, para cada metabólito em cada tecido, não apresentam diferenças significativas entre as cargas de frutos ($p > 0,05$) e letras diferentes representam diferenças significativas entre as cargas de frutos pelo teste Tukey ($p < 0,05$). $n = 3$; ND – Não detectado. Amostras obtidas aos 219 dias após o desbaste.