*INCORPORAÇÃO DE $^{14}\text{CO}_2$ E ATIVIDADE DA RuDP CARBOXILASE
EM ALGUMAS VARIEDADES DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)*

ARNÓBIO GONÇALVES DE ANDRADE

Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz,” da
Universidade de São Paulo, para obten-
ção de título de Doutor em Solos e
Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo — Brasil
Setembro, 1977

*A minha esposa, cuja dedicação e
apoio me ajudaram sobremaneira;*

*Aos meus filhos, para quem espero
que a ciência possa, no futuro,
proporcionar uma vida cada vez
melhor;*

*Aos meus pais, irmãos e amigos, a
quem devo muito;*

O F E R E Ç O

A G R A D E C I M E N T O S

Na oportunidade em que encerramos o presente trabalho, expressamos os nossos agradecimentos às seguintes pesoas e instituições :

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, através de seus dirigentes, pela oportunidade concedida para frequentar o curso de pós-graduação.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pelos ensinamentos e apoio financeiro.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), e ao Programa de Ensino Agrícola Superior (PEAS), pelas bolsas concedidas em diferentes etapas do nosso curso.

Ao ilustre Professor Dr. Otto Jesu Crocomo que com a sua sabedoria e elevado espírito científico, soube nos transmitir confiança e ensinamentos do mais alto significado para a nossa vida na pesquisa científica.

Ao Professor, José Henrique Carnevalheira, pelo esforço realizado para que pudéssemos completar o nosso curso, bem como, pela paciente revisão dos originais.

Ao Engº Agº M.S. Murilo César Amorim Silva, pelas valiosas críticas e sugestões que enriqueceram sobretudo o

nosso trabalho.

Ao Dr. Everardo de Sá Barreto Sampaio, pelo auxílio na composição do Summary.

A Srt^a Clarice Matraia, pelo auxílio em todas as etapas dos trabalhos de laboratório.

Ao sr. Cesário Rodrigues Gusmão, pelos trabalhos de datilografia.

Aos funcionários da Imprensa Universitária da UFRPe, pela impressão da tese.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. RESUMO	01
2. INTRODUÇÃO	03
3. REVISÃO DE LITERATURA	07
3.1. Eficiência fotossintética e sua regulação	07
3.1.1. Fatores que regulam a atividade fotos- sintética	15
3.2. Fotossíntese e produtividade	43
3.3. Diferenças entre variedades	51
3.4. Medida da atividade fotossintética pela incor- poração de $^{14}\text{CO}_2$	60
4. MATERIAL E METODOS :.....	64
4.1. Sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i>	64
4.2. Métodos	65
4.2.1. Condução das plantas	65
4.2.2. Incorporação de $^{14}\text{CO}_2$	68
4.2.3. Ensaio enzimático	70
4.2.4. Determinação do teor de clorofila	72
4.2.5. Medida da área foliar	72
4.2.6. Análise de crescimento	73
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1. Observações sobre o cultivo das plantas	74
5.2. Adaptação da metodologia	75
5.2.1. Incorporação de $^{14}\text{CO}_2$	75
5.2.2. Ensaio enzimático	84

5.2.3. Avaliação da área foliar	94
5.3. Efeito da hora do dia sobre a incorporação de de $^{14}\text{C}\text{O}_2$	96
5.4. Diferenças entre variedades	100
6. CONCLUSÕES	123
7. SUMMARY	126
8. LITERATURA CITADA	128

ABREVIATURAS USADAS

No presente trabalho foram usadas várias abreviaturas, principalmente as relacionadas a seguir :

DTE - ditioeritritol

DTT - ditiotreitrol

HEPES - ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfônico

IAF - Índice de área foliar

ly - langley (cal/cm^2)

IRGA - infrared gas analyzer

MES - ácido morfolinoetanosulfônico

PPO - 2,5-difeniloxazole

POPOP - 1,4-bis-2(5-feniloxalozil)benzeno

RAF - relação de área foliar

R-5-P - ribose-5-fosfato

RuDP - ribulose-1,5-difosfato

TAL - taxa de assimilação líquida

TCR - taxa de crescimento relativo

1. R E S U M O

O presente trabalho consta de uma série de experimentos desenvolvidos no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/ESALQ/ USP). A sua principal finalidade foi a de testar a adequabilidade do método de incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ em folhas intactas, utilizando equipamento portátil para detectar diferenças na eficiência fotossintética de variedades de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). As diferenças relativas a atividade da RuDP carboxilase em extrato bruto de folhas, área foliar e teor de clorofila das folhas também foram estudadas, procurando-se estabelecer as relações entre estes parâmetros e a taxa fotossintética.

As plantas foram cultivadas em meio hidropônico com solução de Hoagland e Arnon nº 2, sendo utilizado o folíolo central da 1ª folha trifoliolada, exceto quando se estudou o efeito da idade da folha, quando foram usados os folíolos centrais de todas as folhas do mesmo ramo. A análise das condições experimentais e da própria metodologia se constituem pontos básicos do trabalho.

A taxa de incorporação de $^{14}\text{CO}_2$, à luz saturante, variou de 14,94 a 22,91 mg CO_2/dm^2 .hora, podendo-se dividir as variedades em duas classes, tendo como limite a taxa de 20 mg CO_2/dm^2 .hora. Observa-se uma variabilidade relativamente elevada entre plantas da mesma variedade e forte dependência em relação ao ambiente, de modo que as diferenças entre variedades somente podem ser detectadas quando acentuadas. Contudo, o método é apropriado para verificação destas diferenças em condições controladas.

As diferenças encontradas em relação a atividade da RuDP carboxilase não foram consistentes de um ensaio para outro. Esta atividade corresponde aproximadamente à metade da taxa de incorporação, embora não se tenha verificado relação entre estes parâmetros. Também com a área foliar total e o teor de clorofila das folhas não se verificou tendência para correlação, apesar das diferenças entre variedades serem significativas, especialmente à medida que a planta cresce.

2 INTRODUÇÃO

Uma das mais importantes metas da pesquisa dos sistemas fisiológicos da planta é o entendimento dos processos que culminam na produção agrícola. Esta capacidade de prever a produtividade vem sendo perseguida desde a década de 20, mas somente após a 2ª Guerra Mundial é que os primeiros resultados positivos começaram a aparecer. E, apesar da grande quantidade de estudos realizados, diversos aspectos morfogênicos, nutricionais, hormonais e enzimáticos relacionados à Eficiência de Produção ainda continuam desconhecidos.

Alguns fatores como a fotossíntese, a translocação e armazenamento de substâncias de reserva, a absorção e utilização de água e nutrientes, e caracteres morfológicos interagem de forma íntima e altamente complexa para determinar a "produção econômica" da cultura. Segundo CHARLES-EDWARDS (1975), deve-se estabelecer os processos componentes do crescimento e tentar eliminar aqueles energeticamente ineficientes, pois, do controle cinético das reações individuais é que resulta a eficiência global do crescimento.

O mais importante objetivo no melhoramento dos sistemas de produção atualmente é manipular as plantas dentro do ambiente para maximizar seus processos de conversão de energia (WITTWER, 1974). Para isto o melhoramento com bases fisiológicas se tem voltado principalmente para a criação de plantas com estrutura foliar mais adequada, ou mesmo com um arranjo espacial mais eficiente na captura da luz, mais resistentes à seca, e que apresentem maior eficiência de absorção e utilização de nutrientes minerais (ZELITCH, 1971; MOSS e MUSGRAVE, 1971; MONSI *et alii*, 1973). A utilização destes novos tipos de plantas, aliada ao uso de novos sistemas de produção, foram os responsáveis pelos resultados espetaculares conseguidos na "Revolução Verde", quando se chegou a elevar consideravelmente a produtividade do trigo e do arroz (ZELITCH, 1973).

Segundo McCLOUD (1975), um dos problemas mais sérios da alimentação humana atualmente, e especialmente no futuro, é a carência de proteínas, uma vez que a produtividade das leguminosas não foi aumentada à medida da necessidade. Assim, uma nova Revolução Verde das leguminosas alimentícias se faz necessário. Nesta, preocupar-se-ia não só aumentar a produção econômica da planta, mas aumentar o teor e melhorar a qualidade de suas proteínas de reserva.

O feijão é uma importante fonte de proteínas na alimentação brasileira, sendo largamente utilizado em todo o território nacional e, embora diversos países do mundo

estejam envolvidos em programas de melhoramento, no Brasil a produtividade é ainda muito baixa, cerca de 600 a 700 Kg/ha (FAO, 1974).

Mesmo já se tendo obtido, em condições ótimas, até 4.500 Kg/ha, normalmente a produção nos experimentos de campo não ultrapassam a 2.000 Kg/ha (TULMANN NETO, comunicação particular). Isto demonstra que o potencial de produção das nossas variedades de *Phaseolus vulgaris* L. é baixo. Várias hipóteses de cunho fisiológico poderiam ser admitidas para explicar este fato: a baixa eficiência fotossintética e capacidade de armazenamento de metabólitos (STOY, 1969; SPRAGUE, 1969; ZELITCH, 1971; SINHA e KHANNA, 1975), a possível senescência precoce devido a alta translocação do nitrogênio orgânico (SINCLAIR e DEWIT, 1975), e até mesmo uma ineficiência energética generalizada (CHARLES-EDWARDS, 1975).

Um trabalho de melhoramento com bases fisiológicas aparece cada vez mais com possibilidade de sucesso, especialmente em relação a eficiência fotossintética, que é de certo modo, o reflexo das interações fisiológicas básicas da planta. Contudo, necessário se faz o conhecimento dos fatores associados a esta eficiência e que estão limitando a produção, bem como, de uma metodologia adequada para a sua avaliação especialmente em condições de campo.

O presente trabalho é, em termos práticos uma contribuição para o melhoramento do feijoeiro visando aumentar a sua produtividade, desde que é uma tentativa de ana

lise da metodologia de determinação, para condições de campo da eficiência fotossintética, que poderá ser utilizada no acompanhamento da capacidade produtiva das novas variedades criadas. Assim, foram fixados os seguintes objetivos principais:

1. Testar a adequabilidade do método de incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ em discos de folhas intactas, para detecção de diferenças na eficiência fotossintética entre variedades de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).
2. Tentar promover adaptações na metodologia de ensaio para, em condições controladas, detectar taxas fotossintéticas compatíveis com as observadas em ambientes naturais, assim como estudar o método de determinação da atividade da RuDP carboxilase em extrato bruto de folhas.
3. Estabelecer a relação entre a variação de taxa de incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ e outros parâmetros como atividade de carboxilase, teor de clorofila e área foliar.
4. Avaliar as diferenças relativas destes parâmetros entre algumas variedades de interesse comercial no Brasil, tentando estabelecer uma relação com a produtividade das mesmas.
5. Observar também as variações destes parâmetros estudados em relação à hora do dia, idade da folha e da planta.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Eficiência fotossintética e sua regulação

A eficiência fotossintética de uma planta pode ser definida como a sua capacidade de conversão de energia luminosa em energia química. Esta, é armazenada nas ligações químicas dos carboidratos e outros metabólitos (RABINOVITCH e GOVINDJEE, 1969; DEVLIN e BARKER, 1971; CHARLES-EDWARDS, 1975).

Podemos representar a eficiência fotossintética através das equações:

$$\% \text{ Eficiência} = \frac{\text{Calorias armazenadas}}{\text{Calorias recebidas}} \times 100$$

$$\text{Eficiência quântica} = \frac{\text{Moléculas de CO}_2 \text{ absorvidas}}{\text{Nº de quanta absorvidos}}$$

Segundo MONTEITH (1976), a palavra eficiência é

multas vezes usada como sinônimo de desempenho fisiológico ou produtividade de um organismo, embora, no sentido estrito, ela deva ser aplicada ao fluxo energético em um ecossistema.

A radiação total que atinge a superfície externa da atmosfera (constante solar) está em torno de $1,97 \text{ cal/cm}^2 \cdot \text{min}$. Deste total, apenas 45% está situado na faixa visível (400 a 700 nm), sendo que 5 a 10% são perdidos por reflexão ou transmissão. Isto implica que o máximo de energia disponível para a fotossíntese é cerca de $0,8 \text{ cal/cm}^2 \cdot \text{min}$. Nas regiões tropicais as medidas indicam que a média anual de fluxo radiante recebido é de 400 a $500 \text{ cal/cm}^2 \cdot \text{dia}$, ou seja, $0,17 \text{ cal/cm}^2 \cdot \text{min}$ de radiação disponível (COOPER, 1970; LOOMIS e WILLIAMS, 1963; SZEICZ, 1974).

O número de quanta do fluxo radiante é calculado em $8,64 \times 10^{-6}$ Einstein/cal (LOOMIS e WILLIAMS, 1963), ou segundo McCartney, 1975, citado em MONTEITH (1976), $2,77 \times 10^{18}$ quanta/joule ($11,57 \times 10^{-6}$ Einstein/cal.). Para que seja reduzida uma molécula de CO_2 ao nível de carboidrato, o número mínimo de quanta necessários é de 8 a 10 (RABINOVITCH e GOVINDJEE, 1969), sendo que para o feijoeiro, BALEGH e BIDDULPH, (1970) encontraram um mínimo de 8,8 quanta. Deste modo, a eficiência máxima é calculada em 18 a 20% da energia fotossinteticamente ativa, ou 10% da radiação total. Em condições naturais, contudo, cerca de 280 quanta/molécula de O_2 são requeridos, o que dá uma eficiência média de 0,34% (RABINOVITCH e GOVINDJEE, 1969).

Em termos de produção econômica mundial, apenas cerca de 0,1% da energia que atinge as áreas cultivadas é aproveitada (MONTEITH, 1976). Para o feijoeiro, se considerarmos uma produção média brasileira de 619 kg/ha, durante um ciclo de 90 dias (FAO, 1974), isto corresponde a aproximadamente, $2,63 \times 10^9$ cal/ha. 90 dias, ou seja, $0,292 \text{ cal/cm}^2 \cdot \text{dia}$, ou se considerarmos que a radiação recebida é $400 \text{ cal/cm}^2 \cdot \text{dia}$, a uma eficiência de conversão de energia de 0,073%.

Do ponto de vista operacional, a eficiência fotossintética pode ser avaliada de diversos modos, sendo o mais comum a medida da troca de CO_2 pelo órgão (ou partículas isoladas), planta ou comunidade em estudo, o que pode ser feito inclusive em seu meio ambiente natural (ZELITCH, 1971; MOONEY 1972). Dependendo do tipo de mensuração feita, pode-se encontrar variações acentuadas na taxa de troca de CO_2 (JACKSON e VOLK, 1970), de tal forma que é indispensável estabelecer as condições em que foram feitas as medidas (FRASER e BIDWELL, 1974).

A taxa de troca de CO_2 é comumente chamada Taxa Fotossintética, Fotossíntese Líquida (diferenciada da fotossíntese bruta pela respiração à luz), ou Eficiência Fotossintética; embora, como friza BLACK Jr. (1973), ao absorver o CO_2 pelos estômatos, a planta está apenas iniciando uma série complexa de reações cujo desfecho final é o acúmulo de material orgânico.

Os trabalhos realizados com níveis diversos de complexidade mostram diferenças acentuadas na atividade fotossintética entre espécies, em especial quando se trata de plantas com metabolismo C_3 e C_4 (ZELITCH, 1971; 1975-a; BLACK Jr. 1973), traduzindo-se estas em diferenças na utilização da luz e produção (COOPER, 1970; GIFFORD, 1974; MONTEITH, 1976). Também entre variedades há possibilidade de se encontrar diferenças significativas, tanto maiores quanto maior a diversidade genética (CHANDLER, 1969; CURTIS *et alii* 1969).

O número de trabalhos publicados que contêm informações sobre a taxa fotossintética das plantas é muito grande. Assim, analisaremos apenas a literatura concernente ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), ou plantas semelhante como a soja (*Glycine max*) e *Vigna unguiculata*, utilizando dados de outras espécies quando estritamente necessário.

Ao nível enzimático, os dados disponíveis mostram que as plantas C_3 (incorporação primária do CO_2 na Ribulose-1,5-difosfato, dando duas moléculas de Ácido 3-fosfoglicérico) apresentam atividades que variam de 40 μ moles CO_2 /mg de clorofila .hora, para plantas adaptadas à sombra, a 200 a 300 μ moles para as adaptadas ao sol (BJORKMAN, 1968; BJORKMAN e GAUHL; 1969). Em *Plantago lanceolata*, BJORKMAN (1968) encontrou que para uma taxa fotossintética de 840 μ moles CO_2 /dm².hora (aproximadamente 37 mg CO_2 /dm².hora, ou 280 μ moles/mg clor. hora), a atividade da carboxilase (medida "in vitro") com con-

centração de CO_2 no meio próxima da saturação foi 200 $\mu\text{moles CO}_2/\text{mg}$ de clorofila.hora, sugerindo que a atividade da carboxilase é limitante para a fotossíntese. Também NEALES *et alii* (1971) encontraram dados para o feijoeiro que concordam com esta afirmação.

Preparações de cloroplastos intactos com atividade adequada foram até agora conseguidas principalmente com espinafre, ervilha e poucas outras plantas (JENSEN e BASSHAN, 1966; 1968; JENSEN, 1971; PLAUT e GIBBS, 1970). As taxas máximas obtidas com estas preparações variam de 50 a 240 $\mu\text{moles CO}_2 / \text{mg}$ clor.hora. Contudo, o cloroplasto "in vitro" perde facilmente a sua capacidade de fixar CO_2 , embora conserve a capacidade da condução eletrônica (reação de Hill) (ZELITCH; 1971; JENSEN, 1971). Para o feijoeiro não encontramos na literatura referência ao isolamento do cloroplasto, a não ser para estudo da síntese de amido (KOVACS e HILL, 1974) e verificação do efeito do pH sobre a hidrólise dos lipídeos de sua membrana (McCARTY e JAGENDORF, 1965).

O meio em que o cloroplasto é isolado (aquoso ou em solventes orgânicos), é um fator altamente crítico nestes estudos, possivelmente devido à extração das proteínas associadas com a membrana e inativação de certas enzimas, de formas que este tipo de estudo ainda hoje se prende a características funcionais do sistema (ZELITCH, 1971).

Os trabalhos com folhas intactas ou discos de fo-

lhas mostram que a capacidade fotossintética do feijoeiro é relativamente baixa, quando comparada com as plantas de cana de açúcar, milho, girassol, etc. (ZELITCH, 1971).

Comparando 13 espécies diferentes, HESKETH e MOSS (1963) encontraram para o feijoeiro uma taxa de fotossíntese aparente de $12 \text{ mg CO}_2/\text{dm}^2.\text{hora}$ (1 repetição), não havendo aparentemente aumento quando o fluxo luminoso foi aumentado de 0,7 para 1,4 $\text{ly}/\text{min}.$

HESKETH (1967), estudou o efeito da concentração de O_2 sobre a taxa fotossintética de 12 espécies, a 30°C e iluminação de 0,9 $\text{ly}/\text{min}.$ Para o *Phaseolus vulgaris*, ebtteve 17 e 26 $\text{mg CO}_2/\text{dm}^2.\text{hora}$, respectivamente em ar normal e livre de O_2 (fotossíntese líquida e real), para plantas adaptadas ao sol e 16 e 22 $\text{mg CO}_2/\text{dm}^2.\text{hora}$ para as plantas crescidas à sombra.

AUSTIN e LONGDEN (1967), empregando um método semelhante ao utilizado no presente trabalho, obtiveram a curva de resposta das folhas cotiledonares do feijoeiro ao aumento de iluminação, sendo que com $0,37 \text{ cal}/\text{cm}^2.\text{min}.$, a fotossíntese foi de $9,5 \text{ mg CO}_2/\text{dm}^2.\text{hora}$, e o método se mostrou altamente comparável ao IRGA. Também Woolhouse e Wareing citados em MEIDNER (1969) obtiveram taxas de $11,7 \text{ mg CO}_2/\text{dm}^2.\text{hora}$ com plantas intactas, e 12,9 para as que sofreram defoliações parciais.

IZHAR e WALLACE (1967-b) pesquisaram as variações

na taxa de fotossíntese entre variedades de feijoeiro, obtendo valores de 16,43 a 24,30 mg CO₂/dm².hora para o cultivar Mitchellite-62 e 13,24 a 20,45 para o Red Kidney. Os mesmos cultivares foram estudados por CROOKSTON *et alii* (1975), obtendo taxas de 18,6 e 17,8 mg CO₂/dm².hora, respectivamente a 22.000 lux e 4,6 e 3,5, respectivamente, e 3.200 lux.

A taxa fotossintética varia drasticamente com a idade, segundo os dados de NEALES *et alii* (1971), que encontraram fixação de 16,3 mg CO₂/dm².hora aos 20 dias de idade da planta, caindo esta para 6,7 e 5,9 depois de 3 e 4 dias. A defoliação parcial aumentou esta taxa para 20,3 e 18,3 mg CO₂/dm².hora no 3º e 4º dia, havendo uma correlação positiva entre a taxa fotossintética e a atividade da RuDP carboxilase ($r^2 = 0,77$), e em menor grau para a PEP carboxilase, Melato desidrogenase e quantidade de proteína solúvel.

A vagem do feijoeiro também fixa CO₂ quando verde. CROOKSTON *et alii* (1974.b) encontraram taxas fotossintéticas de 5 a 9% em relação a da folha, respectivamente 1,0 e 21,2 mg CO₂/dm².hora. A fotossíntese real foi estimada em 6,2 e 24,1 mg CO₂/dm².hora, o que dá cerca de 26% de atividade na superfície da vagem em relação à folha. Possivelmente esta fixação é limitada à reciclagem do CO₂ metabolicamente liberado, tendo em vista que a parede da vagem é cerca de 8 vezes mais espessa que a folha (correspondendo ao parênquima).

FRASER e BIDWELL (1974) estudaram a fotossíntese

real e fotorespiração de folhas de feijoeiro cultivado com uma luminosidade de 1.350 ± 150 ft-c durante o seu desenvolvimento. Para a folha cotiledonar a taxa fotossintética real variou de aproximadamente 10 a 18 mg CO_2/dm^2 .hora, aumentando pelo menos levemente quando do aparecimento de folhas novas ou das flores, sendo que a fotorespiração variou de cerca de 2,0 a 4,0 mg/ dm^2 .hora. Para a primeira folha trifoliolada, 2 dias após seu aparecimento sua taxa fotossintética era 3,0 mg CO_2/dm^2 .hora, aumentando aos 7 dias para 17 mg/ dm^2 .hora e a fotorespiração que no início era de 4 mg/ dm^2 .hora, decresceu, aumentando somente imediatamente antes do florescimento, quando alcançou 7 mg CO_2/dm^2 .hora. O comportamento da 2ª e 3ª folhas foi semelhante.

Plantas intactas foram estudadas por ORMRÖD(1964) para determinar o efeito da iluminação, temperatura e densidade de plantio sobre a atividade fotossintética do feijoeiro. A atividade máxima foi cerca de 2,7 mg CO_2/dm^2 de folha.hora, aos 32 dias após o plantio, dando aproximadamente 40 mg $\text{CO}_2/\text{pote.hora}$. À intensidade luminosa de 600 ft-c e ao escuro, as taxas foram negativas. A temperatura em que ocorreu o máximo de absorção foi cerca de 25°C, e para temperaturas abaixo de 15°C houve decréscimo acentuado, especialmente para menores taxas de iluminação, o que indica, segundo o autor, que a disponibilidade de CO_2 deve ser mais limitante que o processo enzimático.

Estudos de troca de CO_2 em comunidades de plantas foram feitos recentemente por SALE (1975) em região de alta luminosidade (até 1000 W/m^2), nos vales do sul da Austrália. Utilizou uma câmara instalada no campo, com um sistema semi-fechado, acompanhando seus experimentos com análise de crescimento. Para plantas de feijoeiro cultivadas em alta densidade detectou aumentos da taxa fotossintética até com iluminação de 600 W/m^2 , obtendo valores de 36 a $39 \text{ mg CO}_2/\text{dm}^2$ de área.hora, com IAF (Índice de área foliar, isto é a relação entre a área das folhas da planta e a área do solo correspondente à projeção das folhas), em cerca de 5, o que dá 7,2 a $7,8 \text{ mg CO}_2/\text{dm}^2$.hora. Acima deste IAF, a taxa fotossintética permaneceu inalterada até com o IAF 8. Para os plantios de baixa densidade, a saturação também foi alcançada com IAF em torno de 5, embora com IAF 3 tenha obtido 30 a $32 \text{ mg CO}_2/\text{dm}^2$ de área.hora, o que dá uma média de 10 a $11 \text{ mg CO}_2/\text{dm}^2$.hora. Para uma iluminação de 200 W/m^2 a taxa máxima conseguida foi de 13 a $15 \text{ mg CO}_2/\text{dm}^2$.hora, com IAF 5 a 6.

3.1.1. Fatores que regulam a atividade fotossintética

Os fatores que influenciam a atividade fotossintética são, principalmente :

a. Fatores externos

- Luz
- Temperatura
- Concentração de CO_2 e O_2 no meio

- Disponibilidade de água e nutrientes, e estado sanitário da planta

b. Fatores internos

- Características morfológicas da folha, como, espessura, número de estômatos e suas dimensões, etc
- Teor de clorofila e proteínas da folha
- Características do fotossistemas
- Resistências à difusão do CO_2
- Características do sistema de carboxilação primária
- Respiração
- Mecanismos de inibição

Todos estes fatores se interrelacionam determinando as características fisiológicas da folha, e por extensão da planta.

a.1.. Efeito da luz

Uma série enorme de estudos sobre a resposta das plantas à luz e papel desta no processo fotossintético já foram realizados. Na verdade, a radiação eletromagnética de comprimento de onda de 400 a 700 nm é o principal fator deste processo (RABINOVITCH e GOVINDJEE, 1969).

Na passagem através das folhas, parte da luz incidente sofre uma reflexão difusa, e quanto maior o comprimento

mento de onda, maior é a transmissão e reflexão do tecido sendo que as microfibrilas da parede celular induzem o espalhamento da luz. Assim, o número de paredes encontradas, que depende da espessura do tecido, aumenta a reflexão (SINCLAIR *et alii*, 1973).

A luz que atinge o cloroplasto provoca uma série de fenômenos já bastante conhecidos, e que têm importância na determinação da taxa fotossintética quando o nível de iluminação é baixo (por exemplo, nas folhas inferiores, na cobertura). O nível de clorofila na folha baixa proporcionalmente quando a folha se desenvolve à sombra (BLENKINSOP e DALE, 1974). O próprio cloroplasto exibe respostas específicas à luz, tanto na forma, quanto na posição, sendo esta resposta dependente da intensidade luminosa, e principalmente da sua qualidade. O cloroplasto se movimenta de acordo com a intensidade da luz recebida pela célula; se alta, caminha para o lado oposto, se baixa é conduzido para a região de maior exposição (HAUPT, 1973).

Em relação a eficiência quântica, ela é máxima com baixa intensidade de iluminação. Além disso, nem todo o espectro é aproveitado da mesma maneira. BALEGH e BIDDULPH (1970) estudaram o espectro de ação das folhas de feijoeiro, usando uma fonte primária de 6.500 Watts, e uma grade de difração que separava faixas de 12,5 nm. O número de quanta mínimo para reduzir uma molécula de CO_2 variou de 8,8 (a

662,5 nm) a 13,8 (a 400 nm), sendo que a 700 nm houve uma queda acentuada (29,3 quanta/molécula). Os picos de absorção encontrados foram a 440 nm (menor) e 630 e 665 nm. Dados semelhantes foram obtidos por MCCREE (1972) e INADA (1976), que para 33 espécies diferentes encontraram picos primários entre 600 e 680 nm e o secundário a aproximadamente 435 nm. Deve-se lembrar que ao se trabalhar com iluminação artificial é conveniente expressar o fluxo quântico e não o fluxo de energia ativa para a fotossíntese (MCCREE, 1972).

Quando a intensidade do fluxo radiante é baixa, o processo fotoquímico é limitante, e a eficiência de formação de ATP e NADPH deve ser importante. Medidas realizadas por diversos pesquisadores têm mostrado certa variabilidade na relação $P/2 e^-$. TREBST (1974) reviu a literatura sobre o assunto, mostrando que para o caminhamento acíclico esta relação se aproxima de 1,0 em cloroplasto intacto, embora, de acordo com o requerimento quântico para a redução de CO_2 , valores próximos de 2,0 sejam necessários. Para o caminhamento cíclico espera-se uma relação $P/2 e^-$ de cerca de 0,5.

Segundo DILLEY e VERNON (1967), na fase inicial de iluminação $5 H^+/e^-$ são trocados na membrana do cloroplasto e na fase de fluxo contínuo ("steady state"), $2,5 H^+/e^-$. Desse modo, cria-se um gradiente de pH na membrana do cloroplasto e tilacoides, com o pH interior menor que o exterior, e segundo HELDT *et alii* (1973), ocorre uma alcalinização do

estroma e acidificação do espaço tilacoide, detectando-se uma diferença de 2,5 unidades de pH, sendo esta quase independente do pH do meio ou da intensidade luminosa.

O gradiente de pH na membrana provoca um fluxo de íons, principalmente o Mg^{++} , o que controla, em grande parte, a atividade das "enzimas-chave" do ciclo de C a l v i n (BASSHAM, 1971). NOBEL (1969), encontrou concentrações internas no cloroplasto de 16 mM de Mg^{++} , e segundo JENSEN (1971), e BAHR e JENSEN (1974), altas concentrações deste íon são necessárias para a máxima atividade da RuDP carboxilase, além de estar envolvida no controle da atividade da oxigenase, responsável, pelo menos em parte, pela síntese do glicolato (BAHR e JENSEN, 1974-b).

Além deste, outros mecanismos da "fase escura" da fotossíntese são dependentes da luz: a regeneração da ribulose-difosfato (RuDP) (AVRON e GIBBS, 1974); as enzimas gliceraldeído-3P-desidrogenase dependente de NADP, desidrogenase málica dependente de NADP, ribulose-5P-quinase e seduheptulose-1,7 diP-desidrogenase são dependentes da ativação pelo fluxo eletrônico, possivelmente através da ferredoxina (ANDERSON e AVRON, 1976).

Parece que o número de unidades fotossintéticas é mais importante que o teor de clorofila em si, pois mutantes virescentes, em sua fase amarelada, podem apresentar a mesma taxa fotossintética que o indivíduo normal, embora quando expressa em função do teor de clorofila, sejam superiores

(BENEDICT *et alii*, 1972).

À medida que a intensidade de iluminação aumenta, a incorporação de CO_2 cresce linearmente até que ocorre a saturação do sistema de fixação (HESKETH e MOSS, 1963; PICKETT, 1971; BRUN e COOPER, 1967; ZELITCH, 1971, etc.). Esta saturação adapta-se à intensidade luminosa durante o crescimento da planta. BOWES *et alii* (1972) verificaram que as folhas de soja crescidas em alta intensidade luminosa tem uma maior taxa fotossintética máxima, sendo que a saturação foi alcançada com iluminação aproximadamente igual a máxima desenvolvida durante sua ontogênese. Também BLENKINSOP e DALE (1974) verificaram que a quantidade de RuDP carboxilase em plantas sombreadas chega a ser apenas 1/3 da atingida nas plantas conservadas sob alta irradiação. SINGH *et alii* (1974), trabalhando em 10 espécies, obtiveram dados semelhantes, sendo que apenas 2 espécies não mostraram adaptação em relação à luminosidade recebida durante o crescimento.

Eagles e Treharne (1969), citados em TREHARNE (1972), encontraram efeitos da intensidade luminosa sobre os componentes fotossintéticos de 2 populações de plantas naturais contrastantes de *Dactylis glomerata*, sendo uma originária de Portugal e outra da Noruega. Houve efeito marcante sobre a atividade fotossintética, que mostrou alta correlação com a atividade de RuDP carboxilase "in vitro". As populações crescidas sob baixa irradiação mostraram disponibilidade limitada de ATP e NADPH_2 , indicando que os processos fotoquímicos

são limitantes nestas populações.

Ao se considerar a resposta de uma cultura à iluminação deve-se incluir a penetração da luz na "cobertura" de plantas, a qual é bastante estudada pela micrometeorologia e ecologia. Este foi um dos pontos básicos para o acentuado aumento de produção de certas variedades de trigo e arroz, modificando-se a arquitetura do "Stand", como ocorreu durante a chamada "Revolução Verde" (ZELITCH, 1973).

Segundo MONSI *et alii* (1973), o arranjo espacial das folhas dentro da estrutura é muito importante. No caso das leguminosas, como a soja por exemplo, as folhas se concentram especialmente na parte superior da cobertura, sendo que cerca de 27, 30,5 e 17,4% estão distribuídos segundo os ângulos 15 a 30°; 30 a 45° e 45 a 60°, respectivamente. DUNCAN (1969) estimou que uma planta 10cm mais baixa que as vizinhas tem 20% menos de matéria seca que elas, quando em baixa densidade, e 50% menos quando em alta densidade.

O IAF ótimo para a fotossíntese é função da intensidade luminosa. JEFFERS e SHIBLES, (1969) determinaram que para a soja, sob irradiação de 0,2 ly/min, a saturação ocorreu com IAF aproximadamente 3, enquanto para uma irradiação de 1,2 ly/min o IAF ótimo foi maior que 8. Isto também pode ser deduzido do trabalho de MAGALHÃES e MONTOJOS (1971) com o feijoeiro.

O IAF ótimo está relacionado ao balanço Fotossíntese/Respiração, pois o sombreamento das folhas basais po-

de tornar o balanço metabólico até negativo (ZELITCH, 1971) , pois a respiração, no caso das leguminosas, não é praticamente afetada pelo sombreamento (LUDLOW *et alii*, 1974).

Algumas leguminosas podem mover suas folhas de acordo com a intensidade luminosa (MONSI *et alii*, 1973 ; TRENBATH e ANGUS, 1975). KAWASHIMA (1969) mostrou este fenômeno para a soja, encontrando que com alta intensidade luminosa as folhas formavam um ângulo de 30° com a direção dos raios. WIEN e WALLACE (1973), verificaram que as folhas de feijoeiro também apresentam mudança de ângulo dos seus folíolos (movimento nictinástico), orientando-se no sentido de torná-los paralelos aos raios luminosos, quando estes eram dirigidos ao topo da cobertura. Quando a luz era dirigida lateralmente o movimento era no sentido de torná-los perpendiculares. Contudo, as variedades diferiram quanto à orientação do movimento, e segundo os autores há possibilidade de se explorar esta mudança de orientação para se obter maiores taxas fotossintéticas, especialmente quando se deseja alta densidade de plantio.

a.2 Efeito da Temperatura

Alguns trabalhos sobre efeito da temperatura na taxa fotossintética do feijoeiro e seu crescimento podem ser citados. ORMROD (1964), verificou que para altas taxas de irradiação não houve muito efeito da temperatura sobre a taxa fotossintética. Em contraste, para intensidades de 0 a 600 ft-c

houve acentuada perda de CO_2 com o aumento da temperatura. Para outras espécies, como soja, fumo e trigo, a resposta ao aumento da temperatura segue padrões semelhantes, demonstrando que para plantas de metabolismo fotossintético C_3 a temperatura ótima para a fotossíntese está em torno de 25°C (ZELITCH 1971; HESKETH, 1967; HOFSTRA e HESKETH, 1969; JEFFERS e SHIBLES, 1969).

A temperatura noturna no período imediatamente anterior à medida tem influência sobre a taxa fotossintética determinada. IZHAR e WALLACE (1967-a) submeteram plantas de feijoeiro a temperaturas noturnas de 10° a 18°C . No dia seguinte a atividade fotossintética das plantas submetidas a temperatura de 10°C foi 58% relativamente às plantas controle, havendo recuperação em 5 horas. Recentemente CROOKSTON *et alii* (1974-a) estudaram o mecanismo desta depressão, sugerindo que uma carência temporária de água seria a responsável, pois observa-se um grande aumento na resistência estomática, passando a resistência total de 5 sec/cm para maior que 100 sec/cm, enquanto a taxa fotossintética passou de $17\text{mg CO}_2/\text{dm}^2\cdot\text{hr}$ para $0,5\text{mg CO}_2/\text{dm}^2\cdot\text{hr}$.

A atividade da RuDPcarboxilase também é afetada pela temperatura. A resposta pode ser mais ou menos acentuada, dependendo da espécie, mas para plantas C_3 o ótimo encontra-se entre 20 e 30°C (TREHARNE e COOPER, 1969).

FRIEND e HELSON (1976) estudaram o efeito do termoperíodo sobre o crescimento do trigo e outras culturas

Inclusive feijoeiro, encontrando para este uma temperatura ótima de crescimento de 30°C constante, ou 30°C/25°C (dia/noite), sugerindo que a temperatura ótima deve variar com a idade da planta, pois temperaturas mais elevadas aumentam o crescimento, mas aceleram a senescência.

Do mesmo modo que para a luminosidade, as plantas também se adaptam à temperatura de crescimento. Plantas crescidas a baixas temperaturas apresentam menor taxa fotossintética máxima; porém quando transferidas para temperaturas mais elevadas se adaptam em poucas horas ao novo ambiente (MOONEY e HARRISON, 1970; SAWADA e MIYACHI, 1974-a). Em termos metabólicos, há um acúmulo relativo de RuDP e maior intensidade relativa de metabolismo do glicolato. Sobre a condução eletrônica não há efeito aparente quando se emprega um acceptor exógeno (SAWADA e MIYACHI, 1974-b).

Certas modificações morfológicas se processam nas folhas como resposta a modificações térmicas. KU e HUNT, (1973) verificaram para a alfafa, que a área foliar, o peso específico das folhas, bem como a densidade e volume do espaço intercelular, eram maiores em plantas mantidas a 20°C/15°C (dia/noite) que as crescidas a 30°C/25°C.

A resposta diferencial ao aumento de temperatura acima de 25°C refere-se a diferenças no aumento da fotossíntese bruta e da fotorespiração. Segundo ZELITCH (1971, 1973), há um aumento considerável na fotossíntese bruta quando se eleva a temperatura, mas a fotossíntese líquida é a

mesma porque há um aumento compensatório na fotorespiração. Para folhas de fumo, o Q_{10} encontrado foi de 1,88 para a fotossíntese bruta, 2,0 para a respiração ao escuro e 3,7 para a fotorespiração.

Recentemente se tem atribuído o efeito de altas temperaturas a modificações cinéticas na RuDP carboxilase/oxigenase, que em temperaturas elevadas diminui sua afinidade pelo CO_2 , mas conserva a afinidade pelo O_2 , resultando em um aumento relativo da atividade da oxigenase em relação à carboxilase (CHOLLET e OGREN, 1975).

, a.3. Efeito da concentração de CO_2 e O_2

O efeito da concentração externa de CO_2 e O_2 sobre a taxa fotossintética está relacionado a vários fatores endógenos, principalmente à somatória das resistências à difusão do CO_2 até o cloroplasto, atividade do sistema de carboxilação e mecanismos de controle de sua concentração e hidratação, como a atividade da anidrase carbônica.

Existe uma interação entre a taxa de iluminação e o teor de CO_2 no meio, resultando em modificações na atividade fotossintética. De um modo geral, quanto maior a concentração de CO_2 no meio, maior o efeito da iluminação, e vice-versa (HESKETH e MOSS, 1963; BRUN e COOPER, 1967; McPHERSON e SLATYER, 1973). Este efeito corresponde, em certa extensão, ao que se verifica sobre a atividade da RuDP carboxilase/oxigenase, pois com o aumento do teor de CO_2 no

meio há um aumento da atividade da carboxilase e inibição da oxigenase, com a consequente inibição da fotorespiração (GOLDSWORTHY, 1970; BLACK Jr., 1973; BAHR e JENSEN, 1974-b ; LILLEY e WALKER, 1975; ANDREWS *et alii*, 1975; CHOLLET e OGREN, 1975).

O fechamento dos estômatos, provocando aumento da resistência estomática, é um dos efeitos paralelos do aumento do teor de CO_2 (LUDLOW e WILSON, 1971).

Em se tratando de uma cobertura (stand), existe uma variação no teor de CO_2 no seu perfil, mais acentuada em plantas mais eficientes (MONSI *et alii*, 1973). O fluxo de CO_2 no perfil vertical da estrutura do stand é função da radiação recebida (ALLEN *et alii*, 1974), mostrando geralmente uma distribuição côncava.

É bem conhecido o fato que o aumento do teor de O_2 no ambiente provoca um decréscimo na taxa fotossintética (Efeito Warburg), resultante do aumento da fotorespiração e decréscimo da fotossíntese bruta (JACKSON e VOLK, 1970 ; LUDWIG e CANVIN, 1971). D'Aoust e CANVIN (1973) calcularam, usando absorção diferencial de $^{14}\text{CO}_2$ e $^{12}\text{CO}_2$, que do efeito do aumento do teor de O_2 de 2% para 21% em folhas de feijoeiro, 55% foi devido à inibição da fotossíntese bruta, e 45 % pelo aumento da fotorespiração.

a.4. Estados de hidratação, nutricional e sanitário

A carência D'água diminui a taxa fotossintética através de dois fenômenos distintos: aumento das resistências ,

estomáticas e do mesófilo, e efeito direto sobre o cloroplasto (BOYER, 1970; 1971; BOYER e BOWEN, 1970; TROUGHTON, 1969). BOYER (1970) encontrou que uma tensão de -17 bars inibiu em 50% a fotossíntese em folhas de soja, enquanto -4 bars já inibia a expansão das folhas.

A produção de matéria seca do feijoeiro começa a decrescer acentuadamente quando o ψ_{H_2O} da folha atinge -8 bars, com boa correlação com a diminuição da transpiração (MILLAR e GARDNER, 1972). Também o trabalho de CROOKSTON *et alii* (1974-a), sugere que a fotossíntese líquida do feijoeiro tende para 0, com ψ_{H_2O} na folha de aproximadamente - 6,8 bars (normal: - 2,0 bars), principalmente pelo aumento da resistência estomática.

Diversos pesquisadores já mostraram que a deficiência de macro e micronutrientes afeta a estrutura do cloroplasto, em especial as de enxofre e nitrogênio (BASZYNSKY *et alii*, 1972), embora todos os macronutrientes provoquem modificações ultraestruturais e bioquímicas. Para o Ca, K e P a alteração funcional é pouco acentuada (HALL *et alii*, 1972). Por sua vez Mg e Fe, que estão diretamente relacionados à síntese de clorofila, as suas deficiências provocam diminuição no teor deste pigmento (ZELITCH, 1971).

TERRY (1976), estudou o efeito da concentração de S sobre a taxa fotossintética em beterraba, verificando que existe uma relação linear entre o teor de S e a fotossíntese líquida. Aumento da resistência do mesófilo e decréscimo

mo do teor de clorofila parecem ser os principais fatores envolvidos, e em menor escala a atividade da carboxilase.

No caso de deficiência de Zn, há uma diminui-ção da formação da RuDP carboxilase (JYUNG e CAMP, 1976); enquanto a síntese de proteínas e carboidratos com a corres-pondente diminuição da atividade da carboxilase, é o resultado de uma deficiência severa de P (AVDEEVA e ANDREEVA, 1975).

É bastante conhecido o efeito de K sobre a a-bertura estomática, eficiência fotossintética e translocação (ZELITCH, 1971).

A presença de patógenos provoca alterações na estrutura do cloroplasto, principalmente pela destruição de suas proteínas, como é o caso do mosaico dourado; inibição da síntese de clorofila, ou a sua destruição por toxinas, ou por dano direto sobre a estrutura do cloroplasto (GOODMAN *et alii* 1967; WILDMAN *et alii*, 1949; ZELITCH, 1971).

b. Fatores internos

Os fatores fisiológicos que controlam a taxa fotos-sintética variam de acordo com a informação genética da plan-ta e a interação genótipo-ambiente. Assim, a ação de um fa-tor interno é função da carga genética que o determina, do controle que o ambiente exerce sobre a exteriorização desta carga, e da interação, ao nível fisiológico, com fatores ex-ternos.

b.1 Resistência à difusão do CO_2

Em plantas terrestres que consomem CO_2 deve haver uma queda de concentração entre o ar ambiente e o local de reação do cloroplasto, pois, de acordo com a lei de Fick para a difusão, o fluxo de um gás ou soluto é relacionado à diferença de concentração e inversamente relacionado à distância (WHITTINGHAN, 1974). Calcula-se que na ausência de qualquer mecanismo de concentração o teor de CO_2 no espaço intercelular poderá atingir 50 a 100 ppm, e em muitas plantas C_3 se tem encontrado esta concentração (WALKER, 1973-a).

As resistências ao fluxo de CO_2 são, principalmente:

a. Resistência da camada adjacente, cuja magnitude depende da largura da folha e da sua forma, bem como, da velocidade do vento. Para o feijoeiro, CHARTIER *et alii* (1970) encontraram $r_a = 0,5 \text{ sec/cm}$, em ambiente com velocidade de vento moderado.

b. Resistência estomática (r_s), que varia muito mais intensamente com as condições ambientais e endógenas, especialmente luz, teor de CO_2 no meio, potencial água da folha, temperatura noturna, concentração de K e hormônios como ácido abscísico e cinetina (WAREING *et alii.*, 1968; ZELITCH, 1971).

Para o feijoeiro, FRASER e BIDWELL (1974) encontraram valores variando de 2,5 a 12 sec/cm , dependendo da idade da folha e dos eventos ontogênicos, e embora menor que

para a r_m (resistência do mesófilo), encontraram boa correlação entre r_s e a taxa fotossintética. CHARTIER *et alii* (1970) detectaram valores de 0,6 a 2,2 sec/cm para uma resistência total de 5 a 13 sec/cm.

c. Resistência do mesófilo (r_m), que do ponto de vista fisiológico inclui três componentes: resistência da camada subestomática, que possivelmente se desenvolve nas paredes celulares; o componente de resistência à difusão na fase líquida, e as limitações do sistema enzimático ou resistência aparente do sistema enzimático, sendo que este último componente constitui uma grande proporção da resistência total à difusão (HOLMGREN *et alii.*, 1965; BARRS, 1968; ZELITCH, 1971).

CHARTIER *et alii* (1970), mediram a resistência da fase gasosa e da fase líquida, encontrando valores de 4,5 a 9,1 sec/cm e resistência à carboxilação de 0,1 a 0,6 sec/cm para o feijoeiro à luz saturante. Também CROOKSTOMN *et alii* (1974-a) encontraram resistência do mesófilo variando de 6,0 a 8,0 sec/cm em plantas cultivadas a 18°C.

FRASER e BIDWELL (1974) encontraram uma relação linear entre a taxa fotossintética e a resistência do mesófilo nas folhas cotiledonar, 1ª e 2ª trifoliolada no feijoeiro, e sugeriram que a variação destas resistências parece estar ligada a eventos ontogênicos, não só da folha como da planta, variando de 6,0 a aproximadamente 22,0 sec/cm. Parece haver também um controle tipo "feed-back" (THORNE e

KOLLER, 1974; NEALES e INCOLL, 1968; UPMEYER e KOLLER, 1973).

BEARDELL *et alii*, (1973), trabalhando com soja, concluíram que a taxa fotossintética é primariamente controlada pela resistência do mesófilo, no que concordam os dados de HOLMGREN (1968), que mostrou que diferenças na r_m podem ser associadas ao número e tipo de células do mesófilo.

A importância relativa da resistência de carboxilação deve diferir de acordo com o material e condições de cultivo (CHARTIER *et alii*, 1970; LUDLOW e WILSON, 1972), devendo-se considerar que estes parâmetros estão interrelacionados, não se podendo avaliar seus efeitos separadamente (CROOKSTON *et alii*, 1975; NEALES *et alii*, 1971), sendo que este último autor achou que durante a senescência da folha, o componente de difusão na fase líquida toma uma parte importante em r_m .

O transporte de HCO_3^- na membrana do cloroplasto pode também ser um dos fatores que controlam a concentração de CO_2 dentro do cloroplasto. POINCELOT e DAY (1976), sugerem que a maior taxa de transporte de HCO_3^- na membrana pode ser um dos fatores da maior eficiência fotossintética do girassol, estando este transporte ligado a atividade de ATPase na membrana.

b.2. Características do sistema de carboxilação Primária

Em plantas C_3 , como o feijoeiro, a carboxilação

primária se dá pela reação do CO_2 com Ribulose-1,5-difosfato (RuDP), catalisada pela Ribulose-difosfato carboxilase (Carboxidismutase E.C. 4.1.1.39). A atividade e propriedades desta enzima coincidem com as da Proteína Fração 1, que constitui cerca de 50% do total das proteínas solúveis de folhas de plantas superiores (KAWASHIMA e WILDMAN, 1970).

Esta enzima é uma das mais importantes no controle do processo fotossintético, e em muitos casos encontrou-se correlação entre a sua atividade e a taxa fotossintética (TREHARNE, 1972). O seu peso molecular tem sido estimado em 560.000, com um diâmetro de cerca de 100 a 200 Å, sendo composta de 8 (oito) subunidades maiores (peso molecular 58.200), e oito subunidades menores (peso molecular aprox. 15.300), acreditando-se que as subunidades maiores contêm o sítio catalítico, e as menores têm função reguladora (KAWASHIMA e WILDMAN, 1970; KAWASHIMA *et alii*, 1971; ZELITCH, 1975-b). Ela é alostérica com respeito a concentração de CO_2 , mostrando uma curva sigmoide com o acréscimo de CO_2 no meio (SUGIYAMA *et alii*, 1968).

TAKABE e AKAZAWA (1975), encontraram evidências de uma evolução molecular da RuDP carboxilase, sendo que a subunidade A, a maior, (codificada pelo cloroplasto), é idêntica para todas as espécies, enquanto a subunidade B (codificada por genes nucleares) apresenta especificidade para a espécie, estando estreitamente relacionada ao acoplamento $\text{pH} - \text{Mg}^{++}$. Segundo CHEN *et alii* (1975), a análise da composição

polipeptídica da Fração I pode revelar a natureza da híbridação intraespecífica em trigo, pois o parente materno codifica o cloroplasto, e as subunidades A podem apresentar características físico-químicas diferentes.

A atividade da RuDP carboxilase é altamente dependente do Mg^{++} , sendo que a maioria das preparações exige concentrações deste íon em torno de 10 mM (KAWASHIMA e WILDMAN, 1970). Segundo WALKER (1973-a), o íon Mg^{++} está envolvido no mecanismo de ativação da carboxilase pela luz, sendo que o sistema de cloroplasto reage imediatamente à presença deste íon.

A afinidade pelo substrato RuDP é muito alta, estando o $K_m(RuDP)$ entre $1,0 \times 10^{-4}$ a $7,0 \times 10^{-4} M$, sendo que a RuDP induz uma mudança conformacional reversível, sendo este possivelmente um mecanismo de resistência à degradação proteolítica (KWOK e WILDMAN, 1974). O complexo Carboxilase-RuDP é 100 vezes mais solúvel em presença de excesso de HCO_3^- e Mg^{++} que a carboxilase sozinha.

Diversos estudos foram feitos para determinar a dependência da carboxilase em relação à concentração de CO_2 , sabendo-se que o CO_2 deve ser o substrato ativo ao invés do HCO_3^- , como seria de esperar para um sistema que opera em solução (COOPER *et alii*, 1969). O $K_m(HCO_3^-)$ foi encontrado estar situado entre 2,5 a 30 mM para sistemas "in vitro" (KAWASHIMA e WILDMAN, 1970; PAULSEN e LANE, 1966), e para enzima purificada cerca de 22mM (ZELITCH, 1971), o que,

segundo WALKER (1973-b) está em equilíbrio com 0,54 mM de CO_2 em solução e 1,8% de CO_2 atmosférico a pH 7,9. Em 1971, JENSEN (1971) observou que a atividade da carboxilase imediatamente após a sua liberação do cloroplasto, ao escuro, tinha um $\text{Km} (\text{HCO}_3^-) = 0,6 \text{ mM}$ (pH = 7,8)

BAHR e JENSEN (1974-a) estudaram as propriedades desta carboxilase de alta afinidade, encontrando um $\text{Km} (\text{CO}_2)$ calculado em 11 a 18 μM , verificando que ela se convertia rapidamente em uma forma de alto Km , enquanto a incubação com Mg^{++} e HCO_3^- fornecia uma forma intermediária, embora as velocidades máximas fossem bem abaixo da esperada "in vivo". Subsequentemente, ANDREWS *et alii*, (1975), verificaram que a forma de baixo Km poderia ser estabilizada em presença de Mg^{++} e concentrações de CO_2 próximas da atmosférica, achando que a forma de alto Km era produto da conversão da forma "in vivo" devido a ação de inibidores, como açúcares-P, por exemplo.

LILLEY e WALKER (1975) ensaiaram a atividade da RuDP carboxilase por um método com condições similares verificadas "in vivo" e obtiveram velocidades máximas de até 1000 μmoles de CO_2/mg clorofila.hr (média de 573 $\mu\text{moles}/\text{mg}$ clorofila.hr) e $\text{Km} (\text{CO}_2)$ aproximadamente 46 μM , podendo-se obter velocidades compatíveis com as verificadas para cloroplastos intactos e folhas, com concentrações de CO_2 similares às atmosféricas.

O pH que estas preparações mostram atividade má-

xima está em torno de 8,0 (BAHR e JENSEN, 1974-a; ANDREWS *et alii*, 1975; LILLEY e WALKER, 1975). O K_m (CO_2), tanto de cloroplastos, de preparações, como da enzima purificada, é dependente do pH, decrescendo de 25 μM para 7 μM ao se passar o pH do meio de 7,2 para 8,8, sendo possivelmente este o mecanismo de sua ativação pela luz, isto é, provocando esta um fluxo de protons para fora do cloroplasto (BOWES *et alii*, 1975).

Certos metabólitos, normalmente presentes no cloroplasto podem ativar a RuDP carboxilase, como Frutose-6-P e Ribulose-5-P, enquanto outros como Glucose-1-P, Glucose-1,6-diP e outros inibem-na até em cerca de 50% (BUCHANAN e SCHURMANN, 1973). Também o $NADPH_2$ ativa a carboxilase, enquanto a Frutose-1,6-diP e 6-Fosfogluconato podem inibir ou ativar, de acordo com as condições de ensaio e concentrações empregadas (CHU e BASSHAM, 1973; 1974).

Só recentemente é que foi proposto por BOWES *et alii*, (1971) que a Proteína Fração I catalisa a oxigenação de RuDP a PGA e fosfoglicolato, havendo aparentemente uma competição entre o CO_2 e O_2 pela RuDP, chamando-se a esta atividade de RuDP-oxigenase, podendo este mecanismo explicar a inibição da carboxilação pelo O_2 (ANDREWS *et alii* 1973; BOWES e OGREN, 1972), embora este mecanismo não exclua a possibilidade de haver outros mecanismos de formação do glicolato, substrato da fotorespiração (ZELITCH, 1973; BASSHAM e KIRK, 1973). BAHR e JENSEN (1974-b), trabalhando com a enzima recém liberada do cloroplasto (baixo

K_m (CO_2), encontraram atividade de carboxilase/oxigenase su
ficiente para a produção de glicolato quando empregaram con
centrações de CO_2 e O_2 próximas da atmosférica, propondo que
o pH do estroma é que controla a relação de atividades Car-
boxilase/Oxigenase. Ao pH 7,3 apenas 15% do C assimilado o
foi como glicolato, enquanto ao pH = 8,9, 100% era incorpo-
rado em glicolato. A relação 1:4 Oxigenase: Carboxilase, ,
prevista por LAING *et alii* (1974) foi encontrada por diver-
sos pesquisadores em soja e espinafre (ANDREWS *et alii*, 1973;
BADGER e ANDREWS, 1974; BAHR e JENSEN, 1974-b).

O sistema de ativação da oxigenase é similar ao
da carboxilase, exigindo Mg^{++} e CO_2 , sendo que a carboxila-
se de baixo K_m (CO_2) tem K_m (O_2) aproximadamente 0,22 mM ,
(ANDREWS *et alii*, 1975). O K_i (CO_2) foi encontrado ser
20 μM , e a inibição da oxigenase pelo CO_2 a pH mais baixo se
deve a maior concentração externa de CO_2 , é necessário 9 ve
zes mais HCO_3^- dissolvido a pH 7,5 que ao pH 6,5 para atin
gir a mesma concentração interna de CO_2 (WALKER, 1973-b).

b.3. Translocação (Efeito de Retroinibição)

O efeito da taxa de translocação sobre a efici-
ência fotossintética do feijoeiro foi demonstrado de dois modos
diferentes, por LIU *et alii*, (1973) e por NEALES *et alii*,
(1971). Os primeiros usaram medidas da quantidade de ^{14}C que
permanecia na folha após determinado período, verificando

que o cultivar que apresentava menor taxa de translocação tam b ẽ apresentava menor atividade fotossintética. O cultivar Michelite-62, que excedia o Red Kidney em 23 a 31% da fixação de CO_2 , continha, após 8 horas, apenas 38% do ^{14}C fixado, enquanto o outro possuía 60%.

NEALES *et alii*, (1971), verificaram que a defoliação parcial (aumento de consumo relativo às folhas remanescentes), aumentava a taxa fotossintética, e consequentemente a atividade da RuDP carboxilase e PEP carboxilase, havendo, por conseguinte, uma diminuição da resistência residual, que os autores atribuíram ao componente de resistência à carboxilação.

Também se pode verificar este efeito durante a ontogenia do feijoeiro. Sempre que aparecem novas folhas na planta, ou imediatamente antes da floração, há aumento na taxa fotossintética das folhas existentes (TURNER e BIDWELL, 1965; FRASER e BIDWELL, 1974). Também RYLE e POWELL (1974), detectaram 80% do ^{14}C fixado nas áreas de crescimento potencial após certo tempo de translocação. Sabe-se que o desenvolvimento de frutos se constitui uma forte fonte de consumo de assimilados (FLINN, 1974).

È conhecido o fato que a luz aumenta a taxa de translocação (HARTT, 1965; PLAUT e REINHOLD, 1969), sendo seu efeito notado sobre a quantidade e direção do movimento. Com a planta ao escuro, a direção é essencialmente acropetal, e à luz é basipetal. Este efeito da luz (saturante a menos que

250 ft-c) pode ser devido ao balanço hormonal, isto é, possivelmente hormônios produzidos pelas fontes de consumo estimulam o fluxo de assimilados e previnem o acúmulo de carboidratos (NEALES e INCOLL, 1968; STOV, 1969), havendo aumento da síntese da ATP e promoção da permeabilidade (PLAUT e REINHOLD, 196). A taxa de iluminação recebida pela planta durante o seu desenvolvimento também tem influência sobre a translocação (LUSH e EVANS, 1974).

Em trabalho recente, NAFZIGER e KOLLER, (1976) tentaram separar o efeito da concentração de amido na folha do efeito hormonal. A relação entre taxa fotossintética e o teor de amido por unidade de área foliar foi dada por uma equação de segundo grau observando uma relação quadrática positiva entre a resistência do mesófilo e o teor de amido, sugerindo que o amido deve impedir o transporte intracelular de CO_2 , possivelmente ao nível celular.

A distância intervenal é um dos fatores relacionadados à diferença de taxa de translocação em plantas C_3 e C_4 (CROOKSTON e MOSS, 1974), pois em plantas C_3 esta distância é 3 vezes maior que nas C_4 .

B.4. Fotorrespiração

Segundo ZELITCH (1971;1973;1975-a-b) a fotorrespiração é um dos principais fatores de decréscimo da taxa fotossintética nas plantas C_3 , especialmente em temperatu -

ras mais elevadas. As evidências indicam que a fotorespiração é um processo de perda de energia, e que a fotossíntese líquida poderia ser aumentada até em 50% pela repressão deste tipo de metabolismo (GOLDSWORTHY, 1970; CHOLLET e OGREN, 1975; MONTEITH, 1976).

O termo fotorespiração, proposto por DECKER e TIO, (1959) para explicar a aceleração da saída de CO_2 após um período luminoso, ocorre em todas as plantas com metabolismo C_3 , e se processa pela passagem do carbono assimilado pelo metabolismo do glicolato. DOWNTON e TREGUNNA (1967), medindo a taxa fotossintética a 21% de O_2 e em sua ausência, tomando a diferença como medida da fotorespiração. Esta variou de 37 a 60% da fotossíntese líquida encontrada.

Em 6 leguminosas forrageiras, HESLEHURST e WILSON (1974) determinaram que cerca de 31% do carbono fixado era perdido pela fotorespiração, e estudos realizados por CHMORA *et alii.*, (1976) mostraram uma relação inversa entre a taxa fotossintética e o ponto de compensação, sugerindo que existe uma relação direta entre a fotossíntese e a fotorespiração, o que também foi observado por CARLSON *et alii* (1971) e NELSON *et alii*, (1975-b). Esta relação também já foi sugerida para a respiração ao escuro por MCCREE (1974) e PENNING de VRIES (1974).

Recentemente FRASER e BIDWELL (1974) determinaram a taxa de fotorespiração em folhas de feijoeiro, desde o aparecimento das folhas cotiledonares até o florescimento ,

determinando a eficiência de assimilação (fotossíntese bruta/fotorespiração). A fotorespiração variou apenas ligeiramente com a idade e tipo de folha, variando de aproximadamente 2 a 4mg CO₂/dm².hr, e em apenas uma ocasião foi detectada a taxa de 7mg CO₂/dm².hr. Não houve correlação entre a fotossíntese bruta e a fotorespiração, nem entre esta e as resistências do estômato e do mesófilo.

Com foi frizado anteriormente, a atividade da RuDP carboxilase/oxigenase deve estar associada à produção de glicolato, embora outros mecanismos como a oxidação de fragmentos dicarbonados (dihidroxietiltiamina pirofosfato) possam fornecer glicolato, envolvendo a ferredoxina e H₂O₂ que se podem formar à luz (SHAIN e GIBBS, 1971; LAING *et alii*, 1974; BAHR e JENSEN, 1974-b). Apesar de ser considerado um processo de perda, muitos mecanismos têm sido relacionados como dependentes da fotorespiração, a saber, a proteção dos centros de reação da fotossíntese contra a oxidação (OSMOND e BJORKMAN, 1972), refixação de CO₂, formação de ATP ao nível de mitocondria (BIRD *et alii*, 1972), fornecimento de energia para redução do nitrato (LIPS e AVISSAR, 1972), embora esta última afirmação seja contestada por DALLING *et alii*, (1972). Existe contudo uma correlação entre o ponto de compensação de CO₂ e a relação redutase de nitrato/RuDP carboxilase, que sugere o envolvimento da fotorespiração no metabolismo nitrogenado (FAIR *et alii*, 1973; 1974).

b.5. Idade do órgão de assimilação

Diversos trabalhos sobre o efeito da idade do tecido na taxa fotossintética em cana de açúcar foram relatados por ALEXANDER (1973). Também, KORTSCHAK e FORBES, (1969) separaram estatisticamente o efeito da idade da folha e da estação de crescimento, verificando que a primeira tem muito maior influência sobre a absorção do CO_2 atmosférico.

JEWISS e WOLEDGE (1967), estudaram a variação da taxa fotossintética com a idade da folha em *Festuca arundinacea* (Schreb), verificando que, após a expansão completa, a fotossíntese na folha começa a cair, chegando a alcançar 0 de absorção, ou mesmo taxas negativas (perdas líquidas).

Em feijoeiro, OZBUN *et alii*, (1964), usando a técnica de absorção diferencial de $^{13}\text{CO}_2 / ^{12}\text{CO}_2$, mostraram que a taxa fotossintética é mais ou menos constante com a idade. Também FRASER e BIDWELL (1974), não encontraram relação direta entre a idade da folha de feijão e a sua fotossíntese real ou aparente (durante 24 dias de medições).

Segundo SALE (1975), a taxa fotossintética de um stand de feijão só começa a decrescer após 70 dias, atribuindo isto a senescência.

KISAKI *et alii*, (1973) mostraram que, a partir do surgimento da folha a taxa fotossintética tende a aumentar até certa idade, havendo relação entre este aumen

to e a atividade da PEP carboxilase, porém não com a RuDP carboxilase. A taxa de fotorespiração também cresceu até a expansão completa da folha e depois decresceu com a idade, sendo que o teor de clorofila decresceu mais acentuadamente que a taxa fotossintética. SALIN e HOMANN (1971) também encontraram grande aumento na taxa de fotorespiração à medida que o tecido se desenvolvia.

Os principais eventos bioquímicos que se processam durante a senescência são: a perda de clorofila, ácidos nucleicos (especialmente RNA) e proteínas; sendo que o cloroplasto é a primeira organela a mostrar sinais de senescência, com uma perda de RuDP carboxilase bastante acentuada (KAWASHIMA e WILDMAN, 1970; PETERSON *et alii*, 1973; HUFFAKER e PETERSON, 1974; PETERSON e HUFFAKER, 1975). As mudanças estruturais no cloroplasto começam com a desintegração das lamelas do estroma, seguido do rompimento da pilha de grana (DODGE, 1970). A perda da atividade de Hill pode ser relacionada, de um modo geral, à perda de pigmentos, proteínas e ácidos nucleicos, havendo, possivelmente, alteração sequencial na cadeia de condução eletrônica entre a água e o Fotossistema II (BISWAL e MOHANTY, 1976).

Observa-se nos trabalhos sobre senescência que deve haver o envolvimento de hormônios, pois sempre se verifica que a cinetina retarda os sintomas de senescência, enquanto a serina a acelera (PETERSON e HUFFAKER, 1975 ;

BISWAL e MOHANTY, 1976).

3.2. Fotossíntese e produtividade

A relação entre a taxa fotossintética e a produção final de uma cultura, embora estreita, é muito complexa, pois a produção é o resultado da acumulação de material orgânico (cerca de 95% da matéria seca) no órgão colhido, durante todo o tempo em que este é fisiologicamente ativo. Além disso, quando o material precisa ser translocado para armazenamento, acresce-se os fatores de equilíbrio do balanço de translocação ("source-sink"). Ao entender-se o papel de cada fator que influi sobre a taxa fotossintética, e como a modificação do mesmo afetará a produção, poder-se-á estabelecer padrões fisiológicos para o melhoramento genético (ZELITCH, 1971; 1975; MOSS e MUSGRAVE, 1971; WITTWER, 1974; SINCLAIR e DeWIT, 1975; ADAMS, 1975).

Embora conhecendo-se atualmente mutantes, que alteram determinados passos da cadeia fotossíntese-produção e mesmo já se empregando certos princípios fisiológicos no trabalho de melhoramento convencional, o melhoramento de um processo fisiológico, como tal, ainda está longe de ser conseguido (SPRAGUE, 1969).

As taxas máximas de fotossíntese (com luz e CO_2 saturantes) são somente ligeiramente maiores em milho, cana de açúcar e sorgo, que em fumo, feijão e outras cultu-

ras com metabolismo C_3 . Contudo, a taxa de crescimento máximo relatado para as primeiras é cerca de 2 vezes a das outras (ZELITCH, 1973). Também outra observação interessante é que nos últimos 20 anos a produtividade do milho triplicou nos Estados Unidos da América, enquanto a da soja aumentou somente cerca de 20%, embora as técnicas culturais tenham melhorado semelhantemente. Isto possivelmente se deve à barreira biológica da baixa taxa de fotossíntese da soja em relação ao milho (ZELITCH, 1975-a).

Se observarmos as principais diferenças entre as plantas "eficientes" e "ineficientes" do ponto de vista da produção de matéria seca, verificamos que a fotossíntese destas espécies também acompanha estas diferenças. Pode-se assim inferir que a taxa fotossintética é um bom indicador da produtividade da cultura, desde que observadas as variações a ela inerentes (ZELITCH, 1971; MOSS e MUSGRAVE, 1971).

Segundo MONTEITH (1976), se considerarmos a taxa fotossintética máxima como o aproveitamento de 10% da radiação total recebida, e que a média de produção mundial corresponde ao aproveitamento de apenas 0,1% desta, as causas principais deste decréscimo são:

- a. Respiração
- b. Saturação lumínica do stand
- c. Falta de área foliar para aproveitamento da luz (juvenilidade)

- d. Senescência
- e. Falta de Fertilizantes e água, e ataque de pragas e doenças
- f. Quantidade de material vegetal que não é colhido

Uma análise da relação fotossíntese - produção (acumulação da matéria seca) em fumo, foi realizada por HACKETT (1973); HACKETT e RAWSON (1974) e RAWSON e HACKETT (1974). Inferindo que a taxa fotossintética das folhas poderia se manter ao mesmo nível durante grande parte da fase de crescimento, lançaram a hipótese que deveria haver um excesso de fotos sintetados de 70 a 170% em relação ao consumo (acumulado + res pirado), e a retroinibição deveria ser um dos mecanismos mais importantes no controle da fotossíntese. Contudo, testando esta hipótese encontraram que em plantas com 16 folhas, as de número 10 a 13 eram responsáveis por mais que 75% da fotossí ntese líquida total e 65% da respiração. O máximo de fotossí ntese foi alcançado quando a folha tinha 37% de sua área má xi ma, sendo que quando atingiram seu máximo desenvolvimento as de número 2 a 5 tinham fotossíntese líquida de 2 a 9mg CO₂/dm².hr, enquanto as de nº 10 a 12 tinham a taxa fotossintética de 10 a 13mg CO₂/dm².hr. Concluíram que a relação procurada era mais complexa que a simples inferência feita, propondo novos estudos para elucidá-la.

Normalmente quando se compara o crescimento de gramíneas tropicais com leguminosas obtêm-se correla

ção entre a taxa fotossintética e a taxa de assimilação aparente, indicando que a produtividade biológica acompanha o aumento da fotossíntese líquida (LUDLOW e WILSON, 1970 ; HELESHURST e WILSON, 1974; GIFFORD, 1974), embora nem sempre a taxa fotossintética expressa por unidade de área foliar seja um dado comparativo, mesmo dentro da mesma espécie (DUNCAN e HESKETH, 1968; DELANEY e DOBRENZ, 1974).

Para o feijoeiro também foi encontrada boa correlação entre a fotossíntese líquida e o crescimento. Para um aumento de 13,8g de matéria seca/m².dia, houve um ganho líquido diurno de 14,8g/m² e uma perda noturna de 3,1g/m² (média de 10 dias) (SALE, 1975).

O feijoeiro parece ser muito sensível à radiação (MAGALHÃES e MONTJOIS, 1971), apresentando um índice de área foliar ótimo de cerca de 3 para uma taxa de radiação de 300 a 500 cal/cm².dia, o que demonstra, segundo os padrões de distribuição foliar, que sua arquitetura é altamente desvantajosa (MONSI *et alii*, 1973).

EDJE *et alii*, (1975), fazendo defoliações diferenciais, mostraram que as folhas da parte média são as mais efetivas para a produção, seguindo-se as do topo e por último as basais, sendo que a defoliação completa aos 20 dias produziu 579 kg/ha (possivelmente houve recuperação parcial da área foliar), e que a presença das folhas basais junto com as da parte média foram prejudiciais, dando a entender que aquelas se tornavam parasitas destas.

A produção final de grãos também está relacionada com a persistência da área foliar, que por sua vez está relacionada com a quantidade de N absorvido. Além disso, deve-se considerar que nas variedades de hábito de crescimento indeterminado há a formação contínua de meristemas vegetativos, constituindo-se importantes fontes de consumo de material orgânico, que irão competir com as estruturas reprodutivas (ADAMS, 1975).

O índice de colheita do feijoeiro (Produtividade Econômica / Produtividade Biológica, ou Matéria Seca dos Grãos / Matéria Seca Total), é cerca de 56 a 62% (MOSJIDIS CH, 1976), sendo semelhante à maioria das culturas. Contudo, sua necessidade de N orgânico é alta, cerca de 25mg/g de material orgânico, levando a uma translocação relativamente elevada deste nutriente das folhas para os grãos durante o seu desenvolvimento. Desde que, durante esta fase a absorção de N não é alta, o desenvolvimento do grão possivelmente força a planta a uma senescência prematura, que se caracteriza pela diminuição da atividade fotossintética (SINCLAIR e DeWIT, 1975).

A fixação de N atmosférico, é altamente dependente da taxa fotossintética da planta, como demonstrado por HARDY e HAVELKA (1973, 1975); em soja cultivada em ambiente enriquecido com CO_2 durante a fase de fixação máxima, que no caso, é de 80 a 100 dias. Os principais efeitos verificados sobre a associação *Rizobium* - leguminosa englobam tan

to a duplicação de atividade da nltrogenase por planta, como a duplicação do número de nódulos por planta . Observaram ainda um aumento de 75 para 425 kg de N/ha.

A respiração é um dos fatores fisiológicos cuja modificação genética tem sido recentemente discutida como possível caminho para aumentar a produtividade (ZELITCH , 1973; 1975-a; PENNING de VRIES, 1975; WITTWER, 1974; HEICHEL, 1971).

A fotorespiração, como já citado, é considerada um processo de perda de energia, e as plantas mais eficientes, isto é, as de metabolismo C_4 , não apresentam este fenômeno em escala detectável, possivelmente devido ao controle da síntese de glicolato (ZELITCH, 1975-b; CHOLLET e OGREN, 1975).

Vários trabalhos já foram realizados para comprovar o efeito da fotorespiração sobre a produção em plantas C_3 . O decréscimo da concentração de O_2 no meio aumenta consideravelmente a quantidade de matéria seca produzida (BJORKMAN *et alii* , 1968; PARKINSON *et alii* , 1974) , embora a produção de sementes seja pouco afetada, possivelmente porque o desenvolvimento do fruto exige concentrações normais de O_2 (QUEBEDEAUX e HARDY, 1973, 1975). Contudo , aumentando-se a taxa fotossintética pelo aumento do teor de CO_2 no meio, observa-se grande aumento da produção de sementes (QUEBEDEAUX e HARDY, 1975; CHOLLET e OGREN, 1975).

A respiração no escuro, que pelas evidências continua ativa à luz (ZELITCH, 1971), embora em apenas cerca de 25% da taxa observada ao escuro (MANGAT *et alii*; 1974), é um processo necessário à manutenção dos processos celulares, constituindo-se um fator negativo na produtividade das plantas (PENNING de VRIES, 1975). Segundo MCCREE (1974) e PENNING de VRIES, (1975) é formada de dois componentes básicos: a "respiração de crescimento", cuja intensidade é proporcional à quantidade de material sintetizado à luz, e a "respiração de manutenção", proporcional ao peso da matéria seca da planta, sendo esta calculada pelo último autor em cerca de 13 a 23 mg de glucose/g de matéria seca.dia, energia esta usada para manter o "turnover" das proteínas e a concentração de íons na planta, podendo possivelmente ser diminuída consideravelmente pelo emprego de hormônios, substâncias químicas ou pelo melhoramento, resultando em uma economia que poderia alcançar 10 a 40 kg de carboidratos por hectare por dia.

A literatura mostra que de 29 a 71% do CO_2 fixado durante a fotossíntese é perdido pela respiração (ZELITCH, 1975-a). RYLE e POWELL (1974) encontraram variações de 10 a 60% da perda no período de 1 dia para gramíneas, dependendo do genótipo, ambiente e tratamento. Para o feijão, SALE (1975) detectou taxas de 0,5 a 18 mg CO_2/dm^2 de área.hora, para uma taxa fotossintética máxima de 40 mg

de CO_2 . Também observou dependência marcante da temperatura, com um Q_{10} de aproximadamente 3, sendo que para a mesma temperatura, a respiração (ao escuro) quando medida durante o dia foi sempre ligeiramente superior à da noite. Contudo, RYLE *et alii*, (1976) argumentam que o efeito de temperaturas mais elevadas está no decréscimo da constante de tempo para a respiração de manutenção, sem alteração significativa na fração do total que é respirada.

MONTEITH (1976) calcula que para as plantas C_3 cerca de 30% do carbono assimilado é perdido por fotorespiração. Do restante, 30% é perdido pela respiração no escuro, resultando no aproveitamento de apenas 50% do total fixado no crescimento e produção, enquanto para as plantas tipo C_4 esta fração é cerca de 70% do total fixado.

Se comparamos as plantas "eficientes" com as "ineficientes" do ponto de vista de produção primária (matéria seca total), pode-se dizer que a evolução as levou a superar muitas barreiras biológicas antes citadas, como por exemplo: a relação entre atividade carboxilase/oxigenase, com menor síntese de glicolato e menor fotorespiração (no caso exclusivo das plantas C_4); maior taxa de translocação devido a modificações anatômicas e fisiológicas; o desenvolvimento do retículo periférico junto a membrana do cloroplasto e menor distância intervenal; menor resistência à entrada do CO_2 no mesófilo. No caso das gramíneas acresce-se a disposição das folhas, que são mais eretas e rijas, possibi

litando maior penetração da luz no "stand" (BLACK Jr., 1973; WITTWER, 1974; ZELITCH, 1975-a).

3.3. Diferenças entre variedades

Diferentes variedades de uma mesma espécie podem apresentar grandes variações em sua capacidade fotossintética, sendo provavelmente tanto mais acentuadas quanto maior diversidade genética dentro da espécie. Vários pesquisadores já estudaram estas diferenças, tentando estabelecer, em muitos casos, as causas morfológicas, fisiológicas ou bioquímicas responsáveis pelas mesmas, bem como, a possibilidade da exploração desses conhecimentos em trabalhos de melhoramento.

CHANDLER (1969), estudou cerca de 50 variedades de arroz, encontrando variações na taxa fotossintética de 34,5 a 62 mg CO₂/dm².hr, sendo que entre centenas de linhagens em seleção, duas das mais produtivas tinham fotossíntese líquida semelhante à das variedades de maior taxa fotossintética.

Em aveia, APEL e LEHMAN (1969), trabalhando com 115 variedades, verificaram uma relação constante na atividade fotossintética destas variedades, apesar da variabilidade com o ambiente (variação total de 11 a 22 mg CO₂/dm².hr). As variedades adaptadas ao ambiente em que foi conduzido o ensaio apresentaram sempre taxas próximas do máximo,

Também PEARCE *et alii*, (1968), encontraram uma variação de 20 a 50 mg CO₂/dm².hr entre clones de alfafa, estabelecendo uma correlação positiva com o peso específico da folha, que variou de 1,9 a 5,3 mg/cm², sugerindo que este é um caráter morfológico conveniente para um método rápido de classificar a capacidade genotípica em relação a taxa fotossintética.

Variações de 28 ± 2 a 85 ± 3 mg CO₂/dm².hr na fotossíntese de cultivares de milho em condições de campo foram encontradas por HEICHEL e MUSGRAVE (1969). Quatro destas linhagens foram posteriormente selecionadas (a partir dos pais de um híbrido promissor, criado em Cornell-USA), com a finalidade de avaliar a influência da capacidade fotossintética na produção. Após 5 gerações, conseguiram criar 6 linhagens de alta taxa fotossintética e 3 de baixa; e, embora a maioria não apresentasse estabilidade em relação ao caráter pesquisado, algumas linhagens se mostraram promissoras para o melhoramento com base na capacidade fotossintética. Além disso, parece que em alguns casos apenas um pequeno número de genes controla essas diferenças, e a herdabilidade é suficientemente alta para prometer sucesso no melhoramento (MOSS e MUSGRAVE, 1971).

Em 1970, NELSON *et alii*, (1974), iniciaram um programa de medições da taxa de troca do CO₂ em *Festuca arundinacea*, visando estabelecer diferenças estatisticamente significativas de pelo menos 2 mg CO₂/dm².hr. Em 113 genó-

tipos pesquisados, encontraram uma variação de 16,4 a 25,8 mg $\text{CO}_2/\text{dm}^2 \cdot \text{hr}$. Segundo os autores a variabilidade encontrada e a herdabilidade são suficientes para emprego em programas de melhoramento (ASAY *et alii*, 1974).

Diferenças marcantes na resposta, a variações nas condições ambientais, entre variedades de cana de açúcar, foram encontradas por HARTT e BURR (1967). A variedade H-52-125 alcançou a saturação luminosa com 10.000 ft-c, enquanto a H-41-1041 continuou insaturada com 14.000 ft-c. Também IRVINE (1967), realizou extensivos experimentos com cana de açúcar em condições de campo, verificando que os híbridos interespecíficos apresentam maior capacidade fotossintética que os intraespecíficos. A espessura da folha e sua porosidade foram os caracteres morfológicos mais estreitamente relacionados às diferenças.

SONDHAL (1974), empregando o mesmo método utilizado no presente trabalho, e aperfeiçoando-o, obteve diferenças na taxa de fotossíntese (aparente segundo ele) entre cultivares de café, sendo que os cultivares mais produtivos foram os que apresentaram maiores taxas de incorporação de $^{14}\text{CO}_2$.

WALLACE e MUNGER (1965) compararam 3 tipos de feijoeiro em relação a área foliar, taxa de assimilação líquida (TAL), relação de área foliar (RAF) e taxa de crescimento relativo (TCR), encontrando que a relação de área foliar era geralmente a responsável pelas diferenças no cres-

cimento, (considerando que a $TCR = TAL \times RAF$), embora numerosas diferenças entre variedades na taxa de assimilação líquida tenham sido encontradas. No Brasil, XAVIER *et alii* (1976), realizaram a análise de crescimento de 4 cultivares de feijão, sendo 2 do grupo "manteigão fosco" e 2 do grupo "preto", detectando diferenças eventuais nos parâmetros de crescimento, o que entretanto não afetou o rendimento econômico.

IZHAR e WALLACE (1967-a), determinaram a eficiência fotossintética de 5 variedades de feijoeiro, medindo a troca de CO_2 em folhas intactas através de medidas no IRGA e tomando a média de 5 determinações, geralmente de 5 folhas diferentes como estimativa do potencial fotossintético geneticamente controlado. A variedade "Michelite-62" excedeu a "Monroe", "Perry Marrow", "Steben" e "Red Kidney" em 9%, 22%, 35% e 31% respectivamente, em todas as intensidades luminosas acima do ponto de compensação. Os autores sugerem que possivelmente a resistência à difusão do CO_2 deve ser principal causa das diferenças encontradas. A comparação dos pais e progênies leva a crer que o mecanismo genético é quantitativo, e deve ser controlado relativamente por poucos genes, havendo certa dominância para a baixa eficiência fotossintética.

Uma análise genética das diferenças na taxa fotossintética entre variedades foi realizada por WILSON e COOPER (1969), que efetuaram cruzamentos semi-dialélicos entre 6 genótipos de *Lolium perenne*, obtendo variação genética

aditiva para : a taxa fotossintética à luz saturante e limitada; conteúdo de clorofila; e tamanho das células do mesófilo e sua espessura. As maiores taxas foram encontradas em folhas pouco espessas, com células do mesófilo pequenas e maior teor de clorofila por unidade de volume, não havendo necessariamente correlação entre as taxas de fotossíntese à luz saturante e limitada. Também determinaram a herdabilidade, que no sentido estrito foi alta para a fotossíntese à luz saturante, conteúdo de clorofila, tamanho das células do mesófilo, e espessura e largura da folha.

Diferenças morfológicas e na atividade fotoquímica dos cloroplastos podem ser responsáveis pela variação na taxa fotossintética de cultivares de soja, havendo correlação entre a taxa fotossintética e a quantidade de cloroplastos e clorofila por unidade de área foliar, e ainda com a reação de Hill, bem como correlação inversa com o volume médio do cloroplasto (WATANABE, 1973).

TREHARNE (1972) relata diferenças entre variedades de até 40% na atividade da RuDP carboxilase por unidade de área foliar, e quase de um fator 3 em termos de proteína solúvel, havendo correlação entre a atividade fotossintética e a atividade da carboxilase, quando ambos não expressos em termos de área foliar. Este mesmo autor selecionou 6 variedades de *Lolium* para combinar estudos bioquímicos, fisiológicos e genéticos, analisando as principais enzimas do ciclo de Calvin simultaneamente. Já foram obtidas evidências de alta correlação entre a atividade da RuDP carboxilase e eficiência fo-

tossintética e atividade das outras enzimas do ciclo. Convém salientar que expressando a atividade enzimática por unidade de área foliar, peso fresco ou peso seco da folha obtem-se melhor discriminação das variedades do que exprimido por unidade de quantidade de proteína solúvel (NELSON *et alii*, 1975-b).

Usando a inclinação da curva: Taxa de troca de CO_2 versus concentração de CO_2 , como indicação da eficiência de carboxilação, AUGUSTINE e STEVENS (1976), obtiveram variações acentuadas neste parâmetro (0,090 a 0,334 $\text{mg CO}_2/\text{dm}^2 \text{ hr (ppm CO}_2)^{-1}$), entre cultivares de tomate, assim como na eficiência fotossintética (10,2 a 26,9 $\text{mg CO}_2/\text{dm}^2 \cdot \text{hr}$), não encontrando correlação com a resistência difusiva da folha, e obtendo uma forte correlação inversa com a fotorespiração, medida pela interceptação com a concentração 0 de CO_2 (-8,3 a -25,0 $\text{mg CO}_2/\text{dm}^2 \cdot \text{hr}$).

Segundo ZELITCH (1973;1975-a) o controle da fotorespiração por meios genéticos pode ser o caminho para a obtenção de variedades com maior taxa fotossintética. No trabalho por ele relatado, a fotossíntese foi inversamente relacionada com a fotorespiração (embora CHOLLET e OGREN, 1975, contestem o método usado), o que também foi encontrado em 10 cultivares de *Poa pratensis* por WATSCHKE *et alii*, (1972). Normalmente contudo, se tem encontrado relação direta entre a taxa de fotossíntese e de fotorespiração, isto é, as variedades de maior fotossíntese líquida têm tendên-

cia a apresentar maior fotorespiração (CARLSON *et alii*, 1971; NELSON *et alii*, 1975-b; CHMORA *et alii*, 1976).

Em dois cultivares de *Dactylis glomerata* estudados por HILLIARD e WEST (1971), um de alta fotorespiração e outro de baixa, foi verificado que o de baixa respiração à luz (de maior taxa fotossintética) possuía o retículo periférico do cloroplasto, característico de espécies C_4 , e cuja função é o transporte de metabolitos do cloroplasto para o citoplasma.

WIDHOLM e OGREN (1969), tentaram encontrar indivíduos com baixo ponto de compensação a partir de 200.000 plântulas de soja da geração M_2 , provindas de sementes tratadas com agente mutagênico, e mais de 6.000 plântulas de aveia, mas não encontraram nenhum indivíduo deficiente na fotorespiração. MENZ *et alii*, (1969), desenvolveram um método semelhante, encerrando plântulas de alto ponto de compensação com plântulas de milho no mesmo ambiente. MOSS e MUSGRAVE (1971), relatam a análise de aproximadamente 10.000 plântulas de aveia e 50.000 de trigo, não sendo encontrado nenhum indivíduo com baixo ponto de compensação. Recentemente NELSON *et alii*, (1975-b) submeteram 4.000 plântulas da variedade "Alta" e 2.200 da "Kentucky - 31" de *Festuca arundinacea*, a um ambiente com tensão de CO_2 abaixo do ponto de compensação por 8 dias, tomando os 36 e 22 sobreviventes finais para análise das características fotossintéticas, verificaram que não havia diferenças na taxa fotossintética em rela

ção a população base, assim como em relação a fotorespiração. Apenas a respiração no escuro foi significativamente aumentada.

A literatura concernente à herança e heterose da taxa fotossintética e seus componentes foi analisada por SINHA e KHANNA (1975). Em diversos casos encontrou-se variações nestes parâmetros ao nível de cultivar, sem contudo notar-se evidências claras a favor da ocorrência de heterose na eficiência fotossintética, apesar de não ser uma hipótese de todo descartável. Em relação aos seus componentes, sugerem que há possibilidade da operação de um sistema multialélico no mesmo locus para a fotorespiração, embora outros pesquisadores tenham encontrado dominância parcial ou total. Em relação às enzimas de carboxilação parece haver dominância mendeliana simples, assim como para o teor de clorofila por unidade de peso. Assim, os componentes do processo fotossintético mostram-se interdependentes, e portanto podem ser apenas complementares, não multiplicativos, sendo teoricamente difícil obter-se alto grau de heterose na taxa fotossintética.

Poucos estudos têm sido feitos sobre a herança de caracteres codificados pelo DNA do cloroplasto e mitocôndria, mas em muitos casos de herança citoplasmática devem operar genes destas organelas. A herança dos plastídeos foi estudada em mais de 50 espécies, verificando-se que em cerca de 2/3 dos casos, esta herança é puramente maternal, o

que assegura perspectiva de fácil manejo dos caracteres codificados (BIRKY, Jr. 1976).

Em relação à respiração no escuro parece importante a determinação da intensidade desta na variedade e que fração se constitui simplesmente em perda de energia. Heichel (1971), citado em ZELITCH (1975-a), comparou duas variedades de milho, e embora ambas apresentassem a mesma taxa fotossintética, uma delas mostrava um ganho de peso seco 50% superior ao da outra. A de crescimento mais rápido perdia 26% de seu ganho bruto no período escuro subsequente, enquanto que a variedade, de crescimento mais lento perdia cerca de 33% do fixado.

Parece que certa porção da respiração mitocondrial ocorre por uma via alternativa de transporte eletrônico, insensível ao cianeto e antimicina, e inibido especificamente pelo ácido salicílicohidroxâmico, e que produz apenas 1/3 do ATP para cada par de átomos de H oxidados pelo caminho convencional. Em mitocôndrias isolados de certo número de espécies, em condições normais, este caminho contribui com 1 a 100% da respiração, com valores de 15 a 20% normalmente observados (ZELITCH, 1975-a). E embora não se tenha incluído nestes ensaios mitocôndria de folhas de plantas, as evidências mostram que este mecanismo também opera aí.

3.4. Medida da atividade fotossintética pela incorporação de $^{14}\text{CO}_2$.

As medidas da assimilação de CO_2 e translocação dos produtos formados usando o ^{14}C têm sido extensivamente usadas há cerca de 30 anos, sendo este, dos isótopos do C, o mais usado devido a sua longa meia-vida (o ^{11}C tem meia-vida de apenas 20 minutos), fácil disponibilidade e baixa periculosidade face à sua baixa energia (máximo de 0,115 MeV). Embora para os estudos de distribuição e movimento de produtos marcados seja praticamente o único método utilizado atualmente, a estimativa da taxa fotossintética usando o ^{14}C ainda é pouco comum (SESTAK *et alii*, 1971).

Os russos foram os primeiros a usar os sistemas fechados com alto conteúdo de $^{14}\text{CO}_2$ para medir o potencial fotossintético das culturas (MOONEY, 1972). Em 1967, STREBEYKO (1967) e AUSTIN e LONGDEN (1967), desenvolveram, separadamente, sistemas portáteis para fornecimento de $^{14}\text{CO}_2$ a câmaras onde se encerrava a folha ou parte dela. Estes últimos autores compararam seus dados com determinações no IRGA, variando a intensidade de iluminação, obtendo para o feijão a equação:

$$\text{Fot}(^{14}\text{CO}_2) = (0,833 \pm 0,059) \text{ Fot. líquida (IRGA)} + 2,07 \text{ unidades}$$

Baseado no equipamento de Austin e Longden, SHIMSHI (1969) desenvolveu um outro, portátil, apropriado pa

ra determinações de campo, com o qual fez determinações do curso diário da fotossíntese em milho e algodão, irrigados e não irrigados, concluindo que o aparelho é satisfatório para efetuar grande quantidade de determinações, especialmente ao relacionar-se a taxa fotossintética com fatores ambientais.

Recentemente, NAYLOR e TEARE (1975), aperfeiçoaram o sistema, introduzindo um controle de fluxo, o que segundo eles é crítico, e um "timer", pois o tempo usado na incorporação é muito pequeno (aproximadamente 20 segundos), e o erro de 1 segundo no tempo de incorporação já dá um apreciável erro de 5%. Mediram a influência do fluxo que passa sobre a folha e do tempo de descarga em trigo, sorgo, soja e milho, concluindo que desde que se faça uma calibração adequada, o sistema se presta para comparações da taxa fotossintética, inclusive entre genótipos da mesma espécie.

O mesmo sistema de incorporação foi usado por FOCK *et alii* (1970), para separar a evolução do CO_2 da sua absorção verdadeira (fotorespiração e fotossíntese bruta respectivamente) em folhas de *Amaranthus* e girassol. Eles utilizaram a absorção de $^{14}\text{CO}_2$ quando se estava passando uma corrente contínua de $^{12}\text{CO}_2$, a 1% de O_2 e outra à determinada concentração de O_2 . Contudo, foram LUDWIG e CANVIN (1971) que construíram o sistema mais aperfeiçoado para medida simultânea da absorção de $^{12}\text{CO}_2$ e $^{14}\text{CO}_2$, medindo assim a fotorespiração e fotossíntese verdadeira sem subestimar o primeiro parâmetro o que é característico dos métodos convencionais. Este tipo

de método foi utilizado por STEWARD *et alii* (1971), e também FRASER e BIDWELL (1974), estes últimos em feijoeiro.

O método de incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ apresenta diversos problemas, que segundo SESTAK *et alii* (1971), o torna apenas semi-quantitativo, sendo melhor empregado para comparações. Os principais erros apontados são devidos a:

A. Discriminação isotópica contra o ^{14}C devido a diferenças na cinética de incorporação dos dois isotópos ^{14}C e ^{12}C , discriminação esta que é maior em plantas C_3 que em plantas C_4 (BLACK, Jr. 1973). Usa-se atualmente um fator de correção (K) proposto por AUSTIN e LONGDEN (1967), dependente da atividade da mistura $^{12}\text{CO}_2$ - $^{14}\text{CO}_2$ usada.

b. Não atingir o "steady-state" no tempo empregado. NAYLOR e TEARE (1975) observaram sempre uma taxa ligeiramente maior de absorção do $^{14}\text{CO}_2$ com 15 segundos de incorporação, atingindo o equilíbrio após 20 segundos, e começando aparentemente a decrescer (efeito da fotorespiração) após cerca de 45 segundos do início da exposição.

c. Fluxo insuficiente para eliminar o gradiente de $^{14}\text{CO}_2$. Segundo NAYLOR e TEARE (1975), o fluxo que passa pela câmara é altamente crítico, devendo ser calibrado para cada cultura (e possivelmente deve ser feito um estudo crítico de suas variações com as condições ambientais). Para o seu equipamento os melhores fluxos foram de 150 ml/min para o sorgo e soja e 100 ml/min para trigo e milho, sendo que pa-

ra o trigo anotaram uma variação muito pequena com variação do fluxo entre 50 e 150 ml/min, enquanto o sorgo apresentou uma variação acentuada.

d. Distribuição não uniforme no tecido da folha, que toma importância maior quando a mini-câmara é usada sobre uma nervura.

e. Diluição pelo ^{12}C da respiração, o que decresce a concentração efetiva do ^{14}C no local de fixação. Parte do carbono respirado deve ser reciclado, não escapando para os espaços intercelulares, ou sendo recapturado a este nível (GOLDSWORTHY, 1970). Este fato levou SONDHAL (1974) a calcular o $^{14}\text{CO}_2$ incorporado como a fotossíntese líquida, ao contrário dos demais autores que acham que o calculado é fotossíntese bruta devido ao tempo de exposição não ser suficiente para reciclar o ^{14}C absorvido (AUSTIN e MONGDEN, 1967; SHIMSHI 1969; LUDWIG e CANVIN, 1971; NAYLOR e TEARE, 1975; STEWARD *et alii*, 1971; FRASER e BIDWELL, 1974; etc.). Segundo SESTAK *et alii* (1971), não há dados suficientes para se generalizar a importância desta diluição, devendo-se realmente "calibrar" o método.

4. MATERIAL e MÉTODOS

4.1 Sementes de *Phaseolus vulgaris*

As sementes de *Phaseolus vulgaris* utilizadas foram obtidas na Seção de Leguminosas do Instituto Agrônomo de Campinas e na Seção de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA, Piracicaba). As sementes foram selecionadas quanto à uniformidade em tamanho e coloração.

As seguintes variedades foram empregadas nos ensaios de comparação de variedades :

- a. Carioca
- b. Rosinha Precoce
- c. Pintado
- d. Piratã - 1
- e. Rosinha G - 2
- f. Venezuela - 42
- g. Goiano Precoce
- h. Pintadinho Precoce

Entretanto, em estudos preliminares foram utilizadas apenas as variedades Carioca e Rosinha Precoce.

De acordo com as informações obtidas de ensaios de campo conduzidos no estado de São Paulo, normalmente as variedades Carioca e Pintado são de alta produtividade, as variedades Venezuela-42, Rosinha -G-2 e Piratã-1, de média produtividade e as variedades Goiano Precoce, Rosinha Precoce e Pinta-

dinho Precoce apresentam normalmente baixa produtividade, isto se levarmos em conta que a cultura não tenha sido atingida por doenças ou pragas a que o feijoeiro é muito sensível (TULMANN NETO, 1975).

4.2 Métodos

4.2.1 Condução das Plantas

O Substrato para a germinação das sementes foi a sílica moída, previamente lavada com ácido clorídrico (1 + 4) e água destilada até voltar ao pH 6,5. As sementes foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio (água sanitária comercial 1 + 9), durante 20 minutos, e arejadas em água destilada por cerca de 1 hora com a finalidade de eliminar o excesso de cloro e diminuir o tempo de germinação. Em alguns experimentos foram utilizados $\text{CuSO}_4 \cdot 10^{-4}\text{M}$ e $\text{CaSO}_4 \cdot 10^{-4}\text{M}$ durante o arejamento, com a finalidade de eliminar fungos e promover um bom desenvolvimento das raízes.

A germinação foi conduzida em bandejas de plástico mantidas em Germinador de Sementes (Convion) com tempo de iluminação de 12 horas a $28^\circ\text{C}/25^\circ\text{C}$ (durante o período claro e escuro respectivamente) e controle de umidade. Alternativamente, para evitar ataque de bactérias, possivelmente devido a alta umidade noturna, as sementes para os últimos experimentos foram postas a germinar na própria Câmara de Crescimento adiante descrita.

Antes da germinação, a sílica foi regada com água destilada, e, vinte e quatro horas após o início da germinação, com solução de Hoagland e Arnon diluída 1 + 4 em água desmineralizada para suprir de nutrientes os "seedlings" incipientes. O transplante dos "seedlings" foi realizado quando as folhas cotiledonares mediam cerca de 2 a 3cm de comprimento, sendo colocados em vasos de plástico de 3 litros de capacidade (2 plantas por vaso), com 2,5 litros de solução nutritiva de Hoagland e Arnon e fornecendo-se o ferro sob a forma de FeEDTA . Em alguns casos foram utilizadas bandejas de 35 litros de capacidade, com aproximadamente 28 a 30 plantas, mas somente quando da utilização das plantas até o 20º dia após a germinação, uma vez que após esta idade havia o entrelaçamento das plantas, especialmente aquelas das variedades de crescimento indeterminado, dificultando a identificação da planta a ser colhida para o ensaio. A disposição das plantas na Câmara e sua colheita formaram um delineamento inteiramente casualizado. A solução nutritiva foi trocada de 10 em 10 dias.

As plantas foram mantidas na Câmara de Crescimento (Conviron), ou, em certos casos especificados, na Casa de Vegetação. A Câmara de Crescimento foi regulada para as seguintes condições:

a) Iluminação - Segundo o catálogo fornecido pelo fabricante o banco de luzes da Câmara de Crescimento fornece, a 15cm das lâmpadas, aproximadamente..

50.000 lux. As medidas aí realizadas com fotômetro Zeiss forneceram os seguintes dados:

A 15cm das lâmpadas - 4.500 ft-c (fluorescentes + incandescentes)

A 1 m das lâmpadas - 2.400 ft-c (fluorescentes) + 175 ft-c (Incandescentes)

A 2 m das lâmpadas - 1.800 ft-c (fluorescentes) + 120 ft-c (incandescentes).

Como as plantas foram mantidas a cerca de 1 metro das lâmpadas, devem ter recebido aproximadamente 2.575 ft-c,, ou $8.912 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ o que, segundo os dados de GAASTRA (1959), para cálculo de energia do fluxo luminoso de lâmpadas artificiais, este fluxo corresponde a $0,127 \text{ cal}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$. na faixa visível (400 a 700nm), com uma relação Fluorescente/Incandescente em torno de 10, em termos de energia.

O fotoperíodo empregado foi 13 horas de luz/11 horas de escuro.

b) Temperatura - A Câmara foi calibrada para um termo período de $27 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ durante o período iluminado e $22 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ para o período escuro.

c) Umidade - A câmara não possui controle de umidade, observando-se entretanto que a mesma variou de 50 - 60% durante o dia e 80 - 90% durante a noite.

Na casa de Vegetação, em uma medida efetuada, a temperatura variou de 26,5°C a 36°C e a umidade de 30 a 48%, durante o dia.

4.2.2 - Incorporação de $^{14}\text{CO}_2$

Para incorporação de $^{14}\text{CO}_2$, método utilizado para avaliar a eficiência fotossintética, foi empregado o método de SHIMSHI (1969), com as modificações propostas por SONDHAL (1974) (SONDHAL *et al.*, 1976) com pequenas modificações. Assim, a atividade total foi diminuída para 25 $\mu\text{Ci/atm}$, dando uma atividade específica de 4,165 mCi/mM de carbonato, e o fluxo foi aumentado para 81,12 ml/min (67,60 ml/min), numa faixa de operação do esfigmomanômetro de 160 para 88 mm Hg, sendo esta testada, como descrito em Resultados e Discussão.

O diâmetro do disco da folha retirado foi aumentado porque o peso específico da folha do feijoeiro é baixo e para melhor assegurar a retirada do local de incorporação. O mesmo foi marcado com uma tira de adesivo com espessura de aproximadamente 1 mm, colocada na parte inferior da folha porque ali se encontra a parte de borracha que molda as saliências da superfície da folha. Posteriormente mudou-se a marcação para a posição de uma pasta de óxido de Zn e glicerol, conforme recomendam NAYLOR e TEARE (1975), na página superior da folha. Esta modificação na marcação do local de incorporação foi feita porque foi verificado que o giz utilizado por SONDHAL (1974) torna opaca a mini-câmara de incorporação após algum uso.

A digestão dos discos foi realizada por via seca utilizando o BMO (BIOLOGICAL MATERIAL OXIDIZER) da Beckman, sendo o $^{14}\text{CO}_2$ recebido em solução de tolueno/triton X-100, com 0,4% de PPO e 0,01% de POPOP, contendo 2 ml de NaOH 0,33 M. A detecção da radioatividade foi feita através do Beckman Scintillation System, e o cálculo de CO_2 incorporado foi feito através da fórmula proposta por SHIMSHI (1969).

$$\text{CO}_2 \text{ fixado (mg/dm}^2\text{-h.)} = \frac{44 \cdot 180 \cdot K \cdot \text{dpm}}{0,3848 \times 10^{-2} \cdot S}$$

Em que K é o fator de correção para a discriminação isotópica, calculado no presente caso ser 1,193 (para 4,17 / mCi/mM). O valor 44 corresponde a mg/mM de CO_2 ; 180: a fração de hora correspondente ao tempo de incorporação; dpm: o valor das contagens corrigido para a eficiência de contagem e de oxidação no BMO; S: o valor em dpm da atividade específica utilizada ($9,174 \times 10^9$ dpm, no presente caso).

Durante o período de incorporação foi utilizada seja a luz natural (as plantas eram levadas ao sol 5 minutos antes do início da incorporação) seja à luz da Câmara de Crescimento, ou ainda lâmpada fotográfica ATLAS, cujo feixe luminoso passava por uma camada de 15cm de água para evitar aquecimento do material vegetal. O último sistema produzia resultados mais satisfatórios.

4.2.3. Ensaio enzimático

Para determinação da atividade da RuDP carboxilase (e PEP carboxilase em certos casos), utilizou-se basicamente a metodologia descrita por TREHARNE e COOPER (1969), com algumas modificações,

a) Preparação do extrato

Três (3) gramas de folhas idênticas às utilizadas nos experimentos de incorporação de $^{14}\text{CO}_2$, recém-colhidas, foram homogeneizadas a alta rotação por 45 segundos em homogeneizador SORVALL com 10ml de solução contendo tampão HEPES ou TRIS (Sigma especial pH 7 a 9) (50mM), ajustado ao pH 7,8 ; MgCl_2 (40 mM); EDTA (1 mM) e DTE ou DTT (5 mM) (ou 2-mercaptoetanol, 10mM), mantendo-se o copo do homogeneizador em banho de gelo. O homogenado foi filtrado através de duas camadas de nylon e centrifugado a 20 000 Xg por 10 minutos à temperatura de 0 a 2°C. O sobrenadante foi conservado em banho de gelo e usado dentro de 30 minutos, exceto quando especificado.

Para determinação de proteína solúvel no extrato foram tomadas alíquotas de 0,2 ml, utilizando-se o método de LOWRY *et alii* (1951). Como tampão usado interfere no método (EDREVA e CHOLAKOVA, 1975), utilizou-se o método de BARNETT e NAYLOR (1966) para separar a proteína solúvel dos interferentes. O teor de clorofila do homogenado foi determinado pelo método de ARNON (1949), usando-se 0,5ml deste (em duplicata),

antes da centrifugação e adicionando-se 10ml de acetona a 80%.

O número de repetições do extrato variou de acordo com o experimento, sendo normalmente de duas.

b) Ensaio de atividade da RuDP carboxilase

A atividade da RuDP carboxilase (E.C. 4.1.1.39) foi determinada utilizando-se a seguinte mistura de reação:

400 μ l de solução idêntica à de preparação do extrato bruto

100 μ l de solução de R-5-P (25mM), ATP (100mM) e HEPES (25mM) também ajustada ao pH 7,8 (também utilizou-se RuDP 3 mM quando especificado)

100 μ l da solução de $H^{14}CO_3$ (40mM), com uma atividade específica de 0,5 mCi/mM .

100 μ l do extrato bruto de folhas, contendo aproximadamente 0,25 a 0,40 mg de proteína solúvel.

Portanto, a mistura de reação continha: 27,5 μ moles de HEPES ou TRIS (conc. final 39 mM); 20 μ moles de $MgCl_2$ (conc. final 28,6 mM); 2,5 μ moles de DTE (conc. final 3,57mM) 0,5 μ moles de EDTA (conc. final de 0,7 mM); 2,5 μ moles de R-5-P (conc. final 3,57 mM); 10 μ moles de ATP (conc. final 14,28 mM) e 4,0 μ moles de $H^{14}CO_3$ (conc. final 5,71 mM) com 2,0 μ Ci .

Para cada extrato foram conduzidas três repetições, deixando-se equilibrar à temperatura de 25°C por 2 minu-

tos com o tampão e HCO_3 antes da adição do substrato (R-5-P + ATP). Após 5 minutos de reação, adicionou-se 0,2 ml de ácido acético a 30%, sendo os tubos de ensaio aquecidos a aproximadamente 60°C para eliminar a possível $^{14}\text{CO}_2$ adsorvido, e após o equilíbrio da temperatura adicionou-se 10 ml da solução cintiladora (Tolueno/Triton X-100), fazendo-se as contas da radioatividade em contador de cintilação líquida (Beckman Scintillation System), com uma eficiência média de 90%.

4.2.4 Determinação do teor de clorofila

Dez discos de 1,6 cm de diâmetro, das folhas em que foram feitas as incorporações, foram utilizadas para determinação de clorofila, evitando-se tirar os discos nas áreas das nervuras. Os discos foram pesados 2 a 2^g macerados em gral de porcelana com tampão MES 0,05 M, pH 7,5. Do macerado tomou-se 0,2 ml, adicionando-se 5 ml de acetona a 80%. Os tubos foram mantidos ao escuro por 15 minutos a 4°C , e o seu conteúdo foi centrifugado (3.000 rpm) em centrífuga de mesa, e o sobrenadante foi lido no espectrofotômetro a 645 e 663 nm, conforme ARNON (1949).

4.2.5 Medida da área das folhas

A área das folhas existentes na planta no dia da incorporação foi avaliada através das medições do seu comprimento e largura (SESTAK *et alii*, 1971) NDAWULA-SENYIMBA, 1972).

Este método foi calibrado por comparação com medidas no integrador de área foliar " Portable Area Meter, LI-3000 " da "Lambda Instrument Corporation".

4.2.6 Análise do crescimento

Apenas no último experimento procedeu-se a análise de crescimento das plantas, usando as seguintes fórmulas:

$$T.A.L. = \frac{(P_2 - P_1) (L A_2 - L A_1)}{(A_2 - A_1) (t_2 - t_1)}$$

$$T.C.R. = \frac{(L P_2 - L P_1)}{(t_2 - t_1)}$$

Onde: T. A. L. - Taxa de Assimilação Líquida (Aparente)

T.C.R. - Taxa de Crescimento Relativo

P - Peso da matéria seca da planta

A - Área foliar

L - Logaritmo neperiano

t - tempo (os índices 1 e 2 correspondem a amostragem).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos desenvolvidos foram conduzidos de modo a trazer respostas às perguntas anteriormente formuladas, levando em conta que a metodologia utilizada apresenta uma sêrie de peculiaridades, especialmente a incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ através da microcâmara.

5.1 Observações sobre o cultivo das plantas

Inicialmente foi testada a condução das plantas, em solução nutritiva, em uma câmara de crescimento e em casa de vegetação, tendo a destacar dois tipos de problemas observados. Na câmara de crescimento a umidade durante o día é muito baixa e devido ao sistema de ventilação forçada há uma intensa evaporação, provocando possivelmente uma alta absorção de nutrientes o que levaria a distúrbios que serão posterior - mente mencionados. Na casa de vegetação, o problema observado foi que ao se cultivar o feijoeiro em vasos de 3 litros, no verão, a temperatura da solução nutritiva chega a mais de 40°C , o que pode causar distúrbios da raiz (RADKE e BAUER, 1969).

Entretanto, tal não ocorreu quando as plantas foram cultivadas em bandejas de 40 litros (a temperatura máxima observada foi de 32°C a 33°C).

5.2 Adaptação da metodologia

5.2.1 Incorporação do $^{14}\text{CO}_2$

Segundo os dados levantados na literatura (AUSTIN e LONGDEN, 1967; SHIMSHI, 1969; SONDHAL *et alii*, 1976; SESTAK *et alii*, 1971; NAYLOR E TEARE, 1975), e considerando a natureza dos erros inerentes ao processo, os principais pontos que necessitavam ser testados eram os seguintes:

1. Metodologia da incorporação, incluindo sistema de injeção e enchimento; atividade específica usada; área e volume da mini-câmara; fluxo do gás e tempo de incorporação.

2. Iluminação da folha, antes e durante a incorporação.

3. Metodologia de contagem do $^{14}\text{CO}_2$ incorporado, incluindo a oxidação no "BMO", temperatura de contagem, tempo de estocagem entre a oxidação e a contagem no cintilador.

a) Detecção da atividade de $^{14}\text{CO}_2$ nas folhas

Este foi o primeiro problema abordado em relação a incorporação do $^{14}\text{CO}_2$. Foram utilizadas várias misturas com a solução cintiladora para a formação da solução de fixação (TRAPP), principalmente hiamina, hiamina + NaOH 1N, etanolamina, e diversas concentrações de NaOH. Como os sistemas se

mostraram equivalentes, passou-se a usar 2 ml de NaOH 0,33 N com 10 ml de solução tolueno/triton X-100. Estes dados não constam de tabelas por serem apenas paralelos ao assunto do presente trabalho.

Em relação a contagem da solução, foi observado que há dois problemas importantes: a temperatura da solução cintiladora e o tempo decorrido entre a oxidação e a contagem das soluções. Os dados da tabela 1 mostram que as soluções contendo $^{14}\text{CO}_2$ recuperado das folhas incorporadas não sofreram alterações significativas após a oxidação. No entanto, as soluções com lisina- ^{14}C e $^{14}\text{CO}_2$ recuperado da mistura manitol + lisina ^{14}C decaíram de modo acentuado, especialmente na primeira hora. Em um outro experimento, logo após a oxidação do material as soluções foram conservadas em geladeira e à temperatura ambiente (aproximadamente 28°C), verificando-se que a solução com $^{14}\text{CO}_2$ recolhida da oxidação não sofria alteração, enquanto a solução de referência quase estabilizava após uma (1) hora.

Tabela 1 - Efeito do tempo de estocagem sobre a taxa de contagem da solução de fixação. (TRAPP).

Material Contado	Tempo de Estocagem - (horas).				
	0	1	3	9	20
	% da Contagem Inicial				
Lisina - ^{14}C + NaOH + Na_2CO_3 (sem oxidação)	100	85,5	80,0	76,5	76,6
Lisina - ^{14}C (oxidação com <u>ma</u> nitrol)	100	62,5	47,0	42,5	38,8
Discos de folhas incorporados	100	98,7	99,5	98,6	99,5

Diante destas evidências, na falta de outro método padrão para calibração, e mesmo ausência de informações no manual do aparelho de oxidação (BMO) ou na bibliografia específica resolveu-se adotar o critério de deixar todas as soluções durante 1 hora à temperatura de 25°C antes da contagem de sua atividade.

b.2 Fluxo de gás na mini-câmara

De acordo com NAYLOR e TEARE (1975), o fluxo do gás que passa na superfície da folha é crítico, podendo haver variações acentuadas na taxa de incorporação determinada quando se empregam fluxos diferentes, sendo que diferentes espécies respondem de modo diverso. Para verificar a melhor faixa de operação do sistema empregado, fez-se a incorporação do $^{14}\text{CO}_2$ utilizando as pressões de descarga apresentadas na Tabela 2, que correspondem aos fluxos aí discriminados.

Tabela 2 - Efeito da pressão de descarga de $^{14}\text{CO}_2$ sobre a taxa de incorporação (Folhas recém-amadurecidas).

Faixa de Descarga mm de Hg	Fluxo de Gás ml/min.	$^{14}\text{CO}_2$ incorporado mg/dm ² .hr
120 - 60	67,60	6,70 ± 0,95 ^c
140 - 74	74,36	8,51 ± 2,11 ^{b,c}
160 - 88	81,12	13,48 ± 0,90 ^a
180 - 104	85,63	10,56 ± 1,24 ^b
200 - 120	90,13	11,23 ± 1,23 ^{a,b}
F		14,38 **
d.m.s. (Tuckey 5%)		2,87
C.V. (%)		15,02

A taxa de incorporação aumentou com a elevação do fluxo até um ponto ótimo e depois decresceu. Possivelmente a resistência da camada adjacente é responsável pelo aumento inicial, e o aumento da evaporação no espaço intercelular pelo decréscimo posterior (NAYLOR e TEARE, 1975). Os fluxos empregados estão em uma faixa muito estreita porque a dimensão da mini-câmara não permitiria maior variação. Verifica-se que a faixa de pressão de descarga que deu maiores incorporações e menor variação foi a de 160 a 88 mm de Hg, a qual foi escolhida para utilização durante o trabalho.

b.3 Iluminação da folha

A iluminação da folha foi um dos problemas mais sérios encontrados durante o trabalho. Inicialmente partiu-se da premissa de que qualquer sistema de iluminação para ser considerado adequado deveria dar incorporações de $^{14}\text{CO}_2$ semelhantes à encontrada quando a fonte de luz é o sol. Em alguns dos experimentos apresentados, a incorporação foi realizada na câmara de crescimento sem nenhuma outra fonte artificial, podendo-se notar nas Tabelas 13 e 14, que a taxa de incorporação é sempre menor que a metade da observada ao sol. Assim esses dados poderiam ser considerados, do ponto de vista da diferença inter-varietal, como sendo devidos à luz limitante, o que revela apenas aspectos parciais desta diferença, sendo aconselhável o exame à luz saturante (HESKETH e MOSS, 1963 ; ZELITCH, 1971).

Devido a dificuldades operacionais e problemas de ordem técnica, não era conveniente cultivar as plantas na câmara de crescimento e realizar as incorporações ao sol. Assim, procurou-se adaptar o sistema de iluminação para que as incorporações fossem feitas dentro da própria câmara,

Após algum tempo, conseguiu-se o sistema que aparentemente é satisfatório, utilizando uma lâmpada fotográfica Atlas de 375 Watts, fazendo passar o efeito luminoso através de um tubo de PVC de 10 cm de diâmetro e 15cm de comprimento, cheio d'água, e cujas extremidades foram fechadas com duas placas de vidro coladas ao tubo. Na frente foi colocada uma lente para colimar o feixe. E como a lâmpada tem uma vida útil limitada, foi acoplado um reostato para ligar a lâmpada vagarosamente, além de controlar a taxa de iluminação. Este sistema encontra-se esquematizado na Figura 1,

FIGURA 1- DIAGRAMA DO SISTEMA DE ILUMINAÇÃO ADAPTADO

A taxa de iluminação da fonte artificial usada é dada na tabela 3, em função da distância e da voltagem empregada. Deve-se observar que a variação da tensão elétrica no reostato possivelmente desloca o espectro para o vermelho.

Tabela 3 - Taxa de iluminação da fonte artificial usada, em função da distância e da voltagem empregada.

Distância da Fonte (cm)	Distância da Lente (cm)	Iluminação (lux) δ	Tensão (no reostato) (volts)	Iluminação (lux) $\delta\delta$
45	10	80.000	110	80.000
50	15	70.000	100	72.000
60	25	60.000	90	60.000
70	35	42.000	80	46.000
80	45	30.000	70	30.000
90	55	20.000	60	18.000
100	65	15.000	50	10.000
110	75	11.000		

δ - Com tensão de 110 Volts

$\delta\delta$ - Distância de 10cm da lente ou 45 cm da fonte

Para testar o presente sistema foi realizada uma incorporação na câmara de crescimento usando a fonte artificial sendo que logo após, as mesmas plantas foram levadas ao sol e cinco minutos depois incorporadas. Ao término, as plantas

retornaram à câmara, sendo imediatamente reutilizadas. Os dados constam da Tabela 4.

Tabela 4 - Efeito da luz solar sobre a taxa de incorporação do $^{14}\text{CO}_2$ em folhas de feijoeiro var. Carioca.

Tratamento	$^{14}\text{CO}_2$ incorporado (mg/dm ² .hr)					Média
	pl.1	pl.2	pl.3	pl.4	pl.5	
Câmara + iluminação Artificial	14,3	14,8	17,2	16,6	17,3	16,1 ± 1,2
S o l	20,2	20,3	25,0	23,7	23,7	22,4 ± 1,9
Câmara + iluminação Artificial (2a. de-terminação)	23,3	24,3	25,2	20,7	16,6	22,0 ± 3,1

Pode-se notar por estes dados que a fonte utilizada se aproxima, em termos gerais, da iluminação natural. Contudo, a qualidade da luz é um pouco inferior à do sol porque ao serem conduzidas a este ambiente houve um aumento na taxa de incorporação, sendo que esta diferença persistiu quando trazidas de volta à câmara. Além disso, embora possa ser circunstancial, as plantas ao serem levadas ao sol tiveram suas taxas de incorporação aumentadas da primeira para a segunda, havendo o inverso no retorno. Como a iluminação inicial é quase concomitante com a injeção de $^{14}\text{CO}_2$, possivelmente pode-se atribuir as variações observadas ao aumento da quantidade de ATP e NADPH₂ formados antes e durante a incorporação,

além de possível ativação de certas enzimas do ciclo de Calvin, ou redução da resistência do mesófilo (ANDERSON e AVRON 1976; AVRON e GIBBS, 1974; BOWES *et alii*, 1972; TREHARNE, 1972; ZELITCH, 1971; BEARDSSELL *et alii*, 1973).

Diante do exposto, os experimentos realizados posteriormente para constatar diferenças entre variedades foram classificados em dois tipos: diferenças à luz limitante; quando realizados na câmara sem iluminação adicional; e diferenças à luz saturante, com iluminação adicional ou ao sol.

Quanto ao problema apresentado na Revisão de Literatura, sobre a representação da fotossíntese líquida ou bruta em relação a fixação do $^{14}\text{CO}_2$, pode-se analisar alguns aspectos importantes:

1. Obviamente deverá ocorrer um lapso de tempo até que o $^{14}\text{CO}_2$ injetado atinja o cloroplasto. Para uma resistência total de 10 sec/cm o gás percorrerá 0,1 cm em um segundo, e portanto, pode-se assegurar que o tempo decorrido até que o $^{14}\text{CO}_2$ seja processado é menor que um segundo.

2. O $^{12}\text{CO}_2$ liberado na fotorespiração e que é reciclado dentro da célula ou tecido, é sempre um fator de sub-estimação da fotossíntese bruta e fotorespiração (GOLDSWORTHY, 1970; SESTAK *et alii*, 1971).

3. Ao se injetar $^{14}\text{CO}_2$ por 20 segundos não implica, no caso presente, que somente durante este espaço de tempo haverá fotossíntese, desde que há uma demora de pelo menos 20

segundos até que o disco de folha seja mergulhado no N_2 líquido para imobilização. Há ainda a considerar que além do $^{14}CO_2$ fixado em produtos orgânicos, ainda existe cumulativamente o que fica nos espaços intra e intercelulares. Isto é, embora os autores apontem o tempo de 45 segundos para que o C sintetizado ser fotorespirado, outras características do próprio método devem ser consideradas.

4. Também deve-se lembrar que o fluxo do gás ($^{14}CO_2$) empregado, leva a uma pressão maior que a atmosférica dentro da mini-câmara, mesmo levando em conta que a descarga de resíduo se dá próximo desta, indo a um recipiente com pressão atmosférica. Isto é, o gradiente de pressão é transitório, mas suficiente para forçar o gás através dos estômatos e mesófilo, o que provocará uma troca forçada de $^{12}CO_2$ por $^{14}CO_2$, podendo inclusive haver difusão deste através das células do parênquima clorofiliano (PENNY e NELSON, 1970).

Todos estes aspectos considerados levam a admitir que a medida da incorporação de $^{14}CO_2$ através da aparelhagem utilizada se aproxima mais da fotossíntese bruta que da fotossíntese líquida, embora, como afirmam alguns autores, este método precisa ser "calibrado" contra outros mais exatos, como o emprego do IRGA, por exemplo, (SESTAK *et alii*, 1971).

5.2.2 Ensaio enzimático

É do consenso geral dos pesquisadores que trabalham com a RuDP carboxilase, que este tipo de ensaio é muito delicado, especialmente na manutenção da temperatura durante a preparação de extrato e sua estocagem, manutenção de ambiente redutor para proteção dos grupos -SH da enzima, proteção contra outros agentes como fenóis, por exemplo, que inibem a atividade de carboxilação (KAWASHIMA e WILDMAN, 1970).

Para o tempo de incubação do extrato (Tabela 5), a análise estatística não mostrou diferenças significativas dentro dos tratamentos, embora o valor de S se aproxime do limite significativo a 5% (4,00 contra 4,07), por isto, pode-se dizer que em nível mais elevado há probabilidade de se detectar diferenças. Além disso, o que se verifica é que para reação sem incubação, o desvio da média foi muito elevado, o que demonstra alta variabilidade. Desde que a maioria dos autores aconselha um período de incubação com HCO_3^- e Mg^{++} para indução da plena atividade da enzima (KAWASHIMA e WILDMAN, 1970; BAHR e JENSEN, 1974-a; WALKER, 1973-a), passou-se a adotar um período de 2 minutos de incubação do extrato bruto de folha, a 25°C com $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$, Mg^{++} e tampão, antes de se iniciar a reação com a adição de R-5-P e a ATP.

Em relação ao tempo de reação nota-se na Tabela 5 que a maior taxa de fixação por mg de clorofila-hora foi a de 4 minutos, seguindo-se 7, 10, 1 e 20 minutos respectiva-

mente, A curva construída com os dados desta Tabela (Figura 2) mostra que há um período de indução de cerca de 1 minuto, sendo que a partir daí a taxa de reação é linear, havendo uma diminuição da velocidade (ds/dt) a partir dos 10 minutos. Deve-se salientar que esta queda não se deve à diminuição na quantidade de $H^{14}CO_3^-$ disponível, desde que foram adicionados 4 μ moles no início da reação e após 10 minutos ainda restava cerca de 3,4 μ moles, mas possivelmente à perda da propriedade catafáltica da carboxilase devido à sua instabilidade já bastante comprovada (KAWASHIMA e WILDMAN, 1970; WALKER, 1973-a), em relação à indução, possivelmente se deve ao aumento da solubilidade da enzima pela presença da RuDP (KWOK e WILDMAN 1974).

FIGURA 2- EFEITO DO TEMPO DE REAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE DA RUDPCARBOXILASE EM EXTRATO BRUTO DE FOLHAS DE FEIJOEIRO

Tabela 5 - Efeito do tempo de incubação do extrato de *fungo* sobre a atividade da RLP carbonilase
 em extrato bruto de folha de feijão, var. Carleca (idade: 30 dias após a germinação).

Tempo de incubação (min.)		µmoles de $H^{14}CO_3^-$ fixado			
		por mg Clor.	por mg de Clor. hr.	por mg de Prot.	por mg Prot. hr
0	10	16,99 ± 2,61	101,91 ± 15,87	1,21 ± 0,19	7,27 ± 1,12
2	10	21,60 ± 1,15	129,58 ± 6,92	1,54 ± 0,09	9,23 ± 0,49
4	10	17,53 ± 0,47	105,19 ± 2,81	1,25 ± 0,03	7,50 ± 0,20
10	10	18,80 ± 0,30	112,82 ± 1,78	1,34 ± 0,20	8,04 ± 0,13
2	0 ^s	0,30 ± 0,03	0,002 ± 0,0002		
2	1	1,62 ± 0,80	97,38 ± 4,73 (c,d)	0,12 ± 0,08	6,96 ± 0,50
2	4	10,81 ± 0,63	162,12 ± 9,48 (a)	0,77 ± 0,06	11,55 ± 0,82
2	7	15,56 ± 1,36	133,35 ± 11,64 (a,b)	1,11 ± 0,08	9,51 ± 0,68
2	10	21,60 ± 1,15	129,58 ± 6,92 (b,)	1,54 ± 0,68	9,23 ± 0,66
2	20	25,24 ± 3,67	75,72 ± 11,02 (d,)	1,80 ± 0,13	5,40 ± 0,39

F	(tempo de incubação) (tempo de reação)	4,00 48,75**
d.m.s. (Tukey 5%)	- (tempo de incubação) (tempo de reação)	n.s. 29,60
C.V. (%)	- (tempo de incubação) (tempo de reação)	9,5 7,0

^s - Considerando a fração de tempo necessário para a injeção do ácido acético.

Os dados foram calculados em termos de proteína solúvel porque a quantidade de clorofila por unidade de área foliar é variável de acordo com a intensidade luminosa durante o crescimento, sendo o teor de proteína mais constante (exceto em casos de deficiência de nitrogênio), (SONDHAL, 1974 ; BLENKINSOP e DALE, 1974).

O efeito da quantidade de extrato (por consequente da quantidade de enzima), sobre a atividade da carboxilase foi testado fazendo-se variar a quantidade de proteína solúvel de 67 a 591 $\mu\text{g/ml}$ de solução final de ensaio (Tabela 6). Verifica-se que até 70 μl de extrato bruto os dados são semelhantes diminuindo um pouco com 100 μl . Este é um fato que ocorre normalmente, pois quando há aumento da quantidade do catalizador em qualquer reação há uma diminuição do " Turnover " devido ao aumento da relação enzima/substrato. Por facilidade de medida passou-se a utilizar 100 μl do extrato bruto na solução de ensaio.

Tabela 6 - Efeito da concentração do extrato bruto sobre a atividade da RuDP carboxilase em folhas recém-amadurecidas de feijoeiro var. Carioca

Quantidade de Extrato	§ Proteína $\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{moles HCO}_3^-$ fixado	
		por mg clor.hr	por mg prot.hr
10 μl	67	139,39 $\pm$ 15,50	9,93 $\pm$ 1,10
40 μl	257	134,89 $\pm$ 21,37	9,63 $\pm$ 1,52
70 μl	431	128,65 $\pm$ 16,83	9,17 $\pm$ 1,20
100 μl	591	116,47 $\pm$ 7,03	8,30 $\pm$ 0,50

§ - Para: 500 μl de tampão; 100 μl de solução de R-5-P + ATP; 50 μl de solução de HCO_3^- (marcado com ^{14}C), conforme Material e Métodos

Para ter uma idéia da adequabilidade da metodologia usada, em confronto com a literatura existente, foram realizadas duas determinações de K_m (HCO_3^-), sendo a primeira com plantas apenas da variedade Carioca e a segunda com plantas de Rosinha Precose e Carioca. Os resultados encontram-se nas Tabelas 7 e 8 e na Figura 3 construída com os dados da Tabela 8, e na Figura 4 para os dados da dupla recíproca (Lineweaver e Burk).

Tabela 7 - Efeito da concentração de HCO_3^- sobre a atividade da RuDP carboxilase em extrato bruto de folhas de feijoeiro var. Carioca (Idade: 33 dias após a germ.)

$\left[\text{HCO}_3^- \right]$ mM	Atividade da RuDP carboxilase ($\mu\text{moles HCO}_3^-$ fixado)	
	por mg clor.hr	por mg prot.hr
0,563	$30,45 \pm 3,05$	$2,34 \pm 0,23$
2,162	$58,74 \pm 8,48$	$4,51 \pm 0,65$
3,640	$95,25 \pm 11,4$	$7,32 \pm 0,87$
5,000	$118,02 \pm 11,2$	$9,07 \pm 0,86$

Os K_m (HCO_3^-) observados, em ambos os casos, para variedade Carioca se aproximam bastante (1,47 e 1,78 mM), embora as velocidades encontradas para a mesma concentração de HCO_3^- sejam algo diferente. Estes dados correspondem mais ou menos ao que BAHR e JENSEN (1974-a) chamaram de forma intermediária da carboxilase, obtida da forma de baixo K_m por incubação com tampão e Mg^{++} à temperatura de 0°C , o que tam -

bem se constituiu o principal método de ensaio para carboxilase no presente trabalho, $0 \text{ Km}(\text{HCO}_3^-)$ para o extrato de Rosinha Precose foi 46 mM , o que está enquadrado entre as preparações de baixa afinidade. Considerando-se que não foi utilizada a gaseificação com N_2 para eliminar o O_2 e CO_2 existentes na solução pode-se considerar bons estes resultados, uma vez que o O_2 existente inibe a carboxilase e estimula a oxigenase, as quais apresentam efeitos antagônicos (ANDREWS *et alii*, 1973); BOWES e OGREN, 1972; BAHR e JENSEN, 1974-b). Por sua vez o CO_2 presente na solução compete com o adicionado, provocando um efeito de diluição isotópica.

FIGURA 3-EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE HCO_3^- SOBRE A ATIVIDADE DA RUDP CARBOXILASE EM FOLHAS DE DUAS VARIEDADES DE FEIJOEIRO

O K_m (CO_2) está em torno de 35 a 40 M, o que deve, segundo WALKER (1973-a) estar em equilíbrio com 0,12% de CO_2 atmosférico, ou seja, quatro vezes a concentração atmosférica normal.

Tabela 8 - Efeito da concentração do HCO_3^- sobre a atividade da RuDP carboxilase em extrato bruto de folhas de duas variedades de feijoeiro (idade: 27 dias).

Variedade	HCO_3^- mM	μ moles de HCO_3^- fixado	
		por mg Clór./hr	por mg prot./hr
Carioca	0,160	11,54	0,730
	0,308	14,92	0,894
	0,571	26,51	1,747
	1,600	68,33	4,503
	3,077	137,23	9,044
	5,714	167,88	11,064
Rosinha Precoce	0,160	5,12	0,144
	0,308	11,12	0,900
	0,571	16,86	1,365
	1,600	53,13	4,302
	3,077	90,42	7,321
	5,714	134,28	10,872

Comparando-se as curvas correspondentes as variedades, pode-se verificar importantes diferenças. Em primeiro lugar, para a mesma concentração de HCO_3^- , a quantidade fixada foi sempre menor para o sistema de Rosinha Precoce que

para o de Cariooca, Essas diferenças acentuavam-se com menores concentrações de substrato, e sendo menos evidentes quando a atividade foi expressa por unidade de proteína solúvel. A inclinação das retas no gráfico das duplas recíprocas sugere que as carboxilases são idênticas nas duas variedades. Contudo, o sistema obtido de Rosinha Precoce deve ter maior concentração de inibidores.

FIGURA 4- GRÁFICO DAS DUPLAS RECÍPROCAS DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE HCO_3^- SOBRE A ATIVIDADE DE RUBISCO CARBOXILASE EM FOLHAS DE DUAS VARIEDADES DE FEJOEIRO

No dados obtidos para o extrato de folhas da variedade Carioca (Figura 4) observam-se distintamente dois mecanismos que agem de acordo com a concentração de HCO_3^- (CO_2) no meio. BAHR e JENSEN (1974-a) relatam três formas de carboxilase com diferentes K_m , e segundo ANDREWS *et alii*, (1975) as formas de alto K_m são produtos da ação de inibidores. As curvas mostradas por estes autores para a velocidade da reação em resposta à concentração de CO_2 se aproximam das aqui obtidas.

Tomando-se somente a parte da curva correspondente às maiores concentrações de HCO_3^- , obteve-se graficamente velocidades máximas de aproximadamente 330 $\mu\text{moles de HCO}_3^-/\text{mg de Clor.}\cdot\text{hr}$ para os extrato de Carioca e 235 $\mu\text{moles de HCO}_3^-/\text{mg Clor.}\cdot\text{hr}$ para o de Rosinha Precoce. Os K_m correspondentes seriam respectivamente 6,1 mM. e 7,3 mM. A possível segunda forma da carboxilase no extrato de folhas de Carioca teria V_{max} aproximadamente 23,5 $\mu\text{moles HCO}_3^-/\text{mg de clorofila}\cdot\text{hora}$, e o K_m (HCO_3^-) seria 0,165 mM, valor este inferior ao encontrado para a carboxilase de baixo K_m por BAHR e JENSEN, (1974-a).

Com a finalidade de eliminar interferentes de baixo peso molecular foi testada a "clarificação" do extrato, após a centrifugação, numa coluna contendo Sephadex G-50, como recomendam ANDREWS e HATCH (1971). Os resultados constam da Tabela 5, podendo-se observar que houve uma diminuição da atividade enzimática para a mesma concentração de HCO_3^- na solução de ensaio.

Tabela 9 - Efeito da "clarificação" do extrato em Sephadex G-50 sobre a atividade da RuDP carboxilase em folhas recém-amadurecidas de duas variedades de feijoeiro.

Variedade	[HCO ₃ ⁻] mM	Atividade enzimática (μmoles/mg prot..hora)
Carioca	0,308	0,610
	0,571	1,180
	3,077	5,108
	5,714	7,988
Rosinha Precoce	0,308	0,436
	0,571	0,728
	1,600	1,851
	5,714	7,506

Para verificar o efeito do tempo de incubação a 6°C com tampão; DTT e Mg⁺⁺, sobre a atividade da carboxilase, ensaiou-se o extrato aos 15 minutos, 3 horas e 5 horas após a centrifugação. Os dados constam da Tabela 10, onde se pode notar que os extratos obtidos de folhas da variedade Rosinha Precoce, além de apresentar atividade enzimática bem menor no primeiro ensaio, a diminuição da taxa de fixação com a incubação foi bem mais acentuada. Observe-se que ao expressar-se os dados da atividade da carboxilase em relação ao teor de proteína do extrato, os dados são mais consistentes, em todos os ensaios, que por unidade de teor de clorofila, demonstrando uma variação na relação clorofila/proteína nestas variedades.

Embora não tenha sido avaliada, a quantidade ou a taxa de oxidação de fenóis deve ser mais acentuada nas folhas de Rosinha Precoce que de Carlota tendo em vista que há um maior escurecimento do seu extrato no mesmo espaço de tempo, sendo que os produtos de oxidação dessas substâncias são conhecidos inibidores da atividade da carboxilase, pelo menos "in vitro" (KAWASHIMA e WILDMAN, 1970).

Tabela 10 - Efeito do tempo de incubação a 0°C sobre a atividade da RuDP carboxilase em extrato bruto de folhas de duas variedades de feijoeiro.

Variedade	Tempo de Incubação	Atividade da Carboxilase	
		$\mu\text{moles/mg clor.}\cdot\text{hr}$	$\mu\text{moles/mg Prot.}\cdot\text{hr}$
Carlota	15 min.	118,02 $\pm$ 11,20	9,07 $\pm$ 0,86
	3 horas	48,23 $\pm$ 2,67	3,70 $\pm$ 0,20
Rosinha Precoce	15 min.	67,75 $\pm$ 2,95	6,85 $\pm$ 0,30
	3 horas	17,75 $\pm$ 0,52	1,79 $\pm$ 0,05
	5 horas	5,28 $\pm$ 0,33	0,53 $\pm$ 0,03

A presença do oxigênio na solução de ensaio também influi na estabilidade da enzima, pois esta exige ambiente redutor para manter a integridade dos centros catalíticos (WALKER, 1973-b; ZELITCH, 1975-b; ANDREWS *et alii*, 1975).

5.2.3. Avaliação da área foliar

Desde que não se dispunha de um método direto de medida da superfície foliar (como um integrador por exemplo), procurou-se calibrar o método da medida do comprimento e largura da folha. Este é um método rápido e se tem mostrado suficientemente preciso para a estimativa da área foliar para trabalhos de análise de crescimento. SESTAK *et alii* (1971) fazem uma análise completa sobre o assunto, dizendo que, embora o mais usado seja a relação $y = b \cdot LC$, o mais preciso é fazer-se uma regressão linear $y = a \cdot X + b$, onde a variável independente X é o produto comprimento x largura (LC).

Em amendoim, VIVEKANANDAN *et alii* (1972) encontraram correlação linear entre as medidas efetuadas pelo método de medida do comprimento e largura com o método planimétrico. Também NDAWULA-SENYIMBA (1972) encontrou boa correlação deste método com outros considerados mais comuns, verificando correlação altamente significativa, especialmente na fase de maior estabilidade morfológica da folha.

Para calibração das medidas, foram tomadas 23 folhas de feijoeiro da variedade Carioca e 22 de Rosinha Precoce. Os folíolos terminais foram medidos em seu comprimento e largura máximos e logo após a sua área total foi medida através do integrador LI-3000 (Lambda Instrument Corporation). Realizada a análise através da regressão linear, obteve-se:

a) Para variedade Carioca

$$Y_{\text{integrador}} = 1,697 \cdot X - 10,597 \quad r = 0,98^{**}$$

b) Para variedade Rosinha Precoce

$$Y_{\text{integrador}} = 1,735 \cdot X - 6,555 \quad r = 0,99^{**}$$

Sendo:

Y = a área foliar medida

X = o produto Comprimento $\times$ largura

Como os valores da inclinação da reta e da interceptação do eixo da ordenada não são tão diferentes entre variedades, resolvemos incluir as 45 folhas em uma só análise, obtendo a equação:

$$Y_{\text{área}} = 1,694 \cdot X - 8,825 \quad r = 0,99^{**}$$

Os dados correspondentes acham-se plotados na Figura 5, onde se verifica que realmente a dispersão dos dados em torno da reta é muito pequena. Apenas quando o produto comprimento $\times$ largura é menor que $0,25 \text{ dm}^2$ há uma tendência para o desvio no sentido zero.

Também foi testado o método utilizado contra outros mais comuns. Foram recortados os perímetros das folhas em papel sulfite, sendo a área avaliada através do peso do recorte. A relação Área/C.L foi encontrada como 1,557, o que se aproxima dos valor encontrado pelo integrador. O método da relação Peso Médio da folha/Área Foliar bastante utiliza-

do em trabalhos de análise de crescimento, não parece ser adequada porque a variação nesta relação com a idade da folha é acentuada, obtendo-se $3,54 \text{ g/dm}^2$ para as folhas novas, $4,27$ para as recém-amadurecidas e $5,09 \text{ g/dm}^2$ para as folhas velhas.

FIGURA 5- RELAÇÃO ENTRE O PRODUTO COMPRIMENTO X LARGURA DO FOLÍOLO TERMINAL E A ÁREA FOLIAR

5.3 Efeito da hora do dia sobre a incorporação de $^{14}\text{CO}_2$

Desde que existe um ritmo circadiano constatado em diversas plantas, para diversos eventos fisiológicos inclusive a fotossíntese (ZELITCH, 1971), decidiu-se verificar se para o feijoeiro cultivado em condições controladas também havia este fenômeno.

meno em intensidade detectável pelo nosso método. Segundo PALLAS Jr. (1973), além do efeito da diferença de luminosidade durante o dia, existe um ritmo que deve ser controlado internamente, encontrado na maioria das espécies que pesquisou.

As plantas, conduzidas na Câmara de Crescimento foram incorporadas com $^{14}\text{CO}_2$ adaptando-se numa iluminação adicional de 4 lâmpadas incandescentes de 150 watts. Logo após, foram levadas ao sol e depois de 5 minutos sob esta iluminação, foram novamente incorporadas. Os resultados se encontram na Tabela 11 e na Figura 5.

Tabela 11 - Efeito da hora do dia sobre a taxa de incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ em folhas recém-amadurecidas de feijoeiro, ao sol e na Câmara de Crescimento (idade: 18 dias após a germinação).

Hora do dia	Taxa de Incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ (mg/dm ² por hora)	
	<u>Ao Sol</u>	<u>Câmara</u>
7:00		5,42 ± 1,65
8:30	16,86 ± 0,48	6,62 ± 0,37
9:30	19,90 ± 1,53	6,79 ± 0,71
11:00	17,57 ± 1,37	9,13 ± 1,12
13:30	22,88 ± 3,53	9,80 ± 1,08
15:00	20,25 ± 2,18	7,46 ± 1,05

Verifica-se na Tabela apresentada, que a taxa de incorporação ao sol aumentou apenas levemente das 8:30 pa

ra as 9:30, o que pode ser explicado pelo aumento da taxa de iluminação neste período. Na incorporação feita às 11:00 horas houve um pequeno decréscimo, que pode ser atribuído ao fato de as plantas terem sido expostas um pouco mais de tempo ao sol que o previsto, o que deve ter provocado um aumento do "potencial água" da folha, à que o feijoeiro é altamente sensível, pelo menos em relação à taxa fotossintética (CROOKSTON *et alii*, 1974 ; FRASER e BIDWELL, 1974). Disto pode-se concluir que a luz natural as diferenças encontradas no ritmo de incorporação se deve ao grau de saturação luminosa.

FIGURA 6 - EFEITO DA HORA DO DIA SOBRE A TAXA DE INCORPORAÇÃO DE $^{14}\text{CO}_2$ EM FOLHAS DE FEIJOEIRO AO SOL E NA CÂMARA (+ 4 lâmpadas de 150 Watts)

Para as incorporações realizadas na Câmara de Crescimento houve um aumento considerável das 7:00 para as 11:00 horas, sendo que das 7:00 às 8:30 o acréscimo se deve possivelmente à diminuição da resistência estomática que se tem verificado constantemente nestes casos (ZELITCH, 1971; DEVLIN e BARKER, 1971). Contudo, o aumento entre 9:30 às 11:00 horas e o decréscimo à tarde é mais difícil de explicar, podendo-se formular as seguintes hipóteses:

a. Devido à diferença de temperatura diurna/noturna (aproximadamente 5°C), a resistência estomática só diminui vagarosamente, possibilitando ao aumento da taxa fotossintética; o que é pouco viável devido a ausência de gradação na taxa encontrada (IZHAR e WALLACE, 1967; CROOKSTON *et alii*, 1974-a; SAWADA e MIYACHI, 1974-a).

b. Há possibilidade de existir um ritmo endógeno cuja gradação não foi encontrada por erro de medida, e neste caso esta diferença seria muito mais acentuada à luz limitante que saturante e, portanto, relacionada também ao conjunto de resistências da folha, ou, alternativamente, à variação da demanda de assimilados durante o dia (FRASER e BIDWELL, 1974; ZELITCH, 1971; THORNE e KOLLER, 1974; BEARDSELL *et alii* 1973).

c. Uma hipótese menos viável é que as plantas que tenham sido levadas ao sol recebam uma indução. Este fenômeno foi constatado anteriormente, mas para pequeno intervalo de tempo. Também a sequência de medidas não sugere a ocorrência des

te fenômeno, que no entanto, não é de todo descartável.

5.4 Diferenças entre variedades

Foram realizados alguns experimentos com a finalidade de verificar diferenças entre variedades, além de objetivar o estudo do efeito de diversos parâmetros, como idade da folha e da planta sobre a taxa fotossintética individual, e sobre as diferenças entre as variedades pesquisadas. Estes experimentos serão apresentados e discutidos na ordem em que foram realizados (cronologicamente), salientando-se que esta ordem foi ditada pela lógica e pelo aperfeiçoamento da técnica de incorporação de $^{14}\text{CO}_2$.

5.4.1 Experimento 1 - Plantas germinadas em 8 de dezembro de 1975, foram conservadas em Câmara de Crescimento, sendo que a temperatura neste experimento era um pouco inferior à indicada anteriormente ($25^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}$); o crescimento foi mais lento, de forma que o ensaio de incorporação foi realizado aos 22 dias após a germinação (normalmente 16 a 17 dias). As sementes da variedade Carioca não germinaram ou morreram no estágio inicial de crescimento, e as plantas da variedade Goiano Precoce foram atacadas por vírus (Mosaico dourado), apresentando folhas enrugadas. As incorporações do $^{14}\text{CO}_2$ foram feitas ao sol, tendo em vista que ainda não se tinha o sistema de iluminação artificial adequado.

As plantas foram incorporadas em duas idades, 22 e 30 dias após a germinação, enquanto o ensaio da atividade enzimática e a determinação do teor de clorofila foram feitas nesta última idade. Os resultados obtidos constam das Tabelas 12 e 13.

Em relação à taxa de incorporação de CO_2 , foram encontradas diferenças significativas entre as variedades pelo teste de F, embora as diferenças entre as médias não alcançassem o limite da diferença mínima significativa (Tukey 5%), de modo que foi aplicado o teste de Duncan, que é menos preciso que o primeiro (PIMENTEL GOMES, 1973), observando-se diferenças entre as variedades Pintado e Rosinha Precoce ou Goiano Precoce. Isto indica que as diferenças estão no limite da significância, e podem ser devido a problemas como a presença do vírus nas folhas de Goiano Precoce, embora as plantas de Rosinha Precoce se apresentassem sadias.

Tabela 12 - Taxa de incorporação do $^{14}\text{CO}_2$ em folhas recém-amadurecidas de diferentes variedades de feijoeiro.

Variedade	$^{14}\text{CO}_2$ incorporado (mg/dm ² por. hora)
Pintado	22,34 ± 1,92 a'
Piratã	21,91 ± 2,91 a'b'
Rosinha G - 2	20,15 ± 3,55 a'b'
Goiano Precoce	17,75 ± 2,72 b'
Rosinha Precoce	17,51 ± 1,06 b'
F.	3,06
d.m.s. (Tukey 5%)	5,45
(Duncan 5%)	4,19 (5 médias)
	4,10 (4 médias)
C:V. (%)	14,50

Na segunda determinação (Tabela 13) não houve diferenças significativas entre variedades, tanto quando se expressou a incorporação por unidade de área foliar, como por unidade do teor de clorofila, a qual uniformizou ainda mais os dados, porque a única variedade que mostrou taxa de incorporação ligeiramente inferior também tinha menor teor de clorofila. Esta diferença no teor de clorofila é significativa, ao nível de 1% de probabilidade, entre Gioano Precoce e as demais. No entanto, deve-se novamente lembrar que as plantas desta variedade estavam atacadas pelo Mosaico dourado, de forma que não se podia ainda afirmar se esta diferença é inerente à variedade.

Os dados obtidos se aproximam dos apresentados por HESKETH (1967), o qual fez ensaio a 30°C e 0,9 ly/min de iluminação (aproximadamente 50% da constante solar). o que se aproxima das condições usadas, porque mesmo fazendo a incorporação ao sol, a mini-câmara desvia parte da radiação. Outros autores também obtiveram dados semelhantes (IZHAR e WALLAGE, 1967-b; NEALES *et alii*, 1971; CROOKSTON *et alii*, 1975; FRASER e BIDWELL, 1974).

Quanto à atividade enzimática, houve diferenças entre as variedades. Os extratos obtidos de folhas da variedade Pintado mostraram maior atividades de carboxilase que das variedades Piratã-1 e Goiano Precoce, quando se expressou esta atividade por unidade do teor de clorofila, e somente em relação ao Piratã-1 ao expressar-se por unidade de área foliar. Como não foram detectadas diferenças em relação à incor-

Tabela 13 - Taxa de Incorporação de $^{14}\text{CO}_2$, atividade enzimática e teor de clorofila de diferentes variedades de feijoeiro (30 dias após a germinação)

Variedade	$^{14}\text{CO}_2$ Incorporado		Atividade enzimática		Teor Clorofila	
	mg/dm ² . hora	mg/mg clor . hora	$\frac{\mu \text{ moles de HCO}_3^-}{\text{mg clor} \cdot \text{hr}}$	$\frac{\mu \text{ g prot} \cdot \text{hr}}{\text{mg}}$	mg/dm ²	$\frac{c_a}{c_b}$
Pintado	21,95 $\pm$ 2,21	12,19	111,58 $\pm$ 18,9 ^a	61,99	1,80 ^a	1,41 ^{ab}
Piratã - 1	22,21 $\pm$ 3,71	11,69	77,30 $\pm$ 4,59 ^b	40,68 ^b	1,90 ^a	1,45 ^a
Rosinha G - 2	21,53 $\pm$ 1,57	11,21	86,73 $\pm$ 12,0 ^{ab}	45,17 ^{ab}	1,92 ^a	1,38 ^b
Golano Precoce	18,07 $\pm$ 1,27	12,72	75,06 $\pm$ 8,26 ^b	52,86 ^{ab}	1,42 ^b	1,40 ^{ab}
Rosinha Precoce	22,03 $\pm$ 1,95	12,81	95,15 $\pm$ 9,9 ^{ab}	55,32 ^{ab}	1,72 ^a	1,40 ^{ab}
F.	2,31	1,17	4,32 ^{**}	4,24 [*]	11,45 ^{**}	2,85
d.m.s (Tukey 5%)	n.s.	n.s.	33,26	18,95	0,25	0,07
C.V. (%)	12,12	11,61	13,89	13,80	7,69	2,63

poração do $^{14}\text{CO}_2$ (avaliação da taxa fotossintética), não se achou conveniente fazer análise de correlação entre estes dois parâmetros.

5.4.2 Experimento 2 - Neste experimento foi feita uma tentativa de utilização da Câmara de Crescimento, sem iluminação adicional, para verificação das diferenças entre variedades. Isto foi realizado porque, como frizado anteriormente, havia dificuldades para levar as plantas ao sol, além deste tipo de procedimento causar perda de água mais acelerada devido à diferença de ambiente, o que provocaria aumento na resistência à penetração do CO_2 , e por conseguinte, diminuição da atividade fotossintética. Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 14 a 17.

Na Tabela 14 encontram-se os dados referentes à incorporação do $^{14}\text{CO}_2$, como sendo à luz limitante, e relacionados com a área da folha incorporada. Fez-se análise estatística usando apenas duas idades da folha devido à diversidade de idade das folhas incorporadas (os dados estão assinalados). A área da folha após 8 dias do seu aparecimento é aproximadamente constante, indicando que nesta época ela atinge seu máximo de crescimento.

Tabela 14 - Relação entre a idade da folha, sua área e taxa de incorporação do $^{14}\text{CO}_2$ à luz limitante.

Variedade	Idade da Planta (dias)	Idade da Folha (dias)	Área da Folha (dm ²)	$^{14}\text{CO}_2$ incorporado (mg/dm ² .hora)
Carioca	9	3	$0,18 \pm 0,04$	$\$ 2,81 \pm 0,36$ ^{ab}
	13	7	$1,71 \pm 0,10$	$\$ 3,55 \pm 0,26$
	17	11		$3,31 \pm 0,38$
Rosinha Precoce	12	05	$1,32 \pm 0,18$	$\$ 3,42 \pm 0,26$ ^{ab}
	16	9		$\$ 2,94 \pm 0,47$
Rosinha G-2	10	4	$0,37 \pm 0,06$	$\$ 4,44 \pm 0,55$ ^{ab}
	14	8	$1,57 \pm 0,21$	$\$ 3,21 \pm 0,38$
	18	12		$3,87 \pm 0,59$
Goiano Precoce	11	4	$0,46 \pm 0,13$	$\$ 2,86 \pm 0,47$ ^b
	15	8		$\$ 3,13 \pm 0,69$
Venezuela - 42	9	3	$0,18 \pm 0,02$	$\$ 3,92 \pm 0,38$ ^{ab}
	13	07	$0,95 \pm 0,24$	$\$ 3,17 \pm 0,48$
Piratã - 1	9	3	$0,25 \pm 0,04$	$\$ 4,31 \pm 0,38$
	13	7	$1,22 \pm 0,38$	$\$ 3,51 \pm 0,42$
	17	11		$4,32 \pm 0,72$
F.				6,10 ^{**}
d.m.s. (Tukey 5%)				0,91
C.V. (%)				14,14

§ Dados utilizados para a análise estatística

Para a quantidade de $^{14}\text{CO}_2$ incorporado foram detectadas diferenças entre as variedades Piratã-1 e Goiano Precoce, verificando-se que para a maioria das variedades, exceto Carioca e Goiano Precoces, houve um ligeiro decréscimo a partir do 3º dia, ou continuaram estáveis. Deve-se salientar que devido às dimensões da mini-câmara e da distância entre as lâmpadas no banco de iluminação, deve ter havido desuniformidade na intensidade da luz o que teria acarretado desuniformidade na iluminação da folha no local da incorporação, levando a uma variabilidade mais elevada, como no caso de Goiano Precoces em que em uma das medidas o desvio padrão da média foi cerca de 22% desta. As diferenças com a idade podem ser devidas à cronologia do aparecimento de novas folhas, isto é, à ontogênese (FRASER e BIDWELL, 1974), pois tem-se observado que não há relação direta entre a idade da folha no feijoeiro e sua taxa fotossintética (OZBUN *et alii*, 1964).

Para verificar a correspondência entre a fixação na Câmara de Crescimento e à luz natural, foram feitas incorporações em ambos os ambientes, Os resultados se encontram na Tabela 15, onde se verifica que a relação entre a incorporação ao sol e na Câmara é semelhante entre as variedades. Não se verificou mais a diferença entre os cultivares como anteriormente.

Tabela 15 - Taxa de incorporação do $^{14}\text{CO}_2$ em folhas recém-amadurecidas de diferentes variedades de feijoeiro (incorporação ao Sol e na Câmara)

Variedade	$^{14}\text{CO}_2$ incorporado (mg / dm ² .hora)		(b)/(a)
	Na Câmara§	ao Sol§§	
Carioca	3,87 0,77	19,68	5,08
Rosinha G-2	3,92 0,22	18,55	4,73
Rosinha Precoce	4,18 0,76	22,21	5,31
Goiano Precoce	3,88 0,66	20,65	5,32
	(a)	(b)	
F.	0,17	-	
d,m.s.	n.s.	-	
C.V.	18,02	-	

§ - média de 5 plantas

§§ - média de 2 plantas

Os dados da atividade da RuDP carboxilase (25 a 28 dias após a germinação), constam na Tabela 16. Nota-se diferenças acentuadas entre variedades, sendo que estas diferenças a i n d a maiores quando se expressou a atividade por unidade do teor de proteína, mostrando que a relação clorofila/proteína é diferente entre variedades (aproximadamente 10 vezes em Rosinha Precoce e 19 em Goiano Precoce).

A atividade enzimática (por unidade de Clorofila/hora) dos extratos de folhas de Rosinha Precoce foi inferior

à metade da apresentada pelo Golano Precoce. Se levarmos em conta que a incorporação do $^{14}\text{CO}_2$ à luz limitante não é diferente entre estas variedades, pode-se afirmar que nestas condições a quantidade de centros dos processos fotoquímicos (número de unidades fotoquímicas) é o fator limitante da fotossíntese (BENEDICT *et alii*, 1972).

Tabela 16 - Atividade da RuDP carboxilase em extrato bruto de folhas e teor de clorofila de diferentes variedades de feijoeiro (Idade: 25 a 28 dias após a germinação).

Variedade	Atividade da RuDP Carboxilase μmoles de HCO_3	
	/mg Clor.. hora	/mg prot.. hora
Carioca	119,30 ± 10,50 ^b	8,18 ± 0,73 ^{ab}
Rosinha Precoce	71,93 ± 3,42 ^c	7,18 ± 0,34 ^b
Rosinha G-2	136,51 ± 10,79 ^{a,b}	10,41 ± 0,87 ^a
Golano Precoce	157,13 ± 17,77 ^a	8,09 ± 0,91 ^{a,b}
Piratã - 1		9,34 ± 0,60 ^{a,b}
F.	18,98	8,08
d.m.s. (Tukey 5%)	37,81	2,34
C.V. (%)	11,91	9,57

O teor de clorofila variou com as diferentes variedades, como indicado na Tabela 17. Ao expressar-se o seu teor por unidade de área foliar, as folhas de Piratã-1 e Venezuela-42 apresentaram teores semelhantes e significativamente

diferentes das outras variedades empregadas.

A situação foi um tanto diferente quando se expressou a quantidade de clorofila por unidade de área foliar pois neste caso os maiores teores foram das folhas de Golano Precoce, Piratã-1 e Rosinha Precoce. Em ambos os casos os menores teores foram os encontrados para as folhas de Carioca.

Como nos experimentos anteriores, a relação Ca/Cb não difere entre variedades, o que sugere não ter havido diferenciação genética em relação aos centros fotoquímicos (ZELITCH, 1971).

Na época do experimento verificou-se visualmente serem as folhas de Piratã-1 e Venezuela-42 de um verde mais intenso que as demais.

Tabela 17 - Teor do Clorofila e Relação entre Clorofila a e b em diferentes variedades de feijoeiro (Idade : 13 dias após a germinação).

Variedade	Teor de Clorofila		Relação Ca / Cb
	mg/dm ²	mg/g.P.E.	
Carioca	2,10 ± 0,12 ^b	1,08 ± 0,10 ^c	1,48 ± 0,06
Rosinha Precoce	2,12 ± 0,17 ^b	1,33 ± 0,13 ^{a,b}	1,50 ± 0,15
Rosinha - G-2	2,20 ± 0,16 ^b	1,16 ± 0,21 ^{b,c}	1,54 ± 0,06
Golano Precoce	2,24 ± 0,10 ^b	1,41 ± 0,80 ^a	1,56 ± 0,07
Venezuela-42	2,59 ± 0,06 ^a	1,27 ± 0,09 ^b	1,56 ± 0,06
Piratã - 1	2,61 ± 0,17 ^a	1,32 ± 0,12 ^{ab}	1,57 ± 0,07
F.	3,76*	6,71**	0,76 n.s.
d.m.s. (Tukey 5%)	0,314	0,314	n.s.
C.V. (%)	7,6	6,0	6,2

Obs: A interação Variedade X Tipo de clorofila não foi significativa.

Experimento 3 - Este experimento se constituiu no teste final da metodologia e na constatação das diferenças entre as variedades empregadas. O plantio foi feito no dia 28 de abril de 1976, conservando-se as bandejas na Câmara de Crescimento. O transplante foi realizado seis dias depois quando já aparecia a 1ª-folha trifoliolada. Os ensaios foram realizados quando estas folhas atingiram sua área máxima, o que se deu cerca de 8 dias após o transplante. Os resultados obtidos acham-se na Tabela 18.

A taxa de incorporação do $^{14}\text{CO}_2$ decresceu na seguinte ordem: Piratã-1, Rosinha G-2, Pintadinho Precoce, Pintado, Carioca e Rosinha Precoce. Quando se expressou a incorporação do $^{14}\text{CO}_2$ por mg de clorofila na folha as diferenças encontradas foram somente entre as variedades Piratã-1 e Pintadinho Precoce e a Rosinha Precoce. Os níveis alcançados são compatíveis com as incorporações à luz saturante (IZHAR e WALLACE, 1967-b). A variação da taxa de incorporação entre plantas da mesma variedade foi elevada, o que também se observa para outros parâmetros, especialmente a área foliar.

Em relação a atividade enzimática não se encontraram diferenças significativas entre variedades, havendo ainda maior uniformização quando a atividade foi expressa por mg de proteína solúvel por hora. Os níveis encontrados correspondem a uma variação de 3,77 a 4,44 mg de CO_2 /mg de clorofila.hora o que equivale a aproximadamente metade da taxa de incorporação determinada. Este fato, aliado à não correspondência das diferenças entre variedades nos leva a crer que o mecanismo des -

Tabela 18 - Incorporação de $^{14}\text{CO}_2$, Atividade enzimática, Área foliar e Teor de clorofila de folhas recém-madurecidas de diferentes variedades de feijoeiro (idade: 14 dias após a germinação).

Variedade	$^{14}\text{CO}_2$ incorporado		Atividade enzimática		Área foliar	Teor de clorofila	
	$\text{mg/dm}^2 \cdot \text{hora}$	mg/mg clor. hora	$\mu\text{moles de HCO}_3^-$ mg clor. hora	mg prot. hora	dm^2	mg/dm^2	mg/g P.P. Ca/Cb
Carioca	$16,38 \pm 3,42$	$7,41 \pm 1,54$	$101,66 \pm 8,17$	$7,17 \pm 0,58$	$3,31 \pm 0,23$	$2,21 \pm 0,16$	$1,15 \pm 0,06$
Rosinha Precoc	$14,94 \pm 2,47$	$6,05 \pm 1,00$	$86,46 \pm 2,67$	$6,89 \pm 0,23$	$2,41 \pm 0,30$	$2,47 \pm 0,40$	$1,24 \pm 0,12$
Pintado	$17,12 \pm 3,51$	$7,50 \pm 1,53$	$86,09 \pm 9,52$	$7,13 \pm 0,79$	$5,22 \pm 0,74$	$2,29 \pm 0,22$	$1,44 \pm 0,19$
Rosinha G-2	$20,96 \pm 3,25$	$8,19 \pm 1,27$	$100,12 \pm 16,89$	$7,72 \pm 1,31$	$4,00 \pm 0,54$	$2,56 \pm 0,22$	$1,59 \pm 0,08$
Pintadinho Precoc	$20,29 \pm 2,69$	$8,45 \pm 1,12$	$85,77 \pm 4,05$	$6,62 \pm 0,31$	$4,62 \pm 1,13$	$2,40 \pm 0,22$	$1,28 \pm 0,16$
Piratã - 1	$22,91 \pm 2,05$	$8,81 \pm 0,79$	$98,45 \pm 4,99$	$6,76 \pm 0,34$	$3,88 \pm 0,97$	$2,60 \pm 0,17$	$1,40 \pm 0,12$
F.	5,45**	3,20*	1,39	0,50	9,05**	2,83*	5,71**
d.m.s. (Tukey 5%)	5,67	2,38	n.s.	n.s.	1,06	0,27	0,28
C.V. (%)	17,2	17,5	11,9	13,7	20,4	5,0	10,9

1,65

n.s.

4,3

tas diferenças deve estar associado ao conjunto de resistências à penetração do CO_2 até o cloroplasto (CHARTIER *et alii* 1970; HOLMGREN *et alii*, 1965; BARRS, 1968; FRASER e BIDWELL, 1974).

Deve-se enfatizar que as variedades utilizadas não são ecótipos nos quais maiores diferenças nas taxas de carboxilação seriam esperados (TREHARNE, 1972). Também é interessante lembrar que o coeficiente de variação encontrado para o ensaio enzimático é baixo porque corresponde a variabilidade das repetições para o mesmo extrato bruto (obtido das folhas da mistura das plantas) e que a maior variabilidade para a incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ foi encontrada entre plantas obtidas de vasos diferentes.

Foram observadas diferenças significativas entre variedades para a área das folhas, sendo que a variedade Pintado apresentou uma área foliar maior que o dobro da Rosinha Precoce, embora a atividade fotossintética de ambas não deferisse. Isto leva a crer que os efeitos ontogênicos são multiplicativos em relação ao crescimento, levantando-se a hipótese de que possivelmente a eficiência fotossintética desta mesma folha seria diferente na sua fase de crescimento embora, pela lógica, o consumo de fotossintetados pela 2ª folha deve ser mais elevado na variedade Pintado que em Rosinha Precoce, o que dificulta este tipo de projeção.

A ordem decrescente observada quanto a área foliar total foi: Pintado, Pintadinho Precoce, Rosinha G-2,

Piratã-1, Carioca e Rosinha Precoce. Para a mesma variedade a variação maior foi encontrada para a variedade Pintadinho Precoce que de um vaso para outro apresentou diferenças de até 50%, sendo que na variedade Piratã-1 estas diferenças foram também acentuadas. Convém salientar que as diferenças entre as plantas da variedade Pintadinho Precoce eram patentes em relação ao porte, tamanho das folhas e mesmo quanto ao aspecto geral das plantas.

Em relação ao teor de clorofila das folhas também foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. As variedades Piratã-1 e Rosinha G-2 apresentaram os maiores teores, enquanto que Carioca e Pintadinho tinham os mais baixos. No entanto, expressando-se o teor de clorofila por unidade de peso fresco, as variedades Rosinha-G-2 e Pintadinho foram as que mostraram maiores quantidades relativas indicando que as folhas desta última devem possuir menor peso específico, o que segundo PEARCE *et alii*, (1969) pode determinar menor eficiência fotossintética. No caso da folha do feijoeiro este teor de clorofila deve ser ainda analisado em relação à região da folha amostrada, tendo em vista que nas áreas de maior densidade de vasos a quantidade de clorofila é menor. A relação clorofila a/b não difere entre variedades.

Verifica-se que, exceto para a variedade Rosinha Precoce, existe correspondência entre o teor de clorofila por unidade de área e a taxa de fixação de $^{14}\text{CO}_2$, levando

a inferir-se que a limitação nestas casos pode estar ligada ao número de centros fotossintéticos representado pelo teor de clorofila.

Também não é de todo descartável uma relação inversa entre o teor de clorofila e o conjunto da resistência à penetração do CO_2 no mesófilo.

Experimento 4 - Após terem sido obtidos dados satisfatórios acerca das diferenças entre variedades em relação à eficiência fotossintética, procurou-se estudar outras implicações destas diferenças principalmente em relação à idade das plantas. Para isto foram utilizadas duas variedades: a Carioca, de crescimento indeterminado, alta produtividade e ciclo longo (aprox. 90 dias), e Rosinha Precoce, que apresenta crescimento determinado, baixa produtividade e ciclo precoce (aprox. 70 dias). Os parâmetros analisados foram: incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ em diversas idades da folha e da planta (representada pela idade cronologicamente determinada e pela posição da folha), atividade de RuDP carboxilase, teor de clorofila e análise de crescimento (taxa de assimilação líquida e taxa de crescimento relativo). Estes dados acham-se nas Tabelas 19, 20 e 21.

Pela análise dos dados do efeito da idade da folha sobre a taxa de incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ (Tabela 19), verifica-se que não foram encontradas diferenças entre variedades para folhas da mesma idade. Nota-se contudo diferenças entre folhas de idades diferentes de uma mesma variedade. Embora se

tenha verificado um ligeiro aumento na taxa de incorporação das primeiras para as segundas determinações, não há padrão nestas variações. Aparentemente, logo após a síntese completa de aparelho fotossintético há uma estabilização da taxa de absorção do $^{14}\text{CO}_2$.

Tabela 19 - Efeito da idade da folha sobre a incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ e área foliar em duas variedades de feijoeiro.

Variedade	Idade da Folha (dias)		$^{14}\text{CO}_2$ Incorporado (mg/dm ² - hr.)	Área da Folha (dm ²)
	Fl.1	Fl.2		
Carloca	03		13,81 ± 5,25	0,54
	05		14,41 ± 1,00	1,22
		01	10,47 ± 3,88	0,25
	08		16,38 ± 3,42	1,87
		04	15,54 ± 2,56	1,14
Rosinha Precoce	03		12,45 ± 2,41	0,31
	05		17,72 ± 1,05	0,86
		01	15,09 ± 2,62	0,13
	08		14,94 ± 2,47	1,40
		04	15,62 ± 4,12	0,94
<hr/>				
F.	Variedade		2,94	
	Idade da Folha		2,95*	
	Variedade x Idade		2,00	
d.m.s. (Tukey 5%)	Idade da Folha		5,06	
C.V. (%)			19,15	

Da observação dos trabalhos de JEWISS e WOLEDGE (1966); OZBUN *et alii*, (1964); KISAKI *et alii* (1973) e SALIN e HOMMAN (1971), pode-se deduzir que realmente deve haver um aumento da intensidade do metabolismo fotossintético à medida que a folha se desenvolve, havendo a estabilização após uma ~~certa~~ idade que variou de espécie para espécie. Além disso, é de se esperar que havendo um aumento da taxa de fotossíntese bruta ocorra um aumento de fotorespiração, isto durante a fase em que a folha faz fotossíntese principalmente para suprir a sua própria necessidade de crescimento, pois após esta fase, o aparecimento de novas folhas ou órgãos é que determina a maior intensidade da taxa de fotossíntese (FRASER e BIDWELL, 1974).

Na tabela 20, são apresentados os dados referentes à análise de folhas de idades diferentes em uma mesma planta aos 27 dias após a germinação. Observa-se diferenças em relação a incorporação do $^{14}\text{CO}_2$ entre variedades, idades (posições) das folhas e interação entre variedades e idade. Pode-se notar que as plantas da variedade Caríoca apresentaram menor taxa fotossintética, em especial as folhas velhas, (o que caracteriza a interação variedade x idade). Esta incorporação foi muito baixa até a folha 4, em Caríoca, enquanto em Rosinha Precoce foi baixa na folha 1, e isto somente em duas plantas. É conveniente observar que nesta idade as plantas da variedade Caríoca apresentava diversos ramos laterais, de modo que a sua área foliar já era 1,5 vezes a das

plantas de Rosinha Precoce (Tabela 21). Devido aos ramos laterais, a área das folhas correspondentes aos números 4 a 7 nas plantas de Carioca era maior que todas as folhas de Rosinha.

Quanto à atividade enzimática, encontraram-se e feitos significativos para variedade, idade da folha e interação variedade x idade. Verifica-se que para ambas espécies a atividade aumentou da 2ª para a 3ª folha, e quando expressa em função do teor de proteína no extrato, este aumento se deu ainda da 3ª para a 4ª folha. Além disso, comparando-se as duas formas de expressão neste ensaio com os anteriores constata-se que a atividade enzimática expressa por unidade do teor de proteína é similar (cerca de 7 a 10 $\mu\text{moles HCO}_3^-/\text{mg}$ de proteína.hora), enquanto que quando expressa por unidade do teor de clorofila a uniformidade é bem menor, indicando que há variação na relação clorofila/proteína das folhas. Reamente os teores de clorofila nestas folhas são superiores aos apresentados na Tabela 18 para as mesmas variedades.

O teor de clorofila foi maior em folhas de Ca-rioca que nas de Rosinha Precoce, quando se considera o teor por dm^2 o que não ocorre quando expresso por mg de peso fresco, indicando que o peso específico é maior nas folhas de Ca-rioca que nas de Rosinha Precoce. Isto contraria o que foi estabelecido por PEARCE *et alii* (1968), que encontraram correlação positiva entre o peso específico da folha e sua taxa fotossintética. Contudo a análise de folhas de idades diversas torna o nosso sistema de certo modo diferente d'aqueles pes -

quisadores, acrescentando-se que o peso específico foi avaliado a penas pelos discos de áreas do mesófilo das folhas. A relação ca/cb não foi diferente entre variedades nem idades das folhas.

5. Não existe relação entre a taxa de incorporação de $^{14}CO_2$ e a atividade da carboxilase ou o teor de clorofila da folha. Isto indica que o mecanismo de que resultam as diferenças entre folhas deve estar ligado a outros caracteres, possivelmente a resistência do mesófilo (IZAHR e WALLACE ; 1967-b; BEARDSELL *et alii*, 1973; HOLMGREN, 1968; FRASER e BIDWELL, 1974; ZELITCH, 1971). Estes caracteres devem estar diretamente ligados a eventos ontogênicos da folha e da planta. Há ainda a considerar que a análise da atividade enzimática, a qual foi realizada em folhas de plantas diferentes das incorporadas com $^{14}CO_2$, e que esta fase era de intenso crescimento vegetativo na variedade Carioca enquanto na variedade Rosinha Precoce já havia se iniciado o período de floração. Nesta espera-se um aumento de taxa de incorporação de $^{14}CO_2$ e diminuição da resistência do mesófilo (FRASER e BIDWELL, 1974), ainda mais considerando-se que a área foliar na variedade Rosinha Precoce é bem menor (Tabela 21) e o reflexo desta interação deve ser bem mais acentuado.

Na Tabela 21 encontram-se os dados da quantidade de matéria seca nas diferentes partes da planta e área das folhas nas duas variedades de feijoeiro.

Tabela 21 - Peso da matéria seca das partes da planta e área foliar de duas variedades de feijoeiro em três idades distintas.

Variedade	Idade da Planta (dias)	Parte da Planta	Peso Seco (mg)	Área Foliar (dm ²)
Carioca	18 dias	Folhas	1,36	3,39 ± 0,85
		Caule	0,27	
		Raiz	0,38	
		Total	2,01	
	27 dias	Folhas	3,92	20,95 ± 5,30
		Caule	1,65	
		Raiz	0,94	
		Total	6,52	
	40 dias	Folhas	11,34	41,62 ± 6,26
		Caule	7,04	
		Raiz	2,86	
		Fruto	1,46	
		Total	22,69 ±	
Rosinha Precoce	18 dias	Folhas	1,07	2,96 ± 0,17
		Caule	0,19	
		Raiz	0,29	
		Total	1,55	
	27 dias	Folha	2,79	14,04 ± 4,56
		Caule	0,89	
		Raiz	0,83	
		Total	4,51	
	40 dias	Folhas	4,26	20,45 ± 4,56
		Caule	1,97	
		Raiz	1,46	
		Fruto	1,26	
		Total	8,95	
F.	Variedade		116,30 **	25,42 **
	Idade da Planta		231,16 **	72,91 **
	Variedade x Idade		69,63 **	10,68 **
	Parte da Planta		116,57 **	
	C.V. (%)		27,25	26,78

As plantas da variedade Carloca apresentaram maior quantidade de matéria seca especialmente nas folhas e caules. As diferenças entre as raízes só foram mais acentuadas 40 dias após a germinação, indicando que depois da floração o crescimento do sistema radicular é bastante diminuído. As plantas de Rosinha Precoce floresceram aos 27 dias e as de Carloca aos 35 dias). A área foliar era bastante superior na variedade Carloca, observando-se ainda uma variabilidade bastante elevada entre as plantas em relação aos parâmetros estudados.

Quanto a taxa de assimilação líquida verifica-se que até aos 27 dias, nas plantas de Carloca ela foi apenas ligeiramente superior que as de Rosinha Precoce, acentuando-se em seguida. Isto indica que o efeito da área foliar sobre a taxa fotossintética da planta inteira é multiplicativo, desde que não existam efeitos de retroinibição.

Segundo WALLACE e MUNGER (1965), a relação da área foliar (área foliar por unidade de peso da planta) é o principal parâmetro de diferenças entre variedades de feijoeiro (considerando $TCR = TAL \times RAF$).

Neste último experimento, verifica-se que 27 dias depois a germinação as plantas começaram a mostrar sinais de senescência precoce, principalmente a queda das folhas mais velhas que se apresentavam manchadas e amareladas. Logo atribuiu-se o fato a um possível efeito de alta concentração salina possivelmente pela alta absorção de água em consequên

cia da elevada transpiração, forçada pelo ambiente, o qual e ra de baixa umidade. As plantas de Carioca foram as mais afe tadas.

Revendo a literatura, encontrou-se que LEGGETT e FRERE (1971), não conseguiram fazer crescer soja em solução nutritiva completa de Hoagland. Aos 25 dias as folhas basais começaram a cair, mostrando amarelecimento generalizado, o qual desaparecia quando as plantas eram transferidas para soluções mais diluídas (1/2 Hoagland). Possivelmente a falta de balanceamento nas concentrações de K, Ca e Mg é um fator importante.

Sugere-se que sejam realizados novos estudos sobre o balanceamento de nutrientes no feijoeiro crescendo em solução nutritiva.

Tabela 22 - Taxa de Assimilação Líquida e Taxa de Crescimento Relativo de duas variedades de feijoeiro.

Variedade	Período (dias)	T.A.L. (g/m ² .dia)	T.C.R. (g/g MS.dia)
Carioca	0 - 18	4,03	$3,88 \times 10^{-2}$
	19 - 27	5,20	$14,10 \times 10^{-2}$
	28 - 40	4,13	$9,59 \times 10^{-2}$
Rosinha Precoce	0 - 18	3,16	$2,43 \times 10^{-2}$
	19 - 27	4,62	$11,86 \times 10^{-2}$
	28 - 40	2,38	$5,27 \times 10^{-2}$

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos, analisados estatisticamente e interpretados à luz dos subsídios coletados na literatura pertinente, permitiram-nos tirar, dentro das condições experimentais em que foi realizado o presente trabalho, as seguintes conclusões :

— É possível detectar-se diferenças na eficiência fotossintética de variedades de feijoeiro usando a técnica de incorporação de $^{14}\text{CO}_2$, em discos de folhas, com aparelhagem portátil. No entanto, necessário se faz uma calibração adequada do método.

— A variabilidade da taxa de incorporação em função do ambiente é alta, mesmo entre plantas da mesma variedade. Assim, o número de repetições (plantas) deve variar de acordo com o ambiente.

— A iluminação natural é sempre superior a artificial para a incorporação de $^{14}\text{CO}_2$, induzindo uma maior atividade fotossintética, mesmo se o sistema de iluminação artificial produz um feixe de luz de intensidade saturante (cer-

ca de 80.000 lux no presente caso). A melhor faixa de descarga foi de 160 a 88 mm de Hg (20 sec.), o que corresponde a um fluxo de gás de 81,12 ml/min.

— As diferenças entre variedades não foram constantes. No entanto, nas condições consideradas adequadas a taxa de incorporação variou de 14,94 a 22,91 mg CO_2/dm^2 por hora. As variedades podem ser grupadas em duas classes, tendo como limite a taxa de 20 mg CO_2/dm^2 .hora :

Classe A (acima de 20 mg) : Piratã-1, Rosinha G-2 e Pintadinho Precoce

Classe B (abaixo de 20 mg): Carioca, Rosinha Precoce e Pintado.

— A taxa de reação da RuDP carboxilase em extrato bruto de folhas foi linear em relação ao tempo, até 10 minutos, sendo encontrado os $\text{Km}(\text{HCO}_3^-)$, 1,78 e 46 mM para as variedades Carioca e Rosinha Precoce respectivamente. A atividade enzimática mostra um padrão duplo em resposta ao aumento da concentração de HCO_3^- no meio, com velocidades máximas calculadas em 330 μmoles de HCO_3^- por mg de clorofila por hora para Carioca e 235 μmoles para Rosinha Precoce. Estas variedades também diferiram em relação ao tempo de inativação da enzima pelo ambiente.

— As variedades não diferem em relação a atividade da RuDP carboxilase em suas folhas. Os níveis encontrados correspondem aproximadamente à metade da taxa de incorporação

encontrada, não se detectando relação entre estes dois parâmetros.

— O método de determinação da área foliar através da medida do comprimento e largura do folíolo central é adequado para avaliação da área das folhas, mostrando alta correlação com as medidas através do integrador.

— A área foliar total não mostra relação com a atividade fotossintética por unidade de área foliar, de modo que esta atividade não é indicativa das diferenças no crescimento vegetativo.

— Em relação ao teor de clorofila há diferenças entre variedades, sendo maior quando expressa por unidade de peso fresco e, com exceções, há relação com a taxa fotossintética. A relação Clorofila a/Clorofila b é essencialmente constante em todas as variedades e idades fisiológicas.

— A idade fisiológica é forte determinante da taxa fotossintética, sendo que não há relação entre estas e a atividade da RuDP carboxilase ou teor de clorofila. Nas variedades de crescimento indeterminado um maior número de folhas envelhece mais depressa que nas de crescimento determinado, fenômeno este explicado pela retroinibição.

— A área foliar final e a permanência da atividade fotossintética em altos níveis depende de novos fenômenos ontogênicos, como desenvolvimento de folhas, flores e vagens, e de fenômenos de retroinibição.

7. S U M M A R Y

The present work describes a series of experiments conducted at the Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/ESALQ/USP). Their main objective was to test the feasibility of detecting differences in the photosynthetic efficiency of beans plant varieties (*Phaseolus vulgaris* L.) using the method of $^{14}\text{CO}_2$ incorporation in intact leaves with portable equipment. Relative differences in RuDP carboxylase activity in the crude extract of leaves, leaf area and leaf chlorophyll concentration were also measured and an attempt was made to associate them with the photosynthetic rate of the leaves.

All plants were grown in hydroponic environment with Hoagland and Arnon's n° 2 solution. Measurements were made on the central trifoliolate of the first trifoliated leaf except when the effect of leaf age was studied in which case all central trifoliate of the same branch were used. The analysis of the experimental conditions and of the methodology itself was one of the basic points of this work.

Rates of $^{14}\text{CO}_2$ incorporation, at saturating light, varied from 14,94 to 22,91 mg CO_2/dm^2 . hour, and varieties could be divided into two classes, one with rates above and the other with rates below 20 mg CO_2/dm^2 .hour. Plants of the same variety showed a relatively high variability and a strong dependence in relation to environmental conditions in such a way that differences among varieties could only be determined if these differences were large. However the method used is feasible to determine these variations under controlled conditions.

Differences among varieties in relation to RuDP carboxylase activity were not consistent from one experiment to another. The activities corresponded to about half the $^{14}\text{CO}_2$ incorporation rates but there was no positive correlation between them. There was also no correlation between leaf area or leaf chlorophyll content and the photosynthetic rate, in spite of the fact that there were significant differences among varieties, especially at later stages of development.

8. L I T E R A T U R A C I T A D A

- ADAMS, M.W., 1975. Arquitetura vegetal y eficiencia fisiológica de la planta de frijol. In: CIAT (Centro Interamericano de Agricultura Tropical), Informativo Anual, p.181-189.
- ALEXANDER, A.G., 1973. Sugarcane Physiology. Amsterdam, Elsevier Scientific Comp. 752 p.
- ALLEN, L.H. Jr., R.L. DESJARDINS e E.R. LEMON, 1974. Line-source carbon dioxide release. I. Field experiment. Agronomy Journal, Madison, 66: 609 - 615.
- ANDERSON, L.E. e M. AVRON, 1976. Light modulation of enzyme activity in chloroplast. Generation of membrane-bound vicinal-dithiol groups by photosynthetic electron transport. Plant Physiology, Lancaster, 57: 209 - 213.
- ANDREWS, T.J. e M. HATCH, 1971. Activity and properties of ribulose-diphosphate carboxylase from plants with C_4 -dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. Phytochemistry, New York, 10: 9 - 15.
- ANDREWS, T.J., G.H. LORIMER e N.E. TOLBERT, 1973. Ribulose diphosphate oxygenase. I. Synthesis of phospho-glycolate by fraction-I protein of leaves. Biochemistry, Washington, 12: 11 - 13.
- ANDREWS, T.J., M.R. BADGER e G.H. LORIMER, 1975. Factors af-

- fecting interconversion between kinetic forms of Ribulose diphosphate carboxylase-oxygenase from spinach. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, 171: 93 - 103.
- APEL, P. e C.O. LEHMANN, 1969. Variabilität und sortenspezifität der photosyntheserate bei sommergerste. Photosynthese, Prague, 3: 255 - 262.
- ARNON, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology, Lancaster, 24: 1 - 15.
- ASAY, K.H., C.J. NELSON e G.L. HORST, 1974. Genetic variability for net photosynthesis in tall fescue. Crop Science, Madison, 14: 571 - 574.
- AUGUSTINE, J.J., M.A. STEVENS, R.W. BREIDENBACH e D.F. PAIGE, 1976. Genotypic variation in carboxylation of tomatoes. Plant Physiology, Lancaster, 57: 325 - 333.
- AUSTIN, R.B. e P.C. LONGDEN, 1967. A rapid method for measurement of rates of photosynthesis using $^{14}\text{CO}_2$. Annals of Botany, London, 31: 245 - 253.
- AVDEEVA, T.A. e T.F. ANDREEVA, 1975. Effect of conditions of phosphorus nutrition on photosynthesis and activity of carboxylating enzymes in bean and corn plants. Soviet Plant Physiology, New York, 21: 753 - 757.
- AVRON, M. e M. GIBBS, 1974. Carbon dioxide fixation in the light and in the dark by isolated spinach chloroplasts. Plant Physiology, Lancaster, 53: 140 - 143.
- BADGER, M.R. e T.J. ANDREWS, 1974. Effects of CO_2 , O_2 and temperature on a high-affinity form of ribulose diphosphate carboxylase-oxygenase from spinach. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, 60: 204 - 210.
- BAHR, J.T. e R.G. JENSEN, 1974-a. Ribulose diphosphate carboxylase from freshly chloroplasts having an in vivo $\text{Km}(\text{CO}_2)$. Plant Physiology, Lancaster, 53: 39 - 44.

- BÄHR, J.T. e R.G. JENSEN, 1974-b. Ribulose biphosphate oxygenase activity from freshly ruptured spinach chloroplasts. Archives of Biochemistry and Biophysics. New York, 164:408-413.
- BALEGH, S.E. e O. BIDDULPH, 1970. The photosynthetic action spectrum of bean plants. Plant Physiology. Lancaster, 46: 1 - 5.
- BARNETT, N.M. e A.W. NAYLOR, 1966. Amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress. Plant Physiology. Lancaster, 41: 1222 - 1230.
- BARRS, H.D., 1968. Effect of cyclic variations in gas exchange under constant environmental conditions on the ratio of transpiration to net photosynthesis. Physiologia Plantarum. Kobenhavn, 21: 918 - 929.
- BASSHAM, J.A., 1971. The control of photosynthetic carbon metabolism. Science. Washington, 172: 526 - 534.
- BASSHAM, J.A. e M. KIRK, 1973. Sequence of formation of phosphoglycollate in photosynthesizing *Clorella pyranoidosa*. Plant Physiology. Lancaster, 52: 407 - 411.
- BASZYNSKY, T., J. BRAND, R. BARRS, D.W. KROGMANN e F.L. CRANE, 1972. Some biochemical characteristics of chloroplasts from mineral-deficient maize. Plant Physiology. Lancaster, 50: 410 - 411.
- BEARDSELL, M.F., K.J. MITCHELL e R.G. THOMAS, 1973. Transpiration and photosynthesis in soybean. Journal of Experimental Botany. Oxford, 24: 587 - 595.
- BENEDICT, C.R., K.J. MCCREE e R.J. KOHEL, 1972. High photosynthetic rate of a chlorophyll mutant of cotton. Plant Physiology. Lancaster, 49: 968 - 971.
- BIRD, I.F., M.J. CORNELIUS, A.J. KEYS e C.P. WHITTINGHAM, 1972. Oxidation and phosphorylation associated with the conversion of glycine to serine. Phytochemistry. New York, 11: 1587 - 1594.

- BIRKY, C.W., Jr., 1976. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts. Bioscience. Washington, 26: 26 - 33.
- BISWAL, U.C. e P. MOHANTY, 1976. Aging induced changes in photosynthetic electron transport of detached barley leaves. Plant and Cell Physiology. Tokyo, 17: 323 - 331.
- BJORKMAN, O., 1968. Further studies on differentiation of photosynthetic properties in sun and shade ecotypes of *Solidago virgaurea*. Physiologia Plantarum. Kobenhavn, 21: 1 - 8.
- BJORKMAN, O. e E. GAUHL, 1969. Carboxydismutase activity in plants with and without -carboxylation photosynthesis. Planta. Berlin, 88: 197 - 202.
- BJORKMAN, O., W.M. HIESEY, M. NOBS, NICHOLSON e R.W. HART, 1968. Effect of oxygen concentration on dry matter production in higher plants. Carnegie Institute Washington Yearbook. Washington, 66: 228 - 232.
- BLACK, C.C., Jr., 1973. Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO_2 uptake. Annual Review of Plant Physiology. Stanford, 24: 253 - 286.
- BLINKINSOP, P.G. e J.E. DALE, 1974. Effects of shade treatment and light intensity on ribulose-1,5-diphosphate carboxylase activity and fraction I protein level in the first leaf of barley. Journal of Experimental Botany. Oxford, 25: 899-912.
- BOWES, G. e W.L. OGREN, 1972. Oxygen inhibition and other properties of soybean ribulose-1,5-diphosphate carboxylase. Journal of Biological Chemistry. Baltimore, 247: 2171-2176.
- BOWES, G., W.L. OGREN e R.H. HAGEMAN, 1971. Phosphoglycollate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase. Biochemical and Biophysical Research Communications. New York, 45: 716 - 722.
- BOWES, G., W.L. OGREN e R.H. HAGEMAN, 1972. Light saturation, photosynthesis rate, RuDP carboxylase activity, and specific

- leaf weight in soybeans grown under different light intensities. Crop Science. Madison, 12: 77 - 79.
- BOWES, G., W.L. OGREN e R.H. HAGEMAN, 1975. pH-dependence of the $K_m(CO_2)$ of ribulose-1,5-diphosphate carboxylase. Plant Physiology. Lancaster, 56: 630 - 633.
- BOYER, J.S., 1970. Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean, and sunflower at various leaf water potentials. Plant Physiology. Lancaster, 46: 233 - 235.
- BOYER, J.S., 1971. Recovery of photosynthesis in sunflower after a period of low water potential. Plant Physiology. Lancaster, 47: 816 - 820.
- BOYER, J.S. e B.L. BOWEN, 1970. Inhibition of oxygen evolution in chloroplasts isolated from leaves with low water potentials. Plant Physiology. Lancaster, 45: 612 - 615.
- BRUN, W.A. e R.L. COOPER, 1967. Effects of light intensity and carbon dioxide concentration on photosynthetic rate of soybean. Crop Science. Madison, 7: 451 - 454.
- BUCHANAN, B.B. e P. SCHURMANN, 1973. Regulation of ribulose-1, 5-diphosphate carboxylase in the photosynthetic assimilation of carbon dioxide. Journal of Biological Chemistry. Baltimore, 248: 4956 - 4964.
- CARLSON, G.E., R.B. PEARCE, D.R. LEE e R.H. HART, 1971. Photosynthesis and photorespiration in two clones of orchardgrass. Crop Science. Madison, 11: 35 - 37.
- CHANDLER, R.F., Jr., 1969. Plant morphology and stand geometry in relation to nitrogen. In: EASTIN, J.D., C.Y. SULLIVAN e C.H.M. VanBAVEL, ed. Physiological aspects of crop yield. Madison, American Society of Agronomy. p. 262 - 285.
- CHARLES-EDWARDS, D., 1975. Efficiency and expediency in plant growth. Annals of Botany. Oxford, 39: 161 - 162.
- CHEN, K.C., J.C. GRAY e S.G. WILDMAN, 1975. Fraction I protein

and the origin of polyploid wheats. Science. Washington, 190: 1304 - 1306.

CHARTIER, P., M. CHARTIER e J. CATSKY, 1970. Resistances for carbon dioxide diffusion and for carboxylation as factors in bean photosynthesis. Photosynthetica. Prague, 4: 48-57.

CHMORA, S.N., G.A. SLOBODSKAYA e A.A. NICHIPOROVICH, 1976. Correlation between photosynthesis and photorespiration in plants with different activity of the photosynthetic apparatus. Soviet Plant Physiology. New York, 23: 963 - 967.

CHOLLET, R. e W.L. OGREN, 1975. Regulation of photorespiration in C_3 and C_4 species. Botanical Review. Lancaster, 41: 137 - 179.

CHU, D.K. e J.A. BASSHAM, 1973. Activation and inhibition of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase by 6-phosphogluconate. Plant Physiology. Lancaster, 52: 373 - 379.

CHU, D.K. e J.A. BASSHAM, 1974. Activation of ribulose 1,5 - diphosphate carboxylase by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and other chloroplast metabolites. Plant Physiology. Lancaster, 54: 556 - 559.

COOPER, J.P., 1970. Potential production and energy conversion in temperate and tropical grasses. Herbage Abstracts. Farnham Royal, 40: 1 - 15.

COOPER, T.G., D. FILMER, M. WISHNICK e M.D. LANE, 1969. The active species of " CO_2 " utilized by ribulose diphosphate carboxylase. Journal of Biological Chemistry. Baltimore, 244: 1081 - 1083.

CROOKSTON, R.K. e D.N. MOSS, 1974. Interveinal distance for carbohydrate transport in leaves of C_3 and C_4 species. Crop Science. Madison, 14: 123 - 125.

CROOKSTON, R.K., J.O'TOOLE, R. LEE, J.L. OZBUN e D.H. WALLACE, 1974-a. Photosynthetic depression in beans after exposure

- to cold for one night. Crop Science. Madison, 14: 457-464.
- CROOKSTON, R.K., J. O'TOOLE e J.L. OZBUN, 1974-b. Characterization of bean pod as a photosynthetic organ. Crop Science. Madison, 14: 708 - 712.
- CROOKSTON, R.K., K.J. TREHARNE, P. LUDFORD e J.L. OZBUN, 1975. Response of beans to shading. Crop Science. Madison, 15: 412 - 416.
- CURTIS, P.E., W.L. OGREN e R.H. HAGEMAN, 1969. Varietal effects in soybean photosynthesis and photorespiration. Crop Science. Madison, 9: 323 - 327.
- DALLING, M.J., N.E. TOLBERT e R.H. HAGEMAN, 1972. Intracellular location of nitrate reductase and nitrite reductase. I. Spinach and tobacco leaves. Biochimica et Biophysica Acta. Amsterdam, 283: 505 - 512.
- D'AOUST, A.L. e D.T. CANVIN, 1973. Effect of oxygen concentration on the rates of photosynthesis and photorespiration of some higher plants. Canadian Journal of Botany. Ottawa, 51: 457-464.
- DECKER, J.P. e M.A. TIÓ, 1973. Carbon dioxide surges in coffee seedlings. Journal of Agriculture University of Puerto Rico. Rio Piedras, 43: 50 - 55. University of Puerto Rico.
- DELANEY, R.H. e A.K. DOBRENZ, 1974. Morphological and anatomical features of alfalfa leaves as related to CO₂ exchange. Crop Science. Madison, 14: 444 - 447.
- DEVLIN, R.M. e A.V. BARKER, 1971. Photosynthesis. New York, Van Nostrand Reinhold Comp. 30 p.
- DILLEY, R.A. e L.P. VERNON, 1965. Ion and water transport processes related to the light-dependent shrinkage of spinach chloroplasts. Archives of Biochemistry and Biophysics. New York, 111: 365 - 375.
- DODGE, J.D., 1970. Changes in chloroplast fine structure during the autumnal senescence of *Betula* leaves. Annals of Botany. London, 34: 817 - 824.

- DOWNTON, W.J.S. e E.B. TREGUNNA, 1968. Photorespiration and glycolate metabolism: a re-examination and correlation of some previous studies. Plant Physiology. Lancaster, 43 : 923 - 929.
- DUNCAN, W.G., 1969. Cultural manipulation for higher yield. In: EASTIN, J.D., F.A. HASKINS, C.Y. SULLIVAN e C.H.M. van BAVEL, ed. Physiological aspects of crop yield. Madison, American Society of Agronomy and Crop Science Society of America. p: 327 - 339.
- DUNCAN, W.G. e J.D. HESKETH, 1968. Net photosynthetic rates, relative leaf growth rates and leaf numbers of 22 races of maize grown at eight temperatures. Crop Science, Madison, 8: 670 - 674.
- EDGE, O.T., L.K. MUGHOGHO e U.W.U. AYONOGADU, 1975. Response of dry beans to varying nitrogen levels. Agronomy Journal. Madison, 67: 251 - 254.
- EDREVA, A. e N. CHOLAKOVA, 1975. Certain errors in determining protein substances by the Lowry method. Soviet Plant Physiology. New York, 22: 169 - 171.
- FAIR, P., J. TEW e C.F. CRESSWELL, 1973. Enzyme activities associated with carbon dioxide exchange in illuminated leaves of *Hordeum vulgare* L. I. Effects of light period, leaf age, and position, on carbon dioxide compensation point (Γ). Annals of Botany. London, 37: 831 - 844.
- FAIR, P., J. TEW e C.F. CRESSWELL, 1974. Enzyme activities associated with carbon dioxide exchange in illuminated leaves of *Hordeum vulgare* L. IV. The effect of light intensity on the carbon dioxide compensation point. Annals of Botany. London, 38: 42 - 52.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION), 1974. Production Yearbook 1973. Rome, United Nations.

- FLINN, A.M., 1974. Regulation of leaflet photosynthesis by developing fruit in pea. Physiologia Plantarum. Kobenhavn, 31: 275 - 278.
- FOCK, H., J.D. BECKER e K. EGLE, 1970. Use of labeled carbon dioxide for separation of CO_2 evolution from true CO_2 uptake by photosynthesizing *Amaranthus* and sunflower leaves. Canadian Journal of Botany. Ottawa, 48: 1185 - 1189.
- FRASER, D.E. e R.G.S. BIDWELL, 1974. Photosynthesis and photorespiration during ontogeny of bean plant. Canadian Journal of Botany. Ottawa, 52: 2561 - 2569.
- FRIEND, D.J.C. e V.A. HELSON, 1976. Thermoperiodic effects on the growth and photosynthesis of wheat and other crop plants. Botanical Gazette. Chicago, 137: 75 - 84.
- GAASTRA, P., 1959. Photosynthesis of crop plants as influenced by light, carbon dioxide, temperature, and stomatal resistance. Meded Landouwhogesch. Wageningen, 59: 1 - 68.
- GIFFORD, R.M., 1974. A comparison of potential photosynthesis, productivity and yield of plant species with differing photosynthetic metabolism. Australian Journal of Plant Physiology. Melbourne, 1: 107 - 118.
- GIFFORD, R.M., P.M. BREMMER e D.B. JONES, 1973. Assessing photosynthetic limitation to grain yield in a field crop. Australian Journal of Agricultural Research. Melbourne, 24: 297 - 307.
- GOLDSWORTHY, A., 1970. Photorespiration. Botanical Review. Lancaster, 36: 321 - 340.
- GOODMAN, R.N., Z. KIRALY e ZAITLIN, 1967. The biochemistry and physiology of infectious plant disease. Princeton, Van-Nostrand Publishers.
- HACKETT, C., 1973. An exploration of the economy of the tobacco plant. I. Inferences from a simulation. Australian Journal of Biological Science. Melbourne, 26: 1057 - 1071.

- HACKETT, C. e H.M. RAWSON, 1974. An exploration of the carbon economy of the tobacco plant. II. Patterns of leaf growth and dry matter partitioning. Australian Journal of Plant Physiology. Melbourne, 1: 271 - 281.
- HALL, J.D., R. BARR, A.H. AL-ABBAS e F.L. CRANE, 1972. The ultrastructure of chloroplasts in a mineral-deficient maize leaves. Plant Physiology. Lancaster, 50: 404-409.
- HARDY, R.W.F. e U.D. HAVELKA, 1973. Symbiotic N₂ fixation : , multifold enhancement by CO₂ enrichment of field-grown soybeans. Abstract American Society Plant Physiologists - Annual Meeting.
- HARDY, R.W.F. e U.D. HAVELKA, 1975. Nitrogen fixation research: a key to world food? Science. Washington, 188: 633 - 643.
- HARTT, C.E., 1965. Light and translocation of C¹⁴ in detached blades of sugarcane. Plant Physiology. Lancaster, 40: 718 - 724.
- HARTT, C.E. e G.O. BURR, 1967. Factors affecting photosynthesis in sugarcane. Proceedings International Sugar Cane Technologists. Porto Rico, 12: 590 - 609.
- HAUPT, W., 1973. Role of light in chloroplast movement. Bioscience. Washington, 23: 289 - 296.
- HEICHEL, G.A., 1971. Genetic control of epidermal cell and stomatal frequency in maize. Crop Science. Madison, 11: 830 - 832.
- HEICHEL, G.H. e R.B. MUSGRAVE, 1969. Varietal differences in photosynthesis of *Zea mays* L. Crop Science. Madison, 9: 483 - 486.
- HELDT, H.W., K. WERDAN, M. MILOVANCED e G. GELLER, 1973. Alkalization of the chloroplast stroma caused by light-dependent proton flux into the thylakoid space. Biochimica et Biophysica Acta. Amsterdam, 314: 224 - 241.

- HESKETH, J., 1967. Enhancement of photosynthetic CO_2 -assimilation in the absence of oxygen, as affected by species and temperature. Planta. Berlin, 76: 371 - 374.
- HESLEHURST, M.R. e G.L. WILSON, 1974. Studies on productivity of tropical pasture plants. IV. Separation of photosynthetic and respiratory components of net assimilation rate by growth analysis and gas exchange techniques under natural lighting. Australian Journal of Agricultural Research. Melbourne, 25: 415 - 423.
- HILLIARD, J.H. e S.H. WEST, 1971. The association of chloroplast peripheral reticulum with low photorespiration rates in a photorespiring plant species. Planta. Berlin, 99: 352 - 356.
- HOFSTRA, G. e J. D. HESKETH, 1969. Effect of temperature on the gas exchange of leaves in the light and dark. Planta. Berlin, 85: 228 - 237,
- HOLMGREN, P., 1968. Leaf factors affecting light-saturated photosynthesis in ecotypes of *Solidago virgaurea* from exposed and shaded habitats. Physiologia Plantarum. Kobenhavn, 21: 676 - 698.
- HOLMGREN, P., P.G. JARVIS e M.S. JARVIS, 1965. Resistances to carbon dioxide and water vapour transfer in leaves of different plant species. Physiologia Plantarum. Kobenhavn, 18: 557 - 573.
- HUFFAKER, R.C. e L.W. PETERSON, 1974. Protein turnover in plants and possible means of its control. Annual Review of Plant Physiology. Stanford, 25: 363 - 392.
- INADA, K., 1976. Action spectra for photosynthesis in higher plants. Plant and Cell Physiology. Tokyo, 17: 355 - 365.
- IRVINE, J.E., 1967. Photosynthesis in sugar cane varieties under field conditions. Crop Science. Madison, 7 : 297 - 300.

- IZHAR, S. e D.H. WALLACE, 1976-a. Studies on physiological basis for crop yield. III. Genetic variation on photosynthetic efficiency of *Phaseolus vulgaris* L. Crop Science. Madison, 7: 457 - 460.
- IZHAR, S. e D.H. WALLACE, 1967-b. Effect of night temperature on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* L. Crop Science. Madison, 7: 546 - 547.
- JACKSON, W.A. e R.J. VOLK, 1970. Photorespiration. Annual Review of Plant Physiology. Stanford, 21: 385 - 426.
- JEFFERS, D.L. e R.M. SHIBLES, 1969. Some effects of leaf area solar radiation, air temperature, and varieties on net photosynthesis in field-grown soybeans. Crop Science. Madison, 9: 762 - 764.
- JENSEN, R.G., 1971. Activation of CO₂ fixation in isolated spinach chloroplasts. Biochimica et Biophysica Acta. Amsterdam, 234: 360 - 370.
- JENSEN, R.G. e J.A. BASSHAM, 1966. Photosynthesis by isolated chloroplasts. Proceedings of the National Academy of Science.USA. Washington, 56: 1095 - 1101.
- JENSEN, R.G. e J.A. BASSHAM, 1968. Photosynthesis by isolated chloroplasts. III. Light activation of carboxylation reaction. Biochimica et Biophysica Acta. Amsterdam, 153: 227 - 234.
- JEWISS, O.R. e J. WOLEDGE, 1967. The effect of age on the rate of apparent photosynthesis in leaves of tall fescue (*Festuca arundinacea*) Annals of Botany. London, 31: 661 - 671.
- JYUNG, W.H. e M.E. CAMP, 1976. The effect of zinc nutrition on the formation of ribulose diphosphate carboxylase in *Phaseolus vulgaris*. Physiologia Plantarum. Kobenhavn, 36: 350 - 355.

- KAWASHIMA, R., 1969. Studies on the leaf orientation-adjusting movement in soybean plants. I: The leaf orientation - adjusting movement and light intensities on leaf surface. Crop Science Society Japanese Proceedings. Tokyo, 38: 718 - 729.
- KAWASHIMA, N. e S.G. WILDMAN, 1970. Fraction I protein. Annual Review of Plant Physiology. Stanford, 21: 325-358.
- KAWASHIMA, N., S. SINGH e S.G. WILDMAN, 1971. Reversible cold inactivation and heat reactivation of RuDP carboxylase activity of crystallized tobacco fraction I protein. Biochemical and Biophysical Research Communications. New York, 42: 664 - 668.
- KISAKI, T., S. HIRABAYASHI e N. YONO, 1973. Effect of the age of tobacco leaves on photosynthesis and photorespiration. Plant and Cell Physiology. Tokyo, 14: 505 - 514
- KORTSCHAK, H.P. e A. FORBES, 1969. The effects of shade and age on photosynthesis rate of sugarcane. Progress in Photosynthesis Research. New York, 1: 383 - 387.
- KOVACS, M.I. e R.D. HILL, 1974. Starch synthesis in isolated *Phaseolus vulgaris* chloroplasts. Phy chemistry. New York, 13: 1335 - 1339.
- KU, S.B. e L.A. HUNT, 1973. Effects of temperature on the morphology and photosynthetic activity of newly matured leaves of alfalfa. Canadian Journal of Botany. Ottawa, 51: 1907 - 1916.
- KWOK, S.Y. e S.G. WILDMAN, 1974. Studies on a conformational change of tobacco ribulose diphosphate carboxylase induced by D-ribulose-1,5-diphosphate. Archives of Biochemistry and Biophysics. New York, 161: 354 - 359.
- LAING, W.A., W.L. OGREN e R.H. HAGEMAN, 1974. Regulation of soybean net photosynthetic CO₂ fixation by the interaction of CO₂, O₂, and ribulose-1,5-diphosphate carboxylase.

Plant Physiology. Lancaster, 54: 678 - 685.

- LEGGETT, J.E. e M.E. FRERE, 1971. Growth and nutrient uptake by soybean plants in nutrient solutions of graded concentrations. Plant Physiology. Lancaster, 48: 457 - 460.
- LILLEY, R. McC. e D.A. WALKER, 1975. Carbon dioxide assimilation by leaves, isolated chloroplasts, and ribulose biphosphate carboxylase from spinach. Plant Physiology. Lancaster, 55: 1087 - 1092.
- LIPS, S.H. e Y. AVISSAR, 1972. Plant-leaf microbodies as the intracellular site of nitrate reductase and nitrite reductase. European Journal of Biochemistry. Berlin, 29: 20 - 24.
- LIU, P., D.H. WALLACE e J.L. OZBUN, 1973. Influence of translocation on photosynthetic efficiency of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiology. Lancaster, 52: 412 - 415.
- LOOMIS, R.E. e W.A. WILLIAMS, 1963. Maximum crop productivity - an estimate. Crop Science. Madison, 3: 67 - 72.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR e R.J. RANDALL, 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. Baltimore, 193: 265 - 275.
- LUDLOW, M.M. e G.L. WILSON, 1968. Studies on the productivity of tropical pasture plants. II. Growth analysis, photosynthesis, and respiration of 20 species of grasses and legumes in a controlled environment. Australian Journal of Agricultural Research. Melbourne, 21: 183 - 194.
- LUDLOW, M.M. e G.L. WILSON, 1971. Photosynthesis of tropical pasture plants. I. Illuminance, carbon dioxide concentration leaf temperature, and leaf-air vapour pressure differences. Australian Journal of Biological Science. Melbourne, 24: 449 - 470.
- LUDLOW, M.M. e G.L. WILSON, 1972. Photosynthesis of tropical

- pasture plants. IV. Basis and consequences of differences between grasses and legumes. Australian Journal of Biological Science. Melbourne, 25: 1133 - 1145.
- LUDLOW, M.M., G.L. WILSON e M.R. HESLEHURST, 1974. Studies on the productivity of tropical pasture plants. V. Effect of shading on growth, photosynthesis and respiration in two grasses and two legumes. Australian Journal of Agricultural Research. Melbourne, 25: 425 - 433.
- LUDWIG, L.J. e D.T. CANVIN, 1971. An open gas-exchange system for the simultaneous measurement of the CO_2 and $^{14}\text{CO}_2$ fluxes from leaves. Canadian Journal of Botany. Ottawa, 49: 1299 - 1313.
- LUSH, W.M. e L.T. EVANS, 1974. Translocation of photosynthetic assimilate from grass leaves, as influenced by environment and species. Australian Journal of Plant Physiology, Melbourne, 1: 417 - 432.
- MAGALHÃES, A.C. e J.C. MONTÓJOS, 1971. Effect of solar radiation on the growth parameters and yield of two varieties of common beans (Phaseolus vulgaris L.). Turrialba, Costa Rica, 21: 165 - 168.
- MANGAT, B.S., W.B. LEVIN, e R.G.S. BIDWELL, 1974. The extent of dark respiration in illuminated leaves and its control by ATP levels. Canadian Journal of Botany. Ottawa, 52: 673 - 681.
- MCCARTY, R.E. e A.T. JAGENDORF, 1965. Chloroplast damage due to enzymatic hydrolysis of endogenous lipids. Plant Physiology. Lancaster, 40: 725 - 735.
- MCCLOUD, D.E., 1975. Man and his food. Agronomy Journal. Madison, 67: 1 - 3. (Presidential Address).
- MCCREE, K.J., 1972. Test of current definitions of photosynthetically active radiation against leaf photosynthesis data. Agricultural Meteorology. Amsterdam, 10: 443 - 453.

- McCREE, K.J., 1974. Equations for the rate of dark respiration of white clover and grain sorghum, as functions of dry weight, photosynthetic rate and temperature. Crop Science. Madison, 14: 509 - 514.
- McPHERSON, H.G. e R.O. SLATYER, 1973. Mechanisms regulating photosynthesis in *Pennisetum typhoides*. Australian Journal of Agricultural Research. Melbourne, 26: 329 - 339.
- MEIDNER, H., 1969. "Rate limiting" resistances and photosynthesis. Nature. London, 222: 876 - 877.
- MENS, K.M., D.N. MOSS, R.Q. CANNELL e W.A. BRUN, 1969. Screening for photosynthetic efficiency. Crop Science. Madison, 9: 692 - 694.
- MILLAR, A.A. e W.R. 1972. Effect of the soil and plant water potentials on the dry matter production of snap beans. Agronomy Journal. Madison, 64: 559 - 562.
- MONSI, M., Z. UCHIJIMA e T. OIKAWA, 1973. Structure of foliage canopies and photosynthesis. Annual Review of Ecology and Systematics. 4: 301 - 327.
- MONTEITH, J.L., 1976. How efficient is crop photosynthesis. In: Simposio Internacional de Bioconversão de Energia, Campinas, SP (julho/76). 13 p. (mimeografado).
- MOONEY, H.A., 1972. Carbon dioxide exchange of plants in natural environments. Botanical Review, Lancaster, 38: 455 - 469.
- MOONEY, H.A. A.T. HARRISON, 1970. The influence of conditioning temperature on subsequent temperature-related photosynthetic capacity in higher plants. In: Prediction and measurement of photosynthetic productivity (Proc. IBP/PP Technical Meeting, Trebon, 1969), PUDOC, Wageningen. p: 411 - 417.
- MOSJIDIS Ch., J., 1976. Distribucion de la materia seca en-

- tre los organos aereos de varios cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Asociacion Latinoamericana, 11: 29 - 33.
- MOSS, D.N. e R.B. MUSGRAVE, 1971. Photosynthesis and crop production. Advances in Agronomy, New York, 23: 317 - 336.
- NAFZIGER, E.D. e H.R. KOLLER, 1976. Influence of leaf starch concentration on CO₂ assimilation in soybean. Plant Physiology, Lancaster, 57: 560 - 563.
- NAYLOR, D.G. e I.D. TEARE, 1975. An improved, rapid, field method to measure photosynthesis with ¹⁴CO₂. Agronomy Journal, Madison, 67: 404 - 406.
- NDAWULA-SENYIMBA, M.S., 1972. Estimation of leaf area of trifoliolate legumes using non-destructive linear measurements. East African Agricultural and Forestry Journal, Nairobi, 37: 192 - 196.
- NEALES, T.F. e L.D. INCOLL, 1968. The control of leaf photosynthesis rate by the level of assimilate concentration in leaf: a review of hypothesis. Botanical Review, Lancaster, 34: 107 - 125.
- NEALES, T.F., K.J. TREHARNE e P.F. WAREING, 1971. A relationship between net photosynthesis, diffusive resistance, and carboxylating enzyme activity in bean leaves. In: HATCH, M.D., C.B. OSMOND, e R.O. SLATYER (ed.). Photosynthesis and Photorespiration. New York, Wiley Interscience. p: 89 - 96.
- NELSON, C.J., K.H. ASAY, G.L. HORST e E.S. HILDEBRAND, 1974. Field measurement of photosynthesis in a forage grass breeding program. Crop Science, Madison, 14: 26 - 28.
- NELSON, C.J., K.J. ASAY e G.L. HORST, 1975-a. Relationship of leaf photosynthesis to forage yield of tall fescue. Crop Science, Madison, 15: 476 - 478.

- NELSON, C.J., K.H. ASAY e L.D. PATTON, 1975-b. Photosynthetic response of tall fescue to selection for longevity below CO_2 compensation point. Crop Science. Madison, 15:629-633.
- NOBEL, P.S., 1969. Light induced changes in the ionic content of chloroplasts in *Pisum sativum*. Biochimica et Biophysica Acta. Amsterdam, 172: 134 - 143.
- ORMROD, D.P., 1964. Net carbon dioxide exchange rates in *Phaseolus vulgaris* L. as influenced by temperature, light intensity, leaf area index, and age of plant. Canadian Journal of Botany. Ottawa, 42: 393 - 401.
- OSMOND, C.B. e O. BJORKMAN, 1972. Effects of O_2 on photosynthesis. Simultaneous measurements of oxygen effects on net photosynthesis and glycolate metabolism in C_3 and C_4 species of *Atriplex*. Carnegie Institute Washington Yearbook. Washington, 71: 141 - 148.
- OZBUN, J.L., R.J. VOLK e W.A. JACKSON, 1964. Effects of light and darkness on gaseous exchange of bean leaves. Plant Physiology. Lancaster, 39: 523 - 527.
- PALLAS Jr., J.E., 1973. Diurnal changes and daily photosynthetic rate of several plants. Crop Science. Madison, 13: 82 - 84.
- PARKINSON, K.J., H.L. PENNAM e E.B. TREGUNNA, 1974. Growth of plants in different oxygen concentrations. Journal of Experimental Botany. Oxford, 25: 132 - 146.
- PAULSEN, J.M. e M.D. LANE, 1966. Spinach ribulose diphosphate carboxylase. I. Purification and properties of the enzyme. Biochemistry. Washington, 5: 2350 - 2357.
- PEARCE, R.B., R.H. BROWN e R.E. BLASER, 1968. Photosynthesis of alfalfa leaves as influenced by age and environment. Crop Science. Madison, 8: 677 - 680.
- PENNING de VRIES, F.W.T., 1974. Substrate utilization and

respiration in relation to growth and maintenance in higher plants. Netherlands Journal of Agricultural Science. Amsterdam, 22: 40 - 44.

PENNING de VRIES, F.W.T., 1975. The cost of maintenance processes in plant cells. Annals of Botany. London, 39: 77 - 92.

PENNY, P. e C.D. NELSON, 1970. Movement within leaves and plants of ^{14}C applied as $^{14}\text{CO}_2$. Canadian Journal of Botany. Ottawa, 48: 1033 - 1037.

PETERSON, L.W. e R.C. HUFFAKER, 1975. Loss of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase and increase in proteolytic activity during senescence of detached primary barley leaves. Plant Physiology. Lancaster, 55: 1009 - 1015.

PETERSON, L.W., G.E. KLEINKOPF e R.C. HUFFAKER, 1973. Evidence of lack of turnover of Ribulose 1,5-diphosphate carboxylase in barley leaves. Plant Physiology. Lancaster, 51: 1042 - 1045.

PICKETT, J.M., 1971. Photosynthetic enhancement at high light intensities. Plant Physiology. Lancaster, 48: 265 - 266.

PIMENTEL GOMES, F., 1973. Curso de Estatística Experimental. 5ª ed. Piracicaba, ESALQ/USP - Livraria Nobel. 430 p.

PLAUT, Z. e M. GIBBS, 1970. Glycolate formation in intact spinach chloroplasts. Plant Physiology. Lancaster, 45: 470 - 474.

PLAUT, Z. e L. REINHOLD, 1969. Concomitant photosynthesis implicated in the light effect on translocation in bean plants. Australian Journal of Biological Science. Melbourne, 22: 1105 - 1111.

POINCELOT, R.P. e P.R. DAY, 1976. Isolation and bicarbonate transport of chloroplast envelope membranes from species of differing net photosynthetic efficiency. Plant Physiology. Lancaster, 57: 334 - 338.

- QUEBEDEAUX, B. e R.W.F. HARDY, 1973. Oxygen as a new factor controlling reproductive growth. Nature. London, 243: 477 - 479.
- QUEBEDEAUX, B. e R.W.F. HARDY, 1975. Reproductive growth and dry matter production of *Glycine max* (L.) Merr. in response to oxygen concentration. Plant Physiology. Lancaster, 55: 102 - 107.
- RABINOVITCH, E. e GOVINDJEE, 1969. Photosynthesis. New York, John Willey & Sons, Inc. 273 p.
- RAWSON, H.M. e C. HACKETT, 1974. An exploration of the economy of the tobacco plant. III. Gas exchange of leaves in relation to position on the stem, ontogeny and nitrogen content. Australian Journal of Plant Physiology. Melbourne, 1: 551 - 560.
- RYLE, G.J.A. e C.E. POWELL, 1974. The utilization of recently assimilated carbon in graminaceous plants. Annals of Applied Biology. Cambridge, 77: 145 - 148.
- RYLE, G.J.A., J.M. COBBY e C.E. POWELL, 1976. Synthetic and maintenance respiratory losses of $^{14}\text{CO}_2$ in unculm barley and maize. Annals of Botany. London, 40: 571 - 586.
- SALE, P.J.M., 1975. Productivity of vegetable in a region of high solar input. IV. Field chamber measurements of French beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and cabbages (*Brassica oleracea* L.). Australian Journal of Plant Physiology. Melbourne, 2: 461 - 470.
- SALIN, M.L. e P.H. HOMANN, 1971. Changes in photorespiratory activity with leaf age. Plant Physiology. Lancaster, 48: 193 - 196.
- SAWADA, S. e S. MIYACHI, 1974-a. Effects of growth temperatures on photosynthetic carbon metabolism in green plants. I. Photosynthetic activities of various plants acclimatized to different temperatures. Plant and Cell Physiology. Tokyo, 15: 111 - 120.

- SAWADA, S. e S. MIYACHI, 1974-b. Effects of growth temperatures on photosynthetic carbon metabolism in green plants. II. Photosynthetic $^{14}\text{CO}_2$ incorporation in the leaves of plants acclimatized to different temperatures. Plant and Cell Physiology. Tokyo, 15: 225 - 238.
- SAWADA, S. H. MATSUSHIMA e S. MIYACHI, 1974. Effects of growth temperature on photosynthetic carbon metabolism in green plants. III. Differences in structure, photosynthetic activities of ribulose diphosphate carboxylase and glycollate oxidase in leaves of wheat grown under varied temperatures. Plant and Cell Physiology. Tokyo, 15: 239 - 248.
- SESTAK, Z., J. CATSKY e P.G. JARVIS, 1971. Plant photosynthetic production - Manual of methods. The Hague, W. Jung, N.V. 762 p.
- SHAIN, Y. e M. GIBBS, 1971, Formation of glycollate by a reconstituted spinach chloroplast preparation. Plant Physiology. Lancaster, 48: 325 - 330.
- SHIMSHI, D., 1969. A rapid field method for measuring photosynthesis with labelled carbon dioxide. Journal of Experimental Botany. Oxford, 30: 381 - 401.
- SINCLAIR, T.R. e C.T. DeWIT, 1975. Photosynthate and nitrogen requirements for seed production by various crops. Science. Washington, 189: 565 - 567.
- SINCLAIR, T.R., M.M. SCREIBER e R.M. HOFFER, 1973. Diffuse reflectance hypothesis for the pathway of solar radiation through leaves. Agronomy Journal. Madison, 65: 276-283.
- SINGH, M., W.L. OGREN e J.M. WIDHOLM, 1974. Photosynthetic characteristics of several C_3 and C_4 plant species grown under different light intensities. Crop Science. Madison, 14: 563 - 566.
- SINHA, S.K. e R. KHANNA, 1975. Physiological, biochemical, and genetic basis of heterosis. Advances in Agronomy.

New York, 27: 123 - 173.

SONDHAL, M.R., 1974. Incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ em folhas intactas de cafeeiro. Piracicaba, ESALQ/USP. 70 p. (Dissertação de mestrado).

SONDHAL, M.R. e O.J. CROCOMO, 1974. Medida da eficiência fotossintética em cafeeiro utilizando $^{14}\text{CO}_2$. Arquivos de Biologia e Tecnologia. Curitiba, 17: 11 - 23.

SONDHAL, M.R., O.J. CROCOMO e L. SODEK, 1976. Measurements of ^{14}C incorporation by illuminated intact leaves of coffee plants from gas mixtures containing $^{14}\text{CO}_2$. Journal of Experimental Botany. Oxford, 27: 1187 - 1195.

SPRAGUE, G.F., 1969. Germ plasm manipulation in the future. In: EASTIN, J.D., F.A. HASKINS, C.Y. SULLIVAN e C.H.M. VanBAVEL (ed.), Physiological aspects of crop yield. Madison, American Society of Agronomy and Crop Science Society of America. p: 375 - 387.

STEWART, F.C., G.H. CRAVEN, S.P.R. WEERASINGHE e R.G.S. BIDWELL, 1971. Effects of prior environmental conditions on the subsequent uptake and release of carbon dioxide in the light. Canadian Journal of Botany. Ottawa, 49 : 1999 - 2007.

STOY, V., 1969. Interrelationship among photosynthesis, respiration and movement of carbon in developing crops. In : EASTIN, J.D., F.A. HASKIN, C.Y. SULLIVAN e C.H.M. Van BAVEL, (ed.). Physiological aspects of crop yield. Madison, American Society of Agronomy and Crop Science Society of America. p: 185 - 202.

STREBEYKO, P., 1967. Rapid method for measuring photosynthetic rate using $^{14}\text{CO}_2$. Photosynthetica. Prague, 1: 45 - 49.

SUGIYAMA, T., N. NAKAYAMA e T. AKAZAWA, 1968. Structure and function of chloroplast proteins. V. Homotropic effect of

- bicarbonate in RuDP carboxylase reaction and the mechanism of activation by magnesium ions. Archives of Biochemistry and Biophysics. New York, 126: 737 - 745.
- SZEICZ, G., 1974. Solar radiation for plant growth. Journal of Applied Ecology, 11: 617 - 626.
- TAKABE, T. e T. AKAZAWA, 1975. Molecular evolution of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase. Plant and Cell Physiology. Tokyo, 16: 1049 - 1060.
- TERRY, N., 1976. Effects of sulfur on the photosynthesis of intact leaves and isolated chloroplasts of sugar beets. Plant Physiology. Lancaster, 57: 477 - 479.
- THORNE, J.H. e H.R. KOLLER, 1974. Influence of assimilate demand on photosynthesis, diffusive resistances, translocation, and carbohydrate levels of soybean leaves. Plant Physiology. Lancaster, 54: 201 - 207.
- TREBST, A., 1974. Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts. Annual Review of Plant Physiology. Stanford, 25: 423 - 458.
- TREHARNE, K.J., 1972. Biochemical limitations to photosynthetic rates. In: REES, A.R., K.E. COCKSHULL, D.W. HAND e R. G. HURD (ed.), Crop processes in controlled environments. London, Academic Press. p: 285 - 303.
- TREHARNE, K.J. e J.P. COOPER, 1969. Effect of temperature on the activity of carboxylating in tropical and temperate gramineae. Journal of Experimental Botany. Oxford, 20: 170 - 175.
- TRENBATH, B.R. e J.F. ANGUS, 1975. Leaf inclination and crop production. Field Crop Abstracts. Aberystwyth, 28: 231 - 244.
- TROUGHTON, J.H., 1969. Plant water status and carbon dioxide exchange of cotton leaves. Australian Journal of Biological Science. Melbourne, 22: 289 - 302.

- TULMANN NETO, A., 1975. Contribuição ao melhoramento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) visando aumentar a quantidade e melhorar a qualidade da proteína. Piracicaba, ESALQ/USP. (tese de doutoramento)
- TURNER, W.B. e R.G.S. BIDWELL, 1965. Rates of photosynthesis in attached and the detached bean leaves, and the effect of spraying with indoleacetic acid solution. Plant Physiology. Lancaster, 40: 446 - 451.
- UPMEYER, O.J. e H.R. KOLLER, 1973. Diurnal trends in net photosynthetic rates and carbohydrate levels of soybean leaves. Plant Physiology. Lancaster, 51: 871 - 874.
- VIVEKANANDAN, A.S., H.P.S. GUNASENA e T. SIVANAYAGAM, 1972. Statistical evaluation of the accuracy of three techniques used in the estimation of leaf area of crop plants.
- WALKER, D.A., 1973-a. Some characteristics of a primary carboxylating mechanism. In: Plant carbohydrate biochemistry. New York, Academic. p: 7 - 26.
- WALKER, D.A., 1973-b. Photosynthetic induction phenomena and the light activation of ribulose diphosphate carboxylase. New Phytologist. London, 72: 209 - 235.
- WALLACE, D.H. e H.M. MUNGER, 1965. Studies of physiological basis for crop yield differences. I. Growth analysis of dry beans varieties. Crop Science. Madison, 5: 343-348.
- WAREING, P.F., M.M. KHALIFA e J.J. TREHARNE, 1968. Rate-limiting processes in photosynthesis at saturating light intensities. Nature. London, 220: 453 - 457.
- WATANABE, I., 1976. Mechanism of varietal differences in photosynthetic rate of soybean leaves. I. Correlation between photosynthetic rates and some chloroplasts characteristics. Proceedings Crop Science Society Japanese. Tokyo, 42: 377 - 386.

- WATSCHKE, T.L., R.E. SCHMIDT, E. CARSON e R.E. BLASER, 1972. Some metabolic phenomena of kentucky bluegrass under high temperatures. Crop Science. Madison, 12: 87 - 90.
- WHITTINGHAM, C.P., 1974. The mechanism of photosynthesis. London, Edward Arnold Publishers. 125 p.
- WIDHOLM, J.M. e W.L. OGREN, 1969. Photorespiratory-induced senescence of plants under conditions of low carbon dioxide. Proceedings of National Academy of Science USA. Washington, 63: 668 - 673.
- WIEN, H.C. e D.H. WALLACE, 1973. Light-induced leaflet orientation in *Phaseolus vulgaris* L. Crop Science. Madison, 13: 721 - 724.
- WILDMAN, S.G., C.C. CHEO e J. BONNER, 1949. The proteins of green leaves III. Evidence of formation of tobacco mosaic virus protein at the expense of a main protein component of tobacco leaf cytoplasm. Journal of Biological Chemistry. Baltimore, 180: 985 - 1001.
- WILSON, D. e J.P. COOPER, 1969. Diallel analysis of photosynthetic rate and related leaf characters among contrasting genotypes of *Lolium perenne*. Heredity, Edimburg, 24 : 633 - 649.
- WITTWER, S.H., 1974. Maximum production capacity of food crops. Bioscience. Washington, 24: 216 - 224.
- XAVIER, F.E., M.MAESTRI, C. VIEIRA e L.N. BASTOS, 1976. Análise de crescimento de quatro cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em duas épocas de plantio em Viçosa, Minas Gerais. VI Reunião da Sociedade Latinoamericana de Fisiologia Vegetal. (Campinas S.P.). Resumos, p: 18 - 19.

ZELITCH, I., 197. Photosynthesis, photorespiration and plant productivity. New York, Academic Press Inc. 347 p.

ZELITCH, I., 1973. Plant productivity and the control of photorespiration. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. Washington, Dc. 70: 579 - 584.

ZELITCH, I., 1975-a. Improving the efficiency of photosynthesis. Science, Washington, 188: 626 - 633.

ZELITCH, I., 1975-b. Pathways of carbon fixation in green plants. Annual Review of Biochemistry, Palo Alto, 44: 123 - 145.