

Asimilación de Carbono y Nitrógeno en Hojas de Café¹

J.I. Fahl*, M.L.C. Carelli*, A.C. Magalhães**

ABSTRACT

A greenhouse experiment was carried out to study the effect of leaf age on net photosynthesis rate, *in vivo* nitrate reductase activity, and chlorophyll a, b, protochlorophyll and total nitrogen content of coffee plants (*Coffea arabica* L.). Young plants were cultivated in pots containing a mixture of soil and organic matter. Measurements were made in the first four pairs of leaves of the orthotropic stem, from the apex. The leaves in expansion, around 30 d old, were considered as pair +1; the leaves recently expanded were pair +2, around 45 d old; pairs +3 and +4 were those the following. Photosynthetic rate and nitrate reductase activity were low in pair +1, highest in pair +2, and decreased with age (pairs +3 and +4). Total nitrogen content increased as the leaf expanded, remaining constant in mature leaves. Chlorophyll content showed a similar nitrogen behavior, and the chlorophyll ratio a:b was maintained constant among the studied pairs. Photosynthetic capacity and nitrate reductase activity showed the same pattern of change during coffee leaf ontogeny, suggesting a close relationship between these two processes.

RESUMEN

Se estudió el efecto de la edad de la hoja sobre la tasa fotosintética neta, la actividad *in vivo* de la enzima reductasa de nitrato y el contenido de clorofila a y b, protoclorofila y N total en café (*Coffea arabica* L.). Se cultivaron plantas jóvenes en bolsas de polipropileno, en una mezcla de tierra y materia orgánica, en condiciones de invernadero. Las determinaciones se efectuaron en los cuatro primeros pares de hojas de la rama ortotrópica, contadas a partir del ápice. La tasa de fotosíntesis neta y la actividad de la reductasa de nitrato fueron bajas en las hojas al inicio de la expansión (par +1), que alcanzaron valores máximos en las hojas recientemente expandidas (par +2) y que decayeron posteriormente con la edad (pares +3 y +4). El contenido de N total también aumentó con la expansión de la hoja y permaneció constante en las hojas fisiológicamente más maduras. El comportamiento del contenido de clorofila y de N total fue similar y la relación clorofila a y b se mantuvo constante en los cuatro pares de hojas estudiados. El paralelismo determinado entre la tasa fotosintética y la actividad de la reductasa de nitrato indica la existencia de una interrelación entre los dos procesos y su importancia durante la ontogenia de hojas de plantas de café.

INTRODUCCION

La fotosíntesis foliar puede ser influenciada por muchos factores, algunos propios de la planta tales como edad y la posición de la hoja, el efecto de "sink", el sombraje mutuo, y otros de carácter ambiental como la luz, temperatura, nutrición y disponibilidad de agua (6).

En el nivel celular el contenido de N foliar y la capacidad fotosintética son altamente correlacionados

(11). Esto parece ser consecuencia de las limitaciones de la capacidad fotosintética impuesta por la cantidad de enzimas de carboxilación y el paralelismo entre los niveles de N foliar y de enzimas fotosintéticas (11). Por otro lado, la reductasa de nitrato (RN), clave en la incorporación de N-mineral en compuestos orgánicos (2), depende de los hidratos de carbono producidos en los procesos fotosintéticos.

La edad de las hojas es un factor importante en la capacidad fotosintética. La producción fotosintética aumenta después del inicio de la morfogénesis de la hoja y alcanza el punto máximo cuando la hoja completa su crecimiento y, posteriormente, empieza a declinar. Este comportamiento ha sido observado en numerosas especies, tales como *Pinus* spp. (13), *Perilla frutescens* (15), cacao (1), algodón (6), soja (30) y papaya (20).

La actividad de la reductasa de nitrato (aRN) muestra un modelo similar descrito para la fotosíntesis durante la ontogenia de la hoja (3, 16, 25).

¹ Recibido para publicación el 6 de marzo de 1992.
Trabajo financiado parcialmente con fondos del *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq). Se agradece al Dr. Roberto Antonio Arévalo por su colaboración en la traducción del trabajo.
* Instituto Agronómico de Campinas, Caixa Postal 28, CEP 13001-Campinas, SP, Bra.
** Instituto de Biología, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Bra.

El descenso en la tasa de fotosíntesis neta (Fn), durante el envejecimiento de la hoja, pudo relacionarse con el contenido de clorofila, N total, proteína y actividad de la enzima ribulosa-1.5 difosfato carboxilasa-oxigenasa (22).

La declinación de la aRN con el aumento de la edad en los tejidos guarda correspondencia con la capacidad de síntesis de proteínas (2) y la actividad fotosintética (19).

En plantas de café, como en otras especies, se ha observado previamente que la Fn (9, 28) y la aRN (4, 21) disminuyen con la edad de la hoja. Sin embargo no fueron investigadas las relaciones entre Fn, aRN y el contenido de clorofila y N-total durante el desarrollo de la hoja de café.

El presente trabajo tiene como objetivo verificar los efectos de la edad de la hoja sobre la tasa fotosintética, la actividad de la reductasa de nitrato y el contenido de clorofila y N en plantas jóvenes de café.

MATERIALES Y METODOS

Se usaron semillas de café (*C. arabica* L.) cv. Catuai Vermelho H-2077-2-5-81 de la *Seção de Genética del Instituto Agrônomo de Campinas*- SP- Brasil, germinadas en arena gruesa previamente lavada. Cuando las plantas alcanzaron el estadio vegetativo correspondiente a la apertura de las hojas cotiledonares, fueron trasplantadas en bolsas de polipropileno, que contenían alrededor de dos litros de una mezcla de suelo y material orgánico. Las plántulas se mantuvieron en invernáculo con una disminución del 50% de la luz solar hasta la edad de diez meses. Las determinaciones se efectuaron en los cuatro primeros pares de hojas de la rama ortotrópica, a partir del ápice. Se consideró como hoja +1 aquella en crecimiento, con edad alrededor de 30 días después de haber emergido, una hoja +2 aquella que llegó al crecimiento definitivo, con una edad de 45 días; como hojas +3 y +4, los pares subsecuentes.

La tasa de fotosíntesis neta (Fn) fue determinada por la metodología descrita por Fahl *et al.* (10), mientras se mantuvo la cámara de asimilación del carbono (CAC) en las siguientes condiciones: necesidad de flujo de fotones (DFF) $222 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura $27^\circ\text{C} \pm 0.5$ y velocidad del aire 1.20 cm s^{-1} .

La actividad *in vivo* de la enzima reductasa de nitrato (aRN) fue determinada siguiendo la metodolo-

gía especificada por Carelli *et al.* (5) y los tenores de N-total por el método de microkjeldahl.

Las extracciones de protoclorofila (protoCfla), clorofila a (Cfla a) y clorofila b (Cfla b) se realizaron por la metodología delineada por Koski *et al.* (19) con modificaciones, procurando optimar la técnica para café. Transcurridas 9 h se retiró una hoja en forma separada de cada par, de cuatro plantas diferentes, con el fin de formar cuatro muestras. Seguidamente se seccionaron las hojas y 1.0 g de cada muestra se sumergió en 15 ml de acetona; después se transfirió a un mortero de porcelana y se maceró con arena.

El extracto de acetona se filtró al vacío y se lavó dos veces con 70 ml de acetona; se agregaron 20 ml de éter etílico y la mezcla se colocó en un embudo de reparación con 100 ml de agua destilada. El proceso se repitió dos veces para remover la acetona y la mezcla éter-acetona-pigmentos. La solución de éter-pigmentos se colocó en una probeta y el volumen se completó a 20 ml con éter etílico. Se tomó una alícuota de 1.0 ml; se colocó en un balón volumétrico de 10 ml y se completó el volumen con el mismo solvente. Las lecturas fueron hechas en un espectrofotómetro en 620 nm y 625 nm para la protoCfla; en 660 nm y 665 nm para la Cfla a; en 640 nm y 645 nm para la Cfla b; los valores de la absorbancia se calcularon a 624 nm, 662 nm y 642 nm, por medio de la interpolación armónica (23). Para estimar los valores de protoCfla, Cfla a y Cfla b, fue utilizado el sistema de ecuaciones propuesto por Smith y Benitez (26).

El área foliar (AF) de cada hoja se obtuvo calculando el producto del largo por ancho máximo por factor 0.62. Ese factor fue previamente calculado a través de una submuestra compuesta de hojas por cada par estudiado, con el auxilio de un integrador de área foliar LICOR modelo LI 3000.

La aRN, tenores de Cfla y de N-total se analizaron en los mismos tejidos vegetativos usados para determinar la Fn, con cuatro repeticiones por cada par de hojas, y cada repetición fue en una planta.

RESULTADOS

Las variaciones en la Fn y en la AF de los pares de hojas, colocados a lo largo de la rama ortotrópica de las plantas de café, se representan en las Figs. 1 y 3. Se comprueba que la Fn es baja en las hojas en el inicio de

su crecimiento (par +1) y alcanza valores máximos en las hojas recién expandidas (par +2) y declina posteriormente con la edad (pares +3 y +4). Ese comportamiento fue observado en plantas de café (9, 28).

En la Fig. 2 se determina que los contenidos de Cfla total, Cfla a y Cfla b acompañan el aumento de la Fn que ocurre con la expansión de la hoja (Fig. 1). En las hojas fisiológicamente más maduras (+3 y +4), la concentración de esos pigmentos aumentó levemente, mientras que la Pn empezó a disminuir (Fig. 1). Los contenidos de Cfla a y Cfla b acompañaron los aumentos verificados en las concentraciones de Cfla total y la relación Cfla a: Cfla b se mantuvo constante en los pares de hojas estudiados (Fig. 2). Esos resultados concuerdan con los datos obtenidos por Baker y Hardwich (1) en hojas de plantas de cacao.

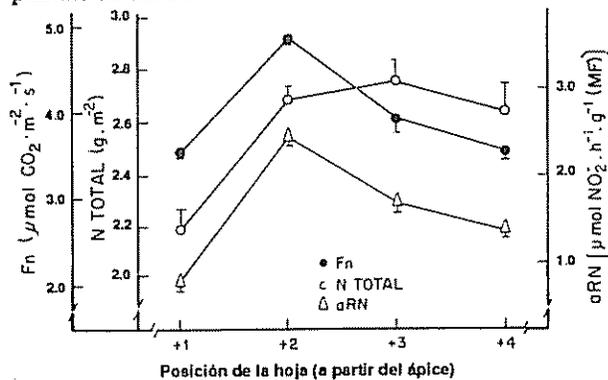


Fig. 1. Tasa fotosintética neta (Fn), actividad *in vivo* de la enzima reductasa de nitrato (aRN) y tenor de nitrógeno total (N-total) en varios pares de hojas de la rama ortotrópica de planta de café (edad 10 meses). Valores medios \pm desviaciones promedio de cuatro repeticiones.

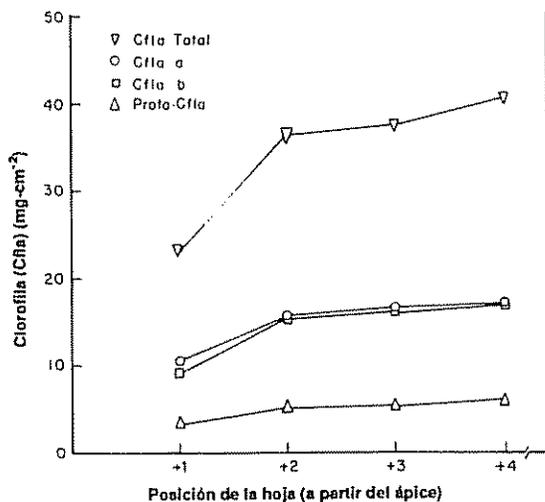


Fig. 2. Contenidos de clorofila total (Cfla total), clorofila b (Cfla b) y protoclorofila (protoCfla) en varios pares de hojas de ramas ortotrópicas de plantas de café (edad 10 meses). Valores medios de cuatro repeticiones. Variaciones de las desviaciones promedio 0.05 mg cm⁻² a 1.67 mg cm⁻².

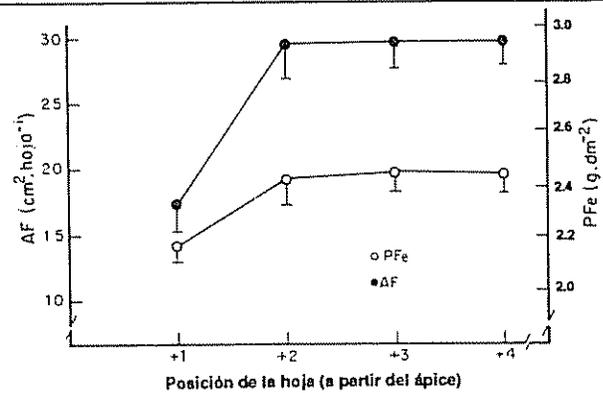


Fig. 3. Area foliar (AF) y peso foliar específico (PFe) de varios pares de hojas de ramas ortotrópicas de plantas de café (10 meses de edad). Valores \pm desviaciones promedio de cuatro repeticiones.

La aRN presentó un patrón idéntico al de la Fn, o sea, aumentó con la expansión de la hoja y en seguida disminuyó (Fig. 1). A su vez, el contenido de N-total también aumentó con la expansión de la hoja y permaneció casi constante en las hojas maduras.

El peso foliar específico (PFe), semejante de la AF, se incrementó con la expansión de la hoja y se mantuvo inalterado en las más viejas.

DISCUSION

El período de crecimiento comprendido entre la emergencia y la expansión total de las hojas, presenta una intensa actividad metabólica, que se manifiesta en un aumento de la fotosíntesis, de las concentraciones de Cfla y N-total, y de la aRN. Un aspecto por destacar es que después de alcanzar la expansión total, las hojas de las plantas de café continuaron acumulando clorofila, aunque en una tasa más lenta. Las plantas de cacao, que como las de café pertenecen a una especie leñosa tropical, presentan la principal síntesis de Cfla después que la hoja ha alcanzado su expansión total (1). Ese patrón de síntesis es bastante diferente del seguido por hojas de especies de clima templado, en las cuales el contenido de Cfla por unidad de área generalmente alcanza el máximo antes de la expansión total de la hoja (1).

Después de lograr la expansión total, las hojas de especies anuales entran en la fase de senectud que se caracteriza por una progresiva disminución de la tasa fotosintética, asociada a una pérdida de Cfla, N-total, proteínas, actividad de rubisco, actividad y compo-

ción de los cloroplastos y conductancia de CO₂ (7, 12, 14, 29, 30). En plantas de soja, Wittenbach *et al.* (30) verificaron que las pérdidas de Cfla y de N-total en las hojas estaban estrechamente relacionadas con la declinación de la fotosíntesis y sugirieron que eran los primeros síntomas de senectud.

En plantas de café, los resultados mostraron que el inicio del declive de la tasa de Pn no iba acompañada por caídas en las concentraciones de Cfla y de N-total; al contrario, esas concentraciones continuaron aumentando, aunque levemente. La duración del período de decadencia gradual de la fotosíntesis varía entre las especies, ya que puede abarcar pocas semanas, como en soja y cebada, meses o años, como en *Phoenix dactylifera* (17). Como el café es una especie perenne, sería poco probable que las hojas después de alcanzar la expansión total (+3 y +4) entrasen en un proceso acentuado de senectud. La conservación del peso foliar específico y los contenidos de Cfla y de N-total de las hojas maduras de plantas de café muestran que, aparentemente, no hubo movilización de compuestos de N y C hacia las partes vegetativas en crecimiento, característica del proceso de senectud (30).

La rubisco, que es la enzima carboxilativa en plantas C₃, representa alrededor del 20% del N-total de las hojas (8); cantidad que permaneció casi constante después de la expansión foliar. Por otra parte, la aRN, limitante en la incorporación del N-mineral en compuestos orgánicos (2), acompañó el decrecimiento observado en la Fn de hojas fisiológicamente maduras.

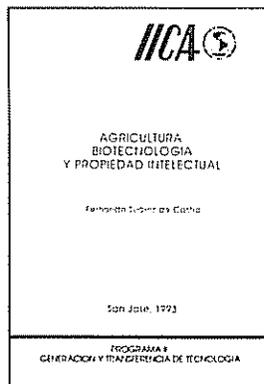
La aRN depende de la capacidad de los tejidos para sintetizar proteína (27) y del proceso fotosintético, ya sea a través del suministro de energía y de los esqueletos de C provenientes de la oxidación de los fotosintatos o directamente de las reacciones fotoquímicas de los cloroplastos (24). La semejanza entre las curvas de la fotosíntesis y de la reducción de nitratos indica una interrelación entre esos dos procesos y su importancia durante la ontogenia de las hojas de las plantas de café.

LITERATURA CITADA

1. BAKER, M.R.; HARDWICH, K. 1973. Biochemical and physiological aspects of leaf development in cocoa (*Theobroma cacao*). *New Phytologist* 72:1315-1324.
2. BEEVERS, L.; HAGEMAN, R.H. 1969. Nitrate reduction in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 20:495-522.
3. CARELLI, M.L.C.; MAGALHÃES, A.C. 1981. Development of nitrate reductase activity in green tissues of soybean seedlings (*Glycine max* L. Merr.). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 104:17-24.
4. CARELLI, M.L.C. 1987. Estudo do processo de redução de nitrato durante o desenvolvimento inicial e no estágio reproductivo de plantas de café (*Coffea arabica* L.). Tesis Ph.D, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, SP, Bra. 111 p.
5. CARELLI, M.L.C.; FAHL, J.I.; MAGALHÃES, A.C. 1990. Atividade da redutase de nitrato em folhas e raízes de plantas de café (*Coffea arabica* L.). *Revista Brasileira de Botânica* 13:119-123.
6. CONSTABLE, G.A.; RAWSON, H.M. 1990. Effect of leaf position expansion and age on photosynthesis, transpiration and water use efficiency of cotton. *Australian Journal of Plant Physiology* 7:89-100.
7. DAVIS, S.D.; McCREE, K.J. 1978. Photosynthetic rate and diffusion conductance as a function of age in leaves of bean plants. *Crop Science* 18:280-282.
8. EVANS, J.R.; SEEMANN, J.R. 1984. Differences between wheat genotypes in specific activity of RuBP carboxylase and the relationship to photosynthesis. *Plant Physiology* 74:759-765.
9. FAHL, J.I.; CARELLI, M.L.C. 1984. Efeitos da idade da folha e níveis de radiação sobre a taxa de fotossíntese aparente de plantas de café (*Coffea arabica* L.). In Congresso Brasileiro de Pesquisas Caffeiras (11., 1984, Londrina, PR, Bra.). Anais. Rio de Janeiro, RJ, Bra., Ministério da Indústria e Comércio, IBC, GERCA p. 220-203.
10. FAHL, J.I.; CARELLI, M.L.C.; MAGALHÃES, A.C. 1991. Medidas da fotossíntese líquida em folhas intactas de plantas de café por cromatografia a gás. *Revista Brasileira de Botânica* (Aceito para publicação).
11. FIELD, C. 1983. Allocating leaf nitrogen for the maximization of carbon gain: Leaf age as a control on the allocation program. *Oecologia* 56:341-347.
12. FORD, D.M.; SHIBLES, R. 1988. Photosynthesis and other traits in relation to chloroplast number during soybean leaf senescence. *Plant Physiology* 86:108-111.
13. FREELAND, R.O. 1952. Effects of age of leaves upon the rate of photosynthesis in some conifers. *Plant Physiology* 27:685-690.
14. FRIEDRICH, H.W.; HUFFAKER, R.C. 1980. Photosynthesis, leaf resistances and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase degradation in senescing barley leaves. *Plant Physiology* 65:1103-1107.
15. HARDWICH, K.; WOOD, M.; WOOLHOUSE, H.W. 1968. Photosynthesis and respiration in relation to leaf age in *Perilla frutescens* (L.). *Brit. New Phytologist* 67:79-86.
16. HARPER, J.E.; HAGEMAN, R.H. 1972. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybeans (*Glycine max* L. Merr.). *Plant Physiology* 49:146-154.
17. HOPKINSON, J.M. 1964. Studies on the expansion of the leaf surface. IV. The carbon and phosphorus economy of a leaf. *Journal of Experimental Botany* 15:125-137.

18. KANNANGARA, C.G.; WOOLHOUSE, H.W. 1967. The role of carbon dioxide, light and nitrate in the synthesis and degradation of nitrate reductase in leaves of *Perilla frutescens*. *New Phytologist* 66:553-561.
19. KOSKI, V.M.; GREINCH, C.S.; SMITH, J.H.C. 1951. The action spectrum for the transformation of protochlorophyll to chlorophyll a in normal and albino corn seedlings. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 208:466-486.
20. LIN, Z.F.; EHLERINGER, J. 1982. Effects of leaf age on photosynthesis and water efficiency of papaya. *Photosynthetica* 16:514-519.
21. MEGURO, N.E.; MAGALHÃES, A.C. 1982. Atividade da reductase de nitrato em cultivares de café. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 17:1725-1731.
22. OLESINSKI, A.A.; WOLF, S.; RUDICH, J.; MARANI, A. 1989. Effect of leaf age and shading on photosynthesis in potatoes (*Solanum tuberosum*). *Annals of Botany* 64:643-650.
23. PIMENTEL GOMES, F. 1984. A estatística moderna da pesquisa agropecuária. Piracicaba, POTAFOS. 160 p.
24. SCHRADER, L.E.; THOMAS, R.J. 1981. Nitrate uptake, reduction and transport in whole plant. In Nitrogen and carbon metabolism. J.D. Bewley (Ed.) The Hague, Martinus Nijhoff. p. 49-93.
25. SRIVASTAVA, H.S. 1980. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. *Review Phytochemistry* 19:725-733.
26. SMITH, J.M.C.; BENITEZ, A. 1955. Chlorophyll: Analysis in plant materials. In *Modern methods of plant analysis*. K. Paech, M.V. Travey (Eds.). Berlin, Springer-Verlag. p. 142-196.
27. TRAVIS, R.L.; KEY, J.L. 1934? Correlation between polyribosome level and the ability to induce nitrate reductase in darkgrown corn seedlings. *Plant Physiology* 48:617-620.
28. YAMAGUCHI, T.; FRIEND, D.J.C. 1979. Effects of leaf age and irradiance on photosynthesis of *Coffea arabica*. *Photosynthetica* 13:272-278.
29. WITTENBACH, V.A. 1979. Ribulose biphosphate carboxilase and proteolytic activity in wheat leaves from anthesis through senescence. *Plant Physiology* 64:884-887.
30. WITTENBACH, V.A.; ACKERSON, R.C.; GIAQUINTA, F.T.; HERBERT, R.R. 1980. Changes in photosynthesis, ribulose biphosphate carboxilase, proteolytic activity, and ultrastructure of soybean leaves during senescence. *Crop Science* 20:225-231.

LIBRO RECOMENDADO



Agricultura, Biotecnología y Propiedad Intelectual. Fernando Suárez de Castro. Programa II. 136 p. Serie Publicaciones Misceláneas (ISSN 0534-5391) AI/SC-93-05.

Importante contribución a la protección de las innovaciones tecnológicas. Se discute ampliamente el desarrollo, su relevancia actual y el potencial de las nuevas agrobiotecnologías. Además enfoca los aspectos técnicos y legales de la evolución de estas tecnologías.

US\$6.00

Ver lista de publicaciones disponibles para la venta y boleta de solicitud en la última sección de la revista Turrialba.