

**SAMUEL CORDEIRO VITOR MARTINS**

**LIMITAÇÕES E POTENCIALIDADES DA FOTOSSÍNTESE NO CAFEIEIRO EM  
FUNÇÃO DA IRRADIÂNCIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011

**SAMUEL CORDEIRO VITOR MARTINS**

**LIMITAÇÕES E POTENCIALIDADES DA FOTOSÍNTESE NO CAFEIEIRO EM  
FUNÇÃO DA IRRADIÂNCIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 16 de fevereiro de 2011.

---

Prof. Agnaldo Rodrigues de Melo Chaves

---

Prof. Raimundo Santos Barros

---

Prof. Fábio Murilo DaMatta

Orientador

*Aos meus pais, Vacvenus e Vânia,*

*Por todo o amor, carinho, dedicação,  
exemplo, incentivo e por nunca  
medirem esforços e sacrifícios para a  
realização dos meus sonhos.*

*À minha esposa Karina,*

*Pelo amor, carinho, paciência,  
compreensão e companheirismo. Por  
ser parte da minha vida agora e  
sempre.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

A Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Biologia Vegetal e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, por todo suporte, auxílio e também pela oportunidade.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Fábio, pelo exemplo, incentivo, orientação, amizade e empenho em sempre me fazer um profissional e pessoa melhor.

Aos meus familiares, e em especial ao meu avô Valdivino (*in memoriam*), minha madrinha Vani e meu tio Válquer, por todo o incentivo nos estudos e por serem os melhores exemplos que eu poderia ter.

Aos meus grandes amigos em Cristalina, por terem contribuído para a formação do meu caráter e senso crítico, em especial ao amigo Ricardo; se não fosse por ele, seria muito difícil estar aqui hoje.

Aos Professores Raimundo Barros e Agnaldo Chaves, pela participação na banca da dissertação, sugestões e críticas. Agradecimento especial ao Professor Raimundo, pela atenção sempre dedicada e pelas divertidas brincadeiras.

A todos os professores do curso de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos, amizade e paciência com todas as minhas perguntas.

Aos integrantes, ex-integrantes e amigos do grupo café: Wagner, Ângela, Karine, , Elaine, Fábio Vilella, Marcelo, Álvaro, Ricardo, Ziley, Roberto PCI, Fábio Baiano, Diego, Nelson, Paulo Eduardo, Mariela, Aline, Alice, Leandro, Yesid, Lílian, Medina, Josimar, Lucas, Gustavo e Kelly, pela agradável convivência e por serem minha família aqui em Viçosa. Ao grande amigo Paulo Cavatte, por ter se tornado um valioso amigo em todos esses anos de convivência e por toda a paciência com a minha teimosia durante nossas discussões, que muito contribuíram e contribuem para o meu conhecimento.

Aos amigos da república “Bombrilândia”, por todas as gargalhadas durante nossa estadia juntos em Viçosa.

Aos funcionários e velhos amigos da Fisiologia: Werner, Danilo, Dani, Eduardo, Rose, Carol, Clenilso, Flancer, Rafael Calçado, Luciene, Tânia, Izabel, Marcel, Valdir e Adriana, Rogério Gomide, João Bosco, Geraldo Marreco, Carlos Raimundo, Zé Antônio, Osvaldo, Reginaldo e Toninho. Em especial à Mercês, por todo o carinho.

A todos aqueles que contribuíram para realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## ÍNDICE

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	6
3. RESULTADOS	14
4. DISCUSSÃO	29
5. CONCLUSÃO	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- $A$  = taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$
- $A^*$  = taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  na ausência de limitação estomática
- $A_g$  = taxa de fotossíntese bruta aparente
- $A_{g^*}$  = taxa de fotossíntese bruta real
- $A/g_s$  = eficiência intrínseca do uso da água
- AFE = área foliar específica
- Car = carotenóides totais
- CCLII = complexo coletor de luz
- Chl  $a$  e  $b$  = clorofilas  $a$  e  $b$
- $C_c$  = concentração cloroplastídica de  $\text{CO}_2$
- $C_i$  = concentração intercelular de  $\text{CO}_2$
- $C_i^*$  = ponto de fotocompensação luminoso na ausência de respiração em nível intercelular
- DE = densidade estomática
- $D_v$  = densidade de venação
- $E_N$  = eficiência fotossintética do uso do nitrogênio
- EI = estado de indução fotossintético
- $F_0$  = fluorescência inicial
- $F_m$  = fluorescência máxima
- FSII = fotossistema II
- $F_v$  = fluorescência variável
- $F_v/F_m$  = eficiência fotoquímica máxima do FSII
- $F_v'/F_m'$  = eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII
- $g_m$  = condutância mesofílica
- $g_s$  = condutância estomática
- IE = índice estomático
- $J_{\max}$  = taxa máxima de transporte de elétrons
- LB = limitações bioquímicas
- LE = limitações estomáticas
- LM = limitações mesofílicas
- LT = limitações totais

$K_L$  = condutância hidráulica foliar  
 NPQ = coeficiente de extinção não-fotoquímico  
 $P_b$  = fração de N em componentes da cadeia de transporte de elétrons  
 $P_l$  = fração de N em pigmentos envolvidos na captura de luz e proteínas associadas  
 $P_r$  = fração de N em Rubisco  
 $P_s$  = fração de N em componentes estruturais  
 $q_L$  = coeficiente de extinção fotoquímico  
 RFA = radiação fotossinteticamente ativa  
 $R_L$  = taxa de respiração na luz  
 $R_d$  = taxa de respiração no escuro  
 $R_p$  = fotorrespiração  
 $S$  = fator de especificidade real da Rubisco  
 $S^*$  = fator de especificidade aparente da Rubisco  
 $S_{C/O}$  = fator de especificidade da Rubisco calculado  
 TTE = taxa de transporte de elétrons  
 $TTE_C$  = taxa de transporte de elétrons associada à carboxilação  
 $TTE_O$  = taxa de transporte de elétrons associada à oxigenação  
 $V_{cmax}$  = velocidade máxima de carboxilação  
 $Y(II)$  = rendimento do FSII  
 $Y(NO)$  = rendimento da dissipação constitutiva de energia e da própria fluorescência  
 $Y(NPQ)$  = rendimento da dissipação regulada de energia associada ao ciclo das xantofilas  
 $\Phi_{CO_2}$  = rendimento quântico da assimilação de  $CO_2$   
 $\Phi_{FSII}$  = rendimento quântico do transporte de elétrons  
 $\Gamma^*$  = ponto de fotocompensação luminoso na ausência de respiração em nível cloroplastídico



## RESUMO

MARTINS, Samuel Cordeiro Vitor, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Limitações e potencialidades da fotossíntese no cafeeiro em função da irradiância.** Orientador: Fábio Murilo DaMatta. Coorientadores: Adriano Nunes Nesi e Marília Contin Ventrella.

O presente estudo foi conduzido procurando-se analisar as contribuições das limitações hidráulicas, difusivas (estomática e mesofílica) e bioquímicas à fotossíntese do cafeeiro, a partição do nitrogênio dentro da maquinaria fotossintética e a ativação desta maquinaria em resposta à irradiância. Para tal, plantas de café arábica (*Coffea arabica* L.) foram cultivadas em vasos durante 12 meses, sob duas intensidades lumínicas (0 e 90% de sombreamento). Comparadas com as plantas de sol, as plantas à sombra exibiram maiores área foliar específica (63%), concentrações (em base de massa) de clorofilas (76%), carotenóides (62%) e de nitrogênio (N) (15%), como também maior razão clorofilas/N (53%); em contraste, as plantas sombreadas exibiram menores densidade estomática (32%), índice estomático (20%), densidade de venação (27%), condutâncias estomática (27%) e mesofílica (37%) e concentração de N em base de área (30%). Não houve variações significativas nas concentrações de pigmentos em base de área e na razão clorofila *a/b* entre os tratamentos. A partição do N investido em Rubisco e em componentes envolvidos no transporte de elétrons pouco diferiu entre os fenótipos; porém, maior fração do N investida em componentes estruturais (13%) foi observada nas plantas à sombra em relação às plantas ao sol. Não houve diferenças, em base de massa, nos parâmetros de trocas gasosas, com exceção da velocidade máxima de carboxilação tomando-se por base a concentração de CO<sub>2</sub> nos sítios de carboxilação, 24% maior nas plantas sombreadas em relação às plantas a pleno sol. Em contraste, em base de área, as plantas de sol exibiram maiores velocidade máxima de carboxilação (32%), taxa fotossintética máxima (45%) e taxa de transporte de elétrons (43%). Aparentemente, a condutância mesofílica tem importância igual ou inferior à da condutância estomática na explicação das baixas taxas fotossintéticas, independentemente da irradiância de crescimento. Sugere-se que a arquitetura hidráulica seja o fator primário mais limitante à fotossíntese no cafeeiro. Os resultados suportam a hipótese de que as plantas sombreadas aproveitariam melhor a energia de *sunflecks* em relação às plantas de sol, em razão dos maiores estados de ativação e menores perdas de indução fotossintética, além de ausência de fotoinibição nas folhas de sombra. Os resultados ajudam a explicar, em parte, a baixa eficiência fotossintética do uso do N, em decorrência de alto investimento desse elemento em compostos não-fotossintéticos.

## ABSTRACT

MARTINS, Samuel Cordeiro Vitor, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Photosynthetic potentialities and limitations in coffee as affected by irradiance.** Adviser: Fábio Murilo DaMatta. Co-Advisers: Adriano Nunes Nesi and Marília Contin Ventrella.

The present study was carried out in order to analyse the contributions of hydraulic, diffusive (stomatal and mesophilic) and biochemical limitations to photosynthesis in coffee, the nitrogen partitioning within the photosynthetic machinery as well as its activation state in response to light. To this end, arabica coffee (*Coffea arabica* L.) plants were grown in pots during 12 months under two light availabilities (0 and 90% shading). Compared to sun plants, shade plants showed higher specific leaf area (63%), chlorophyll (76%), carotenoids (62%) and nitrogen (N) (15%) mass-based concentrations, as well as higher chlorophyll/N ratio (53%); in contrast, shade plants showed lower stomatal density (32%), stomatal index (20%), venation density (27%), stomatal (27%) and mesophyll (37%) conductance and N concentration on an area basis (30%). There were no differences in pigment concentrations (on an area basis) or in the chlorophyll *a/b* ratio between treatments. The N partitioning invested in Rubisco and electron transport chain components differed little between the phenotypes; however, higher N fraction was invested in structural components (13%) in shade plants compared to sun plants. There were no differences in mass-based gas exchange parameters except for the maximum carboxylation velocity calculated on a  $C_c$  basis, 24% higher in shade plants than in sun plants. In contrast, on an area basis, sun plants exhibited higher maximum carboxylation velocity (32%), maximum photosynthetic rate (45%) and electron transport rate (43%). Apparently, mesophyll conductance may be of equal or less importance than stomatal conductance to explain the low photosynthetic rates in coffee, regardless of growth irradiance. It is suggested that the hydraulic architecture is the most limiting primary factor to photosynthesis in coffee plants. The results support the hypothesis that shade plants would take better advantage of sunflecks energy in relation to sun plants as a result of having higher activation states and lower induction losses, in addition to absence of photoinhibition in the shade leaves. The results help to explain, in part, the low photosynthetic nitrogen-use efficiency, as a consequence of high investment of N into non-photosynthetic components.

## 1. Introdução

As plantas perenes sempre-verdes são conhecidas por possuírem baixas taxas de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (*A*) em relação às herbáceas e decíduas (Lloyd et al., 1992). As limitações à fotossíntese podem ser de ordem bioquímica ou difusiva; a primeira concerne à fixação cloroplastídica de CO<sub>2</sub>, e a segunda, às resistências estomáticas e mesofílicas que o CO<sub>2</sub> encontra à sua difusão, desde a atmosfera até os sítios de carboxilação, nos cloroplastos (Geber e Dawson, 1997; Flexas et al., 2008). Em diversas plantas perenes, há pouco indício de limitações bioquímicas, uma vez que essas plantas apresentam atividade da Rubisco e capacidade de transporte de elétrons muito além das necessárias para explicar as baixas eficiências fotossintéticas *in situ* (Wullschleger, 1993). Além disso, essas baixas eficiências também não podem ser explicadas somente por limitações estomáticas, dado que as concentrações intercelulares de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>*) dessas plantas apresentam magnitude similar à de outras plantas C<sub>3</sub> (200-250 μmol mol<sup>-1</sup>) que possuem taxas fotossintéticas *in situ* muito superiores (Lloyd et al., 1992). Assim, a baixa eficiência fotossintética nessas plantas perenes seria resultante de baixas condutâncias mesofílicas (*g<sub>m</sub>*), responsáveis por manterem uma baixa concentração de CO<sub>2</sub> nos cloroplastos, diminuindo, portanto, a atividade carboxilativa da Rubisco. Conforme proposto por Warren e Adams (2004), baixa *g<sub>m</sub>* seria, em parte, função de características anatômicas responsáveis por garantirem maior longevidade foliar, como: folhas hipoestomáticas, maior investimento estrutural na espessura das paredes celulares, alta densidade e baixa porosidade do mesofilo. Apesar de essas características restringirem a difusão do CO<sub>2</sub> até o cloroplasto, elas permitiriam maior tolerância à seca e maior conservação de nutrientes nas folhas, aspectos importantes nas plantas perenes que podem estar sujeitas à forte escassez de recursos abióticos durante seu ciclo de vida.

O café arábica (*Coffea arabica* L.) é uma espécie lenhosa perene, de porte arbustivo, e evoluiu nas florestas tropicais da Etiópia, sendo encontrada como vegetação espontânea de sub-bosque, desenvolvendo-se, portanto, permanentemente sob sombra (DaMatta, 2004). Apesar disso, vem sendo, atualmente, cultivado a pleno sol, onde a produtividade é, geralmente, superior à dos cultivos sombreados, especialmente quando associada ao uso intensivo de insumos. Semelhantemente à maioria das espécies lenhosas tropicais cultivadas originárias de ambientes sombreados, o café exibe baixos valores de *A* (DaMatta, 2003), mesmo sob condições ótimas de cultivo (Silva et al., 2004). Os máximos valores de *A* registrados em café arábica situam-se na faixa de 7 a 12 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>,

porém, mais amiúde, esses valores giram em torno de 4 a 5  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Rena et al., 1994). Esses dados indicam que o cafeeiro exibe eficiência fotossintética muito baixa, mesmo em relação à da maioria das plantas lenhosas (Cannell, 1985). Entretanto, apesar das baixas taxas fotossintéticas, o cafeeiro é uma espécie altamente dependente de N (Malavolta et al., 2002; Carelli et al., 2006), com teores médios foliares de N de 3-4% em base de massa, ao passo que plantas lenhosas, em geral, apresentam valores em torno de 1-2%, evidenciando a baixa eficiência fotossintética de uso do N ( $E_N$ ) no cafeeiro.

Em um estudo conduzido por Araújo et al. (2008), investigaram-se as causas de as taxas fotossintéticas potenciais no cafeeiro serem tão diferentes das atuais, *i. e.* 30-40 e 4-5  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente. Teve-se como conclusão que as limitações difusivas seriam preponderantes na explicação da baixa eficiência fotossintética. No entanto, os autores não estimaram a concentração de  $\text{CO}_2$  no sítio dos cloroplastos ( $C_c$ ), não diferenciando, assim, a contribuição das resistências estomática e mesofílica. De acordo com Matos (2008), a última parece ter papel fundamental nas limitações fotossintéticas do cafeeiro, principalmente para folhas desenvolvidas sob sombreamento intenso, o que está de acordo com vários trabalhos publicados demonstrando quedas em  $g_m$  sob condição de sombra (Hanba et al., 2002; Piel et al., 2002; Li et al., 2008). A explicação reside, em parte, em componentes estruturais da  $g_m$  (Evans et al., 2009): as folhas de sombra, por serem menos espessas, apresentam menor área de mesofilo exposta aos espaços intercelulares para a difusão do  $\text{CO}_2$  (Terashima et al., 2001, 2006).

Mais recentemente, tem surgido um grande corpo de evidências demonstrando o papel da eficiência hidráulica e da densidade de venação ( $D_v$ ) como determinantes do potencial fotossintético (Brodribb et al., 2007, 2010). Apesar de os trabalhos publicados até então sobre as limitações à fotossíntese em café arábica (Araújo et al., 2008; Franck e Vaast, 2009) sugerirem que limitações difusivas (estomáticas e mesofílicas) são as proeminentes na espécie, as limitações estomáticas, que precedem as mesofílicas, são governadas pela capacidade da planta em reidratar os tecidos foliares durante o processo de trocas gasosas, quando ocorre a entrada de  $\text{CO}_2$  às custas da saída de vapor d'água. Dessa forma, as limitações hidráulicas ocorrem primariamente no processo fotossintético e impõem limites físicos à máxima capacidade fotossintética da planta (Brodribb, 2009). Apesar de essas limitações serem conhecidas há anos (Sperry, 2000), recentemente foi proposto um modelo em que a capacidade fotossintética seria definida pela distância que a água teria de atravessar, desde os vasos terminais do xilema até o poro estomático, distância esta menor quanto maior for  $D_v$  (Brodribb et al., 2007). Segundo esse modelo, há forte correlação entre  $D_v$  e  $A$  máxima para uma ampla gama de espécies, desde

samambaias até angiospermas. Isso sugere que os princípios que governam as limitações hidráulicas nas plantas seriam altamente conservados e que a evolução da hidráulica foliar foi largamente responsável pelo aumento da capacidade fotossintética nas espécies mais evoluídas (Brodribb and Feild, 2010). Registre-se que plantas que se desenvolvem sob altas irradiâncias exigem uma maior demanda hídrica para crescimento e refrigeração; assim, sua arquitetura hidráulica foliar seria mais eficiente em relação à arquitetura das plantas desenvolvidas à sombra. Estas, além de sofrerem menores pressões evaporativas, não podem arcar com os altos custos de construção envolvidos na formação de um sistema hidráulico mais eficiente (Sack et al., 2005). Com efeito, grande destaque tem sido dado para diferenciarem-se, de um ponto de vista hidráulico, plantas de sol e de sombra. Têm-se relatado grandes diferenças em características morfo-anatômicas, *e.g.*  $D_v$ , diâmetro e frequência de condutos do xilema, etc., entre espécies de sol e sombra (Nardini et al., 2005; Sack e Frole, 2006). Além disso, as resistências hidráulicas correlacionam-se positivamente com características anatômicas como a espessura do parênquima paliçádico e a razão entre espessuras do parênquima paliçádico e do lacunoso (Sack e Frole, 2006). Analisando-se essas características anatômicas, a partir do estudo de Matos et al. (2009), em café, sugere-se a possibilidade de haver grandes diferenças na resistência hidráulica entre folhas de sol e de sombra do cafeeiro, o quê, em parte, poderia explicar as altas limitações difusivas encontradas entre esses dois fenótipos. Ressalta-se, ainda, o grande papel das resistências extra-vasculares (65-75%) encontradas em café por Gascó et al. (2004), muito superiores às já relatadas para espécies de sombra tropicais (~48%; Sack et al., 2005), sugerindo que atributos anatômicos limitariam fortemente a condutividade hidráulica em café.

Aspecto interessante no cafeeiro é a aparente baixa plasticidade da sua maquinaria fotossintética frente às variações na irradiância interceptada, mesmo numa ampla faixa de irradiâncias, de 30 a 750  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Matos et al., 2009). A baixa plasticidade é relacionada a uma estratégia de uso conservativo de recursos (Valladares et al., 2000), sendo comum em espécies que vivem em condições sub-ótimas de crescimento e, portanto, não podem arcar com os custos envolvidos na modificação de sua maquinaria morfo-fisiológica. No entanto, essa estratégia parece não se aplicar ao cafeeiro, porquanto alterações significativas na sua área foliar específica (AFE) ocorrem, e são consideradas de alto custo por envolverem construção de tecido foliar (Niinemets, 2007). O aspecto intrigante no cafeeiro é: como as folhas podem ajustar a AFE sem ajustar, concomitantemente, a robustez de sua maquinaria fotossintética? Esta pergunta decorre do fato de a alteração em AFE ser considerada a principal determinante do potencial

fotossintético na aclimação à luz em plantas perenes (Niinemets et al., 1998; Niinemets, 2007).

Além da alteração em AFE, a aclimação à luz pode ocorrer via alterações na partição do N entre componentes da maquinaria fotossintética (Evans e Poorter, 2001). Como as folhas já desenvolvidas não podem alterar sua espessura, a forma de que elas dispõem para se aclimatar à luz é mediante realocação do N entre Rubisco e componentes envolvidos na captura de luz (Niinemets et al., 2006). Assim, a partição do N permite que os parâmetros fotossintéticos sejam mais correlacionados com as irradiâncias atuais do que com as irradiâncias interceptadas durante a formação das folhas, conforme observado em várias espécies (Le Roux et al., 2001; Frak et al., 2001; Niinemets et al., 2006, Katahata et al., 2007). A realocação do N, das folhas mais sombreadas para as mais expostas, também otimizaria a fotossíntese em nível de copa, para um dado nível de N na planta inteira (Niinemets, 2007).

Pouco se sabe, no cafeeiro, sobre a partição do N em resposta à aclimação das folhas à luz. Como as alterações em AFE parecem não alterar o potencial fotossintético, a alocação do N deve ter papel importante para explicar a manutenção de potencial fotossintético similar em folhas com diferentes espessuras (Araújo et al., 2008; Matos et al., 2009). Em todo o caso, a partição do N no cafeeiro parece pouco eficiente, haja vista que o seu potencial de carboxilação pouco se altera em resposta à disponibilidade de luz e, conseqüentemente, a espécie exibe baixa  $E_N$  (Araújo et al., 2008). Além disso, as taxas fotossintéticas máximas das folhas mais sombreadas no cafeeiro, quando expressas em base de massa, foram superiores em até 73% em relação às das folhas mais expostas (Matos et al., 2009). Diante do exposto, qual seria a razão de investimentos tão altos em componentes do ciclo de Calvin, para uma condição em que dificilmente haveria luz suficiente para alcançar esse potencial? A resposta para esta pergunta se torna ainda mais complexa ao considerar-se que as proteínas são um dos compostos mais caros de serem sintetizados (Poorter e Jong, 1999); assim, os custos de construção e manutenção de folhas de sombra no cafeeiro e o tempo que essas folhas deveriam ficar na copa para “pagar” o investimento realizado seriam, aparentemente, muito grandes (Poorter et al., 2006). Dessa forma, sugere-se que esse elevado potencial de carboxilação seria, justamente, para aproveitar os momentos em que essas folhas estão expostas a altas irradiâncias. Com efeito, em condições de sub-bosque, os feixes de luz esporádicos de alta intensidade (*sunflecks*), que ocorrem com o movimento da copa das árvores e do sol ao longo do dia, podem responder por até 80% da irradiância total interceptada e 60% do ganho diário de carbono (Percy, 1990). Apesar de ser uma importante fonte de energia para espécies de

sombra, o aproveitamento de *sunflecks* é complexo porque esses feixes podem ter duração de segundos e a Rubisco pode levar vários minutos até sua completa indução (Hammond et al., 1998). Portanto, espécies com maiores estados de ativação ou menores tempos de indução da Rubisco apresentariam vantagens na utilização de *sunflecks* (Bai et al., 2008). Apesar de as variedades modernas de café terem sido melhoradas a pleno sol, o cafeeiro evoluiu nas condições de sub-bosque e suas folhas ainda apresentam algumas características típicas de folhas de sombra (DaMatta, 2004). Assim, o alto investimento em capacidade de carboxilação, no cafeeiro, poderia ser uma adaptação para o aproveitamento da alta energia dos *sunflecks*, restando demonstrar como se comporta o estado de ativação da Rubisco na espécie. O sobre-investimento em Rubisco, além de estoque de N, pode ser uma adaptação a condições sub-ótimas de crescimento, com o objetivo de manter um ganho positivo de carbono em condições de intenso sombreamento (Warren et al., 2000 e 2004), como se vê usualmente na folhagem mais interna de cafeeiros a pleno sol, em função do elevado grau de auto-sombreamento (Matos et al., 2009).

Diante do exposto, pretendeu-se responder às seguintes questões:

- (i) Quais seriam as contribuições das condutâncias estomática e mesofilica na limitação da fotossíntese do cafeeiro?
- (ii) A densidade de venação seria um limitante estrutural à fotossíntese na espécie?
- (iii) Como se dá a partição do N entre os componentes fotossintéticos na folha? Haveria, de fato, um desbalanço nos componentes envolvidos na captura de luz e transporte de elétrons, em favor dos processos de carboxilação?
- (iv) Qual o papel de uma maquinaria fotossintética presumivelmente robusta presente na espécie? Seria uma adaptação ao aproveitamento da energia de *sunflecks*?
- (v) Como as respostas para as perguntas acima se alterariam em função da irradiância de desenvolvimento?

## 2. Material & Métodos

### 2.1 Material vegetal, condições de cultivo e desenho experimental

O experimento foi conduzido em Viçosa (20°45'S, 42°54'W, 650 m altitude), Minas Gerais. A espécie utilizada foi *Coffea arabica* L. cv 'Catuaí Vermelho IAC 44', propagada por semente, cultivada em vasos com capacidade de 12 litros. O substrato para o crescimento das plantas foi uma mistura de solo, esterco de curral curado e areia (4:1:1, v/v/v). A mistura foi adubada e teve o pH corrigido, de acordo com análise de solo e recomendações técnicas usuais para a cultura. As plantas foram adubadas e irrigadas periodicamente. Os tratamentos foram constituídos de **duas intensidades lumínicas (10 e 100% de luz)**. O sombreamento foi aplicado, utilizando-se de telas de poliolefinas (Sombrite®) de diferentes malhas. As plantas avaliadas tinham cerca de um ano de idade, utilizando-se folhas do 3º ou 4º nó a partir do ápice de ramos plagiotrópicos. O experimento foi montado e analisado sob delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições. A parcela experimental foi uma planta por recipiente de cultivo.

### 2.2 Parâmetros morfológicos e anatômicos

#### 2.2.1 Área foliar específica

Para determinação da AFE, dez discos foliares, de 1,4 cm<sup>2</sup>, foram secos até peso constante. Para cálculo da AFE utilizou-se da seguinte fórmula:

$$AFE (m^2 kg^{-1}) = \frac{\text{área foliar dos discos } (m^2)}{\text{massa seca } (kg)}$$

#### 2.2.2 Caracterização estomática

Utilizou-se da técnica da impressão epidérmica para a determinação da densidade estomática (DE) e do índice estomático (IE). Após a limpeza da superfície do material vegetal, colocou-se sobre a lâmina histológica uma pequena quantidade de cola instantânea e pressionou-se o material vegetal contra a lâmina por alguns minutos. As lâminas foram observadas em uma magnificação de 20X com o auxílio de microscópio de luz (modelo AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com sistema U-Photo do Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Foram escolhidos, aleatoriamente, 20 campos de 0,171 mm<sup>2</sup>, de acordo com Salisbury (1927). Para determinação da DE e IE, utilizou-se do software Anat Quant (versão 2.0, Laboratório de Anatomia Vegetal/UFV, Viçosa, Brasil).



### **2.2.3 Morfologia de venação**

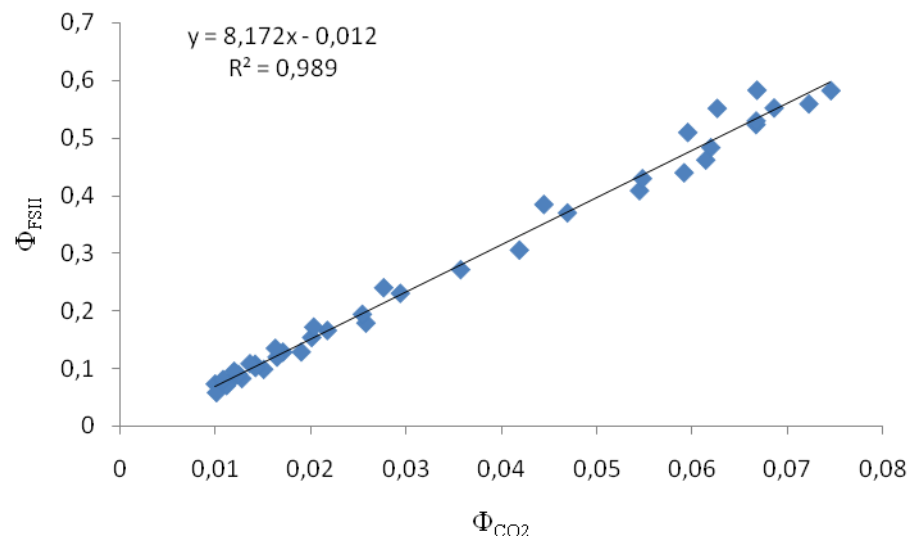
Fragmentos da parte central da lâmina foliar foram selecionados a partir de material a fresco e lavados várias vezes em água destilada para o processo de clarificação. Em seguida, as amostras foram imersas em hidróxido de sódio (NaOH) a 10%, por 2 h, e novamente lavadas em água destilada para remover o NaOH da superfície foliar. As folhas foram então colocadas em hipoclorito de sódio a 20%, até que o material ficasse totalmente translúcido.

Terminado o processo de clarificação, as amostras foram lavadas sucessivas vezes em água destilada, para a remoção completa do alvejante. Após esse procedimento, foram coradas com safranina e violeta cristal, por aproximadamente 12 h, em estufa a 60°C, período necessário para que haja coloração intensa do material. Em seguida, lavou-se o material em água destilada para retirada do excesso de corante, seguida por imersão em etanol 50% e desidratação do material passando por etanol 50, 60, 70, 80, 90 e 100%, por um período de 5 min cada, e, posteriormente, imersão em série xilólica (etanol + xilol 3:1, etanol + xilol 1:1, etanol + xilol 1:3, xilol I e II, durante 5 min, cada). As lâminas histológicas com fragmentos de 60 mm foram montadas em Permount e colocadas para secar à temperatura ambiente. Quando prontas, as lâminas foram observadas em uma magnificação de 32X com o auxílio do microscópio de luz acima citado. As imagens foram digitalizadas e analisadas usando-se do software Image Pro-Plus (version 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). A densidade de venação foi estimada por meio da razão entre o comprimento total de nervuras pela superfície de área foliar.

### **2.3 Parâmetros de fluorescência e trocas gasosas**

A fluorescência da clorofila *a* foi avaliada utilizando-se do fluorômetro integrado à câmara de um analisador de gases a infravermelho (Li 6400XT, Li-Cor, Lincoln, EUA). Após serem adaptados ao escuro, por 30 min, tecidos foliares foram inicialmente expostos a um fraco pulso de luz vermelho-distante ( $0,03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) para a determinação da fluorescência inicial ( $F_0$ ). Em seguida, um pulso de luz saturante, com irradiância de  $6000 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e duração de 0,8 s, foi aplicado para estimar-se a fluorescência máxima emitida ( $F_m$ ). Procedeu-se, ainda, à estimação da eficiência fotoquímica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ), do rendimento quântico do transporte de elétrons ( $\Phi_{\text{FSII}}$ ), da eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII ( $F_v'/F_m'$ ), dos coeficientes de extinção fotoquímica ( $q_L$ ) e não-fotoquímica (NPQ) e da taxa de transporte de elétrons (TTE), conforme descrito em DaMatta et al. (2002) e em Lima et al. (2002). As

constantes  $\alpha$  (absortância foliar) e  $\beta$  (proporção de fotossistemas I e II), utilizados no cálculo da TTE, foram determinadas para cada tratamento a partir da inclinação da relação entre  $\Phi_{\text{FSII}}$  e  $\Phi_{\text{CO}_2}$  (eficiência quântica da assimilação de  $\text{CO}_2$ ) obtidas mediante a construção de curvas de luz sob condições não-fotorrespiratórias em uma atmosfera contendo menos de 1% de  $\text{O}_2$  (Figura 1). Na curva de indução fotossintética, o rendimento do FSII,  $Y(\text{II})$ ; da dissipação regulada de energia associada ao ciclo das xantofilas,  $Y(\text{NPQ})$ ; e da dissipação de energia constitutiva e da própria fluorescência,  $Y(\text{NO})$ , foram calculados segundo Kramer et al. (2004).



**Figura 1** Exemplo da relação entre  $\Phi_{\text{FSII}}$  e  $\Phi_{\text{CO}_2}$  obtida em condições não-fotorrespiratórias.

Curvas de resposta de  $A$  à radiação fotossinteticamente ativa (curva  $A/RFA$ ) foram obtidas, variando-se a RFA de 0 a  $1600 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a  $25^\circ\text{C}$  e concentração de  $\text{CO}_2$  ambiente, elevada ( $2000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ), sob baixo  $\text{O}_2$  (cerca de 1%  $\text{O}_2$ ) e  $\text{O}_2$  ambiente (Yin et al., 2009).

### 2.3.1 Estimação da concentração cloroplastídica de $\text{CO}_2$ ( $C_c$ ), condutância mesofílica ( $g_m$ ) e fotorrespiração ( $R_p$ )

Estimou-se  $C_c$  conforme o método descrito por Epron et al. (1995). De acordo com esse método, considera-se que TTE, estimada a partir de dados de fluorescência, é associada unicamente aos ciclos de oxigenação e carboxilação da Rubisco. Consequentemente:

$$TTE = TTE_C + TTE_O \quad (1)$$

Baseado no requerimento de elétrons necessário para um evento de carboxilação e/ou oxigenação da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP), e considerando-se que uma molécula de CO<sub>2</sub> é liberada para cada ciclo de duas oxigenações, devido à descarboxilação da glicina durante a síntese de serina no ciclo da fotorrespiração (Laing et al., 1974), Valentini et al. (1995) derivaram as seguintes equações para o cálculo de TTE<sub>C</sub> (TTE associada com carboxilação), TTE<sub>O</sub> (TTE associada com oxigenação) e R<sub>p</sub> (taxa de fotorrespiração):

$$TTE_C = 1/3[TTE + 8(A + R_L)] \quad (2)$$

$$TTE_O = 2/3[TTE + 4(A + R_L)] \quad (3)$$

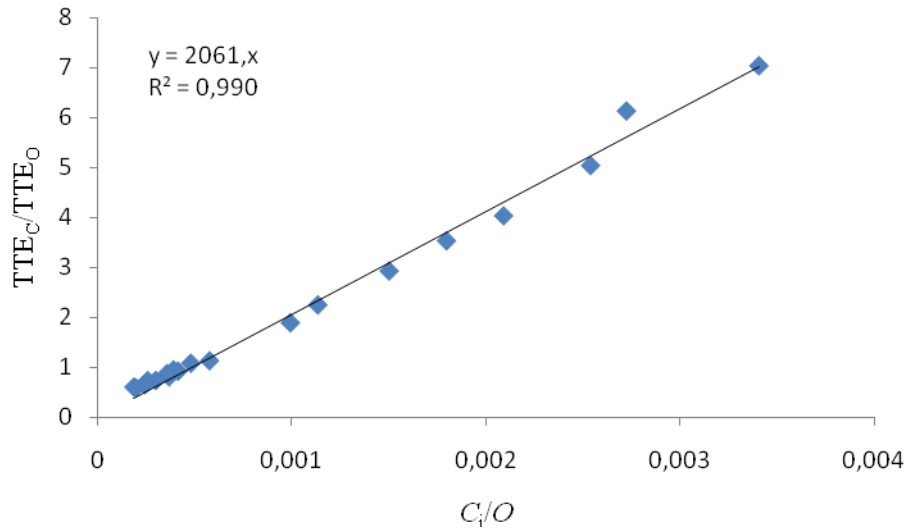
$$R_p = 1/12[TTE - 4(A + R_L)] \quad (4)$$

$$C_c = C_i (S^*/S) \quad (5)$$

em que R<sub>L</sub> representa a taxa de respiração na luz; S e S\* representam respectivamente o fator de especificidade real e aparente da Rubisco. Considerou-se S = 3136.2 mol mol<sup>-1</sup>, que foi o valor obtido para plantas de café mediante o cálculo do C<sub>i</sub>\* pelo método de Laisk (1977), usando-se a seguinte equação e considerando-se O como a pressão parcial de O<sub>2</sub> ambiente:

$$S = O/2C_i^* \quad (6)$$

O valor do fator de especificidade aparente da Rubisco *in vivo* (S\*), para cada tratamento, foi estimado pelo coeficiente linear da regressão linear forçada através da origem e ajustada por meio da relação entre TTE<sub>C</sub> / TTE<sub>O</sub> e C<sub>i</sub>/O, em que C<sub>i</sub>/O é a razão entre a fração molar de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> nos espaços intercelulares (Cornic & Briantais, 1991) (Figura 2).



**Figura 2** Exemplo de uma regressão linear forçada através da origem e ajustada por meio da relação entre  $TTE_C/TTE_O$  e  $C_i/O$ , em que  $TTE_C$  e  $TTE_O$  representam, respectivamente, o fluxo de elétrons destinados para carboxilação e oxigenação da RuBP e  $C_i/O$  a razão entre a fração molar de  $CO_2$  e  $O_2$  no espaço intercelular.

A estimativa da condutância mesofílica ( $g_m$ ), a partir das medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila, foram feitas a partir da relação:

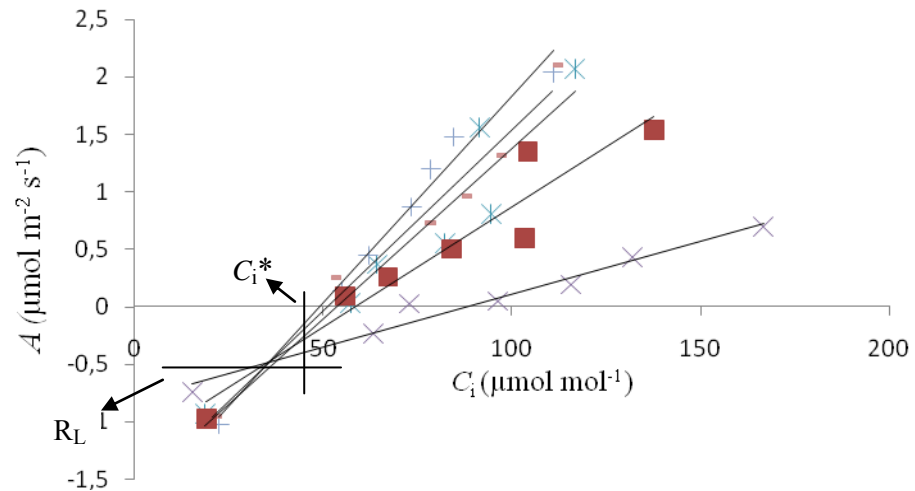
$$g_m = A/(C_i - C_c) \quad (7)$$

A  $g_m$  também foi determinada conforme Harley et al. (1992), a partir de dados de  $A$ ,  $C_i$ ,  $R_d$  e taxa de transporte de elétrons ( $J$ ) (estimada a partir de dados de fluorescência, medidos simultaneamente com a taxa de fotossíntese).

$$g_m = \frac{A}{C_i - \frac{\Gamma_*[J/4 + 2(A + R_d)]}{J/4 - (A + R_d)}} \quad (8)$$

Essas medições foram feitas com o analisador de gases a infravermelho mencionado, ao qual foi acoplado um fluorômetro. Os métodos citados requerem que o ponto de compensação de  $CO_2$  na ausência de  $R_L$  ( $\Gamma^*$ ) seja conhecido. Como  $\Gamma^* = C_i^* + R_L/g_m$ ,  $C_i^*$  foi usado como aproximação para o  $\Gamma^*$ .  $C_i^*$  e  $R_L$  foram estimados conforme o método de Laisk (1977), a partir de curvas  $A/C_i$  obtidas na faixa de 50-200  $\mu\text{mol mol}^{-1} CO_2$ , em seis intensidades distintas de RFA (25, 50, 75, 100, 150, 200 e 500  $\mu\text{mol de fotóns m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Figura 3); o ponto de interseção dessas curvas no eixo X e Y equivalem a

$C_i^*$  e  $R_L$ , respectivamente. A resposta de  $\Gamma^*$  à temperatura, descrita em Bernacchi et al. (2001), foi considerada.



**Figura 3** Exemplo de uma curva de Laisk. Na figura, os pontos em cada reta foram obtidos a uma irradiância distinta.

As respostas de  $A$  à concentração interna de  $\text{CO}_2$  (curva  $A/C_i$ ) foram determinadas a  $25^\circ\text{C}$ , sob  $1000 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , um valor saturante, mas não fotoinibitório, variando-se a concentração de  $\text{CO}_2$ , de 50 a  $2000 \mu\text{mol mol}^{-1}$  (Long et al., 2003). A partir dessas curvas, foram calculadas a taxa de carboxilação máxima ( $V_{\text{cmax}}$ ), a taxa de carboxilação máxima limitada pelo transporte de elétrons ( $J_{\text{max}}$ ) e a taxa de respiração na presença de luz. As curvas  $A/C_i$  foram transformadas em curvas  $A/C_c$  a partir dos dados de  $g_m$  estimados pelo método de Epron et al. (1995), a fim de que  $V_{\text{cmax}}$  e  $J_{\text{max}}$  sejam adequadamente estimados, conforme descrito em Flexas et al. (2007a). Técnicas de regressão não-linear, baseadas nas equações de Farquhar et al. (1980), modificadas por Sharkey (1985) e Harley & Sharkey (1991), foram utilizadas para calcular  $V_{\text{cmax}}$  e  $J_{\text{max}}$  para cada curva  $A/C_c$  obtida, e as constantes cinéticas da Rubisco, com exceção do  $C_i^*$ , foram aquelas descritas em Sharkey (2007). As curvas  $A/C_i$  também foram realizadas em folhas mortas (após fervura, com valores de  $F_v/F_m$  próximos a zero), a fim de se corrigir os valores de  $A$  e  $C_i$ , em função de vazamentos de  $\text{CO}_2$  da câmara de medição do analisador de gases, conforme Flexas et al. (2007b). As limitações fotossintéticas foram calculadas segundo Grassi e Magnani (2001); nessa metodologia as limitações das plantas de sombra foram calculadas tomando-se como referência as plantas de sol. As limitações estomáticas, mesofílicas e bioquímicas são deduzidas a partir da redução nos valores de  $g_s$ ,  $g_m$  e  $V_{\text{cmax}}$ , respectivamente.

## 2.4 Partição do nitrogênio

As frações do N em Rubisco (carboxilação -  $P_r$ ), proteínas da cadeia de transporte de elétrons (bioenergética -  $P_b$ ) e pigmentos envolvidos na captura de luz ( $P_l$ ) foram estimadas de acordo com as equações de Niinemets e Tenhunen (1997):

$$P_r = \frac{V_{c\max}}{6,25 \times 20,5 \times (1/SLAFE N_m)} ;$$

em que  $V_{c\max}$  é a velocidade máxima de carboxilação; 6,25 g Rubisco (g N em Rubisco)<sup>-1</sup> é um fator para converter o conteúdo de N em proteína; 20,5  $\mu\text{mol CO}_2$  (g Rubisco)<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> é a atividade específica da Rubisco; AFE é a área foliar específica; e  $N_m$  é o teor de N total em base de massa.

$$P_b = \frac{J_{\max}}{8,06 \times 156 \times (1/SLAFE N_m)} ;$$

em que  $J_{\max}$  é a taxa máxima de transporte de elétrons; 8,06  $\mu\text{mol}$  citocromo  $f$  (g N em componentes de transporte de elétrons)<sup>-1</sup> é um fator de conversão; e 156 mol elétrons (mol citocromo  $f$ )<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> o fator de atividade do transporte de elétrons por unidade de citocromo  $f$ .

$$P_l = \frac{C_m}{N_m \times C_B} ,$$

em que  $C_m$  é a concentração de clorofilas totais, e  $C_B$  a média ponderada da quantidade de clorofila por quantidade de nitrogênio que há nos fotossistemas (FSII e FSI) e nas antenas do FSII (LHC II). A concentração de cada complexo enzimático por unidade de área e a proporção de clorofila em cada complexo enzimático em relação à concentração total foram calculadas de acordo com Hikosaka e Terashima (1995). A fração do N em componentes estruturais ( $P_s$ ) foi estimada como sendo a fração do N não investida em carboxilação, bioenergética e captura de luz:

$$P_s = 1 - P_r - P_b - P_l$$

## 2.5 Curvas de indução fotossintética

Folhas totalmente adaptadas ao escuro (no mínimo 6 h) foram expostas a uma irradiância de 20  $\mu\text{mol}$  fotóns  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , por 5 min (estado inicial), utilizando-se a câmara do

analisador de gases mencionado anteriormente. Após esse período, a irradiância foi alterada subitamente para  $1500 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , por 30 min (tempo de indução), retornando-se ao valor inicial de irradiância por 10 min, expondo-se novamente a folha à alta irradiância por 1 min (para determinar a perda de indução fotossintética). A luz foi então desligada por 15 min, aplicando-se, então, um pulso de saturação para a estimativa da razão  $F_v/F_m$  no final desse período, encerrando-se a curva de indução fotossintética. Durante todo o protocolo supracitado, os parâmetros de trocas gasosas foram gravados a intervalos de 5 s, e os parâmetros de fluorescência, a intervalos de 1 min. Os parâmetros da curva de indução foram calculados segundo Bai et al. (2008).

As limitações que ocorrem durante o período de indução fotossintética foram calculadas segundo o modelo proposto por Woodrow e Mott (1989). Nesse modelo, as limitações estomáticas à fotossíntese são removidas via normalização das taxas fotossintéticas para um  $C_i$  constante. A taxa de assimilação do  $\text{CO}_2$  sem limitação estomática ( $A^*$ ) foi calculada como:

$$A^* = \frac{(A + R_D)(C_{if} - \Gamma^*)}{C_i - \Gamma^*} - R_d$$

em que  $C_{if}$  é o  $C_i$  no final do período de indução e  $R_d$  é a taxa de respiração no escuro. Subsequentemente, as limitações estomáticas (LE) e bioquímicas (LB), que vão decrescendo durante a curva de indução fotossintética, foram assim calculadas :

$$LE = \frac{A^* - A}{A_{\max} + R_d} \quad LB = \frac{A_{\max} - A^*}{A_{\max} + R_d}$$

em que  $A_{\max}$  é máxima assimilação de  $\text{CO}_2$  no fim do período de indução. As limitações totais (LT) foram calculadas como a soma de LE + LB.

## **2.6 Ensaios bioquímicos**

### **2.6.1 Clorofilas e carotenóides**

As amostras foliares foram coletadas entre 8:00-10:00 h. Os teores de clorofilas (Chl *a* e Chl *b*) e de carotenóides (Car) foram determinados após extração com acetona 80%, em discos foliares retirados das mesmas folhas utilizadas para medições das trocas gasosas, conforme Lichthenthaler (1987).

### **2.6.2 Nitrogênio total**

Amostras foliares foram secas a 70°C, por 72 h, das quais se determinaram o nitrogênio orgânico (Jackson 1958) e o nitrogênio nítrico (Cataldo *et al.* 1975). A soma das duas frações representa o nitrogênio total.

## **3. Resultados**

### **3.1. Características morfológicas, anatômicas e partição do N**

Comparadas com as plantas de sol, as plantas à sombra exibiram maiores área foliar AFE (63%), concentrações (em base de massa) de clorofilas (76%), carotenóides (62%) e de N (15%), como também maiores razões Chl/N (53%) e Chl/Car (9%); em contraste, as plantas sombreadas tiveram menores densidade estomática (32%), índice estomático (20%), densidade de venação (27%) e concentração de N em base de área (30%). Não houve variações significativas nas concentrações de pigmentos em base de área e na razão Chl *a/b* entre os tratamentos. A partição do N investido em Rubisco e em componentes envolvidos no transporte de elétrons pouco diferiu entre os fenótipos; porém, maior fração do N investida em componentes estruturais (13%) foi observada nas plantas à sombra em relação às plantas ao sol. Tomados em conjunto, estes dados indicam maior investimento em pigmentos por unidade de N e maior capacidade de captura de luz nas plantas sombreadas.



**Tabela 1** Características morfo-anatômicas da folha, concentração foliar de clorofilas e carotenóides e partição do nitrogênio (N) em plantas de *Coffea arabica* L. cultivadas sob 100% ou 10% de luz. Os dados são médias  $\pm$  EP de 2-3 folhas de cada indivíduo, sendo 4 indivíduos independentes. Médias seguidas por \*\* ou \* denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p \leq 0,01$  ou  $\leq 0,05$ , respectivamente; teste *t*). Abreviaturas: AFE, área foliar específica; Chl, clorofilas; Car, carotenóides;  $N_m$ , concentração de N em base de massa;  $N_a$  concentração de N em base de área;  $P_l$ , fração do N em componentes envolvidos na captura de luz;  $P_b$ , fração do N em proteínas envolvidas no transporte de elétrons;  $P_r$ , fração do N em Rubisco;  $P_s$ , fração do N em componentes estruturais; e  $E_N$ , eficiência fotossintética do uso do N.

Parâmetros	Tratamentos	
	10% luz	100% luz
AFE, $m^2 kg^{-1}$	22,9 $\pm$ 4,5	14,0 $\pm$ 2,7 **
Densidade estomática, $mm^2$	129,1 $\pm$ 7,2	208,8 $\pm$ 4,2 **
Índice estomático, %	20,3 $\pm$ 1,1	25,7 $\pm$ 1,0 *
Densidade de venação, $mm mm^{-2}$	4,0 $\pm$ 0,1	5,5 $\pm$ 0,2 **
Chl (a + b), $g kg^{-1}$ MS	12,6 $\pm$ 0,4	7,2 $\pm$ 0,3 **
Chl (a + b), $g m^{-2}$	0,5 $\pm$ 0,02	0,5 $\pm$ 0,02 <sup>ns</sup>
Car, $g kg^{-1}$ MS	2,5 $\pm$ 0,08	1,5 $\pm$ 0,02 **
Car, $g m^{-2}$	0,1 $\pm$ 0,004	0,1 $\pm$ 0,002 <sup>ns</sup>
Chl/N, $mmol mol^{-1}$	4,9 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,1 **
Chl a/b	2,9 $\pm$ 0,03	2,9 $\pm$ 0,03 <sup>ns</sup>
Chl/Car	5,1 $\pm$ 0,02	4,7 $\pm$ 0,1 *
$N_m$ , $g kg^{-1}$ MS	39,9 $\pm$ 1,5	34,8 $\pm$ 1,4 *
$N_a$ , $g m^{-2}$	1,7 $\pm$ 0,06	2,5 $\pm$ 0,1 **
$P_l$ , %	15 $\pm$ 0,02	9,7 $\pm$ 0,05 **
$P_b$ , %	3,4 $\pm$ 0,08	3,3 $\pm$ 0,2 <sup>ns</sup>
$P_r$ , %	25 $\pm$ 1	22 $\pm$ 1,3 <sup>ns</sup>
$P_s$ , %	57 $\pm$ 1,1	65 $\pm$ 1,5 **
$E_N$ , $\mu mol g^{-1} s^{-1}$	5,2 $\pm$ 0,4	4.4 $\pm$ 0,4 <sup>ns</sup>

### 3.2. Parâmetros de trocas gasosas

Não houve diferenças, em base de massa, nos parâmetros de trocas gasosas, com exceção da velocidade máxima de carboxilação ( $V_{cmax}$ ) em base  $C_c$ , 24% maior nas plantas sombreadas em relação às plantas a pleno sol. Em contraste, em base de área, as médias dos parâmetros (em base  $C_i$  ou  $C_c$ ) foram superiores nas plantas de sol:  $V_{cmax}$   $C_i$  ou  $C_c$  (32%), taxa fotossintética máxima,  $A_{max}$  (45%), taxa de transporte de elétrons e  $J_{max}$   $C_i$  ou  $C_c$  (43%). A razão  $J_{max}/V_{cmax}$   $C_c$  foi maior (9%) nas plantas ao sol, enquanto  $J_{max}/V_{cmax}$   $C_i$  não diferiu entre os tratamentos.

**Tabela 2** Efeito do sombreamento sobre os parâmetros de trocas gasosas em plantas de *Coffea arabica* cultivadas sob 100 ou 10% de luz em base  $C_i$  (concentração de  $\text{CO}_2$  nos espaços intercelulares) ou  $C_c$  (concentração de  $\text{CO}_2$  nos cloroplastos). Médias seguidas por \*\* ou \* denotam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p \leq 0,01$  ou  $\leq 0,05$ , respectivamente; teste  $t$ ). Abreviaturas:  $A_{\max,a}$  e  $A_{\max,m}$ , capacidade fotossintética por unidade de área ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e por unidade de massa ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), respectivamente;  $V_{\text{cmax},a}$  and  $V_{\text{cmax},m}$ , taxas máximas de carboxilação por unidade de área ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e por unidade de massa ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), respectivamente;  $J_{\max,a}$  e  $J_{\max,m}$ , taxas máximas de transporte de elétrons por unidade de área ( $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e por unidade de massa ( $\mu\text{mol elétrons g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), respectivamente; e  $J_{\max}/V_{\text{cmax}}$ , razão entre a taxa máxima de transporte de elétrons pela taxa máxima de carboxilação. Os dados são médias  $\pm$  EP de 3 folhas de cada indivíduo, sendo 4 indivíduos independentes.

Parâmetros	Tratamentos			
	em base de área		em base de massa	
	10% luz	100% luz	10% luz	100% luz
$A_{\max}$	15,6 $\pm$ 0,5	22,6 $\pm$ 1,3 **	0,4 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,02 <sup>ns</sup>
$V_{\text{cmax}}_{C_i}$	38,5 $\pm$ 2,3	50,8 $\pm$ 3,9 *	0,9 $\pm$ 0,05	0,7 $\pm$ 0,05 <sup>ns</sup>
$V_{\text{cmax}}_{C_c}$	53,3 $\pm$ 2,2	69,7 $\pm$ 3,9 *	1,2 $\pm$ 0,05	1,0 $\pm$ 0,05 *
$J_{\max}_{C_i}$	66,5 $\pm$ 2,5	95,2 $\pm$ 5,6 **	1,5 $\pm$ 0,06	1,3 $\pm$ 0,08 <sup>ns</sup>
$J_{\max}_{C_c}$	71,1 $\pm$ 1,8	101,8 $\pm$ 7,4 *	1,6 $\pm$ 0,04	1,4 $\pm$ 0,1 <sup>ns</sup>
$J_{\max}/V_{\text{cmax}}_{C_i}$	1,7 $\pm$ 0,06	1,9 $\pm$ 0,1 <sup>ns</sup>	-	-
$J_{\max}/V_{\text{cmax}}_{C_c}$	1,3 $\pm$ 0,03	1,5 $\pm$ 0,04 *	-	-

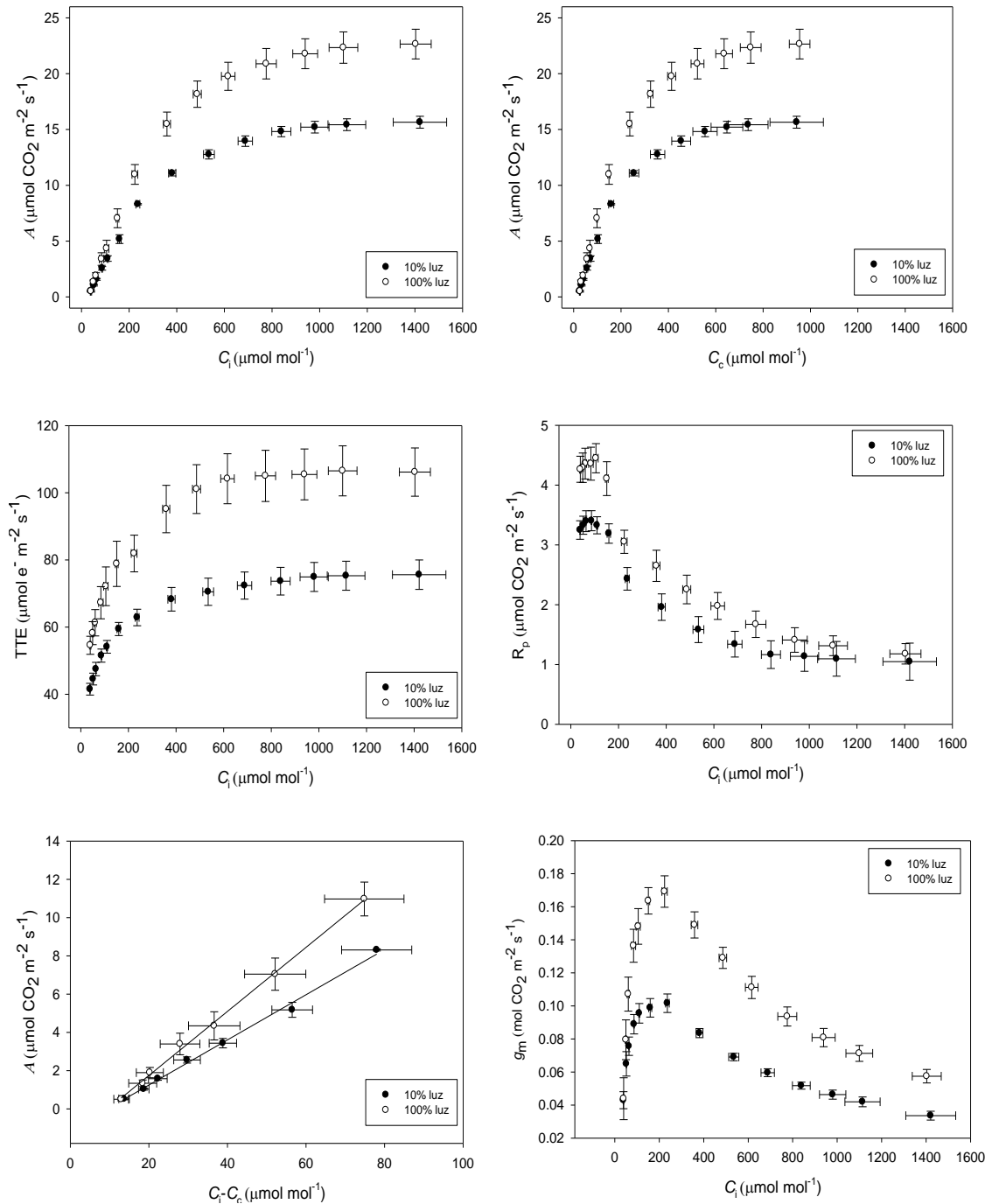
A condutância mesofilica ( $g_m$ ) foi 58% maior nas plantas de sol à concentração ambiente de  $\text{CO}_2$ . Ressalte-se que, em função das várias pressuposições metodológicas para a estimativa de  $g_m$ , foram usadas duas abordagens com metodologias distintas para o cálculo desse parâmetro, alcançando-se resultados muito semelhantes entre os dois métodos usados. Os valores de  $V_{\text{cmax}}$  e  $J_{\max}$  em base  $C_c$  foram 37% e 7%, respectivamente, superiores aos valores em base  $C_i$ , independentemente dos fenótipos analisados.

**Tabela 3** Valores médios dos parâmetros fotossintéticos analisados. Estatística conforme Tabela 2. Abreviaturas:  $A$ , taxa fotossintética líquida;  $g_s$ , condutância estomática;  $g_m$ , condutância mesofilica;  $C_i$ , concentração interna de  $\text{CO}_2$ ;  $C_c$ , concentração cloroplastídica de  $\text{CO}_2$ ; TTE, taxa de transporte de elétrons;  $R_d$ , taxa de respiração no escuro;  $R_L$ , taxa de respiração na luz;  $C_i^*$ , ponto de compensação do  $\text{CO}_2$  na ausência de respiração mitocondrial;  $S_{c/o}$ , fator de especificidade da Rubisco;  $A/g_s$ , eficiência intrínseca do uso da água;  $g_m/g_s$ , razão entre a condutância mesofilica e estomática;  $\text{TTE}/A_g$ , razão entre a taxa de transporte de elétrons e a taxa de fotossíntese bruta aparente ( $A + R_L$ );  $\text{TTE}/A_{g^*}$ , razão entre a taxa de transporte de elétrons e a taxa de fotossíntese bruta real ( $A + R_L + R_p$ );  $R_p$ , taxa fotorrespiratória; LE, LM e LB limitações estomáticas, mesofilicas e bioquímicas, respectivamente.

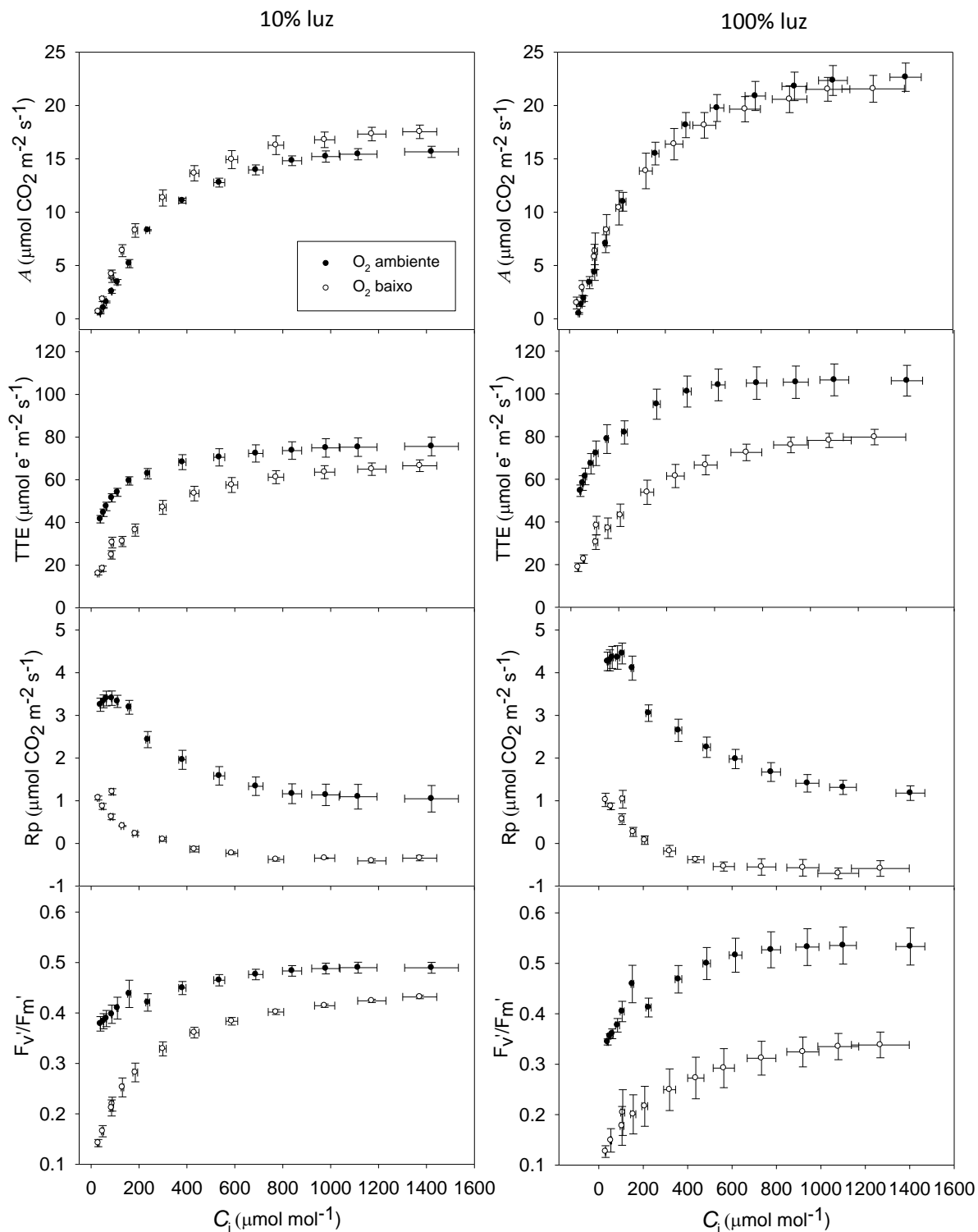
Parâmetros	Tratamentos		
	10% luz	100% luz	Limitação
$A$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	$8,3 \pm 0,05$	$11,7 \pm 0,6^{**}$	Total: 29%
$g_s$ ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	$93 \pm 3,6$	$127 \pm 10^*$	LE: 12%
$g_m$ Harley ( $\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	$111 \pm 13$	$175 \pm 26^{**}$	LM: 6%
$g_m$ Epron ( $\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	$101 \pm 5,6$	$169 \pm 9,5^{**}$	LB: 11%
$C_i$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$ )	$236,5 \pm 8,3$	$223,9 \pm 12^{ns}$	
$C_c$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$ )	$158,5 \pm 10,8$	$149 \pm 5^{ns}$	
TTE ( $\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	$62,9 \pm 2,4$	$81,9 \pm 5,4^*$	
$R_d$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	$0,5 \pm 0,06$	$1,2 \pm 0,05^{**}$	
$R_L$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	$0,1 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,09^{**}$	
$C_i^*$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$ )	$36,5 \pm 0,5$	$33,5 \pm 1,1^{**}$	
$S_{c/o}$ ( $\text{kmol m}^{-3}$ )	108,6	118,3	
$A/g_s$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ )	$89,9 \pm 4,1$	$94,7 \pm 5^{ns}$	
$g_m/g_s$ ( $\text{mol CO}_2 \text{ mol CO}_2^{-1}$ )	$1,7 \pm 0,09$	$2,2 \pm 0,3^{ns}$	
$\text{TTE}/A_g$ ( $\mu\text{mol e}^- \mu\text{mol CO}_2^{-1}$ )	$7,4 \pm 0,2$	$7,3 \pm 0,2^{ns}$	
$\text{TTE}/A_{g^*}$ ( $\mu\text{mol e}^- \mu\text{mol CO}_2^{-1}$ )	$5,8 \pm 0,09$	$5,71 \pm 0,09^{ns}$	
$R_p$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	$2,4 \pm 0,2$	$3 \pm 0,2^{ns}$	

Houve grande variação em  $g_m$  em resposta a  $C_i$ , ocorrendo, por exemplo, uma queda de cerca de 63% em  $g_m$  (Figura 4) a  $C_i = 1400 \mu\text{mol mol}^{-1}$  quando comparada a  $C_i = 200 \mu\text{mol mol}^{-1}$ . As curvas  $A/C_i$ , para ambos fenótipos, quando realizadas em baixa concentração de  $\text{O}_2$ , diferiram marginalmente das realizadas em concentração ambiente de  $\text{O}_2$ ; entretanto, os valores de TTE foram cerca de 50% menores e a eficiência de captura dos centros de reação quando abertos ( $F_v'/F_m'$ ) foi até 70% menor, indicando dissipação de energia térmica incrementada na ausência de  $\text{O}_2$ . As taxas respiratórias à luz ( $R_L$ ) foram

cerca de 50% menores que as taxas respiratórias no escuro ( $R_d$ ) e ambas foram menores nas plantas sombreadas em relação àquelas ao sol (Tabela 5). Salienta-se, ainda, o elevado fator de especificidade estimado para a rubisco ( $S_{c/o}$ ), em torno de  $108 \text{ kmol m}^{-3}$ .



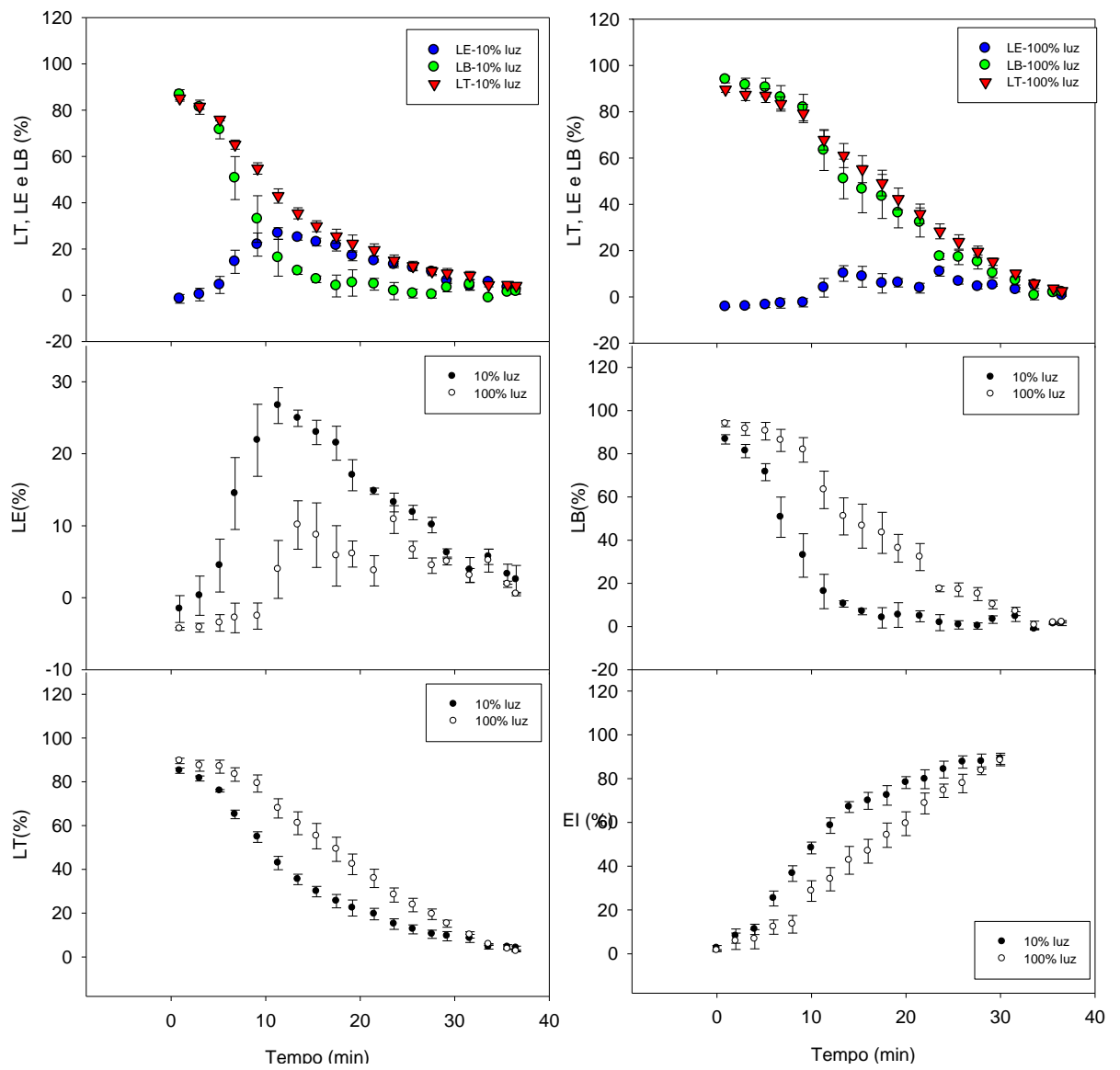
**Figura 4** Taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A$ ) em função da concentração intercelular ( $C_i$ ) ou cloroplastídica ( $C_c$ ) de CO<sub>2</sub>; taxa de transporte de elétrons (TTE) em função de  $C_i$ ; taxas fotorrespiratórias em função de  $C_i$ ;  $A$  em função da depleção de CO<sub>2</sub> entre os espaços intercelulares e os sítios de carboxilação nos cloroplastos por causa da condutância mesofílica ( $g_m$ );  $g_m$  em função de  $C_i$ . Os dados são médias  $\pm$  EP de 3 folhas de cada indivíduo, sendo 4 indivíduos independentes.



**Figura 5** Efeito da concentração de oxigênio sobre o comportamento da curva  $A/C_i$ . Abreviaturas:  $F_v'/F_m'$ , eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII; taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) em função da concentração intercelular ( $C_i$ ) de  $\text{CO}_2$ ; taxa de transporte de elétrons (TTE) em função de  $C_i$ ; taxas fotorrespiratórias em função de  $C_i$ . Os dados são médias  $\pm$  EP de 3 folhas de cada indivíduo, sendo 4 indivíduos independentes.

### **3.3. Ativação da Rubisco**

Os dados de ativação da Rubisco (Tabela 4), obtidos a partir de curvas de indução fotossintética, indicam maior estado de ativação nas plantas sombreadas nos minutos iniciais de iluminação, apesar de a saturação da fotossíntese ter sido atingida ao mesmo tempo (cerca de 30 min) em plantas de sol e de sombra. Ambos os fenótipos apresentaram  $g_s$  próxima de zero no início da curva, alcançando valores na faixa de  $60 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  no seu final. A decomposição das limitações que ocorrem durante a curva de indução fotossintética (Figura 5) sugere que as limitações bioquímicas foram preponderantes nos 5 min iniciais da curva de indução. As limitações estomáticas foram baixas (cerca de 14%) e sempre inferiores às limitações bioquímicas nas plantas a pleno sol durante o tempo da curva de indução (Figura 5). Nas plantas sombreadas, aos 10 min, as limitações estomáticas já eram superiores às bioquímicas e assim permaneceram até o final da curva de indução fotossintética.



**Figura 5** Limitações totais (LT), estomáticas (LE) e bioquímicas (LB) que governam as taxas fotossintéticas durante a curva de indução e o estado de indução (EI) ao longo da curva. Os dados são médias ( $n = 4$ )  $\pm$  EP.



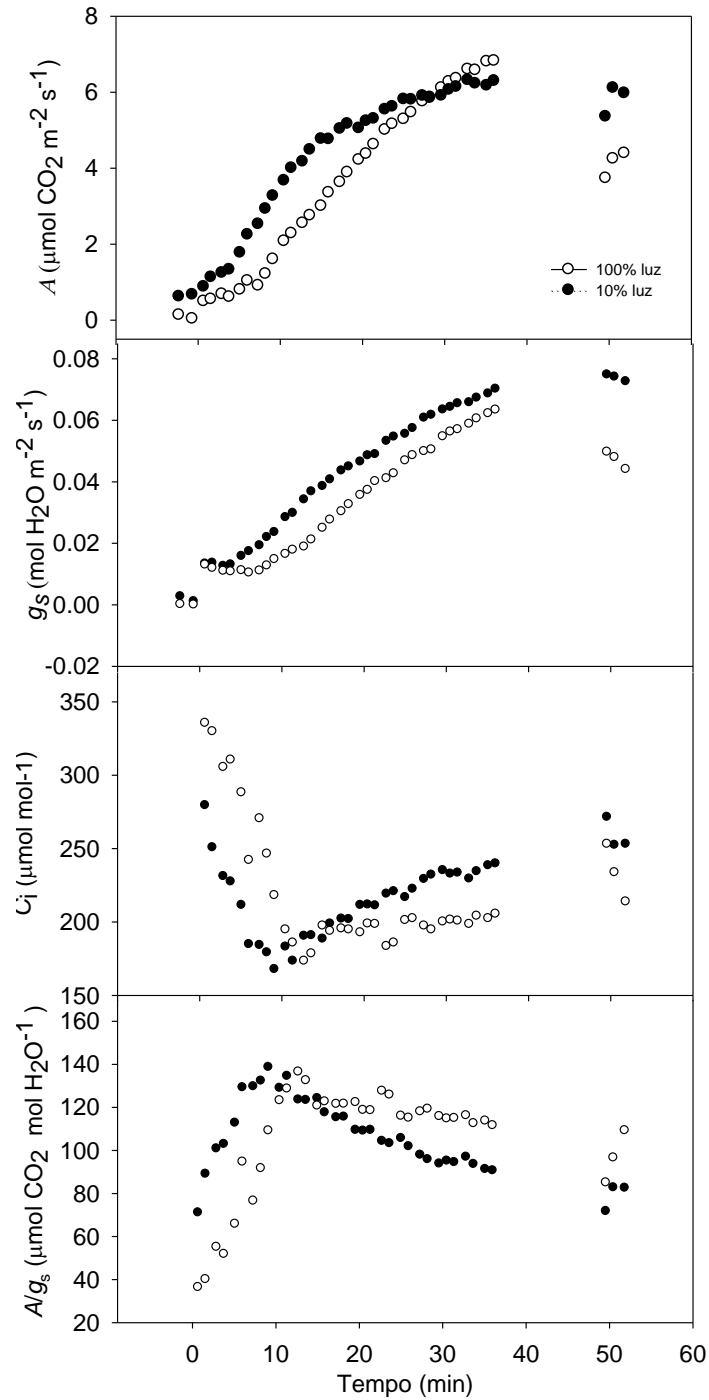
**Tabela 4** Valores médios dos parâmetros de indução fotossintética analisados. Abreviaturas:  $A_{\text{inicial}}$  e  $A_{\text{max}}$ , taxa de fotossíntese líquida inicial e máxima, respectivamente;  $EI_{x\text{min}}$ , estado de indução no tempo x;  $g_{s\text{ inicial}}$  e  $g_{s\text{ max}}$ , condutância estomática inicial e máxima, respectivamente;  $A/g_{s\text{ inicial}}$  e  $A/g_{s\text{ max}}$ , eficiência intrínseca do uso da água inicial e máxima, respectivamente;  $t_{90\%x}$ , tempo necessário para atingir 90% dos valores máximos observados para o parâmetros x;  $TTE_{\text{ inicial}}$  e  $TTE_{\text{ max}}$ , taxa de transporte de elétrons inicial e máxima, respectivamente;  $R_{p\text{ inicial}}$  e  $R_{p\text{ max}}$ ; taxas fotorrespiratórias inicial e máxima, respectivamente. EI, estado de indução fotossintético. Os dados são médias ( $n = 4$ )  $\pm$  EP. Estatística conforme Tabela 2.

Parâmetros	Tratamentos	
	10% luz	100% luz
$A_{\text{inicial}}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	0,7 $\pm$ 0,07	0,08 $\pm$ 0,03 **
$A_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	6,5 $\pm$ 0,6	6,9 $\pm$ 0,6 <sup>ns</sup>
$t_{90\%A}$ (min)	27,7 $\pm$ 1,9	30,7 $\pm$ 0,4 <sup>ns</sup>
$g_{s\text{ inicial}}$ ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	1,4 $\pm$ 2,2	0 $\pm$ 1 <sup>ns</sup>
$g_{s\text{ max}}$ ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	69 $\pm$ 1	63 $\pm$ 1,2 <sup>ns</sup>
$t_{90\%g_s}$ (min)	28,8 $\pm$ 1,4	30,9 $\pm$ 0,9 <sup>ns</sup>
$A/g_{s\text{ inicial}}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ )	64,9 $\pm$ 12,3	22,9 $\pm$ 4,3 *
$A/g_{s\text{ max}}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ )	147,2 $\pm$ 6,1	157,7 $\pm$ 11,3 <sup>ns</sup>
$t_{90\%A/g_s}$ (min)	10,3 $\pm$ 1,7	14,4 $\pm$ 1,9 <sup>ns</sup>
$LE_{\text{max}}$ (%)	29,8 $\pm$ 3,6	14,3 $\pm$ 1,9 *
$EI_{\text{após 10 min escuro}}$ (%)	83,5 $\pm$ 8,7	52,7 $\pm$ 7,9 *
$TTE_{\text{ inicial}}$ ( $\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	7,9 $\pm$ 0,2	8,0 $\pm$ 0,1 <sup>ns</sup>
$TTE_{\text{ max}}$ ( $\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	56,7 $\pm$ 2,5	56,7 $\pm$ 2,8 <sup>ns</sup>
$t_{90\%TTE}$ (min)	18,8 $\pm$ 1,4	20,7 $\pm$ 1,9 <sup>ns</sup>
$R_{p\text{ inicial}}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	0,8 $\pm$ 0,1	1 $\pm$ 0,07 <sup>ns</sup>
$R_{p\text{ max}}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	3 $\pm$ 0,2	3 $\pm$ 0,15 <sup>ns</sup>

Ao iluminarem-se tecidos submetidos previamente à obscuridade, na curva de indução fotossintética, houve rápida ativação dos parâmetros de fluorescência (Tabela 7). O Y(NPQ) já apresentava no primeiro minuto valor semelhante ao valor nos 30 min da curva. Após o término da curva de indução, a razão  $F_v/F_m$  (Tabela 7), medida após 15 min de aclimação ao escuro, foi semelhante entre os tratamentos, sugerindo ausência de fotoinibição nas plantas sombreadas, mesmo após 30 min de exposição a 1500  $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

**Tabela 7** Valores médios dos parâmetros de fluorescência na curva de indução analisados ao longo do tempo da curva. Abreviaturas:  $F_v/F_m$ , rendimento quântico máximo do FSII; Y(NO), dissipação de energia constitutiva e na forma de fluorescência; Y(NPQ), dissipação regulada de energia térmica via ciclo das xantofilas; Y(FSII), rendimento quântico efetivo do FSII. Estatística conforme Tabela 2.

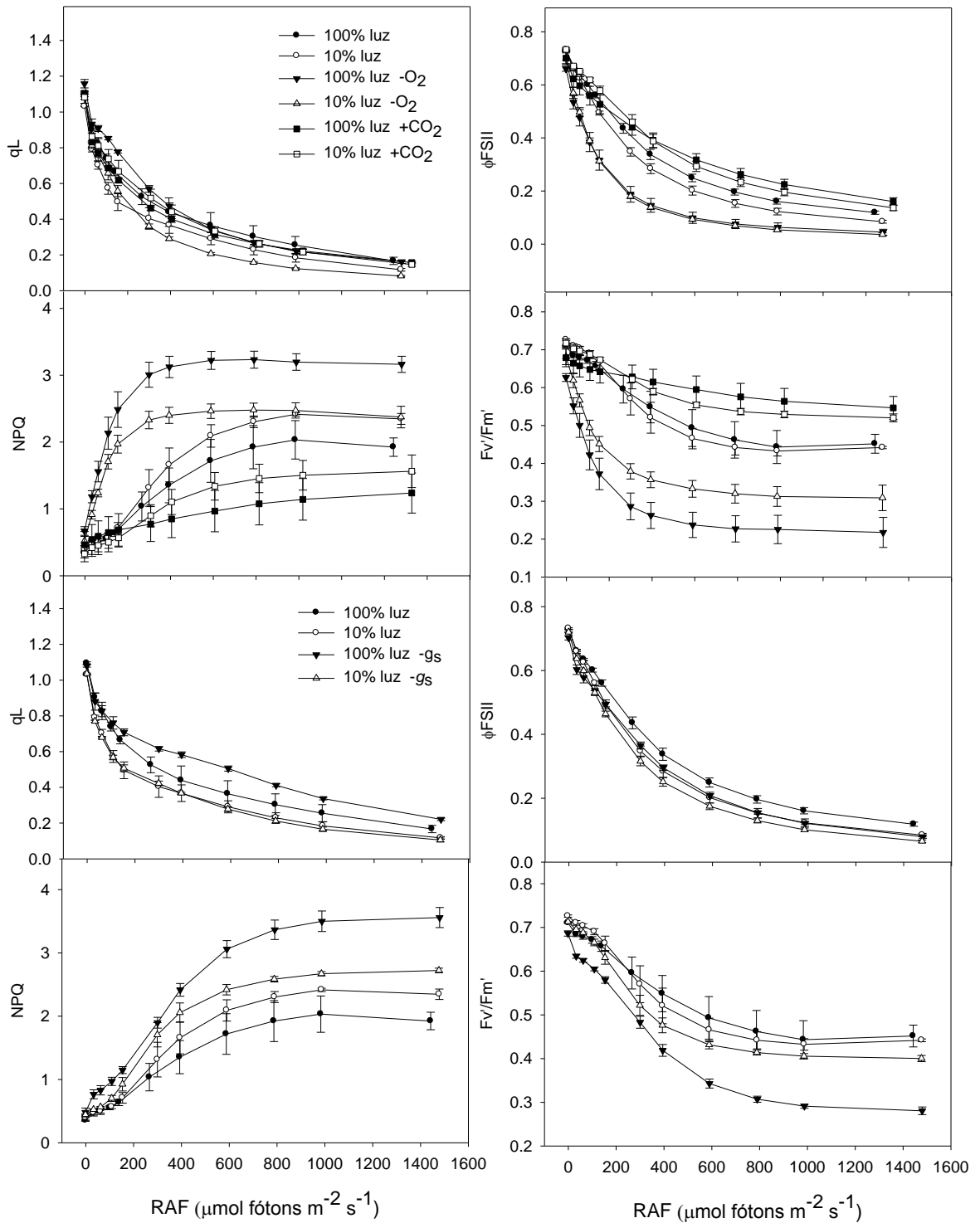
Parâmetros	Tratamentos	
	10% luz	100% luz
$F_v/F_m$ inicial	0,8 ± 0,0015	0,79 ± 0,0074 <sup>ns</sup>
$F_v/F_m$ 15min escuro após término da curva	0,74 ± 0,0048	0,72 ± 0,0033 *
Y(NO) inicial	0,26 ± 0,007	0,26 ± 0,01 <sup>ns</sup>
Y(NO) 1min	0,34 ± 0,0086	0,35 ± 0,02 <sup>ns</sup>
Y(NO) 15min	0,28 ± 0,0062	0,29 ± 0,016 <sup>ns</sup>
Y(NO) 30min	0,28 ± 0,006	0,3 ± 0,022 <sup>ns</sup>
Y(NPQ) inicial	0,081 ± 0,0072	0,078 ± 0,0043 <sup>ns</sup>
Y(NPQ) 1min	0,61 ± 0,0063	0,6 ± 0,018 <sup>ns</sup>
Y(NPQ) 15min	0,64 ± 0,0019	0,64 ± 0,019 <sup>ns</sup>
Y(NPQ) 30min	0,63 ± 0,0031	0,61 ± 0,024 <sup>ns</sup>
Y(PSII) inicial	0,66 ± 0,013	0,66 ± 0,01 <sup>ns</sup>
Y(PSII) 1min	0,046 ± 0,0029	0,04 ± 0,0013 <sup>ns</sup>
Y(PSII) 15min	0,077 ± 0,0052	0,073 ± 0,0047 <sup>ns</sup>
Y(PSII) 30min	0,089 ± 0,0044	0,089 ± 0,0047 <sup>ns</sup>



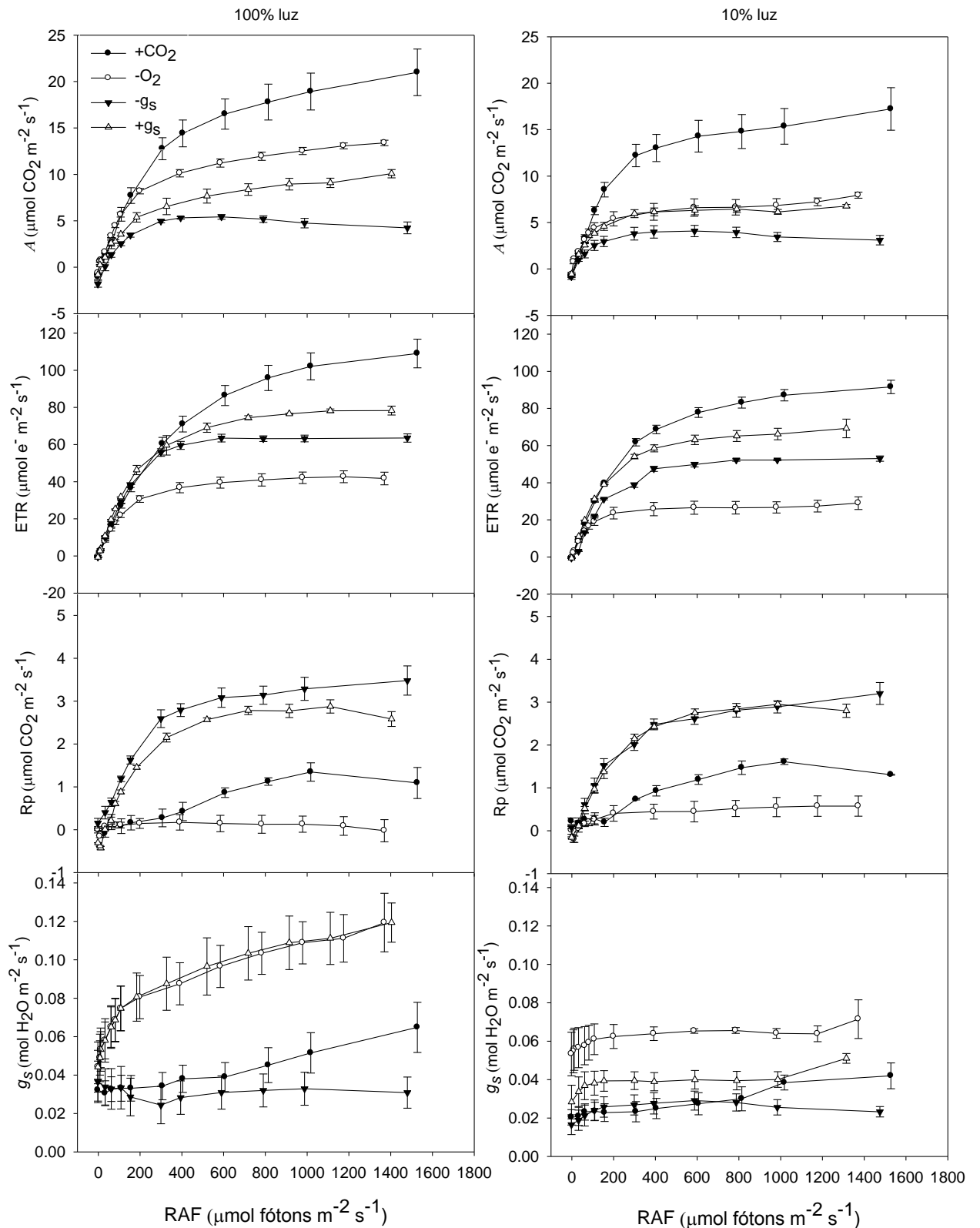
**Figura 6** Curso de tempo dos parâmetros fotossintéticos durante a curva de indução. Abreviaturas: taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ) e eficiência intrínseca do uso da água ( $A/g_s$ ). Os dados são médias ( $n = 4$ )  $\pm$  EP.

### **3.4. Curvas de luz e fluorescência**

Em alta concentração de CO<sub>2</sub> (2000 μmol mol<sup>-1</sup>), foram observados menor NPQ e maior F<sub>v</sub>'/F<sub>m</sub>' associados a maiores taxas fotossintéticas (Figura 7), indicando menor necessidade de dissipação de energia térmica. Em baixa concentração de O<sub>2</sub>, foram observados maior NPQ e menor F<sub>v</sub>'/F<sub>m</sub>', sugerindo maior quantidade de energia de excitação a ser dissipada numa condição em que se espera supressão da fotorrespiração. As diferenças nos parâmetros de fluorescência entre plantas sombreadas e a pleno sol foram dependentes da magnitude das taxas fotossintéticas em função da condutância estomática. Quando g<sub>s</sub> e A foram relativamente elevadas, houve mudanças marginais naqueles parâmetros; entretanto, quando g<sub>s</sub> e A foram baixas, o maior potencial de dissipação de energia de excitação pelas plantas a pleno sol foi evidente pelos maiores valores de NPQ e menores valores da razão F<sub>v</sub>'/F<sub>m</sub>' (Figura 6). De modo geral, A e TTE, em função da irradiância, foram maiores nas plantas a pleno sol (Figura 7), corroborando os maiores valores de V<sub>cmax</sub> e J<sub>max</sub> estimados a partir das curvas A/C<sub>c</sub> (Tabela 4) nestas plantas.



**Figura 7** Par\u00e2metros de fluoresc\u00eancia em fun\u00e7\u00e3o da irradi\u00e2ncia (RFA) e de diferentes condi\u00e7\u00f5es atmosf\u00e9ricas ( $-O_2$ , baixo oxig\u00eanio;  $+CO_2$ , 2000  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), condi\u00e7\u00e3o ambiente (100% ou 10% luz) ou com plantas apresentando baixas ( $g_s \leq 50\%$  dos valores m\u00e1ximos) condut\u00e2ncias estom\u00e1ticas ( $-g_s$ ). Abreviaturas:  $q_L$ , coeficiente de extin\u00e7\u00e3o fotoqu\u00edmica;  $\Phi_{FSII}$ , rendimento efetivo do FSII; NPQ, coeficiente de extin\u00e7\u00e3o n\u00e3o-fotoqu\u00edmica;  $F_v'/F_m'$ , efici\u00eancia de captura de energia de excita\u00e7\u00e3o pelos centros de rea\u00e7\u00e3o abertos do FSII. Os dados s\u00e3o m\u00e9dias ( $n = 4$ )  $\pm$  EP.



**Figura 8** Fotossíntese líquida (A), taxa de transporte de elétrons (TTE), fotorrespiração ( $R_p$ ) e condutância estomática ( $g_s$ ) em função da irradiância (RFA) e de diferentes condições atmosféricas ( $-O_2$ , baixo oxigênio;  $+CO_2$ , 2000  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), condição ambiente com plantas apresentando maiores ou menores condutâncias (+ ou -  $g_s$ ). Os dados são médias ( $n = 4$ )  $\pm$  EP.

## 4. Discussão

### 4.1. Limitações hidráulicas

A densidade de venação encontrada ( $D_v$ ) nas plantas a pleno sol prediz, de acordo com o modelo proposto por Brodribb et al. (2007), uma taxa fotossintética ( $A$ ) máxima de cerca de  $10 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , valor semelhante ao encontrado neste trabalho e aos valores máximos de  $A$  já registrados para o café arábica (Rena et al., 1994). Além disso, parece existir uma forte relação de dependência entre  $D_v$  e a condutância hidráulica foliar ( $K_L$ ); por exemplo, tomando-se os dados de  $D_v$  das plantas sombreadas, obter-se-ia  $K_L$  de cerca de  $5 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ MPa}$ , valor muito próximo do único valor publicado de  $K_L$  para café em condições de sombra (cerca de  $4,17 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ MPa}$ ; Gascó et al., 2004). Salienta-se que esses valores de  $K_L$  se situam fora da faixa das angiospermas tropicais, e são inclusive inferiores aos de espécies temperadas. Ademais, outro parâmetro indicador de limitações hidráulicas é o índice de poro estomático, que guarda correlação positiva com  $K_L$  (Sack et al., 2005); o valor calculado desse índice (0,13 nas plantas de sol) situou-se no limite inferior dos dados para espécies tropicais obtidos por Sack et al. (2005), sugerindo elevadas resistências hidráulicas foliares em café. Em todo o caso, baixo  $K_L$  poderia ser vantajoso do ponto de vista de melhoramento genético da espécie, uma vez que o café se encontra em uma faixa de  $K_L$  em que qualquer incremento nessa característica concorreria para aumentos lineares em  $\Phi_{\text{FSII}}$  e  $g_s$  (Brodribb et al., 2004). A amplitude de outras características fisiológicas em café, tais como TTE,  $\Phi_{\text{FSII}}$  e  $g_s$ , também seriam, em parte, explicadas pela baixa capacidade hidráulica foliar (Brodribb e Holbrook, 2003; Campanello et al., 2008).

Em relação às diferenças entre plantas sombreadas e a pleno sol, os dados sugerem a existência de diferenças substanciais entre os fenótipos pelas diferenças observadas na densidade estomática e  $D_v$ , além das diferenças morfo-anatômicas em nível foliar (vide Matos et al., 2009); de fato, essas diferenças são esperadas, e é frequentemente observado na literatura queda em  $K_L$  com o sombreamento (Sack e Holbrook, 2006; Santiago et al., 2004). Concomitantemente, todas essas evidências sugerem que, devido à prevalência de grandes limitações hidráulicas em café, principalmente no transporte de água célula a célula, uma limitada capacidade de reidratação dos tecidos foliares, durante o processo de trocas gasosas, seria o fator limitante à manutenção de condutâncias estomáticas relativamente elevadas que, por sua vez, limitariam sobremodo as taxas fotossintéticas em café.

#### 4.2. Partição do N

A partição do N entre as frações envolvidas em carboxilação ( $P_r$ ) e bioenergética ( $P_b$ ) não variou entre os fenótipos de sol e sombra, à semelhança dos resultados obtidos por Katahata et al. (2007) e Niinemets et al. (1998) ao estudarem a aclimação a diferentes irradiâncias em várias espécies. No entanto, esses resultados contrastam com os obtidos por outros autores (Li et al., 2008; Roux et al., 2001; Frak et al., 2001) nos quais alterações na partição do N entre aquelas frações tiveram importância no processo de aclimação à luz. Apesar de a teoria de otimização de recursos prever aumentos em  $P_r$  e  $P_b$  para aumentar a eficiência do uso da luz em altas irradiâncias, o cafeeiro segue o comportamento geralmente observado em plantas lenhosas, em que a aclimação à luz é governada, principalmente, por alterações em AFE e, em menor extensão, pela partição do N (Niinemets et al., 1998; Poorter e Evans, 2001). Contudo, o cafeeiro apresenta notável alteração da fração do N em captura de luz ( $P_L$ ), mantendo, mesmo com grandes diferenças em AFE, concentração de clorofilas e carotenóides, em base de área, iguais às das plantas de sol, mas sem alterações na razão chl  $a/b$ . A limitada capacidade de alteração dessa razão contribui para a redução em  $E_N$  no cafeeiro: a quantidade de N presente nos centros de reação do FSII associados à chl  $a$  representa um investimento de 83 mmol N mol<sup>-1</sup> chl, ao passo que os complexos CCLII associados à chl  $b$  contêm somente 25 mmol N mol<sup>-1</sup> chl (Evans et al., 1986). Portanto, decréscimos na razão chl  $a/b$  mantêm a mesma absorvância por unidade de área, mas com menor gasto de N.

Salienta-se que, ao contrário da maioria dos trabalhos publicados sobre partição do N, utilizou-se, neste estudo, valor de  $V_{cmax}$  em base  $C_c$  para estimar-se  $P_r$ , aumentando, pois, a confiabilidade da estimativa. Mesmo com a incerteza associada ao valor da atividade específica da Rubisco (Warren et al., 2003), que pode afetar o valor de  $P_r$ , os resultados obtidos sugerem grande quantidade de N estrutural presente no cafeeiro (cerca de 60% do N-total), teores muito maiores que os observados em *Quercus* (cerca de 23%; Takashima et al., 2004) e em espécies nativas da Austrália (cerca de 10%; Warren et al., 2000). Os teores de N em café (cerca de 3.5%) se situam muito além da faixa de valores encontrados em outras espécies arbóreas tropicais (cerca de 2%; Coste et al., 2005; Rozendaal et al., 2006; Markensteijn et al., 2007); no entanto, como as taxas fotossintéticas em café, em condições de campo, são muito baixas, o café apresenta  $E_N$  muito inferior à da maioria das espécies (Wright et al., 2004), conforme já salientado por Araújo et al. (2008) e Pompelli et al. (2010). Diferentemente do proposto por Araújo et al. (2008), neste estudo, a principal explicação para a baixa  $E_N$  estaria associada ao investimento em compostos nitrogenados



não-fotossintéticos (Hikosaka et al., 2004), e não a baixas  $g_m$  *per se*. Ressalta-se que as taxas fotossintéticas aqui obtidas situam-se entre as máximas para o cafeeiro e, conseqüentemente, os valores de  $g_m$  devem ser considerados os potenciais para a espécie. Portanto, não se pode excluir a possibilidade de que, em condições de campo, baixa  $g_m$  possa ter efeito aditivo na explicação da baixa  $E_N$ . Tomados em conjunto, a aclimação à luz em café parece governada por mudanças em AFE em adição a aumentos na fração do N investida na captura de luz (maiores razões Chl/N e Chl/Car e maior  $P_L$ ), porém, sem mudanças na fração do N investida em carboxilação e bionérgica.

### **4.3. Ativação da Rubisco**

As curvas de indução fotossintética no cafeeiro foram marcadas por baixas condutâncias estomáticas iniciais ( $g_{s \text{ inicial}}$ , cerca de  $1 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e longo tempo para a ocorrência da saturação fotossintética ( $t_{90\% A}$ , cerca de 30 min). Em geral, os valores desses parâmetros diferiram grandemente da média de espécies de sub-bosque sempre-verdes, as quais apresentaram  $g_{s \text{ inicial}}$  e  $t_{90\% A}$  cerca de  $30 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e 13 min, respectivamente (Bai et al., 2009); entretanto, os valores neste estudo foram semelhantes aos obtidos por Urban et al. (2007) em espécies de sombra. Urban et al. (2007) concluíram que as largas diferenças encontradas na literatura entre esses parâmetros são oriundas das diversas condições experimentais existentes, como tempo de exposição à escuridão, irradiância utilizada, etc.

O comportamento sigmoidal das curvas de indução, típico em espécies com baixa  $g_{s \text{ inicial}}$  (Valladares et al., 1997), foi responsável por baixos estados de indução nos primeiros minutos da curva, independentemente dos fenótipos. No entanto, a partir de 5 min, o estado de indução (EI) nas plantas sombreadas já era superior ao das plantas de sol. Na decomposição das limitações estomáticas (LE) e bioquímicas (LB) à fotossíntese, que ocorrem durante o período de indução, nas plantas sombreadas, as LB foram superadas pelas LE aos 10 min, devido ao maior aumento em  $A$  em relação ao de  $g_s$ . Entretanto, nas plantas de sol, LB foi sempre superior à LE, sem diferenças entre a ativação em  $A$  e em  $g_s$ . O fator determinante das LB é a concentração de intermediários metabólicos do ciclo de Calvin, atividade/concentração da ativase da Rubisco e a concentração de inibidores noturnos tais como 2-carboxiarabinitol-1-fosfato (Parry et al., 2008). Espécies de sombra geralmente têm maiores proporções de ativase da Rubisco em relação às da Rubisco (Sage et al., 2002) e, assim, podem promover uma ativação mais rápida da enzima, o que seria uma característica favorável nessas espécies para mais bem aproveitarem os *sunflecks*, que

ocorrem sobremodo em condições de sub-bosque (Pearcy, 1990). Ressalta-se que, devido ao elevado auto-sombreamento observado em plantas adultas de café e à trajetória do sol ao longo do dia, é muito provável a exposição da folhagem mais interna, e, conseqüentemente, mais sombreada, a curtos períodos de iluminação. Logo, mesmo em condições de lavoura a pleno sol, maior aproveitamento de energia pela folhagem mais interna deve contribuir positivamente para a economia de carbono da planta.

As plantas sombreadas também apresentaram menor perda de indução fotossintética após 10 min na condição inicial de baixa irradiância, o que favorece o aproveitamento de novos *sunflecks* que porventura venham a ocorrer (Valladares et al., 1997). Tomados em conjunto, (i) a ausência de fotoinibição nas plantas de sombra, em relação às plantas de sol, após o período de indução, (ii) maiores estados de ativação e (iii) grande capacidade de dissipação de energia térmica verificada pelo elevado Y(NPQ) no primeiro minuto na curva de indução são características favoráveis para o aproveitamento da energia de *sunflecks*, sem ocorrência de fotodanos à maquinaria fotossintética.

#### **4.4 Limitações estomáticas, mesofílicas e bioquímicas**

Diferentemente do esperado, os altos valores de  $g_m$  encontrados neste trabalho (cerca de  $0,175 \text{ mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) não corroboram os resultados obtidos por Araújo et al. (2008), em condições de campo, cujos valores de  $g_m$  foram cerca de  $0,01 \text{ mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Apesar de grande variabilidade em  $g_m$  ser encontrada em algumas espécies (Flexas et al., 2008), é mais provável que as diferenças supracitadas sejam oriundas dos vários artefatos envolvidos no cálculo do parâmetro (Pons et al., 2009). Os valores de  $g_m$  assemelham-se aos de vários outros encontrados na literatura para espécies lenhosas sempre-verdes (Piel et al., 2002; Manter e Kerrigan, 2004; Warren e Adams, 2006) e são muito próximos aos obtidos no gênero *Citrus* (Lloyd et al., 1992), que tem uma fisiologia similar à do café, *e.g.* teores de N em base de área e AFE similares e evolução como vegetação de sub-bosque. Maior  $g_m$  nas plantas a pleno sol (cerca de 58%) tem sido verificado em outros estudos (Li et al., 2008; Warren et al., 2007; Piel et al., 2002; Hanba et al., 2002) e parece ser, em parte, explicada pelas diferenças morfo-anatômicas (*e.g.* AFE) existentes entre os fenótipos. Em café, como demonstrado por Matos et al. (2009), a espessura do parênquima paliádico é o dobro nas folhas de sol em relação ao das folhas mais sombreadas na copa. Para reduzir as resistências na fase líquida, os cloroplastos posicionam-se adjacientemente às paredes celulares no parênquima paliádico, permitindo maior superfície de exposição aos espaços intercelulares (Syvertsen et al., 1995; Terashima et al., 2006). Logo, quanto

maior a espessura do parênquima paliçádico, maior a superfície de exposição dos cloroplastos, o quê explicaria, pelo menos em parte, maior  $g_m$  nas plantas de sol. No entanto, apesar da menor  $g_m$  nas plantas de sombra,  $C_c$  calculado foi muito similar independentemente do fenótipo, evidenciando que as limitações mesofílicas e estomáticas em café seriam conservadas (Warren et al., 2007).

A razão  $g_m/g_s$  (cerca de 2) em café foi muito superior à da maioria dos valores publicados (cerca de 0.5 – 1; Duan et al., 2009; Li et al., 2008; Piel et al., 2002; Hanba et al., 2002), porém semelhante à encontrada em *Fagus sylvatica*, espécie que também evoluiu em condições de sub-bosque (Warren et al., 2007). Aquela razão sugere que as limitações mesofílicas em café têm igual ou menor importância que as estomáticas, com a última contribuindo mais para a depleção do  $CO_2$  nos espaços intercelulares. De fato, o  $C_i - C_c$  médio para várias espécies lenhosas contribui com cerca de 45% na depleção do  $CO_2$  interno (Warren, 2007), ao passo que, em café, essa contribuição é de 32%. Ressalta-se que a maioria dos dados publicados sobre  $g_m$  refere-se a espécies de clima temperado, com pouca, ou nenhuma, informação disponível para espécies tropicais. Portanto, estudos adicionais são necessários para se avaliar se o comportamento da razão  $g_m/g_s$  é uma particularidade do cafeeiro ou se seria uma característica geral de plantas lenhosas tropicais.

Na decomposição das limitações fotossintéticas, as plantas de sombra tiveram 29% de redução em  $A$  (12% estomática, 6% mesofílica e 11% bioquímica) em relação às plantas de sol, demonstrando que, mesmo com  $g_m$  diferindo grandemente, as diferenças entre os fenótipos foram devidas, principalmente, a menores  $g_s$  e  $V_{cmax}$ . As limitações estomáticas, em café, seriam decorrência das limitações hidráulicas exacerbadas, conforme discutido anteriormente. Ademais, a razão  $A/g_s$ , muito superior à da maioria das espécies lenhosas (Medrano et al., 2009), sugere maximização da eficiência intrínseca do uso da água associada a baixas condutâncias hidráulicas.

As limitações bioquímicas em café seriam oriundas de um baixo investimento da fração de N em carboxilação ( $P_r$ ) (25%) e bioenergética ( $P_b$ ) (3%), que não variou entre as plantas de sol e de sombra. Ressalte-se que esses valores referem-se às frações de N-total; como as plantas de sombra tiveram, em base de massa, maior teor de N, a quantidade absoluta de Rubisco e de componentes envolvidos no transporte de elétrons seria maior nas plantas de sombra. Esta seria a estratégia do cafeeiro para aumentar  $A$  à sombra, *i.e.* maior teor de  $N_{massa}$  para reduzir a diluição em  $N_{area}$  causada pelo aumento em AFE. Salienta-se

que há grandes incertezas em relação ao valor da atividade específica da Rubisco usada no cálculo do  $P_r$ ; se fosse usado o valor para *Nicotiana tabacum* encontrado por von Caemmerer et al. (1994), em vez do valor para *Spinacea oleracea* obtido por Jordan e Ogren (1984), o valor de  $P_r$  seria ainda menor, 12.5%. Aparentemente, os altos investimentos em capacidade de transporte de elétrons e carboxilação nas plantas de sombra, em relação à sua irradiância de crescimento, podem ser uma estratégia de utilização/dissipação de energia de *sunflecks*.

A redução nas taxas respiratórias nas plantas sombreadas tem importante papel na redução do ponto de compensação luminoso, permitindo a ocorrência de balanços positivos de carbono em condições de baixa irradiância (Valladares e Niinemets, 2008). As taxas respiratórias no escuro ( $R_d$ ) obtidas neste estudo foram menores (cerca de 50%) que as obtidas por Matos et al. (2009) para as plantas sombreadas, mas foram semelhantes para as plantas de sol. A estimativa das taxas respiratórias na folha iluminada ( $R_L$ ), de acordo com o método de Laisk (1977), indicaram inibição de cerca de 75% em  $R_d$ , valor maior do que a inibição de 50% sugerida por Niinemets et al. (2006) para várias espécies. Já é conhecido há vários anos (Atkin et al., 2000) que a respiração mitocondrial é inibida na presença de luz devido à inibição do ciclo de Krebs e da reação da desidrogenase do piruvato (Tcherkez et al., 2005 e 2008); no entanto, a extensão dessa inibição (30-100%) é controversa. Não obstante, a magnitude da inibição de  $R_d$  em café reflete mudanças importantes no metabolismo respiratório e traz implicações na economia de carbono, como cálculos de *payback* (Poorter et al., 2006), que integram taxas respiratórias ao longo do tempo.

#### ***4.5. Efeitos de baixas concentrações de $O_2$ e elevadas concentrações de $CO_2$ nas curvas de luz ou $A/C_i$***

As diferenças nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* observadas nas plantas de sol e sombra, em condição ambiente, foram fortemente dependentes das taxas fotossintéticas, associadas a maiores ou menores condutâncias estomáticas. Quando as plantas de sol e de sombra apresentaram *A* semelhante, houve mudanças marginais nos parâmetros de fluorescência. Entretanto, em condições de menor  $g_s$ , quando a ocorrência de excesso de energia de excitação é comum, a maior capacidade de dissipação térmica das plantas de sol foi evidente pelas maiores alterações em NPQ e  $F_v'/F_m'$ , refletindo o maior *pool* de xantofilas geralmente encontrado em plantas de sol (Moraes et al., 2010; Pompelli et al., 2010). Independentemente do fenótipo, as mudanças no coeficiente de extinção

fotoquímica ( $q_L$ ) foram sempre menos pronunciadas em relação às mudanças nos demais parâmetros de fluorescência, indicando semelhante estado de oxidação do *pool* de plastoquinonas sob diferentes irradiâncias. Resultado semelhante foi encontrado por outros autores (e.g. Kitao et al., 2006; Wyka et al., 2007), mesmo em condições de sombreamento mais severo que o usado neste experimento.

Quando as curvas de luz foram realizadas sob concentração elevada de  $\text{CO}_2$  ( $2000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ), observaram-se aumentos pronunciados em TTE, além de notável redução na dissipação de energia térmica, demonstrando o importante papel das taxas fotossintéticas no consumo de energia de excitação, que, de outra maneira, seria dissipada como calor, conforme discutido anteriormente. De forma contrária, em condições de baixo  $\text{O}_2$ , o NPQ atingiu valores máximos a irradiâncias muito menores (cerca de  $250 \mu\text{mol fotóns m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) que a de saturação. Esta observação sugere que a fotorrespiração também desempenharia importante papel na dissipação do excesso de ATP e NADPH que ocorreria em condições ambiente. Entretanto, não houve um efeito aditivo da presumida supressão da fotorrespiração em  $A$  nas plantas de sombra e, como nas curvas de luz sob baixo  $\text{O}_2$  observou-se maior  $g_s$  em relação às curvas de luz sob condição ambiente, menor  $C_i$  não seria a explicação para a ausência de diferenças em  $A$ . Uma possível explicação para esse fato seria a atuação de drenos alternativos de elétrons, como a reação de Mehler, que usa o  $\text{O}_2$  como aceptor final de elétrons. Diversos trabalhos têm sugerido a importância da reação de Mehler (Ort e Baker, 2002; Myake, 2010) como dreno de elétrons, podendo responder por até 20% do fluxo total de elétrons no FSII.

As curvas  $A/C_i$  tiveram comportamento similar às curvas de luz sob baixo  $\text{O}_2$ , com alterações mínimas em  $A$ . Ressalta-se que a fase inicial da curva  $A/C_i$  reúne as condições mais propensas para a ocorrência do processo fotorrespiratório: baixos  $C_i$  e elevada irradiância. Portanto, é intrigante que alterações em  $A$  não tenham sido observadas, apesar de mudanças tão marcantes ocorrerem na TTE e  $F_v'/F_m'$ . Em conjunto, essas evidências sugerem a presença de baixas taxas fotorrespiratórias em café, nas condições deste experimento, o que é em parte suportado pelo elevado valor do fator de especificidade da Rubisco estimado, o qual foi maior que os encontrados por Galmés et al. (2005) para espécies lenhosas de clima mediterrâneo.

## 5. Conclusão

Em contraste à hipótese deste estudo, os resultados sugerem que a condutância mesofilica teve importância igual ou inferior ao da condutância estomática na explicação das baixas taxas fotossintéticas no cafeeiro, independentemente do fenótipo. Aparentemente, a arquitetura hidráulica seria o fator primário mais limitante à fotossíntese no cafeeiro, o que limitaria a capacidade de reidratação dos tecidos foliares, restringindo, pois, a manutenção de condutâncias estomáticas elevadas. A partição do N foi caracterizada por uma capacidade limitada de alteração nas frações do N envolvidas em carboxilação e em transporte de elétrons, em função da irradiância, mas com um notável investimento de N em pigmentos envolvidos na captura de luz e na fração estrutural. Os resultados também suportam a hipótese de que as folhas sombreadas no cafeeiro aproveitariam melhor a energia de *sunflecks* em relação às folhas de sol, em razão dos maiores estados de ativação, menores perdas de indução fotossintética e ausência de fotoinibição nas folhas de sombra. Os resultados deste trabalho ajudam a explicar, em parte, a baixa eficiência fotossintética do N, em decorrência de investimento do N em compostos não-fotossintéticos. Sugere-se, ainda, a necessidade de maior investigação das limitações hidráulicas no cafeeiro, que podem ser cruciais no melhoramento da espécie, com vistas ao aumento de suas taxas fotossintéticas.

## 6. Referências Bibliográficas

- Araújo WL, Dias PC, Moraes GABK, Celin EF, Cunha RL, Barros RS, DaMatta FM** (2008) Limitations to photosynthesis in coffee leaves from different canopy positions. *Plant Physiol Biochem* **46**: 884-890
- Atkin OK, Evans JR, Ball MC, Lambers H, Pons TL** (2000) Leaf respiration of snow gum in the light and dark. Interactions between temperature and irradiance. *Plant Physiol* **122**: 915-923
- Bai K, Liao D, Jiang D, Cao K** (2008) Photosynthetic induction in leaves of co-occurring *Fagus lucida* and *Castanopsis lamontii* saplings grown in contrasting light environments. *Trees* **22**: 449-462
- Bernacchi CJ, Portis AR, Nakano H, von Caemmerer S, Long SP** (2002) Temperature response of mesophyll conductance. Implications for the determination of Rubisco enzyme kinetics and for limitation to photosynthesis in vivo. *Plant Physiol* **130**: 1992-1998
- Bernacchi CJ, Singaas EL, Pimentel C, Portis AR, Long SP** (2001) Improved temperature response functions for models of Rubisco-limited photosynthesis. *Plant Cell Environ* **24**: 253-259
- Brodribb TJ, Holbrook MN** (2003) Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf physiological traits. *Plant Physiol* **132**: 2166-2173
- Brodribb TJ, Holbrook MN, Zwieniecki MA, Palma B** (2004) Leaf hydraulic capacity in ferns, conifers and angiosperms: impacts on photosynthetic maxima. *New Phytol* **165**: 839-846
- Brodribb TJ, Feild TS, Jordan GJ** (2007) Leaf maximum photosynthetic rate and venation are linked by hydraulics. *Plant Physiol* **144**: 1890-1898
- Brodribb TJ** (2009) Xylem hydraulic physiology: The functional backbone of terrestrial plant productivity. *Plant Sci* **177**: 245-251
- Brodribb TJ, Feild TS, Sack L** (2010) Viewing leaf structure and evolution from a hydraulic perspective. *Funct Plant Biol* **37**: 488-498

- Cannell MGR** (1985) Physiology of coffee crop. *In* MN Clifford, KC Wilson, eds, Coffee: botany, biochemistry and production of bean and beverage. Croom Helm, London, pp 108-134
- Campanello PI, Gatti MG, Goldstein G** (2008) Coordination between water-transport efficiency and photosynthetic capacity in canopy tree species at different growth irradiances. *Tree Physiol* **28**: 85-94
- Carelli MLC, Fahl JI, Ramalho JDC** (2006) Aspects of nitrogen metabolism in coffee plants. *Braz J Plant Physiol* **18**: 9-21
- Cataldo DA, Haroon M, Schrader LE, Youngs VL** (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Comm Soil Sci Plant Anal* **6**: 71-80
- Cornic G, Briantais J** (1991) Partitioning of photosynthetic electron flow between CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> reduction in a C3 leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO<sub>2</sub> concentrations and during drought stress. *Planta* **183**: 178-184
- Coste S, Roggy J, Imbert P, Born C, Bonal D, Dreyer E** (2005) Leaf photosynthetic traits of 14 tropical rain forest species in relation to leaf nitrogen concentration and shade tolerance. *Tree Physiol* **25**: 1127-1137
- DaMatta FM, Loos RA, Silva EA, Loureiro ME** (2002) Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *J Plant Physiol* **159**: 975-981
- DaMatta FM** (2003) Drought as a multidimensional stress affecting photosynthesis in tropical tree crops. *In* E Hemantaranjan, ed, *Advances in Plant Physiology*, v.5. Scientific Publishers, Jodhpur, pp 227-265
- DaMatta FM** (2004) Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. *Field Crops Res* **86**: 99-114
- Duan B, Li Y, Zhang X, Korpelainen H, Li C** (2009) Water deficit affects mesophyll limitation of leaves more strongly in sun than in shade in two contrasting *Picea asperata* populations. *Tree Physiol* **29**: 1551-1561



- Epron D, Godard D, Cornic G, Genty B** (1995) Limitation of net CO<sub>2</sub> assimilation rate by internal resistances to CO<sub>2</sub> transfer in the leaves of two tree species (*Fagus sylvatica* L. and *Castanea sativa* Mill.). *Plant Cell Environ* **18**: 43-51
- Evans JR** (1986) A quantitative analysis of light distribution between the two photosystems, considering variation in both the relative amounts of the chlorophyll-protein complexes and the spectral quality of light. *Photochem Photobiophys* **10**: 135-147
- Evans JR, Poorter H** (2001) Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant Cell Environ* **24**: 755-767
- Evans JR, Kaldenhoff R, Genty B, Terashima I** (2009) Resistances along the CO<sub>2</sub> diffusion pathway inside leaves. *J Exp Bot* **60**: 2235-2248
- Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA** (1980) A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta* **149**: 78-90
- Flexas J, Dias-Espejo A, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbo M** (2007a) Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO<sub>2</sub> concentration around leaves. *Plant Cell Environ* **10**: 1284-1298
- Flexas J, Dias-Espejo A, Berry JA, Cifre J, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbo M** (2007b) Analysis of leakage in IRGA's leaf chambers of open gas exchange systems: quantification and its effects in photosynthesis parameterization. *J Exp Bot* **58**: 1533-1543
- Flexas J, Ribas-Carbó M, Diaz-Espejo A, Galmés J, Medrano H** (2008) Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>: current knowledge and future prospects. *Plant Cell Environ* **31**: 602-621
- Frak E, Le Roux X, Millard P, Dreyer E, Jaouen G, Saint-Joanis B, Wendler R** (2001) Changes in total leaf nitrogen and partitioning of leaf nitrogen drive photosynthetic acclimation to light in fully developed walnut leaves. *Plant Cell Environ* **24**: 1279-1288
- Franck N, Vaast F** (2009) Limitation of coffee leaf photosynthesis by stomatal conductance and light availability under different shade levels. *Trees* **23**: 761-769
- Galmés J, Flexas J, Keys AJ, Cifre J, Mitchell RAC, Madgwick PJ, Haslam RP, Medrano H, Parry MAJ** (2005) Rubisco specificity factor tends to be larger in plant

species from drier habitats and in species with persistent leaves. *Plant Cell Environ* **28**: 571-579

**Gascó A, Nardini A, Salleo S** (2004) Resistance to water flow through leaves of *Coffea arabica* is dominated by extra-vascular tissues. *Funct Plant Biol* **31**: 1161-1168

**Geber MA, Dawson TE** (1997) Genetic variation in stomatal and biochemical limitations to photosynthesis in the annual plant, *Polygonum arenastrum*. *Oecologia* **109**: 535-546

**Grassi G, Magnani F** (2001) Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant Cell Environ* **28**: 834-849

**Hammond ET, Andrews TJ, Woodrow IE** (1998) Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by carbamylation and 2-carboxyarabinitol 1-phosphate in tobacco: insights from studies of antisense plants containing reduced amounts of rubisco activase. *Plant Physiol* **118**: 1463-1471

**Hanba YT, Kogami H, Terashima** (2002) The effect of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. *Plant Cell Environ* **25**: 1021-1030

**Harley PC, Sharkey TD** (1991) An improved model of C<sub>3</sub> photosynthesis at high CO<sub>2</sub>: reversed O<sub>2</sub> sensitivity explained by lack of glycerate re-entry into the chloroplast. *Photosynth Res* **27**: 169-178

**Harley PC, Loreto F, Di Marco G, Sharkey TD** (1992) Theoretical considerations when estimating the mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> flux by analysis of the response of photosynthesis to CO<sub>2</sub>. *Plant Physiol* **98**: 1429-1436

**Hikosaka K** (2004) Interspecific difference in the photosynthesis–nitrogen relationship: patterns, physiological causes, and ecological importance. *J Plant Res* **117**: 481-494

**Hikosaka K, Terashima I** (1995) A model of the acclimation of photosynthesis in the leaves of C<sub>3</sub> plants to sun and shade with respect to nitrogen use. *Plant Cell Environ* **18**: 605-618

**Jackson ML** (1958) *Soil Chemical Analysis*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 498p

- Jordan DB, Ogren WL** (1984) The CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta* **161**: 308-313
- Katahata S, Naramoto M, Kakubari Y, Mukai Y** (2007) Photosynthetic capacity and nitrogen partitioning in foliage of the evergreen shrub *Daphniphyllum humile* along a natural light gradient. *Tree Physiol* **27**: 199-208
- Kitao M, Lei TT, Koike T, Tobita H, Maruyama Y** (2006) Tradeoff between shade adaptation and mitigation of photoinhibition in leaves of *Quercus mongolica* and *Acer mono* acclimated to deep shade. *Tree Physiol* **26**: 441-448
- Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE** (2004) New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth Res* **79**: 209-218
- Laing WA, Ögren WL, Hageman RH** (1974) Regulation of soybean net photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation by the interaction of CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Plant Physiol* **54**: 678-685
- Laisk, AK** (1977) Kinetics of Photosynthesis and Photorespiration in C<sub>3</sub>-Plants. Nauka, Moscow, 198p
- Le Roux X, Walcroft AS, Daudet FA, Sinoquet H, Chaves MM, Rodrigues A, Osório L** (2001) Photosynthetic light acclimation in peach leaves: importance of changes in mass:area ratio, nitrogen concentration, and leaf nitrogen partitioning. *Tree Physiol* **21**: 377-386
- Lichthenthaler HK** (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* **148**: 350-382
- Li Z, Zhang S, Hu H, Li D** (2008) Photosynthetic performance along a light gradient as related to leaf characteristics of a naturally occurring *Cypripedium flavum*. *J Plant Res* **121**: 559-569
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME** (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ Exp Bot* **47**: 239-247

- Long SP, Bernacchi CJ** (2003) Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *J Exp Bot* **54**: 2393-2401
- Lloyd J, Syvertsen JP, Kriedemann PE, Farquhar JD** (1992) Low conductances for CO<sub>2</sub> diffusion from stomata to the sites of carboxylation in leaves of woody species. *Plant Cell Environ* **15**: 873-899
- Malavolta E, Favarin JL, Malavolta M, Cabral CP, Heinrichs R, Silveira JSM** (2002) Repartição de nutrientes nos ramos, folhas e flores do cafeeiro. *Pesq Agropec Bras* **37**: 1017-1022
- Manter DK, Kerrigan J** (2004)  $A/C_i$  curve analysis across a range of woody plant species: influence of regression analysis parameters and mesophyll conductance. *J Exp Bot* **55**: 2581-2588
- Markensteijn L, Poorter L, Bongers F** (2007) Light-dependent leaf trait variation in 43 tropical dry forest tree species. *Am J Bot* **94**: 515-525
- Matos FS** (2008) Plasticidade anatômica e fisiológica de folhas de *Coffea arabica* L. em resposta à irradiância, *Mestrado em Fisiologia Vegetal*, Universidade Federal de Viçosa, 41 p
- Matos FS, Wolfgramm R, Gonçalves FV, Cavatte PC, Ventrella MC, DaMatta FM** (2009) Phenotypic plasticity in response to light in the coffee tree. *Environ Exp Bot* **67**: 421-427
- Medrano H, Flexas J, Galmés J** (2009) Variability in water use efficiency at the leaf level among Mediterranean plants with different growth forms. *Plant Soil* **317**: 17-29
- Moraes GABK, Chaves ARM, Martins SCV, DaMatta FM** (2010) Why is it better to produce coffee seedlings in full sunlight than in the shade? A morphophysiological approach. *Photosynthetica* **48**: 199-207
- Myake C** (2010) Alternative electron flows (Water–water cycle and cyclic electron flow around PSI) in photosynthesis: molecular mechanisms and physiological functions. *Plant Cell Physiol* **51**: 1951-1963
- Nardini A, Gortan E, Salleo S** (2005) Hydraulic efficiency of the leaf venation system in sun- and shade-adapted species. *Funct Plant Biol* **32**: 953-961

- Niinemets Ü, Kull O, Tenhunen JD** (1998) An analysis of light effects on foliar morphology, physiology, and light interception in temperate deciduous woody species of contrasting shade tolerance. *Tree Physiol* **18**: 681-696
- Niinemets Ü, Cescatti A, Rodeghiero M, Tosens T** (2006) Complex adjustments of photosynthetic potentials and internal diffusion conductance to current and previous light availabilities and leaf age in Mediterranean evergreen species *Quercus ilex*. *Plant Cell Environ* **29**: 1159-1178
- Niinemets Ü** (2007) Photosynthesis and resource distribution through plant canopies. *Plant Cell Environ* **30**: 1052-1071
- Ort DR, Baker NR** (2002) A photoprotective role for O<sub>2</sub> as an alternative electron sink in photosynthesis? *Curr Opin Plant Biol* **5**: 193-198
- Parry MAJ, Keys AJ, Madgwick PJ, Carmo-Silva AE, Andralojc PJ** (2008) Rubisco regulation: a role for inhibitors. *J Exp Bot* **59**: 1569-1580
- Pearcy RW** (1990) Sunflecks and photosynthesis in plant canopies. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **41**:421–453
- Piel C, Frak E, Le Roux X, Genty B** (2002) Effect of local irradiance on CO<sub>2</sub> transfer conductance of mesophyll in walnut. *J Exp Bot* **53**: 2423-2430
- Pompelli MF, Martins SCV, Antunes WC, Chaves ARM, DaMatta FM** (2010) Photosynthesis and photoprotection in coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions. *J Plant Physiol* **167**: 1052-1060
- Pons TL, Flexas J, von Caemmerer S, Evans JR, Genty B, Ribas-Carbo M, Brugnoli E** (2009) Estimating mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>: methodology, potential errors, and recommendations. *J Exp Bot* **60**: 2217-2234
- Poorter H, Jong R** (1999) A comparison of specific leaf area, chemical composition and leaf construction costs of field plants from 15 habitats differing in productivity. *New Phytol* **143**: 163-176
- Poorter H, Pepin S, Rijkers T, Jong Y, Evans JR, Körner C** (2006) Construction costs, chemical composition and payback time of high- and low-irradiance leaves. *J Exp Bot* **57**: 355-371

- Rena AB, Maestri M, Barros RS, Söndahl MR** (1994) Coffee. In B Schaffer, PC Andersen, eds, Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops: subtropical and tropical crops. CRC Press, Boca Raton, pp 101-122
- Rozendaal DMA, Hurtado VH, Poorter L** (2006) Plasticity in leaf traits of 38 tropical tree species in response to light; relationships with light demand and adult stature. *Funct Ecol* **20**: 207-216
- Sage RF, Cen Y, Li M** (2002) The activation state of Rubisco directly limits photosynthesis at low CO<sub>2</sub> and low O<sub>2</sub> partial pressures. *Photosynth Res* **71**: 241-250
- Salisbury EJ** (1927) On the causes and ecological significance of stomatal frequency with special reference to the woodland flora. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **216**: 1-65
- Sack L, Tyree MT, Holbrook NM** (2005) Leaf hydraulic architecture correlates with regeneration irradiance in tropical rainforest trees. *New Phytol* **167**: 403-413
- Sack L, Frole K** (2006) Leaf structural diversity is related to hydraulic capacity in tropical rain forest trees. *Ecology* **87**: 483-491
- Sack L, Holbrook MN** (2006) Leaf Hydraulics. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 361-381
- Santiago LS, Goldstein G, Meinzer FC, Fisher JB, Machado K, Woodruff D, Jones T** (2004) Leaf photosynthetic traits scale with hydraulic conductivity and wood density in Panamanian forest canopy trees. *Oecologia* **140**: 543-550
- Sharkey TD** (1985) Photosynthesis in intact leaves of C<sub>3</sub> plants: physics, physiology and rate limitations. *Bot Rev* **51**: 53-105
- Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD, Singsaas EL** (2007) Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C<sub>3</sub> leaves. *Plant Cell Environ* **30**:1035–1040.
- Silva EA, DaMatta FM, Ducatti C, Regazzi AJ, Barros RS** (2004) Seasonal changes in vegetative growth and photosynthesis of arabica coffee trees. *Field Crops Res* **89**: 349-357
- Syvertsen JP, Lloyd J, McConchie C, Kriedemann PE, Farquar GD** (1995) On the relationship between leaf anatomy and CO<sub>2</sub> diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant Cell Environ* **18**: 149-157
- Sperry JS** (2000) Hydraulic constraints on plant gas exchange. *Agric For Meteorol* **104**: 13-23

- Takashima T, Hikosaka K, Hirose T** (2004) Photosynthesis or persistence: nitrogen allocation in leaves of evergreen and deciduous *Quercus* species. *Plant Cell Environ* **27**: 1047-1054
- Tcherkez G, Cornic G, Bligny R, Gout E, Ghashghaie J** (2005) In vivo respiratory metabolism of illuminated leaves. *Plant Physiol* **138**: 1596-1606
- Tcherkez G, Bligny R, Gout E, Mahé A, Hodges M, Cornic G** (2008) Respiratory metabolism of illuminated leaves depends on CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> conditions. *PNAS* **105**, 797-802
- Terashima I, Miyazawa S, Hanba YT** (2001) Why are sun leaves thicker than shade leaves? Consideration based on analyses of CO<sub>2</sub> diffusion in the leaf. *J Plant Res* **114**: 93-105
- Terashima I, Hanba YT, Tazoe Y, Vyas P, Satoshi Y** (2006) Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO<sub>2</sub> diffusion. *J Exp Bot* **57**: 343-354
- Valladares F, Allen MT, Pearcy RW** (1997) Photosynthetic responses to dynamic light under field conditions in six tropical rainforest shrubs occurring along a light gradient. *Oecologia* **111**: 505-514
- Urban O, Košvancová M, Marek MV, Lichtenthaler HK** (2007) Induction of photosynthesis and importance of limitations during the induction phase in sun and shade leaves of five ecologically contrasting tree species from the temperate zone. *Tree Physiol* **27**: 1207-1215
- Valladares F, Martínez-Ferri, Balaguer L, Perez-Corona E, Manrique E** (2000) Low leaf-level response to light and nutrients in Mediterranean evergreen oaks: a conservative resource-use strategy? *New Phytol* **148**: 79-91
- Valladares F, Niinemets Ü** (2008) Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **39**: 237-257
- Valentini R, Epron D, De Angelis P, Matteucci G, Dreyer E** (1995) *In situ* estimation of net CO<sub>2</sub> assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Quercus cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant Cell Environ* **18**: 631-640

- von Caemmerer S, Evans JR, Hudson GS, Andrews TJ** (1994) The kinetics of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase *in vivo* inferred from measurements of photosynthesis in leaves of transgenic tobacco. *Planta* **195**: 88-97
- Warren CR, Adams MA, Chen Z** (2000) Is photosynthesis related to concentrations of nitrogen and Rubisco in leaves of Australian native plants? *Funct Plant Biol* **27**: 407-416
- Warren CR, Dreyer E, Adams MA** (2003) Photosynthesis-Rubisco relationships in foliage of *Pinus sylvestris* in response to nitrogen supply and the proposed role of Rubisco and amino acids as nitrogen stores. *Trees* **17**: 359-366
- Warren CR, Adams MA** (2004) Evergreen trees do not maximize instantaneous photosynthesis. *Trends Plant Sci* **9**: 270-274
- Warren CR, Adams MA** (2006) Internal conductance does not scale with photosynthetic capacity: implications for carbon isotope discrimination and the economics of water and nitrogen use in photosynthesis. *Plant Cell Environ* **29**: 192-201
- Warren CR, Löw M, Matyssek R, Tausz M** (2007) Internal conductance to CO<sub>2</sub> transfer of adult *Fagus sylvatica*: Variation between sun and shade leaves and due to free-air ozone fumigation. *Environ Exp Bot* **59**: 130-138
- Warren CR** (2007) Stand aside stomata, another actor deserves centre stage: the forgotten role of the internal conductance to CO<sub>2</sub> transfer. *J Exp Bot* **59**: 1475-1487
- Woodrow IE, Mott KA** (1989) Rate limitation of non-steadystate photosynthesis by ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in spinach. *Funct Plant Biol* **16**:487–500
- Wright IJ, Reich PB, Westoby M, Ackerly DD, Baruch Z, Bongers F, Cavendar-Bares J, Chapin T, Cornelissen JHC, Diemer M, Flexas J, Garnier E, Groom PK, Gulias J, Hikosaka K, Lamont BB, Lee T, Lee B, Lusk C, Midgley JJ, Navas M-L, Niinemets Ü, Oleksyn J, Osada N, Poorter H, Poot P, Prior L, Pyankov VI, Roumet C, Thomas SC, Tjoelker MG, Veneklaas EJ, Villar R** (2004) The leaf economics spectrum worldwide. *Nature* **428**: 821–827
- Wyka T, Robakowski P, Zytowski R** (2007) Acclimation of leaves to contrasting irradiance in juvenile trees differing in shade tolerance. *Tree Physiol* **27**: 1293-1306
- Wullschleger SD** (1993) Biochemical limitations to carbon assimilation in C<sub>3</sub> plants - A retrospective analysis of the A/C<sub>i</sub> curves from 109 species. *J Exp Bot* **44**: 907-920



**Yin X, Struik PC, Romero P, Harbinson J, Evers JB, van der Putten PEL, Vos J** (2009) Using combined measurements of gas exchange and chlorophyll fluorescence to estimate parameters of a biochemical C3 photosynthesis model: a critical appraisal and a new integrated approach applied to leaves in a wheat (*Triticum aestivum*) canopy. *Plant Cell Environ* **32**: 448-464