

WAGNER LUIZ ARAÚJO

LIMITAÇÕES DA FOTOSSÍNTESE E METABOLISMO DO CARBONO EM FOLHAS
DE DIFERENTES POSIÇÕES DA COPA DO CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)

Tese 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

2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A663L
2006

Araújo, Wagner Luiz, 1980-

Limitações da fotossíntese e metabolismo do carbono em folhas de diferentes posições da copa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) / Wagner Luiz Araújo. – Viçosa : UFV, 2006.

xii, 43f. : il. ; 29cm.

Orientador: Fábio Murilo da Matta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Café - Efeito da radiação solar. 2. Fotossíntese. 3. Carboidratos - Metabolismo. 4. Ecofisiologia vegetal. 5. Café - Fisiologia. 6. *Coffea arabica*. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.462393

WAGNER LUIZ ARAÚJO

LIMITAÇÕES DA FOTOSSÍNTESE E METABOLISMO DO CARBONO EM FOLHAS
DE DIFERENTES POSIÇÕES DA COPA DO CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)

Tese 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: 15 de fevereiro de 2006

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro
(Conselheiro)

Prof. Raimundo Santos Barros
(Conselheiro)

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva

Dr. Jailson Lopes Cruz

Prof. Fábio Murilo DaMatta
(Orientador)

A Antônio e Maria Margarida, meus pais (*in memoriam*), pelo exemplo de vida e dedicação;

A Teófilo e Maria, meus avós (*in memoriam*), por tudo o que significam para mim;

A Cristiane, por todo amor e paciência,

Com amor

Dedico

A Gilberto e Cesar, meus irmãos, pelo carinho;

A Jeam, meu sobrinho, pela alegria da vida;

A todos meus tios e tias, primos e primas, amigos e amigas, pela confiança,

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa, de maneira especial ao Departamento de Biologia Vegetal e ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade e ajuda para a realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos.

A Antônio e Margarida, meus pais (*in memoriam*), que, embora ausentes, nunca deixaram de estar em meu coração, e por terem sido grandes motivadores da minha carreira.

A Teófilo e Maria, meus avós (*in memoriam*), que nunca deixaram de me dar apoio e incentivo.

A Cristiane, pela paciência e amizade e por todo amor e carinho dedicados a mim.

A Gilberto e Cesar, meus irmãos, pelo carinho, paciência e amizade, mesmo à distância.

A meu sobrinho Jean, por trazer mais alegria a minha vida e por fazer-me testemunhar o milagre da vida.

A todos meus tios e tias, primos e primas, por sempre acreditarem em mim.

Ao Prof. Fábio, além de meu Orientador, um grande amigo, pela orientação e exemplo profissional, pelos ensinamentos e pelo enorme empenho e dedicação na realização deste projeto.

Aos meus amigos Daniel, Ezequiel, Hannuar, Lauro, Luciano e José Manoel, em Viçosa, e André Negão, Marcelinho, Popó, Saulinho e Xandy, em Florestal, pela infinita amizade e por tornarem meu mundo mais alegre e divertido.

Aos meus amigos da graduação e de sempre, Alessandra, Aline, Ézio e Marcy.

A Leo e Arine, pela grande amizade, pelas saudosas brincadeiras e por todo carisma.

Ao Prof. Paulo Mosquim, pela amizade, apoio e constante incentivo e por ter-me levado a conhecer o mundo da pesquisa científica em fisiologia vegetal.

Ao Dr. Jailson Lopes Cruz, pela atenção, confiança, incentivo e amizade, desde a iniciação científica.

Aos professores Marcelo Ehlers Loureiro, Marco Aurélio Pedron Silva, Raimundo Santos Barros e Rolf Puschmann, pela amizade, paciência e ensinamentos transmitidos durante este curso.

Aos amigos Paulo Cesar (PC) e Gustavo Kling, por toda a amizade e companheirismo que me dedicaram, meu sincero muito obrigado.

A Elaine Celin, pelo carinho, compreensão e amizade.

Aos bolsistas de iniciação científica, Elaine, Karine, Marco Túlio e Samuel, pela amizade e grande dedicação na execução dos experimentos.

A todos os que conviveram comigo durante a graduação no alojamento (Apto 1511), o meu agradecimento eterno por sempre terem me ajudado, da melhor maneira possível, a hoje ser o que sou.

Aos funcionários Beth, Carlos Raimundo, Cássia, Geraldo, Ilza, João Bosco, Mercês, Oswaldo, Reginaldo, Rogério Gomide, Zé Antônio e Zé Maria, pela ajuda, pelas brincadeiras e pelo carisma.

A todos os colegas de curso, em especial Adriano Nesi, Adriano Simões, Agnaldo, Ana Maria, Ângela, Caroline, Cláudio, Dimas, Elaine Cabrini, Franciscleudo, Gabriela, Gustavo Resque, Hugo, Marcelo Pompelli, Márcio Rocha, Paulo Cesar (PC2), Rafaela, Roberto, Sidney, Vânia e Werner, pelo companheirismo, apoio e ajuda.

A todo povo brasileiro, por financiar todos meus estudos, por meio de seus esforços e impostos, meu eterno respeito e gratidão.

BIOGRAFIA

WAGNER LUIZ ARAÚJO nasceu em Florestal, MG, aos 20 dias do mês de fevereiro de 1980. Em dezembro de 1997, concluiu o Curso de Técnico em Agropecuária, na Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal – CEDAF, em Florestal, MG. Em abril de 1999, iniciou o Curso de Engenharia Agrônômica, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, concluindo-o em janeiro de 2004. Em março do mesmo ano, iniciou seus estudos no curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal, na mesma Instituição.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
I. Introdução geral.....	1
1.1. Literatura citada.....	3
II. Capítulo 1: Limitações da fotossíntese em folhas de diferentes posições da copa do cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.)	
1.1. Introdução.....	6
1.2. Material e Métodos.....	8
1.3. Resultados.....	11
1.4. Discussão.....	16
1.5. Referências.....	21
III. Capítulo 2: Limitações bioquímicas da fotossíntese e metabolismo do carbono em folhas de diferentes posições da copa do cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.)	
2.1. Introdução.....	27
2.2. Material e Métodos.....	28
2.3. Resultados.....	29
2.4. Discussão.....	36
2.5. Referências.....	38
IV. Conclusões Gerais.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

- A = taxa de assimilação líquida de carbono
 A/C_i = curva de resposta de A à concentração interna de CO_2
 A/RFA = curvas de resposta de A à irradiância
 A_{CO_2} = taxa de assimilação líquida de carbono máxima obtida a partir das curvas A/C_i
 AFE = área foliar específica
 $AGPase$ = pirofosforilase da ADP-glicose
 A_{max} = capacidade fotossintética máxima, determinada sob luz e CO_2 saturantes
 A_{RFA} = taxa de assimilação líquida de carbono saturada pela luz
 C_a = concentração ambiente de CO_2
 C_i = concentração interna de CO_2
 EA = estado de ativação
 F_0 = fluorescência inicial
 $FBPase$ = fosfatase da frutose-1,6-bisfosfato
 F_m = fluorescência máxima
 FS = fotossistema
 F_v/F_m = eficiência fotoquímica máxima do FSII
 $GAPDH$ = desidrogenase do gliceraldeído-3-P
 g_m = condutância mesofílica
 g_s = condutância estomática
 IA = invertase ácida
 I_c = irradiância de compensação
 I_s = irradiância de saturação
 J_{max} = taxa de carboxilação máxima limitada pelo transporte de elétrons
 LER = limitação estomática relativa
 N = nitrogênio
 $NADP-GAPDH$ = desidrogenase do NADP:gliceraldeído-3-P
 R_d = taxa de respiração escura
 RFA = radiação fotossinteticamente ativa

Rubisco = carboxilase/oxigenase da ribulose-1,5-bisfosfato

SPase = fosforilase do amido

SPS = sintase da sacarose-fosfato

SuSy = sintase da sacarose

T_f = temperatura foliar

TTE = taxa de transporte de elétrons

V_{cmax} = taxa de carboxilação máxima

V_{inicial} = atividade inicial da Rubisco

V_{max} = atividade catalítica máxima da SPS

V_{sel} = atividade catalítica seletiva da SPS

V_{total} = atividade total da Rubisco

$\delta^{13}\text{C}$ = composição isotópica do carbono

δ_e = déficit de pressão de vapor entre o interior da folha e a atmosfera

a = rendimento quântico aparente

Φ_{FSII} = rendimento quântico do transporte de elétrons

Γ^* = ponto de compensação de CO_2 na ausência de R_d

RESUMO

ARAÚJO, Wagner Luiz, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006.
Limitações da fotossíntese e metabolismo do carbono em folhas de diferentes posições da copa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Orientador: Fábio Murilo DaMatta.
Conselheiros: Marcelo Ehlers Loureiro e Raimundo Santos Barros.

O cafeeiro é originário de ambientes sombreados, exibindo baixas taxas fotossintéticas, mesmo sob condições ótimas de cultivo. No entanto, muito pouco se sabe, nessa espécie, acerca das oscilações espaciais e temporais da fotossíntese, bem como das causas de suas baixas taxas fotossintéticas. Neste estudo, portanto, examinou-se o comportamento diurno das trocas gasosas, da fluorescência da clorofila *a* e do metabolismo do carbono, em diferentes posições da copa do cafeeiro, investigando-se as estratégias fisiológicas e bioquímicas envolvidas na aclimatação da maquinaria fotossintética, em função da atenuação da irradiância interceptada, ao longo do dossel, em plantas cultivadas em renques orientados no sentido norte-sul. Apesar de a radiação fotossinteticamente ativa (RFA) incidente sobre a copa ter variado, de 500 a 1850 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ao longo dos horários avaliados, a RFA efetivamente interceptada foi bem menor, entre 20 a 800 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para as folhas inferiores, e 50 a 1400 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para as superiores. A taxa de assimilação líquida do carbono (*A*) foi, em média, 135% maior nas folhas superiores, ao passo que a razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) foi sempre maior, e a composição isotópica do carbono menor, nas folhas inferiores, enquanto valores similares das condutâncias estomática (g_s) e mesofílica (g_m) foram observados, comparando-se folhas superiores e inferiores. Apesar da baixa disponibilidade de luz, observada nos estratos inferiores, tanto as irradiâncias de compensação como a de saturação foram similares entre folhas superiores e inferiores. O rendimento quântico aparente também foi similar entre faces e estratos. A taxa de assimilação líquida de carbono saturada pela luz foi relativamente baixa, mesmo nas folhas superiores, indicando que limitações outras, além da luz, podem estar largamente associadas às baixas taxas fotossintéticas do cafeeiro. As atividades inicial e total da Rubisco, bem como seu estado de ativação, pouco variaram entre faces e estratos. Com efeito, estes resultados, juntamente com os obtidos a partir das curvas A/C_i , sugerem que: (i) as causas da variação espacial das taxas fotossintéticas em folhas recém-expandidas não foram resultantes de limitações bioquímicas ou difusionais, mas, fundamentalmente de limitações fotoquímicas associadas à baixa disponibilidade de luz; (ii) as baixas taxas

fotossintéticas *per se*, em café, devem ser resultantes, particularmente, de limitações difusivas, conforme se infere a partir dos valores baixos de g_s e g_m , tanto nas folhas superiores como nas inferiores, ao longo de todo o dia, mas não necessariamente devido a uma baixa capacidade mesofílica para fixação de CO_2 . Mesmo a $C_i = 1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ($C_a = 1600 \mu\text{mol mol}^{-1}$), não se observou saturação de A , em folhas de ambas as faces e estratos. De fato, as pequenas variações nas concentrações dos carboidratos e nas atividades de várias enzimas associadas com o metabolismo do carbono sugerem que o café apresenta uma baixa plasticidade para ajustar a sua maquinaria bioquímica para fixação do CO_2 , em resposta à redução da disponibilidade de luz. As maiores atividades da sintase da sacarose-fosfato e da fosfatase da frutose-1,6-bisfosfato nas folhas superiores, em relação às das inferiores, devem estar fortemente associadas com as maiores taxas fotossintéticas observadas nas primeiras, de modo a garantir-lhes a manutenção da síntese e da exportação de fotoassimilados. Não se verificou fotoinibição da fotossíntese, mesmo nas folhas mais expostas à irradiância. O rendimento quântico do transporte de elétrons através do fotossistema II foi quase sempre menor, e a taxa de transporte de elétrons e o ângulo de inclinação foliar sempre maiores, nas folhas superiores em relação às inferiores. As diferenças observadas em A não estiveram relacionadas a diferenças na alocação de N para a produção de pigmentos fotossintéticos, cujas concentrações não variaram ao longo do dossel. Concomitantemente, estes resultados sugerem que, apesar dos valores relativamente baixos de A , o aparelho fotossintético do café exibe uma plasticidade relativamente baixa às variações da RFA.

ABSTRACT

ARAÚJO, Wagner Luiz, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2006. **Limitations to photosynthesis and carbon metabolism in leaves of different positions in the canopy of the coffee tree (*Coffea arabica* L.)**. Adviser: Fábio Murilo DaMatta. Committee Members: Marcelo Ehlers Loureiro and Raimundo Santos Barros.

This study aimed to explore the physiological and biochemical strategies associated to the acclimation of the photosynthetic apparatus due to irradiance attenuation downwards the canopy of coffee plants, as well as the causes of their low photosynthetic rates. Sampling and measurements were made using outer leaves from upper and lower strata from east- and west-faced sides of a coffee hedgerow (north-south orientation). Photosynthetic active radiation (PAR) incident on the canopy varied from 500 to 1850 $\mu\text{mol (photons) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ but PAR effectively intercepted by leaves was smaller, ranging from 20 to 800 $\mu\text{mol (photons) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for lower leaves, and from 50 to 1400 $\mu\text{mol (photons) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for the upper ones. In general, net carbon assimilation rate (A) was larger in upper leaves (135%), while internal to ambient CO_2 concentration ratio (C_i/C_a) was always larger, and carbon isotope composition smaller, in lower leaves. By contrast, both stomatal (g_s) and mesophyll (g_m) conductances were similar for both upper and lower leaves. The compensation and saturation irradiances as well as the apparent quantum yield were also similar regardless leaf position. Light-saturated A was relatively low even in upper leaves, suggesting that limitations other than light could be largely associated with the low photosynthetic rates of coffee plants. Initial and total activities of Rubisco, as well as its activation state, varied lightly along the treatments. These results, combined with those from curves A/C_i , suggest that: (i) spatial variation of photosynthetic rates in recently expanded leaves were not a result of biochemical or diffusional limitations, but mainly of photochemical limitations associated with low-light availability; (ii) low photosynthetic rates *per se* should have resulted mainly from diffusional limitations, as could be deduced from the low values of g_s and g_m irrespective of leaf position, but not necessarily due to a low mesophyll capacity for CO_2 fixation. Even at $C_i = 1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ($C_a = 1600 \mu\text{mol mol}^{-1}$) A was not saturated. In fact, small variations in carbohydrate concentrations as well as in the activities of several enzymes associated with carbon metabolism suggest that the coffee tree presents a low plasticity to adjust its biochemical apparatus for CO_2 fixation in response to decreasing light availability. The greatest activities of sucrose-phosphate synthase and fructose-1,6-bisphosphatase in upper leaves appeared to be strongly associated with the

greatest photosynthetic rates observed in these leaves in order to guarantee their abilities to maintain sucrose synthesis and export. Photoinhibition of photosynthesis was not observed even in the most exposed leaves. The quantum yield of electron transport was almost always smaller, while the electron transport rate and leaf angles were always larger, in the upper leaves than in the lower leaves. The differences observed in *A* were not related to a differential allocation of N for the production of photosynthetic pigments, which did not vary along the canopy. Taken together, despite the relatively low values of *A*, the photosynthetic apparatus of the coffee plants appears to exhibit a relatively low plasticity in response to varying irradiance.

1. Introdução Geral

Características morfológicas e fisiológicas foliares geralmente variam com a posição na copa, uma vez que diferentes posições estão associadas a ambientes lumínicos distintos (Hollinger, 1989; Ishida et al., 1999). O desempenho fotossintético das plantas deve ser, pois, maximizado, mediante adaptações morfológicas e fisiológicas ao ambiente luminoso (Poorter, 2001), desde o nível subcelular até níveis macroscópicos (Balaguer et al., 2001). Obviamente, não apenas a irradiância interceptada, mas também a temperatura foliar (T_f), deve variar ao longo do dossel, com possíveis reflexos sobre o comportamento estomático e a fotossíntese. Assim, a capacidade fotossintética varia amplamente em diferentes folhas de uma mesma planta, sendo frequentemente limitada por restrições difusivas e bioquímicas (Kozlowski & Pallardy, 1997). Limitações difusivas (e.g., estomáticas e mesofílicas), mas não as limitações bioquímicas, estão associadas a decréscimos na concentração interna de CO_2 (C_i), podendo ser superadas mediante a elevação no suprimento externo de CO_2 . Além de limitações difusivas, alterações nas reações fotoquímicas e na atividade das enzimas da fase bioquímica da fotossíntese, bem como das enzimas do metabolismo dos carboidratos e do nitrogênio (Boyer, 1995; Foyer et al., 1994; Kanechi et al., 1996; Paul & Driscoll, 1997), podem afetar significativamente a magnitude das taxas fotossintéticas. Saliente-se que a atividade de algumas enzimas do ciclo de Calvin (e.g., carboxilase/oxigenase da ribulose-1,5-bisfosfato - Rubisco, EC 4.1.1.39) e da sintase da sacarose-fosfato (SPS, EC 2.4.1.14) são moduladas pela luz (Zimmerman et al., 1995).

O café (*Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre) constitui a cultura perene mais importante e difundida na América Latina, sendo cultivado também nos continentes africano e asiático, contribuindo, assim, para a balança comercial de vários países. Originária das florestas tropicais da África, onde é encontrada em estado espontâneo como vegetação de sub-bosque, desenvolvendo-se, portanto, permanentemente sob sombra, a cultura do café expandiu-se e adaptou-se às mais variadas condições ecológicas da faixa tropical. No Brasil, atualmente, os cafezais vêm sendo conduzidos quase exclusivamente a pleno sol, enquanto em muitos países da América Central, por exemplo, a espécie é mais frequentemente

cultivada em sistemas arborizados. Não obstante, cafeeiros cultivados a pleno sol produzem satisfatoriamente e, na maioria dos casos, mais que os plantios à sombra. Como consequência, o sombreamento, como uma prática cultural regular, foi abandonado em várias regiões do mundo, como no Brasil e no Quênia (Malavolta, 2000).

No cafeeiro, desde que a abertura estomática não seja limitante, a taxa de assimilação líquida do carbono (A) parece maior nas folhas expostas que nas sombreadas (DaMatta, 2004a). Geralmente, quando se observa maior A à sombra que a pleno sol, menor condutância estomática (g_s) nas folhas expostas parece explicar, pelo menos parcialmente, essas observações (Freitas, 2000; Gutiérrez & Meinzer, 1994; Kumar & Tieszen, 1980; Paiva et al., 2001). Uma vez que a abertura dos estômatos em café é maior sob sombra ou em dias nublados ou chuvosos (Fanjul et al., 1985; Maestri & Vieira, 1958), é plausível sugerir que, a pleno sol, a fotossíntese possa ser largamente limitada por baixos valores de g_s . De fato, g_s parece menor nas folhas expostas que nas sombreadas, de modo que nas últimas a fotossíntese seria limitada pela baixa disponibilidade de luz, e não por limitações decorrentes de baixa g_s (Gutiérrez & Meinzer, 1994). Registre-se que alguns atributos típicos de folhas de sombra, como a baixa razão clorofila a /clorofila b (DaMatta & Maestri, 1997; Fahl et al., 1994) e valores relativamente baixos de irradiância de compensação (I_c) (Rena et al., 1994), são usualmente observados, mesmo na folhagem exposta. Outras características, como menor taxa de respiração escura (R_d), aumento na concentração de clorofilas por unidade de massa e no rendimento quântico aparente (Φ_a) (Friend, 1984), assim como a alteração no ângulo de inclinação foliar, devem ter papel de destaque, na aclimatação a baixas irradiâncias, particularmente nas folhas sujeitas a menor disponibilidade de luz. Por outro lado, o cafeeiro exhibe também características indicativas de aclimatação/adaptação às altas irradiâncias, observando-se, em plantas a pleno sol, por exemplo, redução da área foliar específica (AFE), aumento da espessura da cutícula (Fahl et al., 1994; Voltan et al., 1992), incrementos na densidade estomática (Voltan et al., 1992), cloroplastos com menos *grana* e menos tilacóides por *granum* (Fahl et al., 1994), aumento na quantidade e na atividade da Rubisco (Ramalho et al., 1999) e reversão da fotoinibição relativamente rápida (DaMatta & Maestri, 1997). Em adição, em plantas de café, uma vez que se atinja a irradiância de saturação (I_s), com valores variando de 300 a 600-700 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com folhas à sombra, ou as mais internas da copa, exibindo os menores valores (Kumar & Tieszen, 1980; Fahl et al., 1994), a fotossíntese pode prosseguir sem decréscimos substanciais até cerca de 1200 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Kumar & Tieszen, 1980) ou mesmo 1400 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Ramalho et al., 2000). Tomados em conjunto, esses resultados permitem pressupor que o café apresenta mecanismos para ajustar sua maquinaria fotossintética e bioquímica às condições preponderantes de luminosidade,

sugerindo que o cafeeiro possa responder plasticamente às variações da irradiância (DaMatta, 2004 a,b).

Cumprido ressaltar que, como a 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 *C. arabica* situam-se na faixa de 7 a 12 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, porém, mais amiúde, esses valores giram em torno de 4 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Rena et al., 1994). Esses dados indicam que o cafeeiro exibe uma eficiência fotossintética muito baixa, em relação à da maioria das plantas lenhosas (Cannell, 1985). Por outro lado, a capacidade fotossintética máxima, determinada sob luz e CO_2 saturantes, alcança valores da ordem de 30 a 40 $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (e.g., DaMatta et al., 2001). Pouco se sabe sobre os mecanismos que explicariam a magnitude das taxas fotossintéticas do cafeeiro, mas, aparentemente, uma alta resistência à difusão do CO_2 , desde a atmosfera até os sítios de carboxilação, poderia ter papel preponderante nessa resposta, conforme teorizado por DaMatta et al. (2001) e Silva et al. (2004).

A grande maioria dos trabalhos associando, em café, fotossíntese e irradiância foi realizada com plantas jovens cultivadas em vasos (DaMatta, 2004a). Com efeito, pouco ou nada parece ter sido explorado acerca das oscilações espaciais e temporais da fotossíntese ao longo do dossel, oscilações estas que estariam fortemente relacionadas com potenciais aclimações à disponibilidade de luz. O objetivo deste trabalho foi, pois, examinar as estratégias fisiológicas e bioquímicas envolvidas na aclimação da maquinaria fotossintética, em função da atenuação da irradiância interceptada, ao longo da copa do cafeeiro, bem como explorar as causas das suas baixas taxas fotossintéticas.

1.1. Literatura citada

- Balaguer L, Martínez-Ferri E, Valladares F, Pérez-Corona ME, Baquedano FJ, Castillo FJ, Manrique E (2001) Population divergence in the plasticity of the response of *Quercus coccifera* to the light environment. *Functional Ecology* 15: 124-135.
- Boyer JS (1995) Advances in drought tolerance in plants. *Advances in Agronomy* 56: 187-218.
- Cannell MGR (1985) Physiology of coffee crop. In: Clifford MN, Willson KC (Eds) *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*. London: Croom Helm, 108-134.
- DaMatta FM (2003) Drought as a multidimensional stress affecting photosynthesis in tropical tree crops. In: Hemantaranjan E (Ed) *Advances in Plant Physiology*, v.5, Jodhpur: Scientific Publishers, 227-265.

- DaMatta FM (2004a) Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. *Field Crops Research* 86: 99-114.
- DaMatta FM (2004b) Fisiologia do cafeeiro em sistemas arborizados. In: Matsumoto SN (Ed) *Arborização de Cafezais no Brasil*. Vitória da Conquista: Edições Uesb, 87-107.
- DaMatta FM, Loos RA, Rodrigues R, Barros RS (2001) Actual and potential photosynthetic rates of tropical crop species. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 13: 24-32.
- DaMatta FM, Maestri M (1997) Photoinhibition and recovery of photosynthesis in *Coffea arabica* and *C. canephora*. *Photosynthetica* 34: 439-446.
- Fahl JJ, Carelli MLC, Vega J, Magalhães AC (1994) Nitrogen and irradiance levels affecting net photosynthesis and growth of young coffee plants (*Coffea arabica* L.). *Journal of Horticultural Science* 69: 161-169.
- Fanjul L, Arreola RR, Mendez CMP (1985) Stomatal responses to environmental variables in shade and sun grown coffee plants in Mexico. *Experimental Agriculture* 21: 249-258.
- Foyer CH, Lescure JC, Lefebvre C, Morot-Gaudry JF, Vicentz M, Vaucheret H (1994) Adaptation of photosynthetic electron transport, carbon assimilation, and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to change in nitrate reductase activity. *Plant Physiology* 104: 171-178.
- Freitas RB (2000) Avaliações ecofisiológicas de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) e seringueiras (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) em diferentes sistemas de cultivo. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 57p. (Tese MS).
- Friend DJC (1984) Shade adaptation of photosynthesis in *Coffea arabica*. *Photosynthesis Research* 5: 325-334.
- Gutiérrez MV, Meinzer FC (1994) Carbon isotope discrimination and photosynthetic gas exchange in coffee hedgerows during canopy development. *Australian Journal of Plant Physiology* 21: 207-219.
- Hollinger DY (1989) Canopy organization and foliage photosynthetic capacity in a broad-leaved evergreen montane forest. *Functional Ecology* 3: 52-62.
- Ishida A, Toma T, Marjenah (1999) Leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence in relation to leaf angle, azimuth, and canopy position in the tropical pioneer tree, *Macaranga conifera*. *Tree Physiology* 19: 117-124.
- Kanechi M, Uchida N, Yasuda T, Yamaguchi T (1996) Non-stomatal inhibition associated with inactivation of Rubisco in dehydrated coffee leaves under unshaded and shaded conditions. *Plant and Cell Physiology* 37: 455-460.
- Kozlowski TT, Pallardy SG (1997) *Physiology of Woody Plants*. San Diego: Academic Press. 411p.

- Kumar D, Tieszen LL (1980) Photosynthesis in *Coffea arabica*. I. Effects of light and temperature. *Experimental Agriculture* 16: 13-19.
- Maestri M, Vieira C (1958) Movimento de estômatos em café, sob condições naturais. *Revista Ceres* 59: 324-331.
- Malavolta E (2000) *História do Café no Brasil: Agronomia, Agricultura e Comercialização*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 456p.
- Paiva LC, Guimarães RJ, Souza CS (2001) Aspectos fisiológicos de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica*) formadas a pleno sol. In: Simpósio de Pesquisa de Cafés do Brasil, vol II, 2001, Vitória, ES. *Resumos...* Brasília: Embrapa Café, 11.
- Paul MJ, Driscoll SP (1997) Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signaling nitrogen deficiency through source: sink imbalance. *Plant, Cell and Environment* 20: 110-116.
- Poorter L (2001) Light-dependent changes in biomass allocation and their importance for growth of rain forest tree species. *Functional Ecology* 15: 113-123.
- Ramalho JC, Pons TL, Groenvelde HW, Azinheira HG, Nunes MA (2000) Photosynthetic acclimation to high light conditions in mature leaves of *Coffea arabica* L.: role of xanthophylls, quenching mechanisms and nitrogen nutrition. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 43-51.
- Ramalho JDC, Campos PS, Quartim VL, Silva MJ, Nunes MA (1999) High irradiance impairments on photosynthetic electron transport, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and N assimilation as a function of N availability in *Coffea arabica* L. plants. *Journal of Plant Physiology* 154: 319-326.
- Rena AB, Maestri M, Barros RS, Söndahl MR (1994) Coffee. In: Schaffer B, Andersen PC (Eds) *Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops: Subtropical and Tropical Crops*. vol II. Boca Raton: CRC Press, 101-122.
- Silva EA, DaMatta FM, Ducatti C, Regazzi AJ, Barros RS (2004) Seasonal changes in vegetative growth and photosynthesis in Arabica coffee trees. *Field Crops Research* 89: 349-357.
- Voltan RBQ, Fahl JI, Carelli MLC (1992) Variação na anatomia foliar de cafeeiros submetidos a diferentes intensidades luminosas. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 4: 99-105.
- Zimmerman RC, Kohrs DG, Steller DL, Alberte RS (1995) Carbon partitioning in eelgrass: regulation by photosynthesis and the response to daily light-dark cycles. *Plant Physiology* 108: 1665-1671.

II. Capítulo 1

Limitações da fotossíntese em folhas de diferentes posições da copa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.)

1.1. Introdução

Características morfológicas e fisiológicas foliares geralmente variam com a posição na copa, uma vez que diferentes posições estão associadas a ambientes lumínicos distintos (Hollinger, 1989; Ishida et al., 1999). O desempenho fotossintético das plantas deve ser, pois, maximizado, mediante adaptações morfológicas e fisiológicas ao ambiente luminoso (Poorter, 20001), desde o nível subcelular até níveis macroscópicos (Balaguer et al., 2001). Incluem-se, aí, alterações na composição de pigmentos fotossintéticos, na densidade estomática, no ângulo de inclinação foliar e na atividade de enzimas do ciclo de Calvin. Obviamente, não apenas a irradiância interceptada, mas também a temperatura foliar (T_f), deve variar ao longo do dossel, com possíveis reflexos sobre o comportamento estomático e a fotossíntese. Assim, a capacidade fotossintética varia amplamente em diferentes folhas de uma mesma planta, sendo freqüentemente limitada por restrições difusivas e bioquímicas (Kozlowski & Pallardy, 1997). Limitações difusivas (e.g., estomáticas e mesofílicas), mas não limitações bioquímicas, estão associadas a decréscimos na concentração interna de CO_2 (C_i), podendo ser superadas mediante a elevação no suprimento externo de CO_2 . Além das limitações difusivas, alterações nas reações fotoquímicas e na atividade das enzimas da fase bioquímica da fotossíntese, bem como das enzimas do metabolismo dos carboidratos e do nitrogênio (Boyer, 1995; Foyer et al., 1994; Kanechi et al., 1996; Paul & Driscoll, 1997), podem afetar significativamente a magnitude das taxas fotossintéticas. Em adição, o impacto dessas restrições varia entre espécies e genótipos, em resposta às condições ambientes (Guo et al., 2002).

A maioria das espécies lenhosas possui folhas hipoestomáticas, com condutâncias

difusivas consideravelmente inferiores às de plantas herbáceas (Ceulemans & Saugier, 1991). Se, por um lado, muitos estudos têm explorado a importância da condutância estomática (g_s) sobre o controle das trocas gasosas, por outro, relativamente pouco se tem explorado sobre a condutância mesofílica (g_m), em parte, devido a dificuldades para sua mensuração com precisão (De Lucia et al., 2003). Não obstante, inicialmente considerada como sendo grande o bastante para ter um impacto desprezível sobre a fotossíntese (Farquhar et al., 1980), sabe-se hoje que g_m pode ser suficientemente pequena para reduzir significativamente a concentração de CO_2 nos sítios de carboxilação em relação àquela dos espaços intercelulares, limitando, assim, a fotossíntese (Evans et al., 1994; Loreto et al., 1992; von Caemmerer et al., 1994). Com efeito, as baixas taxas fotossintéticas em algumas espécies lenhosas (e.g. *Fagus sylvatica* L.) são atribuídas à baixa g_m (Epron et al., 1995), enquanto em outras (e.g. *Pseudotsuga meinziensis* (Mirb.) Franco) a fotossíntese pode ser limitada, em magnitude similar, por g_s e g_m (Warren et al., 2003).

No cafeeiro (*Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre), pouco se sabe sobre os mecanismos que explicariam os baixos valores de suas taxas fotossintéticas, mas baixas condutâncias difusivas desempenhariam um papel preponderante nessa resposta, conforme especulado por DaMatta et al. (2001) e Silva et al. (2004). Em todo o caso, desde que a abertura estomática não seja limitante, a taxa de assimilação líquida do carbono (A) parece maior nas folhas expostas que nas sombreadas (DaMatta, 2004a). Geralmente, quando se observa maior A sob sombra que a pleno sol, menor g_s nas folhas expostas parece explicar, pelo menos parcialmente, essas observações (Freitas, 2000; Gutiérrez & Meinzer, 1994; Kumar & Tieszen, 1980; Paiva et al., 2001). No entanto, em função da alta sensibilidade do estômato do cafeeiro ao déficit de pressão de vapor entre o interior da folha e a atmosfera (δ_e) (DaMatta, 2004a), que normalmente aumenta, na medida em que a temperatura do ar se eleva e a umidade relativa decresce, podem ocorrer decréscimos apreciáveis em g_s (DaMatta, 2004 a,b), especialmente nos ramos superiores das faces expostas à radiação solar da tarde. Nessa condição, a utilização fotoquímica da radiação interceptada diminui, fato que poderia potencializar a ocorrência de danos fotoinibitórios e fotooxidativos. Nesse contexto, a redução da absorção da energia incidente (e.g., via alteração do ângulo de inclinação da folha) ou o aumento na capacidade de dissipação da energia excedente, podem revestir-se de capital importância para a fotoproteção das plantas (Chaves, 2005). Ressalte-se que o cafeeiro é originário de ambientes sombreados, exibindo baixas taxas fotossintéticas (Silva et al., 2004) e, portanto, nas folhas expostas, a irradiância interceptada pode facilmente exceder $600 \mu\text{mol}$ (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, um valor que parece saturar a fotossíntese nessas folhas (DaMatta, 2004a). Entretanto, os mecanismos de fotoproteção parecem eficientes, de maneira que, mesmo nas

folhas expostas, a fotoinibição da fotossíntese é manifestada apenas episodicamente (Chaves, 2005). Por outro lado, o café, cultivado tanto em vasos como no campo, normalmente exibe alguns atributos típicos de plantas de sombra, como a baixa razão clorofila *a*/clorofila *b* (DaMatta & Maestri, 1997; Fahl et al., 1994) e valores relativamente baixos de irradiância de compensação (I_c) (Rena et al., 1994). Dessa forma, sugere-se que essa espécie apresenta mecanismos para ajustar sua maquinaria fotossintética às condições preponderantes de luminosidade e, como decorrência, poderia responder plasticamente às variações da irradiância (DaMatta, 2004a). Em todo o caso, a grande maioria dos trabalhos associando fotossíntese e irradiância parece ter sido realizada com cafeeiros jovens cultivados em vasos. Com efeito, pouco ou nada parece ter sido explorado acerca das oscilações espaciais e temporais da fotossíntese ao longo do dossel, oscilações estas que estariam fortemente relacionadas com potenciais aclimações à disponibilidade de luz. O objetivo deste trabalho foi, pois, examinar as estratégias envolvidas na aclimação da maquinaria fotossintética, em função da atenuação da irradiância interceptada, ao longo da copa do cafeeiro. Adicionalmente, procurou-se investigar as causas das baixas taxas fotossintéticas do cafeeiro.

1.2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido sob condições de campo, com plantas de café (*C. arabica* L. cv Catuaí Vermelho IAC 44), com 18 anos de idade, em Viçosa (20°45'S, 42°15'W, 650 m de altitude), Minas Gerais. As plantas vêm sendo cultivadas a pleno sol, sob espaçamento de 3,0 x 1,0 m, com uma planta por cova, e fileiras orientadas no sentido nortesul. O cafezal foi renovado, por meio de recepa, em 1996. As medições e amostragens foram realizadas durante dois dias ensolarados, em março de 2005, época quente e chuvosa, quando o cafeeiro ainda se encontra na fase de crescimento ativo, exibindo taxas de fotossíntese relativamente elevadas (Silva et al., 2004). Avaliaram-se folhas completamente expandidas, de posições azimutais semelhantes, do terceiro ou quarto par, a partir do ápice de ramos plagiotrópicos, situados nas faces leste e oeste das plantas, utilizando-se de folhas dos terços superior e mediano inferior das plantas.

O experimento foi instalado sob o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos dispostos em esquema fatorial 2 x 2 (duas faces e dois estratos – superior e inferior, em cada planta), com seis repetições. Cada unidade experimental consistiu-se de uma planta, avaliando-se uma folha por estrato e por face, em cada planta. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade, utilizando-se do Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG-UFV, 1997).

Avaliaram-se os seguintes parâmetros:

a) Parâmetros agrometeorológicos

O déficit de pressão de vapor entre o interior da folha e a atmosfera (δ_e) foi calculado segundo Landsberg (1986). Para isso, foram tomadas, ao longo das avaliações das trocas gasosas, as temperaturas do ar (bulbo seco e bulbo úmido) e da folha (T_f), utilizando-se, respectivamente, de um psicrômetro e de um termopar associado à pinça de um fluorômetro com amplitude de pulso modulado (FMS2, Hansatech, Norfolk, Reino Unido).

b) Radiação interceptada pela folha e inclinação foliar

A radiação fotossinteticamente ativa (RFA) foi medida com um fotômetro/radiômetro (Li-185, LI-COR, Lincoln, EUA), no mesmo ângulo de inserção da folhas e, também, acima da copa das plantas. A inclinação foliar foi mensurada em relação ao horizonte ($= 0^\circ$).

c) Trocas gasosas e parâmetros de fluorescência

A taxa de assimilação líquida do carbono (A), a condutância estomática (g_s) e a razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) foram medidas ao longo do dia, em sistema aberto, sob luz e concentração de CO_2 ambientes, com um analisador de gases a infravermelho (LC *pro+*, Analytical Development Company, Hoddesdon, Reino Unido). Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram determinados nas mesmas folhas utilizadas para as medições de trocas gasosas, por meio do fluorômetro já citado. A fluorescência inicial (F_0), a fluorescência máxima (F_m), a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema (FS) II (F_v/F_m) e o rendimento quântico do transporte de elétrons (Φ_{FSII}) foram estimados como descrito em DaMatta et al. (2002a) e em Lima et al. (2002). Para calcular-se a taxa de transporte de elétrons (TTE), considerou-se que o FS II e o FSI absorvem quantidades iguais de luz; assim TTE foi estimada como: $\text{TTE} = [\text{RFA efetivamente interceptada pela folha}] \times [\text{absortância foliar}] \times \Phi_{\text{FSII}} \times 0,5$; a absortância foliar foi calculada a partir da concentração de clorofila por unidade de área (Evans, 1993).

A condutância mesofílica (g_m) foi determinada conforme Bernacchi et al. (2002), a partir dos dados de A , taxa de respiração escura (R_d) e TTE. Esse método também requer que o fator de especificidade da rubisco para CO_2 e O_2 , dependente do ponto de compensação de CO_2 na ausência de R_d (Γ^*), seja conhecido. A resposta de Γ^* à temperatura, previamente descrita em Bernacchi et al. (2001), foi então considerada. Os parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência foram calculados em uma única folha por posição, em cada face e em cada planta, durante dois dias consecutivos, de forma que os valores obtidos em cada posição dentro de cada planta foram computados como valores médios.

Curvas de resposta de A à irradiância (curva A/RFA) foram obtidas, incrementando-se a RFA em 12 etapas, de 0 a 1600 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a 25°C e concentração de CO_2 ambiente, como descrito em Iio et al. (2005). O rendimento quântico aparente (ϕ_a) foi estimado por meio da regressão linear da porção inicial da curva [0 RFA 150 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$]. As respostas de A à concentração interna de CO_2 (curva A/C_i) foram determinadas a 1000 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, um valor saturante (determinado a partir das curvas A/RFA), mas não fotoinibitório, a 25°C, variando-se a concentração de CO_2 ambiente (C_a), de 50 a 1600 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, exatamente como descrito por Habermann et al. (2003) e Iio et al. (2005). Técnicas de regressão não-linear, baseadas nas equações de Farquhar et al. (1980), modificadas por Sharkey (1985) e Harley & Sharkey (1991), foram usadas para calcular a taxa de carboxilação máxima ($V_{c_{\max}}$), taxa de carboxilação máxima limitada pelo transporte de elétrons (J_{\max}) e taxa de respiração na presença de luz para cada curva A/C_i obtida, conforme descrito em detalhe por Ramalho et al. (1997). A limitação à fotossíntese, imposta pelo fechamento estomático, foi estimada por meio da limitação estomática relativa (LER), calculada a partir das curvas A/C_i , usando-se da equação:
$$\text{LER} = \frac{(A_{C_i} - A_{C_a}) \times 100}{A_{C_i}}$$
, conforme Maroco et al. (2002). As estimativas das taxas de assimilação líquida de CO_2 a $C_i = 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ e a $C_a = 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (A_{C_i} e A_{C_a} , respectivamente) foram obtidas por meio das equações ajustadas para os dados das curvas A/C_i . Os dados obtidos para essas curvas, como também aqueles das curvas A/RFA , foram submetidos à análise de regressão ($n=4$), utilizando-se do modelo hiperbólico retangular com três parâmetros: $y = y_0 + \frac{a \times x}{b + x}$, sendo y_0 , a e b os parâmetros ajustados. Para a obtenção das curvas supracitadas, ramos eram destacados aproximadamente às 7:00 h e imediatamente levados ao laboratório, com suas bases imersas em água.

d) Área foliar específica (AFE), nitrogênio (N), pigmentos e composição isotópica do carbono ($\delta^{13}\text{C}$)

Amostras foliares foram coletadas entre 11:00 e 13:00 h. A AFE foi determinada, utilizando-se de discos foliares de 14 mm de diâmetro, obtendo-se sua massa seca após 72 h, a 70°C. Nestas amostras, o N orgânico e o N nítrico foram determinados conforme descrito em DaMatta et al. (1999). A soma dessas duas frações representa o N-total. Clorofilas e carotenóides totais foram extraídos em acetona/água (80%; v/v) e estimados espectrofotometricamente (Lichtenthaler, 1987). A $\delta^{13}\text{C}$ foi determinada exatamente como descrito em DaMatta et al. (2002b).

1.3. Resultados

Apesar de a RFA incidente sobre a copa ter variado, de 500 a 1850 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ao longo dos horários avaliados (não mostrado), a RFA efetivamente interceptada foi bem menor, situando-se entre 20 a 800 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para as folhas inferiores, e 50 a 1400 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para as superiores (Figura 1). Apesar disso, as variações em T_f foram similares dentro de cada face avaliada; entretanto, as folhas da face leste, que interceptam mais radiação solar nas primeiras horas do dia, apresentaram maiores temperaturas, ao longo do dia, independentemente do estrato amostrado (Figura 1). Saliente-se, ainda, que, apesar de as folhas superiores da face oeste interceptarem RFA em extensão muito maior que as folhas das demais faces amostradas, ao longo da tarde, não se observou qualquer diferença expressiva de temperatura entre tais folhas (Figura 1). O δ_e seguiu estritamente o mesmo comportamento de T_f (Figura 1).

Apesar da baixa disponibilidade de luz, conforme observado nos estratos inferiores, o a foi bastante similar entre faces e estratos (Tabela 1); além disso, tanto a irradiância de compensação (I_c) como a irradiância de saturação (I_s) foram similares para folhas superiores e inferiores (Tabela 1), apresentando valores médios em torno de 20 e 800 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. A taxa de assimilação líquida de carbono saturada pela luz (A_{RFA}) foi relativamente baixa, mesmo nas folhas superiores (Tabela 1), indicando que limitações outras, além da luz, podem estar largamente associadas às baixas taxas fotossintéticas do cafeeiro.

Em geral, A foi maior nas folhas dos estratos superiores em relação às dos estratos inferiores, independentemente da face avaliada (Figura 2), com as médias diárias de A , considerando-se os dados obtidos durante dois dias de avaliação, cerca de 135% maiores nas folhas superiores que nas inferiores (Tabela 2). Tais diferenças não estão associadas a limitações difusivas, conforme se depreende da Figura 2 e da Tabela 2, em que se observam valores similares de g_s e g_m , comparando-se aquelas folhas. A razão C_i/C_a foi sempre maior (Figura 2), e $\delta^{13}\text{C}$ menor, nas folhas inferiores em relação às superiores (Tabela 2), confirmando o padrão manifestado para os parâmetros de trocas gasosas (Figura 2). Em adição, as respostas da A à C_i mostraram que LER , V_{cmax} , J_{max} , a razão $J_{\text{max}}/V_{\text{cmax}}$ e a taxa de assimilação líquida de carbono máxima obtida a partir das curvas A/C_i (A_{CO_2}) foram semelhantes entre folhas superiores e inferiores, independentemente de faces (Tabela 3). Verifica-se ainda que, mesmo a C_i $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (C_a $1600 \mu\text{mol mol}^{-1}$), não se observou saturação de A (Figura 3), em folhas de ambas as faces e estratos. Ressalte-se, ainda, que os baixos valores de A , em café, sob condições de campo, não estiveram associados à

decréscimos na razão F_v/F_m , que se manteve praticamente inalterada ao longo do dia, mesmo nas folhas dos estratos superiores, com valores $\approx 0,80$ (Figura 4).

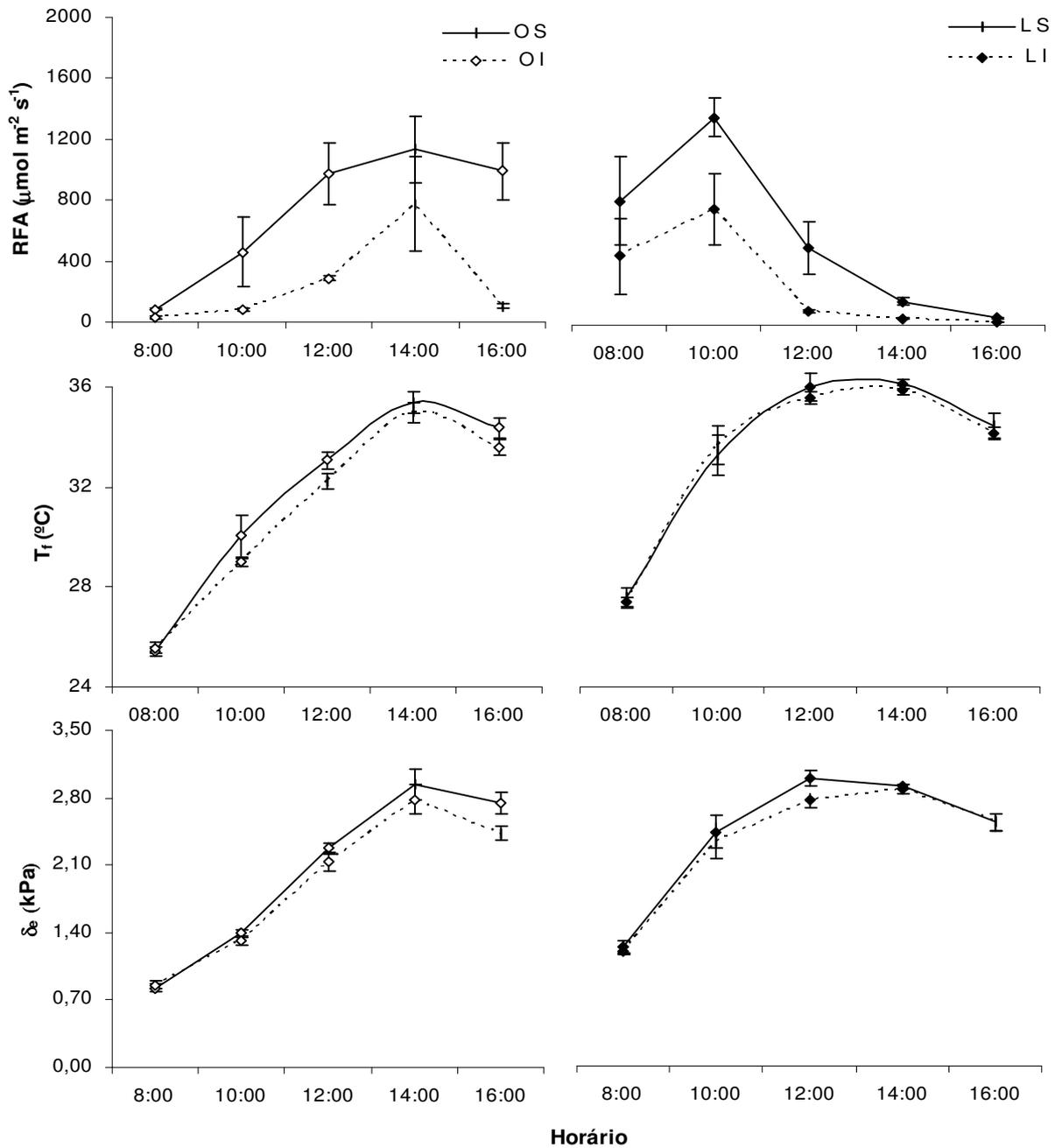


Figura 1: Curso diurno da radiação fotossinteticamente ativa (RFA) efetivamente interceptada pelas folhas, da temperatura foliar (T_l) e do déficit de pressão de vapor entre a folha e a atmosfera (δ_e) em plantas de café cultivadas em campo. As medições foram realizadas em folhas situadas nas faces oeste (O, símbolo vazio) e leste (L, símbolo cheio) dos terços superior (S, linha cheia) e mediano inferior (I, linha tracejada) do dossel. Valores representam a média \pm erro-padrão ($n=6$)

Tabela 1: Irradiância de compensação [I_c , μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$], irradiância de saturação [I_s , μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$], rendimento quântico aparente [α , mol (CO_2) mol^{-1} (fótons)] e taxa de assimilação líquida de carbono saturada pela luz [A_{RFA} , μmol (CO_2) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$] em plantas de café cultivadas em campo, obtidas a partir de curvas A/RFA. As avaliações foram realizadas em folhas situadas nas faces oeste e leste, dos terços superior e mediano inferior do dossel

Parâmetros	Face e posição avaliada			
	Oeste Superior	Leste Superior	Oeste Inferior	Leste Inferior
I_c	$24,5 \pm 2,6^{\text{A}*}$	$16,3 \pm 2,6^{\text{A}}$	$22,1 \pm 3,1^{\text{A}}$	$21,3 \pm 0,8^{\text{A}}$
I_s	$740 \pm 89^{\text{A}}$	$749 \pm 68^{\text{A}}$	$758 \pm 87^{\text{A}}$	$843 \pm 65^{\text{A}}$
α	$0,0177 \pm 0,003^{\text{A}}$	$0,0151 \pm 0,002^{\text{A}}$	$0,0178 \pm 0,001^{\text{A}}$	$0,0190 \pm 0,002^{\text{A}}$
A_{RFA}	$3,49 \pm 0,27^{\text{A}}$	$4,10 \pm 0,14^{\text{A}}$	$3,75 \pm 0,11^{\text{A}}$	$3,66 \pm 0,11^{\text{A}}$

* Médias seguidas por uma mesma letra dentro de cada linha não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Newman-Keuls; valores representam a média \pm erro-padrão ($n=4$)

O Φ_{FSII} tendeu a ser quase sempre menor nas folhas superiores em relação ao das inferiores (Figura 4). As variações diurnas em TTE (Figura 4) seguiram, em larga extensão, as variações diurnas da RFA efetivamente interceptada pela folha, em todos estratos avaliados. Assim, observou-se que, para as folhas da face oeste, os valores de TTE foram menores às 08:00 h, seguindo-se de progressivo aumento ao longo da manhã, decrescendo significativamente ao fim da tarde (Figura 4), quando a RFA foi também reduzida. Para as folhas inferiores da face leste, TTE atingiu valores máximos às 12:00 h; já as folhas superiores da face leste apresentaram TTE aproximadamente constante ao longo do dia, com um decréscimo acentuado ao fim da tarde (\sim às 16:00 h), quando a RFA efetivamente interceptada nessas folhas foi também mínima. Verificou-se, ainda, que as folhas dos estratos inferiores apresentam menores valores de TTE ao longo de todos os horários de avaliação (Figura 4), especialmente quando a RFA interceptada foi muito baixa.

Os ângulos foliares permaneceram praticamente constantes ao longo do dia em cada estrato avaliado (Figura 4). Pôde-se observar, também, que a inclinação das folhas superiores foi sempre maior que a das folhas inferiores (Figura 4), o que deve acarretar menor interceptação do fluxo de energia radiante por unidade de área nas primeiras. Adicionalmente, as folhas situadas nos estratos inferiores, em ambas as faces, apresentaram maior AFE (Tabela 2). A concentração foliar de N-total foi cerca de 10% maior nas folhas do estrato inferior que nas folhas superiores, dentro de uma mesma face amostrada, e aproximadamente 30% maior nas folhas inferiores da face leste que nas superiores da face oeste (Tabela 2).

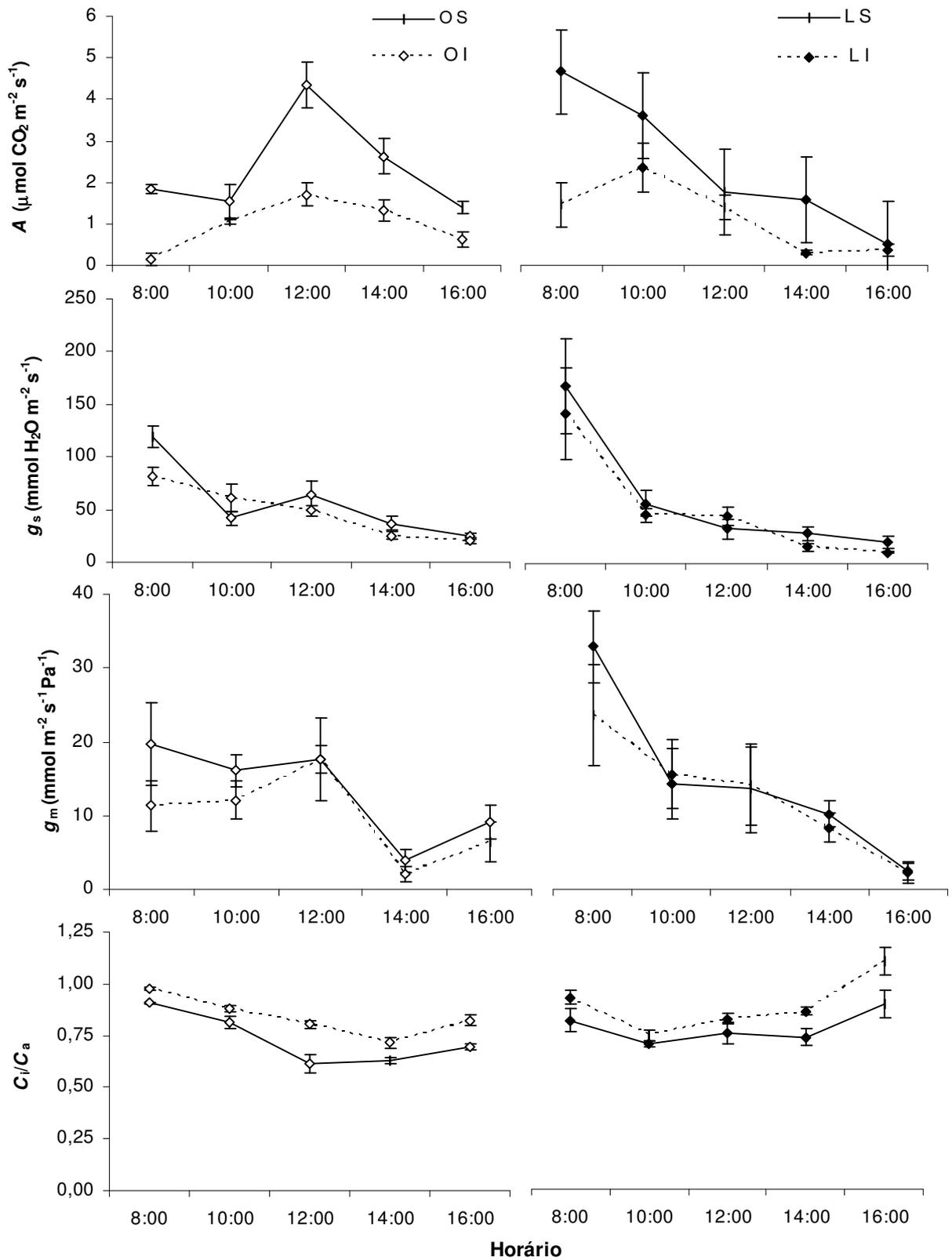


Figura 2: Curso diurno da taxa de assimilação líquida de carbono (A), da condutância estomática (g_s), da condutância mesofílica (g_m) e da razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) em plantas de café cultivadas em campo. Detalhes adicionais na Figura 1

Tabela 2: Taxa de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática (g_s), razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a), composição isotópica do carbono ($\delta^{13}\text{C}$), área foliar específica (AFE), concentração foliar de N-total, concentração de clorofilas (Cl) totais ($a+b$), carotenóides totais (Car), razão Cl/N, razão Cl a / Cl b (Cl a/b) e razão Cl/Car em plantas de café cultivadas em campo, avaliadas em folhas situadas nas faces oeste e leste, dos terços superior e mediano inferior do dossel

Parâmetros	Face e posição avaliada			
	Oeste Superior	Leste Superior	Oeste Inferior	Leste Inferior
A , $\mu\text{mol} (\text{CO}_2) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$2,34 \pm 0,25$ ^{A*}	$2,37 \pm 0,37$ ^A	$0,97 \pm 0,13$ ^B	$1,00 \pm 0,23$ ^B
g_s , $\text{mmol} (\text{H}_2\text{O}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$57,1 \pm 7,2$ ^A	$61,2 \pm 13,5$ ^A	$47,6 \pm 5,3$ ^A	$51,7 \pm 12,1$ ^A
C_i/C_a	$0,73 \pm 0,02$ ^B	$0,78 \pm 0,02$ ^B	$0,84 \pm 0,02$ ^A	$0,89 \pm 0,03$ ^A
$\delta^{13}\text{C}$, ‰	$29,80 \pm 0,15$ ^A	$29,15 \pm 0,37$ ^A	$32,32 \pm 0,35$ ^B	$31,57 \pm 0,32$ ^B
AFE, $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$	$12,87 \pm 0,29$ ^B	$12,09 \pm 0,24$ ^B	$16,49 \pm 0,18$ ^A	$17,09 \pm 0,18$ ^A
N total, g kg^{-1} MS	$28,56 \pm 1,52$ ^C	$33,23 \pm 1,15$ ^{AB}	$30,46 \pm 0,97$ ^{BC}	$37,05 \pm 1,21$ ^A
Cl ($a+b$), mmol kg^{-1}	$1,82 \pm 0,19$ ^A	$2,06 \pm 0,14$ ^A	$2,19 \pm 0,27$ ^A	$2,24 \pm 0,22$ ^A
Car, mmol kg^{-1}	$0,37 \pm 0,02$ ^A	$0,40 \pm 0,02$ ^A	$0,43 \pm 0,04$ ^A	$0,44 \pm 0,04$ ^A
Cl/N, mmol mol^{-1}	$9,08 \pm 1,01$ ^A	$8,75 \pm 0,71$ ^A	$10,27 \pm 1,62$ ^A	$8,52 \pm 0,89$ ^A
Cl a/b	$2,98 \pm 0,05$ ^{AB}	$3,08 \pm 0,04$ ^A	$2,91 \pm 0,06$ ^B	$3,06 \pm 0,03$ ^A
Cl/Car	$4,84 \pm 0,29$ ^A	$5,15 \pm 0,21$ ^A	$5,09 \pm 0,23$ ^A	$5,12 \pm 0,17$ ^A

Valores representam a média \pm erro-padrão ($n=6$), exceto dados de trocas gasosas, que representam a média \pm erro-padrão de dados obtidos ao longo de dois dias de avaliação ($n=60$). * Médias seguidas por uma mesma letra dentro de cada linha não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Newman-Keuls

Sendo uma espécie originalmente de ambientes sombreados, dever-se-iam esperar várias adaptações em resposta à baixa disponibilidade de luz, particularmente nas folhas dos estratos inferiores. Não obstante, as diferenças observadas em A não estiveram relacionadas a diferenças na alocação de N para a produção de pigmentos fotossintéticos, conforme se depreende da Tabela 2, em que não se observaram variações significativas na concentração dos pigmentos avaliados, bem como na razão clorofila/N. De qualquer modo, houve uma discreta redução na concentração de clorofila a nas folhas da face oeste, levando a uma queda na razão clorofila a /clorofila b (Tabela 2). Entretanto, os valores dessa razão foram muito similares e próximos de 3,0, e potenciais diferenças estatísticas devem ter pouca, se alguma, expressão fisiológica. Ademais, não se verificou qualquer alteração na razão clorofilas/carotenóides, ao avaliarem-se folhas das diferentes faces e estratos (Tabela 2).

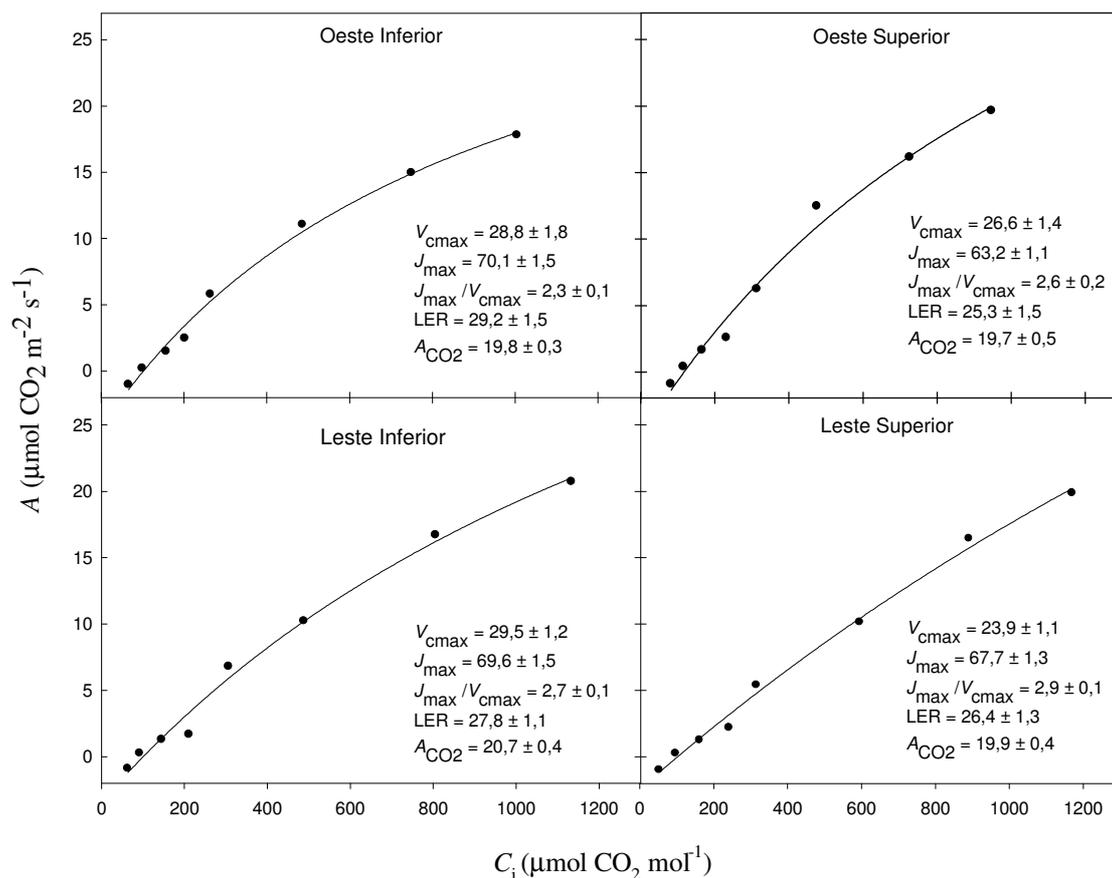


Figura 3: Curvas de resposta da taxa de assimilação líquida da CO_2 [A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$] à concentração interna de CO_2 [C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$] em plantas de café cultivadas em campo. As avaliações foram realizadas em folhas situadas nas faces oeste e leste, dos terços superior e mediano inferior do dossel. Os parâmetros (taxa de carboxilação máxima [V_{cmax} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$], taxa de carboxilação máxima limitada pelo transporte de elétrons [J_{max} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$], razão J_{max}/V_{cmax} , limitação estomática relativa (LER, %) e taxa de assimilação líquida de carbono máxima obtida a partir das curvas A/C_i [A_{CO_2} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]) obtidos a partir das folhas de diferentes faces e estratos não diferiram significativamente, a 5% de probabilidade, pelo teste de Newman-Keuls; valores representam a média \pm erro-padrão ($n = 4$)

1.4. Discussão

Este trabalho é o primeiro a explorar as razões das baixas taxas fotossintéticas em café, assim como quais fatores estariam mais fortemente associados às limitações espaciais e temporais da fotossíntese nessa espécie. De modo geral, as maiores taxas de fotossíntese foram muito baixas e inferiores aos valores máximos já relatados para café cultivado em campo ($\sim 12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; Silva et al., 2004), porém comparáveis com as observadas por outros autores (e.g., Chaves, 2005; Freitas, 2000; Gutiérrez & Meinzer, 1994; Vaast et al., 2005), também sob condições de campo. Nota-se que, em função da alta sensibilidade do

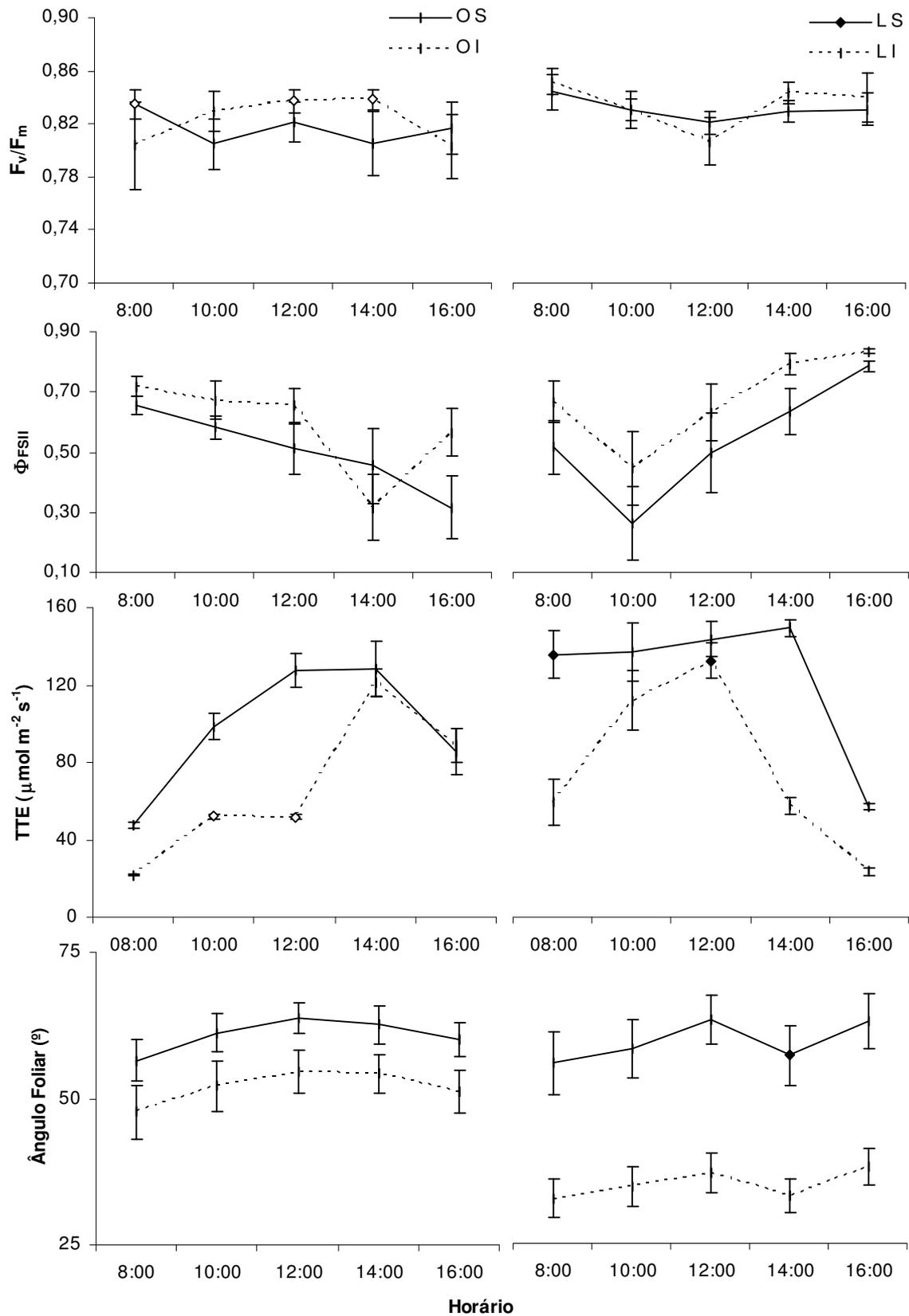


Figura 4: Curso diurno da eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m), do rendimento quântico do transporte de elétrons (Φ_{FSII}), da taxa de transporte de elétrons (TTE) e do ângulo foliar em plantas de café cultivadas em campo. Detalhes adicionais na Figura 1

estômato do cafeeiro ao δ_e (DaMatta 2004 a,b), g_s alcança valores máximos no início da manhã, e negligenciáveis à tarde, fato provavelmente associado ao incremento, ao longo do dia, de δ_e e T_f . Observações similares têm sido relatadas em café (Barros et al., 1997; DaMatta, 2004 a,b; Gutiérrez et al., 1994; Gutiérrez & Meinzer, 1994). Os baixos valores de g_s e/ou g_m devem, pois, estar associados a baixos valores de A à tarde, mesmo nas folhas inferiores, ainda que se observem, em alguns horários, valores relativamente elevados de TTE. Portanto, as variações relativas de g_s e g_m e de TTE devem grandemente responder pelo curso diurno de A . De qualquer modo, deve-se salientar que os valores obtidos para g_s e g_m , neste trabalho, são comparáveis (De Lucia et al., 2003; Manter & Kerrigan, 2004; Piel et al., 2002), ou quase sempre menores (Epron et al., 1995; Loreto et al., 1992; Patakas et al., 2003; Singsaas et al., 2003) aos valores mínimos relatados para várias espécies lenhosas. Estes resultados confirmam o papel fundamental das baixas condutâncias difusivas em relação às baixas taxas fotossintéticas em café, observadas em diversos trabalhos (Chaves, 2005; DaMatta et al., 1997, 2001, 2002 a,b; Gutiérrez & Meinzer, 1994; Lima et al., 2002; Pinheiro et al., 2004; Praxedes et al., 2006; Ramalho et al., 1997, 2000; Silva et al., 2004; Vaast et al., 2005), sob as mais variadas condições de cultivo. Registre-se, ainda, que, embora não tenha ocorrido saturação de A a $C_a = 1600 \mu\text{mol mol}^{-1}$, a capacidade fotossintética máxima (determinada sob luz saturante e $C_a = 50 \text{ mmol mol}^{-1}$) do cafeeiro alcança valores da ordem de 30 a 40 $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Almeida & Maestri, 1997; Campostrini & Maestri, 1998; DaMatta et al., 1997, 2001; Silva et al., 2004), sugerindo, de fato, que as baixas taxas fotossintéticas, nessa espécie, ocorrem, principalmente, em virtude das baixas condutâncias difusivas. Tomados em conjunto, estes resultados, juntamente com os obtidos a partir das curvas A/RFA , sugerem que: (i) as causas da variação espacial das taxas fotossintéticas em folhas recém-expandidas não foram resultantes de limitações bioquímicas ou difusionais, mas, sim, fundamentalmente de limitações fotoquímicas associadas à baixa disponibilidade de luz; (ii) as baixas taxas fotossintéticas *per se*, em café, devem ser resultantes, particularmente, de limitações difusivas, conforme se infere a partir dos valores baixos de g_s e g_m , tanto para folhas superiores e inferiores, ao longo de todo o dia, mas não necessariamente devido a uma baixa capacidade mesofílica para fixação de CO_2 .

As maiores taxas fotossintéticas das folhas superiores em relação às das inferiores aqui observadas são consistentes com observações prévias (Gutiérrez & Meinzer, 1994). Nessas folhas, menor A , sem decréscimos correspondentes em g_s e g_m , resultou em maior discriminação isotópica do carbono (^{13}C mais negativo), sugerindo que, ao longo do tempo, as folhas inferiores tiveram uma menor assimilação cumulativa de carbono. Contudo, desde que I_c , I_s , A_{RFA} e A_{CO_2} foram muito similares, independentemente da posição das folhas

avaliadas, sugere-se que, de fato, a capacidade do ciclo de Calvin, em termos de utilização de ATP e NADPH (Habermann et al., 2003), é similar entre as folhas avaliadas. Assim, menor A nas folhas inferiores deve ter sido grandemente consequência de limitações fotoquímicas, e não bioquímicas, à fotossíntese, em função da menor disponibilidade de luz, como também observado em *Fagus crenata* (Iio et al., 2005). Assim, limitações de luz à fotossíntese poderiam ocorrer em grande parte do dia para uma folha em particular, especialmente nos estratos inferiores, em que RFA interceptada foi quase sempre menor que I_5 . A constância na razão J_{\max}/V_{\max} ainda sugere que um balanço funcional adequado entre a taxa de carboxilação e o transporte de elétrons deve ter ocorrido, em resposta a mudanças no ambiente lumínico, conforme já verificado em café (Ramalho et al., 1997, 2000) e em outras espécies tropicais (Thompson et al., 1992). Wulschleger (1993) sugere que a razão J_{\max}/V_{\max} reflete também a capacidade das plantas em otimizar a alocação de recursos, em particular o N, a fim de preservar o balanço entre as limitações enzimáticas (rubisco) e de captação de luz (clorofilas). Como um todo, os resultados demonstram que a menor RFA interceptada pelas folhas inferiores foi, em larga extensão, responsável pela variação espacial da fotossíntese na copa do cafeeiro.

A variação espacial na concentração foliar de N pode estar associada a diferentes ambientes lumínicos, resultando em maior ganho de carbono para o dossel como um todo, em relação a um dossel cuja concentração foliar de N seja uniformemente distribuída entre todas as folhas (Evans, 1993; Gutiérrez & Meinzer, 1994; Holinger, 1996). No entanto, a similaridade do conteúdo de clorofilas e de carotenóides, e da razão clorofila a/b , refletindo capacidades similares de absorção e de eficiência do uso da radiação para a fotossíntese (Ishida et al., 1999), ao longo do dossel, foi acompanhada por uma constância da razão clorofila/N. Isso indica que tanto folhas superiores quanto inferiores investiram, proporcionalmente, quantidades similares de N para a produção de pigmentos, e que parte do N acumulado pelas folhas inferiores, especialmente as da face leste, pode estar sendo direcionada à produção de compostos insolúveis, que não estariam diretamente envolvidos na assimilação de CO_2 (Cruz et al., 2003). Registre-se que, usualmente, a razão clorofilas/N aumenta com decréscimos em RFA, indicando maior alocação de N para a produção de pigmentos fotossintéticos do que para compostos diretamente envolvidos na fixação do CO_2 (Evans, 1989; Ellsworth & Reich, 1993). Assim, as variações espaciais de A não estiveram relacionadas a diferenças na alocação de N para a produção de pigmentos fotossintéticos, nem com mudanças *per se* na concentração desses pigmentos. Estes resultados sugerem uma baixa plasticidade da maquinaria fotossintética do cafeeiro à disponibilidade de luz.

Pouca ou nenhuma alteração na razão clorofilas/carotenóides entre faces e estratos foi observada, quando a resposta esperada seria um decréscimo relativo nessa razão nos estratos superiores, expostos a maiores RFA, de modo a permitir-lhes um aumento na capacidade de dissipação da energia de excitação, principalmente via operação do ciclo das xantofilas (Demmig-Adams & Adams, 1992, Lambers et al., 1998). Em todo o caso, apesar de a RFA efetivamente interceptada pela folha ter sido superior a I_s , conforme particularmente observado nas folhas superiores da face oeste durante a tarde, não houve fotoinibição da fotossíntese, uma vez que a razão F_v/F_m foi sempre superior a 0,80 e, portanto, dentro de uma faixa ótima (0,80-0,83) relatada por Björkman & Demmig (1987). Com efeito, os mecanismos de fotoproteção, em café, parecem eficientes, de maneira que, mesmo em folhas expostas, a fotoinibição da fotossíntese é manifestada apenas episodicamente (Chaves, 2005).

Em suma, as baixas taxas fotossintéticas, em café, desde que a irradiância seja adequada, parecem decorrer, principalmente, de baixas condutâncias difusivas, mas não necessariamente de uma baixa capacidade mesofílica para assimilação de CO_2 . Os resultados sugerem, ainda, que a variação espacial da fotossíntese foi largamente resultante de limitações fotoquímicas, em função, principalmente, da disponibilidade reduzida de luz. Apesar de o cafeeiro ser capaz de alterar a absorção da energia radiante, mediante a alteração do ângulo foliar, outras adaptações comuns a baixas irradiâncias, como o aumento na concentração de clorofilas por unidade de massa e na razão clorofila/N, e redução na razão clorofila *a/b*, não foram verificadas, demonstrando que a espécie pode ter baixa capacidade de aclimação a ambientes com reduzida disponibilidade de luz, ainda que tenha evoluído em ambientes sombreados. Por outro lado, não houve fotoinibição da fotossíntese, mesmo nas folhas mais expostas à RFA. Concomitantemente, estes resultados sugerem que, apesar dos valores relativamente baixos de *A*, o aparelho fotossintético do café exibe uma plasticidade relativamente baixa à redução da RFA. Ressalte-se, todavia, que, pelo menos no Brasil, as cultivares atualmente plantadas foram selecionadas em ensaios de competição massal, quase sempre conduzidos a pleno sol e sob espaçamentos largos; portanto, tais cultivares podem, potencialmente, apresentar adaptações a baixas irradiâncias em extensão inferior às de cultivares selecionadas para cultivos sombreados (DaMatta, 2004 a,b). Entretanto, deve existir uma plasticidade intra-específica considerável em *C. arabica*, particularmente no que diz respeito às respostas de aclimação/adaptação às variações na RFA disponível, haja vista que, em muitos casos, o cultivo do café tem-se mostrado rentável e satisfatório, mesmo em ambientes sombreados.

1.5. Referências

- Almeida AAF, Maestri M (1997) Photosynthetic oxygen evolution by four *Coffea arabica* genotypes subjected to a dehydration/rehydration cycle. *Journal of Horticultural Science* 72: 593-599.
- Balaguer L, Martínez-Ferri E, Valladares F, Pérez-Corona ME, Baquedano FJ, Castillo FJ, Manrique E (2001) Population divergence in the plasticity of the response of *Quercus coccifera* to the light environment. *Functional Ecology* 15: 124-135.
- Barros RS, Mota JWS, DaMatta FM, Maestri M (1997) Decline of vegetative growth in *Coffea arabica* L. in relation to leaf temperature, water potential and stomatal conductance. *Field Crops Research* 54: 65-72.
- 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 Physiology* 130: 1992-1998.
- Bernacchi CJ, Singsaas EL, Pimentel C, Portis AR, Long SP (2001) Improved temperature response functions for models of Rubisco-limited photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 24: 253-259.
- Björkman O, Demmig B (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504.
- Boyer JS (1995) Advances in drought tolerance in plants. *Advances in Agronomy* 56: 187-218.
- Campostrini E, Maestri M (1998) Photosynthetic potential of five genotypes of *Coffea canephora* Pierre. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 10: 13-18.
- Ceulemans R, Saugier B (1991) Photosynthesis. In: Raghavendra AS (Ed) *Physiology of Trees*. New York: John Wiley & Sons, 21-50.
- Chaves ARM (2005) Fotossíntese e mecanismos de proteção contra estresse fotooxidativo em *Coffea arabica* L., cultivado em condições de campo sob dois níveis de irradiância. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 36p. (Tese MS).
- Cruz JL, Mosquim PR, Pelacani CR, Araújo WL, DaMatta FM (2003) Photosynthesis impairment in cassava leaves in response to nitrogen deficiency. *Plant and Soil* 257: 417-423.
- DaMatta FM (2004a) Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. *Field Crops Research* 86: 99-114.
- DaMatta FM (2004b) Fisiologia do cafeeiro em sistemas arborizados. In: Matsumoto SN (Ed) *Arborização de Cafezais no Brasil*. Vitória da Conquista: Edições Uesb, 87-107.

- DaMatta FM, Amaral JAT, Rena AB (1999) Growth periodicity in trees of *Coffea arabica* L. in relation to nitrogen supply and nitrate reductase activity. *Field Crops Research* 60: 233-229.
- DaMatta FM, Loos RA, Rodrigues R, Barros RS (2001) Actual and potential photosynthetic rates of tropical crop species. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 13: 24-32.
- DaMatta FM, Loos RA, Silva EA, Loureiro ME (2002a) Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *Journal of Plant Physiology* 159: 975-981.
- DaMatta FM, Loos RA, Silva EA, Loureiro ME, Ducatti C (2002b). Effects of soil water deficit and nitrogen nutrition on water relations and photosynthesis of pot-grown *Coffea canephora* Pierre. *Trees* 16: 555-558.
- DaMatta FM, Maestri M (1997) Photoinhibition and recovery of photosynthesis in *Coffea arabica* and *C. canephora*. *Photosynthetica* 34: 439-446.
- DaMatta FM, Maestri M, Barros RS (1997) Photosynthetic performance of two coffee species under drought. *Photosynthetica* 34: 257-264.
- De Lucia EH, Whitehead D, Clearwater MJ (2003) The relative limitation of photosynthesis by mesophyll conductance in co-occurring species in a temperate rainforest dominated by the conifer *Dacrydium cupressinum*. *Functional Plant Biology* 30: 1197-1204.
- Demmig-Adams B, Adams WW III (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 599-626.
- Ellsworth DS, Reich PB (1993) Canopy structure and vertical patterns of photosynthesis and related leaf traits in a deciduous forest. *Oecologia* 96: 169-178.
- Epron D, Godard D, Cornic G, Genty B (1995) Limitations of net CO₂ assimilation by internal resistance to CO₂ transfer in the leaves of two tree species (*Fagus sylvatica* L. and *Castanea sativa* Mill.). *Plant, Cell and Environment* 18: 43-51.
- Evans JR (1989) Photosynthesis and nitrogen relationship in leaves of C₃ plants. *Oecologia* 78: 9-19.
- Evans JR (1993) Photosynthetic acclimation and nitrogen partitioning within a Lucerne canopy. II. Stability through time and comparison with a theoretical optimum. *Australian Journal of Plant Physiology* 20: 69-82.
- Evans JR, von Caemmerer S, Setchell BA, Hudson GS (1994) The relationship between CO₂ transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of Rubisco. *Australian Journal of Plant Physiology* 21: 475-495.

- Fahl JI, Carelli MLC, Vega J, Magalhães AC (1994) Nitrogen and irradiance levels affecting net photosynthesis and growth of young coffee plants (*Coffea arabica* L.). *Journal of Horticultural Science* 69: 161-169.
- Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA (1980) A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* 149: 78-90.
- Foyer CH, Lescure JC, Lefebvre C, Morot-Gaudry JF, Vicentz M, Vaucheret H (1994) Adaptation of photosynthetic electron transport, carbon assimilation, and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to change in nitrate reductase activity. *Plant Physiology* 104: 171-178.
- Freitas RB (2000) Avaliações ecofisiológicas de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) e seringueiras (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) em diferentes sistemas de cultivo. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 57p. (Tese MS).
- Guo J, Jermyn WA, Turnbull MH (2002) Diurnal and seasonal photosynthesis in two asparagus cultivars with contrasting yield. *Crop Science* 42: 399-405.
- Gutiérrez MV, Meinzer FC (1994) Carbon isotope discrimination and photosynthetic gas exchange in coffee hedgerows during canopy development. *Australian Journal of Plant Physiology* 21: 207-219.
- Gutiérrez MV, Meinzer FC, Grantz DA (1994) Regulation of transpiration in coffee hedgerows: covariation of environmental variables and apparent responses of stomata to wind and humidity. *Plant, Cell and Environment* 17: 1305-1313.
- Habermann G, Machado EC, Rodrigues JD, Medina CL (2003) CO₂ assimilation, photosynthetic light responses curves and water relations of “Pera” sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 15: 79-87.
- Harley PC, Sharkey TD (1991) An improved model of C₃ photosynthesis at high CO₂: reversed O₂ sensitivity explained by lack of glycerate re-entry into the chloroplast. *Photosynthesis Research* 27: 169-178.
- Hollinger DY (1989) Canopy organization and foliage photosynthetic capacity in a broad-leaved evergreen montane forest. *Functional Ecology* 3: 52-62.
- Iio A, Fukasawa H, Nose Y, Kato S, Kakubari Y (2005) Vertical, horizontal and azimuthal variations in leaf photosynthetic characteristics within a *Fagus crenata* crown in relation to light acclimation. *Tree Physiology* 25: 533-544.
- Ishida A, Toma T, Marjenah (1999) Leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence in relation to leaf angle, azimuth, and canopy position in the tropical pioneer tree, *Macaranga conifera*. *Tree Physiology* 19: 117-124.

- Kanechi M, Uchida N, Yasuda T, Yamaguchi T (1996) Non-stomatal inhibition associated with inactivation of Rubisco in dehydrated coffee leaves under unshaded and shaded conditions. *Plant and Cell Physiology* 37: 455-460.
- Kozlowski TT, Pallardy SG (1997) *Physiology of Woody Plants*. San Diego: Academic Press. 411p.
- Kumar D, Tieszen LL (1980) Photosynthesis in *Coffea arabica*. L. Effects of light and temperature. *Experimental Agriculture* 16: 13-19.
- Lambers H, Chapin III FS, Pons TL (1998) *Plant Physiological Ecology*. New York: Springer-Verlag, 539p.
- Landsberg JJ (1986) *Physiological Ecology of Forest Production*. Orlando: Academic Press, 198p.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Colowick SP, Kaplan NO (Eds) *Methods in Enzimology*. vol. 148, San Diego: Academic Press, 350-382.
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clone of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany* 47: 239-247.
- Loreto F, Harley PC, Marco GD, Sharkey TD (1992) Estimation of mesophyll conductance to CO₂ flux by three different methods. *Plant Physiology* 98: 1437-1443
- 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. *Journal of Experimental Botany* 55: 2581-2588.
- Maroco JP, Rodrigues ML, Lopes C, Chaves MM (2002) Limitations to leaf photosynthesis in field-grown grapevine under drought – metabolic and modelling approaches. *Functional Plant Biology* 29: 451-459.
- Paiva LC, Guimarães RJ, Souza CS (2001) Aspectos fisiológicos de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica*) formadas a pleno sol. In: Simpósio de Pesquisa de Cafés do Brasil, vol II, 2001, Vitória, ES. *Resumos...* Brasília: Embrapa Café, 11.
- Patakas A, Kofidis G, Bosabalidis AM (2003) The relationships between CO₂ transfer mesophyll resistance and photosynthetic efficiency in grapevine cultivars. *Scientia Horticulturae* 97: 255-263.
- Paul MJ, Driscoll SP (1997) Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signaling nitrogen deficiency through source: sink imbalance. *Plant, Cell and Environment* 20: 110-116.

- Piel C, Frak E, Le Roux X, Genty B (2002) Effect of local irradiance on CO₂ transfer conductance of mesophyll in walnut. *Journal of Experimental Botany* 53: 2423-2430.
- Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Fontes EPB, Loureiro ME (2004) Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Science* 167: 1307-1314.
- Poorter L (2001) Light-dependent changes in biomass allocation and their importance for growth of rain forest tree species. *Functional Ecology* 15: 113-123.
- Praxedes SC, DaMatta FM, Loureiro ME, Ferrão MAG, Cordeiro AT (2006) Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. *Environmental and Experimental Botany* 56: 263-273.
- Ramalho JC, Pons TL, Groenvelde HW, Azinheira HG, Nunes MA (2000) Photosynthetic acclimation to high light conditions in mature leaves of *Coffea arabica* L.: role of xanthophylls, quenching mechanisms and nitrogen nutrition. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 43-51.
- Ramalho JC, Pons TL, Groenvelde HW, Nunes MA (1997) Photosynthetic responses of *Coffea arabica* leaves to a short-term high light exposure in relation to N availability. *Physiologia Plantarum* 101: 229-239.
- Rena AB, Maestri M, Barros RS, Söndahl MR (1994) Coffee. In: Schaffer B, Andersen PC (Eds) *Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops: Subtropical and Tropical Crops*. vol II. Boca Raton: CRC Press, 101-122.
- Sharkey TD (1985) Photosynthesis in intact leaves of C₃ plants: physics, physiology and rate limitations. *Botanical Review* 51: 53-105.
- Silva EA, DaMatta FM, Ducatti C, Regazzi AJ, Barros RS (2004) Seasonal changes in vegetative growth and photosynthesis in Arabica coffee trees. *Field Crops Research* 89: 349-357.
- Singsaas EL, Ort DR, De Lucia EH (2003) Elevated CO₂ effects on mesophyll conductance and its consequences for interpreting photosynthetic physiology. *Plant, Cell and Environment* 27: 41-50.
- Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas- SAEG. (1997) Version 7.1. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes.
- Thompson WA, Huang LK, Kriedemann PE (1992) Photosynthetic response to light and nutrients in sun-tolerant and shade-tolerant rainforest trees. II. Leaf gas exchange and component processes of photosynthesis. *Australian Journal of Plant Physiology* 19: 19-42.

- Vaast P, Angrand J, Franck N, Dauzat J, Génard M (2005) Fruit load and branch ring-barking affect carbon allocation and photosynthesis of leaf and fruit of *Coffea arabica* in the field. *Tree Physiology* 25: 753-760.
- 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, Ethier GJ, Livingston NJ, Grant NJ, Turpin DH, Harrison DL Black TA (2003) Transfer conductance in second growth douglas-fir (*Pseudotsuga meinziessii* (Mirb.) Franco) canopies. *Plant, Cell and Environment* 16: 1215-1227.
- Wullschleger SD (1993) Biochemical limitations to carbon assimilation in C₃ plant – A retrospective analysis of the A/C_i curves from 109 species. *Journal of Experimental Botany* 44: 907-920.

III. Capítulo 2

Limitações bioquímicas da fotossíntese e metabolismo do carbono em folhas de diferentes posições da copa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.)

2.1. Introdução

A taxa de assimilação líquida de carbono (A) é determinada pelas características bioquímicas, fisiológicas e morfológicas da maquinaria fotossintética (De Lucia et al., 2003), que variam com as condições ambientais preponderantes durante o crescimento, tais como irradiância, temperatura e suprimento de água e nutrientes (Mohotti & Lawlor, 2002). De fato, o desempenho das plantas é maximizado por adaptações morfológicas e fisiológicas em resposta ao ambiente lumínico (Poorter, 2001). Em adição, há várias maneiras pelas quais a assimilação de CO_2 e a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo fotossintético poderiam ser limitadas, incluindo fechamento estomático, diferenças no estado de ativação de enzimas, decréscimos no conteúdo total de proteína por unidade de área foliar ou via controle específico durante a transcrição ou tradução de proteínas específicas (Maroco et al., 1999; Lawlor 2002), como a carboxilase/oxigenase da ribulose-1,5-bisfosfato (Rubisco) e a sintase da sacarose-fosfato (SPS).

A capacidade fotossintética varia amplamente em diferentes folhas de uma mesma planta, sendo frequentemente limitada por restrições difusivas e bioquímicas (Kozłowski & Pallardy, 1997). Diferenças existentes nas características bioquímicas e na estrutura física foliar exercem grande influência na capacidade fotossintética, resultando em limitações várias à fotossíntese (Guo et al., 2002). Além de limitações difusivas, alterações na atividade das enzimas da fase bioquímica da fotossíntese, bem como das enzimas do metabolismo dos carboidratos e do nitrogênio (Boyer, 1995; Foyer et al., 1994; Kanechi et al., 1996; Paul & Driscoll, 1997), podem afetar significativamente a magnitude das taxas fotossintéticas. Com efeito, sob condições de irradiância saturante e temperatura moderada, a atividade catalítica da Rubisco limita, em última instância, a fixação do CO_2 (Sage, 2002).

No Capítulo 1, enfatiza-se que as baixas taxas fotossintéticas do cafeeiro seriam decorrentes, em larga extensão, de limitações difusivas ao influxo de CO₂, desde a atmosfera até os sítios de carboxilação. Por outro lado, sugere-se que as causas da variação espacial da fotossíntese, ao longo do dossel, seriam consequência, fundamentalmente, de limitações fotoquímicas, e não bioquímicas, à fotossíntese, conforme deduzido a partir das análises de trocas gasosas. Neste Capítulo, examinaram-se potenciais alterações do metabolismo do carbono, em folhas sujeitas a diferentes ambientes lumínicos, com o intuito de melhor compreender possíveis relações entre aquelas alterações e as causas da variação espacial diurna da fotossíntese, sob uma perspectiva bioquímica. Examinou-se, então, o curso diurno da concentração de carboidratos e do metabolismo do carbono em folhas de diferentes posições da copa de plantas de café cultivadas em campo.

2.2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido sob condições de campo, com plantas de café (*C. arabica* L. cv Catuaí Vermelho IAC 44), com 18 anos de idade, em Viçosa (20°45'S, 42°15'W, 650 m de altitude), Minas Gerais. As plantas vêm sendo cultivadas a pleno sol, sob espaçamento de 3,0 x 1,0 m, com uma planta por cova, e fileiras orientadas no sentido nortesul. O cafezal foi renovado, por meio de recepa, em 1996. As medições e amostragens foram realizadas durante dois dias ensolarados, em março de 2005, época quente e chuvosa, quando o cafeeiro ainda se encontra na fase de crescimento ativo, exibindo taxas de fotossíntese relativamente elevadas (Silva et al., 2004). Avaliaram-se folhas completamente expandidas, de posições azimutais semelhantes, do terceiro ou quarto par, a partir do ápice de ramos plagiotrópicos, situados nas faces leste e oeste das plantas, utilizando-se de folhas dos terços superior e mediano inferior das plantas.

O experimento foi instalado sob o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos dispostos em esquema fatorial 2 x 2 (duas faces e dois estratos – superior e inferior, em cada planta), com seis repetições. Cada unidade experimental consistiu-se de uma planta, avaliando-se uma folha por estrato e por face, em cada planta. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade, utilizando-se do Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da UFV (SAEG-UFV, 1997).

Nas mesmas folhas utilizadas para a avaliação das trocas gasosas (Capítulo 1), amostras de material vegetal (100 mg) foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, procedendo-se, *a posteriori*, às seguintes análises:

a) Extração e determinação de açúcares solúveis, amido e aminoácidos

As amostras foram submetidas à extração etanólica, a quente, determinando-se, na fração solúvel em etanol, os teores de hexoses (glicose + frutose), sacarose (Praxedes et al., 2006) e aminoácidos solúveis totais (DaMatta et al., 1999) e, na fração insolúvel, os teores de amido (Stitt et al., 1989; Trethewey et al., 1998).

b) Extração e determinação de atividades enzimáticas

As amostras foram homogeneizadas com tampão de extração (Geigenberger & Stitt, 1993) a pH 7,4, contendo HEPES-KOH 50 mol m⁻³, MgCl₂ 5 mol m⁻³, EDTA 1 mol m⁻³, EGTA 1 mol m⁻³, β-mercaptoetanol 10 mol m⁻³, benzamidina 2 mol m⁻³, ácido ε-amino-*n*-capróico 2 mol m⁻³, PMSF 5 mol m⁻³, BSA 0,1% (p/v), glicerol 10% (v/v) e Triton X-100 0,1% (v/v), utilizando-se de 100% (p/v) de PVPP. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 15000 g, por 3 min, e o sobrenadante dessalinizado através de colunas Sephadex G-25M. Todo o procedimento foi realizado a 4°C e os ensaios enzimáticos foram previamente otimizados para tempo de reação e volume de extrato. Atividades inicial ($V_{inicial}$) e total (V_{total}) da Rubisco (EC 4.1.1.39) foram avaliadas espectrofotometricamente, como descrito em Sharkey et al. (1991), em extrato dessalinizado fresco. O estado de ativação da Rubisco foi calculado como a razão entre a atividade inicial e total (%). A atividade de SPS (EC 2.4.1.14, velocidades máxima – V_{max} e seletiva – V_{sel}) foi determinada como descrito em Praxedes et al. (2006), utilizando-se do extrato dessalinizado fresco. O estado de ativação da SPS foi calculado como a razão entre V_{sel} e V_{max} (%). As atividades da fosfatase da frutose-1,6-bisfosfato (FBPase; EC 3.1.3.11), pirofosforilase da ADP-glicose (AGPase; EC 2.2.7.27), invertase ácida (IA; EC 3.2.1.26) e sintase da sacarose (SuSy; EC 2.4.1.13) foram determinadas como descrito em Praxedes et al. (2006). Determinaram-se, ainda, as atividades da desidrogenase do NADP:gliceraldeído-3-P (NADP-GAPDH; EC 1.2.1.12) (Häusler et al., 2001), fosforilase do amido (SPase; EC 2.4.1.1) (Harada & Ishizawa, 2003) e desidrogenase do gliceraldeído-3-P (GAPDH.; EC 1.2.1.12) (Burrell et al., 1994).

2.3. Resultados

As concentrações foliares de hexoses, sacarose e amido aumentaram discretamente ($P < 0,10$), enquanto as de aminoácidos mantiveram-se praticamente constantes ao longo do dia (Figura 1). Somente às 8:00 h, as folhas superiores da face oeste apresentaram concentração de hexoses e de amido significativamente maior ($P < 0,05$) que a das folhas inferiores dessa face (Figura 1). Houve uma tendência de a concentração de sacarose ser superior nas folhas da face leste, independentemente do estrato avaliado, ao longo dos horários avaliados (Figura 1).

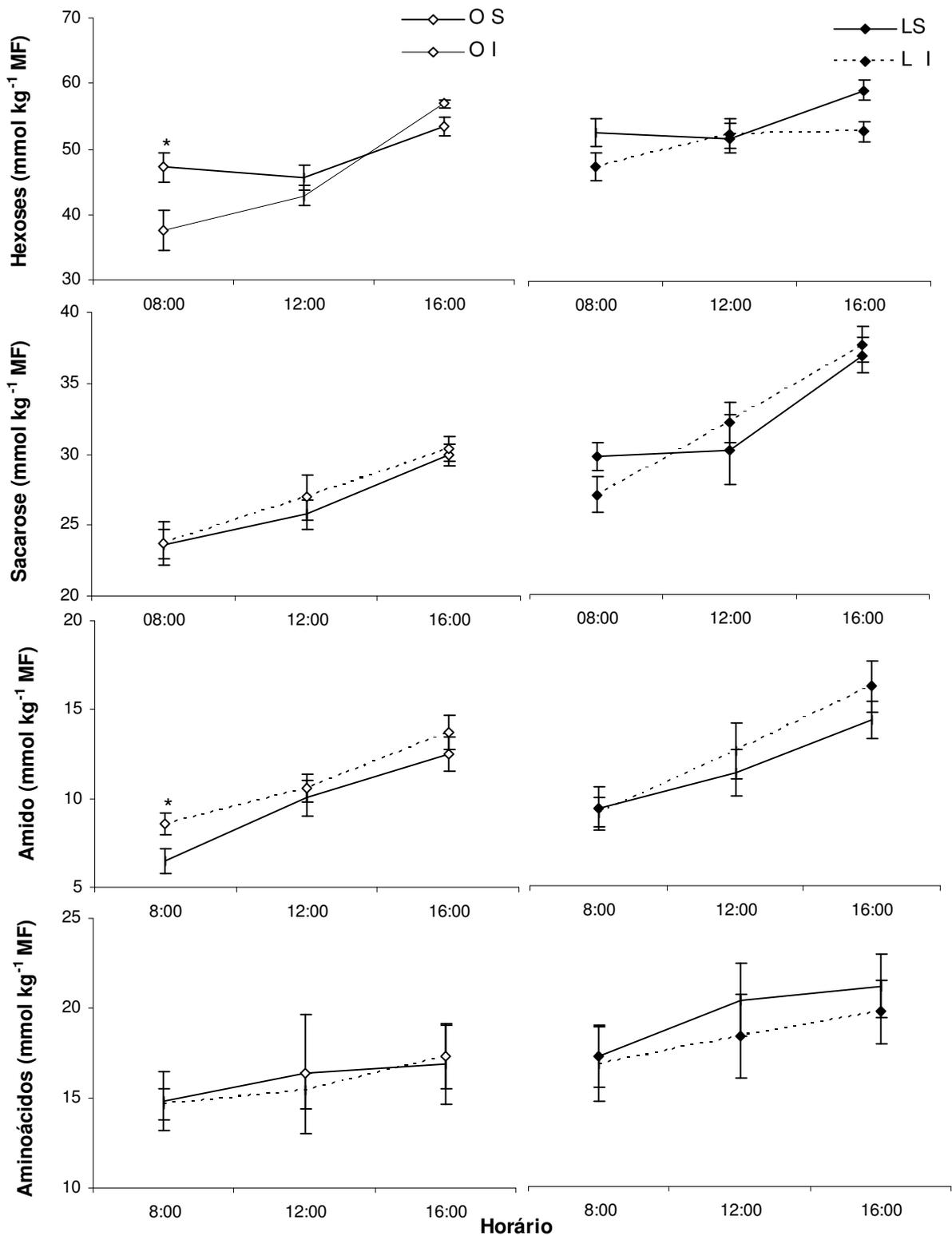


Figura 1: Concentrações foliares de hexoses, sacarose, amido e aminoácidos em plantas de café cultivadas em campo. As medições foram realizadas em folhas situadas nas faces oeste (O, símbolo vazio) e leste (L, símbolo cheio) dos terços superior (S, linha cheia) e mediano inferior (I, linha tracejada) do dossel. Valores representam a média \pm erro-padrão ($n=6$). Asterisco (*) denota diferenças entre folhas superiores e inferiores, dentro de um mesmo horário ($P < 0,05$)

As razões amido:sacarose e hexoses:aminoácidos pouco ou nada se alteraram ao longo do dia, apresentando tendência de maiores valores para as folhas superiores (Figura 2). A razão sacarose: hexose foi, quase sempre, significativamente maior nas folhas inferiores de ambas as faces avaliadas ($P < 0,05$) (Figura 2). Comparando-se folhas das faces oeste e leste, não se verificaram diferenças significativas em nenhuma dessas razões entre estratos e ao longo dos horários avaliados (Figura 2).

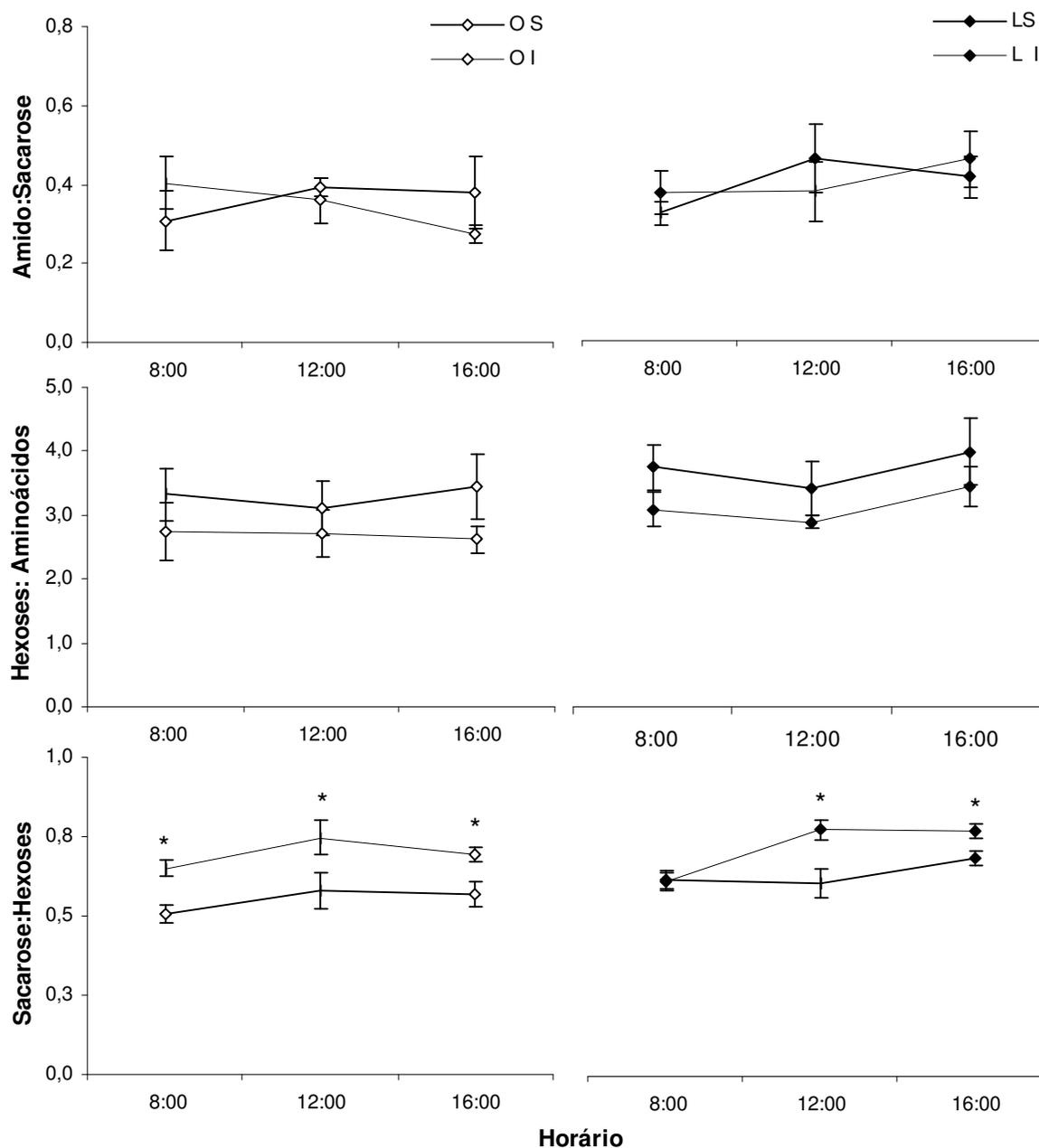


Figura 2: Razões amido:sacarose, hexoses:aminoácidos e sacarose:hexoses em plantas de café cultivadas em campo. Detalhes adicionais na Figura 1

O padrão de variação diurna da atividade inicial (V_{inicial}), atividade total (V_{total}) e estado de ativação (EA) da Rubisco foi bastante similar entre faces e estratos (Figura 3). Todavia, as folhas superiores da face leste apresentaram tendência de maiores V_{inicial} e V_{total} que as demais folhas avaliadas ($P = 0,10$) (Fig. 3), mas sem alteração proporcional no EA da Rubisco (Figura 3). Nota-se também que, particularmente às 8:00 h, as folhas da face leste, em especial as superiores, apresentaram maior V_{inicial} e V_{total} que as folhas da face oeste, horário em que A e a radiação fotossinteticamente ativa (RFA) efetivamente interceptada são também maiores naquelas folhas (Capítulo 1). Apenas às 8:00 h as folhas superiores da face leste tiveram V_{inicial} significativamente maior ($P = 0,05$) que a das folhas inferiores dessa face.

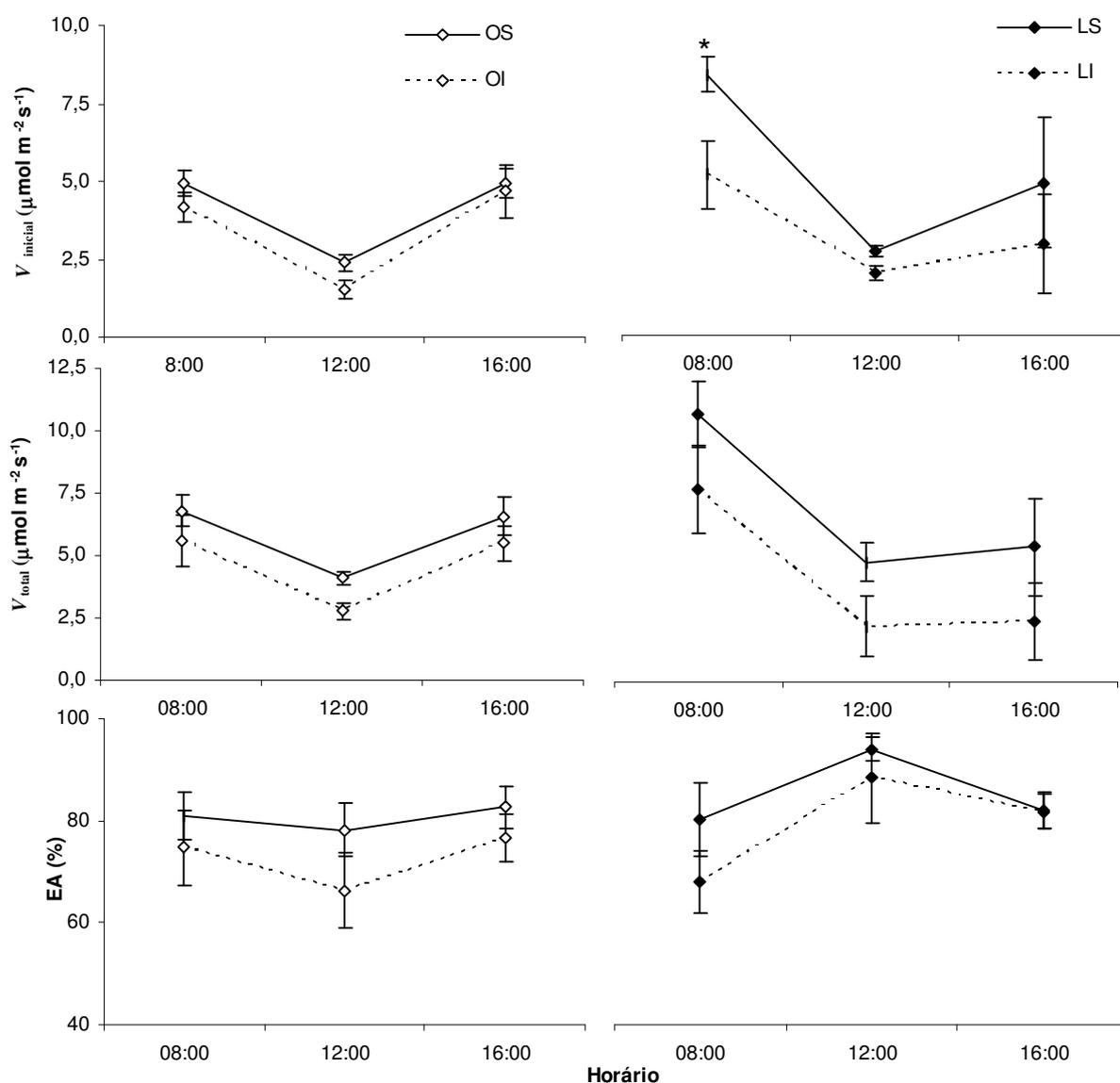


Figura 3: Atividade inicial (V_{inicial}), atividade total (V_{total}) e estado de ativação (EA) da Rubisco, em plantas de café cultivadas em campo. Detalhes adicionais na Figura 1

De modo geral, as atividades catalíticas seletiva (V_{sel}) e máxima (V_{max}) da SPS foram maiores nas folhas superiores de ambas as faces, ao longo do dia, com significância estatística ($P < 0,05$) às 12:00 e 16:00 h (V_{sel}) e às 16:00 h (V_{max}), ao passo que EA foi semelhante entre folhas superiores e inferiores, ao longo do dia (Figura 4). A redução observada em V_{max} , particularmente às 12:00 h, deve ter sido largamente compensada pelo aumento no EA, também observado nesse horário, de modo a manter o fluxo de síntese de sacarose.

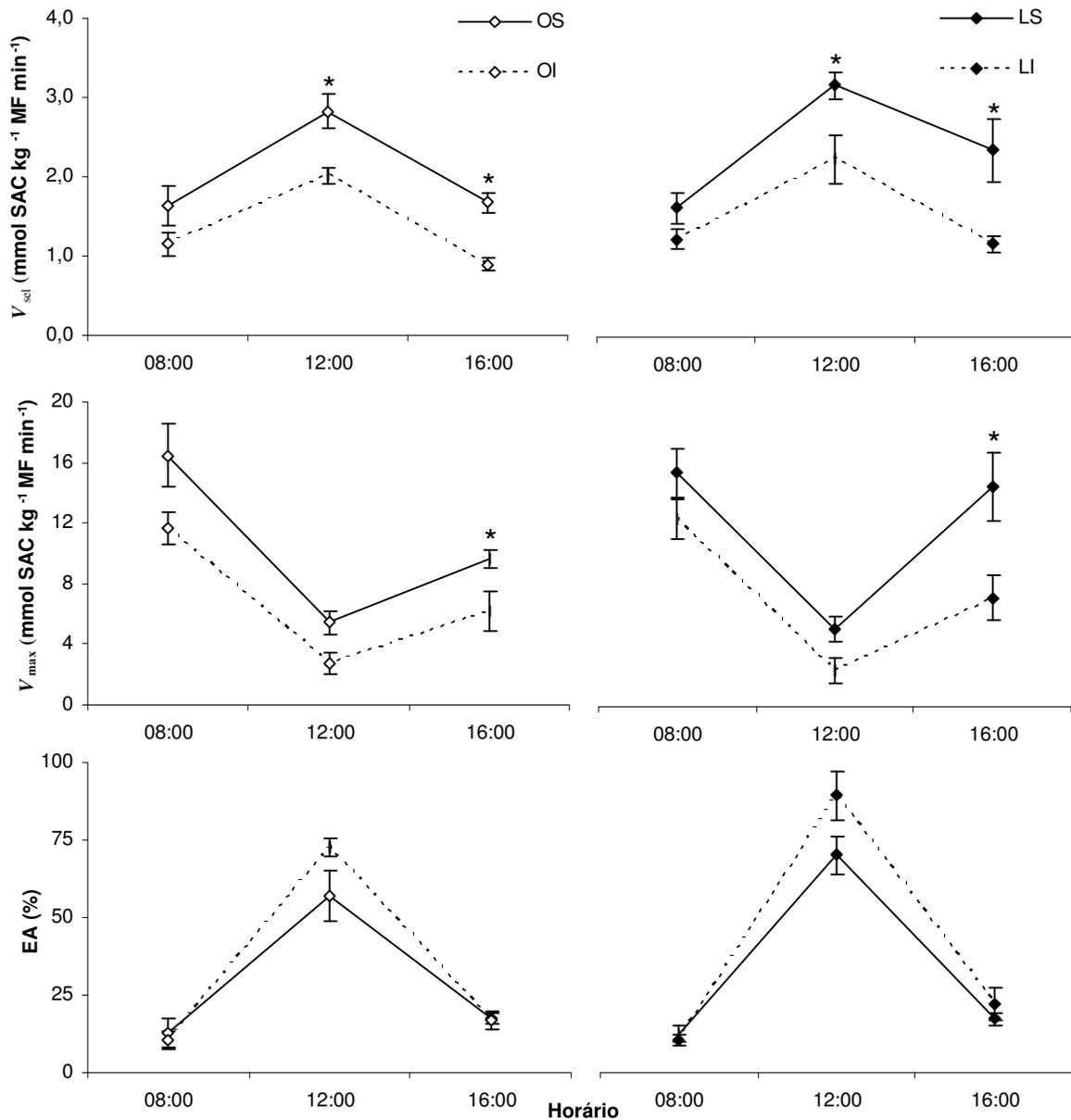


Figura 4: Atividade seletiva (V_{sel}), atividade máxima e (V_{max}) e estado de ativação (EA) da sintase da sacarose-fosfato (SPS), em plantas de café cultivadas em campo. Detalhes adicionais na Figura 1

A atividade da FBPase foi, em média, 28% maior ($P = 0,05$) nas folhas superiores, quando comparada à das folhas inferiores, em ambas as faces (Figura 5), ao longo do dia. Dessa maneira, o incremento na atividade da SPS, especialmente V_{sel} , em paralelo ao aumento da FBPase, nas folhas superiores, associado às maiores A (Capítulo 1), indicam que a síntese de sacarose tenha sido maior nessas folhas que nas inferiores. A atividade da IA foi 100% e 115% maior ($P = 0,05$) nas folhas superiores em relação às inferiores das faces oeste e leste, respectivamente, às 8:00 h, e similar nos demais horários avaliados (Figura 5). Verificou-se, também, que a maior atividade da IA foi acompanhada por maiores concentrações de hexoses e de amido, particularmente nas folhas superiores da face oeste.

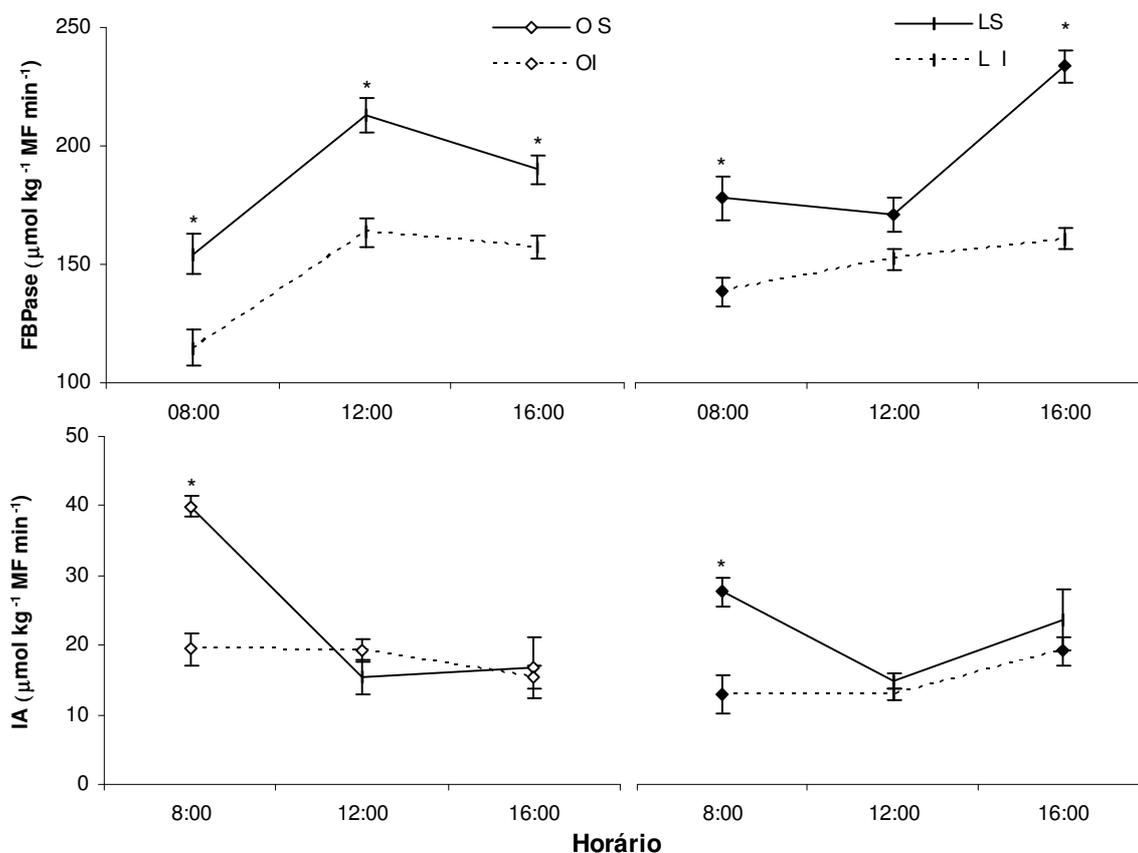


Figura 5: Atividades das enzimas fosfatase da frutose-1,6-bisfosfato (FBPase) e invertase ácida (IA) em plantas de café cultivadas em campo. Detalhes adicionais na Figura 1

A exemplo da Rubisco, praticamente não houve diferenças significativas de atividades das demais enzimas do metabolismo de carboidratos, ao compararem-se folhas dos estratos superiores com as dos inferiores, independentemente da face avaliada (Figura 6). De maneira geral, as atividades das enzimas AGPase, SuSy, SPase, GAPDH e NADP-GAPDH pouco ou nada variaram ao longo do dia, não se evidenciando, também, diferenças marcantes de atividade entre as faces, dentro de cada estrato avaliado (Figura 6), excetuando-se a tendência de as folhas superiores apresentarem maiores atividades que as folhas inferiores.

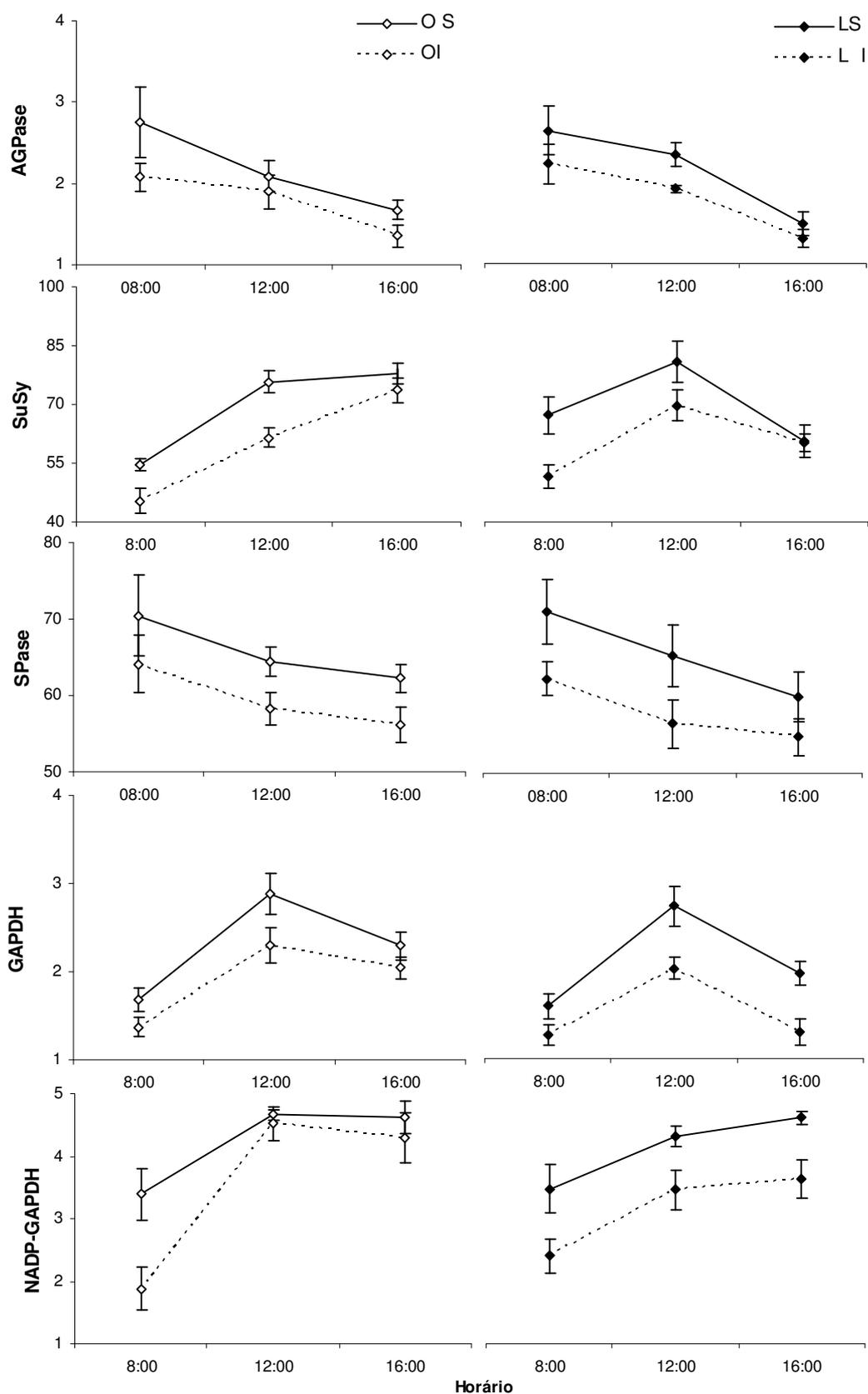


Figura 6: Atividades das enzimas pirofosforilase da ADP-glicose (AGPase), sintase da sacarose (SuSy), amido fosforilase (SPase), desidrogenase do gliceraldeído-3-P (GAPDH) e desidrogenase do NADP:gliceraldeído-3-P (NADP-GAPDH) em plantas de café cultivadas em campo. Atividade expressa em $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{MF min}^{-1}$. Detalhes adicionais na Figura 1

2.4. Discussão

O comportamento diurno das concentrações foliares de hexoses, sacarose, amido e aminoácidos é consistente com outras observações (Geingenberger & Stitt, 2000; Osório et al., 2006; Paul & Driscoll, 1997; Pérez et al., 2005) e sugere que as alterações discretas nos níveis de hexoses, ao longo do dia, não foram decorrentes de aumentos relativos na degradação de sacarose e/ou amido. Em adição, as concentrações relativamente elevadas de carboidratos solúveis, observadas às 8:00 h, sugerem que tais carboidratos acumulados ao longo do dia (Figura 1) não foram completamente mobilizados durante a noite (Pérez et al., 2005). Adicionalmente, a similaridade na concentração de sacarose entre folhas superiores e inferiores deve ter sido, então, reflexo de maiores taxas de exportação de fotoassimilados nas folhas superiores em relação às das inferiores. Os incrementos paralelos nas concentrações de amido (sem alterações proporcionais das atividades de AGPase e SPase) e de sacarose sugerem que não houve mobilização preferencial do carbono fixado para a síntese de um daqueles compostos. De qualquer modo, tais incrementos, associados à constância da razão hexoses:aminoácidos (Isopp et al., 2000; Paul & Driscoll, 1997) e da razão amido:sacarose, em folhas superiores e inferiores, sugerem que potenciais alterações nas taxas de exportação de fotoassimilados não estejam associadas a variações na disponibilidade de carboidratos. Assim, a capacidade de exportação deve ser mantida ao longo do dia, ainda que a taxas relativamente reduzidas, como dever-se-ia esperar nas folhas inferiores, em função de suas menores taxas fotossintéticas (Capítulo 1). Em adição, a constância das razões hexoses:aminoácidos e amido:sacarose sugere que menor *A* nas folhas inferiores não foi decorrente de retroinibição da fotossíntese (Isopp et al., 2000; Paul & Driscoll, 1997; Paul & Foyer, 2001; Paul & Pellny, 2003; Pieters et al., 2001).

Limitações não-estomáticas à fotossíntese ao longo do dia, como verificada neste trabalho (Capítulo 1), têm sido atribuídas à retroinibição metabólica da fotossíntese devido ao acúmulo de carboidratos na parte aérea (Kock, 1996; Krapp et al, 1994; Paul & Driscoll, 1997; Paul & Foyer, 2001; Paul & Pellny, 2003; Pollock & Farrar, 1996). Ademais, tal regulação da fotossíntese poderia, potencialmente, acontecer em qualquer uma das rotas de síntese dos produtos finais, ocorrendo predominantemente nas rotas envolvidas na biossíntese de sacarose, amido e de aminoácidos (Paul & Pellny, 2003). Entretanto, nenhum acúmulo significativo e expressivo desses compostos foi observado e, portanto, menor *A* nas folhas inferiores, em ambos os estratos avaliados, não deve estar associada à retroinibição metabólica da fotossíntese. Com efeito, os resultados obtidos mostram que tanto folhas superiores quanto inferiores, de ambas as faces, mantêm um *pool* praticamente constante de

carboidratos ao longo do dia, como também verificado em *Prunus persica* (Osório et al., 2006). Adicionalmente, alterações na atividade de enzimas-chave envolvidas no metabolismo do carbono (e.g., SPS, FBPase e AGPase) que poderiam, potencialmente, promover mudanças na concentração de fosfato inorgânico (Foyer, 1988) não foram observadas, sugerindo que, de fato, não houve retroinibição da fotossíntese (Herold, 1980; Paul & Foyer, 2001; Stitt, 1991).

As variações diurnas similares de V_{inicial} e V_{total} da Rubisco entre folhas superiores e inferiores sugerem que os sítios catalíticos da Rubisco não estariam bloqueados, *in vivo*, por inibidores (Shirke & Pathre, 2004), refletindo um balanço adequado entre o metabolismo de inibidores e a regulação da Rubisco. Dadas as diferenças na RFA efetivamente interceptada entre folhas superiores e inferiores (Capítulo 1), esperar-se-iam alterações em EA da Rubisco, uma vez que EA freqüentemente aumenta com o incremento da disponibilidade da luz (Portis, 1992); sugere-se, pois, que a atividade da Rubisco não tenha sido afetada (Cen & Sage, 2005; Shirke & Pathre, 2004). Com efeito, como a Rubisco não é completamente ativada sob a grande maioria das condições, exceto luz saturante (Paul & Pellny, 2003), o que foi observado durante boa parte do dia, particularmente para as folhas superiores de ambas as faces (Capítulo 1), sugere-se que a menor atividade da Rubisco nas folhas inferiores tenha sido compensada por um aumento em EA (Krapp & Stitt, 1995; Paul & Pellny, 2003). Maior A observada nas folhas superiores associada com similaridade na atividade e EA da Rubisco é inconsistente com resultados de outros trabalhos (e.g., Osório et al., 2006; Stitt & Schulze, 1994), porém corrobora os resultados mostrados no Capítulo 1, em que se sugere que não há diferenças na capacidade mesofílica para fixação do CO_2 , ao compararem-se folhas superiores e inferiores.

A maior atividade da SPS nas folhas superiores de ambas as faces, ao longo do dia, associada a um EA semelhante entre folhas superiores e inferiores (Figura 4), indica que menor A , nas últimas, acarretou menor produção de trioses fosfatadas, reduzindo, conseqüentemente, a síntese de sacarose (Shirke & Pathre, 2004). Assim, a menor atividade da SPS, nas folhas inferiores, deve ter sido meramente o reflexo da adequação aos níveis disponíveis de substrato. Com efeito, a ativação da SPS requer a presença de luz e CO_2 (Kerr & Huber, 1987; Ruft et al., 1983; Vasey et al., 1991). Assim, devido à semelhança em C_i/C_a e às diferenças em RFA efetivamente interceptada entre folhas superiores e inferiores (Capítulo 1), esperar-se-ia que as folhas superiores apresentassem maiores atividades de SPS, como verificado. Decréscimos na utilização de hexoses fosfatadas pela síntese de sacarose estimulariam a síntese de frutose-2,6-bisfosfato (Paul & Foyer, 2001), o que resultaria em redução na atividade da FBPase citossólica (Paul & Foyer, 2001; Stitt, 1990). A menor atividade de FBPase nas folhas inferiores é, dessa maneira, consistente com a menor síntese

de sacarose. A redução em V_{\max} , particularmente às 12 h, com incremento paralelo em EA da SPS, sugere a manutenção do fluxo de síntese de sacarose, de modo a manter a homeostase metabólica. Considerando-se que as taxas de exportação de sacarose são intimamente ligadas à atividade da SPS (Stitt, 1994) e que não houve diferenças expressivas de concentração de sacarose entre estratos, é plausível sugerir-se que a exportação de sacarose foi maior nas folhas dos estratos superiores.

Devido às alterações observadas em V_{sel} da SPS, é importante verificar se a atividade da SuSy, que pode tanto catalisar a síntese como a degradação da sacarose (Taiz & Zeiger, 2002), poderia compensar, pelo menos em parte, as alterações verificadas na atividade da SPS. Assim, é provável que as pequenas diferenças observadas na atividade da SuSy, juntamente com a da IA, tenham pouca ou nenhuma contribuição em relação à manutenção dos níveis de hexoses, uma vez que não foram observadas diferenças consideráveis na concentração de sacarose, entre folhas superiores e inferiores.

Em síntese, as limitações não-estomáticas à fotossíntese ao longo do dia, observadas neste trabalho, não podem ser atribuídas à retroinibição metabólica da fotossíntese, dadas as pequenas variações observadas nas concentrações foliares de sacarose, amido e de aminoácidos. Os resultados sugerem, ainda, que menor atividade da Rubisco nas folhas inferiores tenha sido compensada por um aumento em EA e as maiores atividades da SPS e da FBPase nas folhas superiores, em relação às das inferiores, devem estar fortemente associadas com as maiores taxas fotossintéticas observadas nas primeiras, de modo a garantir-lhes a manutenção da síntese e da exportação de fotoassimilados. Reforçam-se, aqui, os resultados apresentados no Capítulo 1, na medida em que o café parece mostrar baixa capacidade de ajustar a sua capacidade mesofílica para fixação do CO_2 , em resposta à redução da disponibilidade de luz, ao longo do dossel.

2.5. Referências

- Boyer JS (1995) Advances in drought tolerance in plants. *Advances in Agronomy* 56: 187-218.
- Burrell MM, Mooney PJ, Blundy M, Carter D, Wilson F, Green J, Blundy KS, Rees TA (1994) Genetic manipulation of 6-phosphofructokinase in potato tubers. *Planta* 194: 95-101.
- Cen Y-P, Sage RF (2005) The regulation of Rubisco activity in response to variation in temperature and atmospheric CO_2 partial pressure in sweet potato. *Plant Physiology* 139: 979-990.

- DaMatta FM, Amaral JAT, Rena AB (1999) Growth periodicity in trees of *Coffea arabica* L. in relation to nitrogen supply and nitrate reductase activity. *Field Crops Research* 60: 233-229.
- De Lucia EH, Whitehead D, Clearwater MJ (2003) The relative limitation of photosynthesis by mesophyll conductance in co-occurring species in a temperate rainforest dominated by the conifer *Dacrydium cupressinum*. *Functional Plant Biology* 30: 1197-1204.
- Foyer CH (1998) Feedback inhibition of photosynthesis through source-sink regulation in leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 26: 483-492.
- Foyer CH, Lescure JC, Lefebvre C, Morot-Gaudry JF, Vicentz M, Vaucheret H (1994) Adaptation of photosynthetic electron transport, carbon assimilation, and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to change in nitrate reductase activity. *Plant Physiology* 104: 171-178.
- Geigenberger P, Stitt M (1993) Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta* 189: 329-339.
- Geigenberger P, Stitt M (2000) Diurnal changes in sucrose, nucleotides, starch synthesis and *AGPS* transcript in growing potato tubers that are suppressed by decreased expression of sucrose phosphate synthase. *The Plant Journal* 23: 795-806.
- Guo J, Jermyn WA, Turnbull MH (2002) Diurnal and seasonal photosynthesis in two asparagus cultivars with contrasting yield. *Crop Science* 42: 399-405.
- Harada T, Ishizawa K (2003) Starch degradation and sucrose metabolism during anaerobic growth of pondweed (*Potamogeton distinctus* A. Benn.) turions. *Plant and Soil* 253: 125-135.
- Häusler RE, Rademacher T, Li J, Lipka V, Fischer KL, Schubert S, Kreuzaler F, Hirsch HJ (2001) Single and double over-expression of C₄-cycle genes had differential effects on the pattern of endogenous enzymes, attenuation of photorespiration and on contents of UV protectants in transgenic potato and tobacco plants. *Journal of Experimental Botany* 52: 1785-1803.
- Herold A (1980) Regulation of photosynthesis by sink activity – the missing link. *The New Phytologist* 86: 131-144.
- Isopp H, Frehner M, Long SP, Nösberger J (2000) Sucrose-phosphate synthase responds differently to source-sink relations and to photosynthetic rates: *Lolium perene* L. growing at elevated p_{CO_2} in the field. *Plant, Cell and Environment* 23: 597-607.
- Kanechi M, Uchida N, Yasuda T, Yamaguchi T (1996) Non-stomatal inhibition associated with inactivation of Rubisco in dehydrated coffee leaves under unshaded and shaded conditions. *Plant and Cell Physiology* 37: 455-460.

- Kerr PS, Huber SC (1987) Coordinate control of sucrose formation in soybean leaves by sucrose phosphate synthase and fructose 2,6-bisphosphate. *Planta* 170: 197-204.
- Kock KE (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 509-540.
- Kozlowski TT, Pallardy SG (1997) *Physiology of Woody Plants*. San Diego: Academic Press. 411p.
- Krapp A, Chaves MM, David MM, Rodrigues ML, Pereira JS, Stitt M (1994) Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with “antisense RBCs”. Impact on photosynthesis and growth in tobacco growing under extreme high irradiance and high temperature. *Plant, Cell and Environment* 22: 275-294.
- Krapp A, Stitt M (1995) An evaluation of direct and indirect mechanisms for the sink-regulation of photosynthesis in spinach: changes in gas exchange, carbohydrates, metabolites, enzyme activities, and steady-state transcript levels after cold-girdling source leaves. *Planta* 19: 313-323.
- Lawlor DW (2002) Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata *vs.* metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany* 89: 871-885.
- Maroco JP, Edwards GE, Ku MSB (1999) Photosynthetic acclimation of maize to growth under elevated levels of carbon dioxide. *Planta* 210: 115-125.
- Mohotti AJ, Lawlor DW (2002) Diurnal variation of photosynthesis and photoinhibition in tea: effects of irradiance and nitrogen supply during growth in the field. *Journal of Experimental Botany* 53: 313-322.
- Osório ML, Breia E, Rodrigues A, Osório J, Le Roux A, Daudet FA, Ferreira I, Chaves MM (2006) Limitations to carbon assimilation by mild drought in nectarine trees growing under field conditions. *Environmental and Experimental Botany* 55: 235-247.
- Paul MJ, Driscoll SP (1997) Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signaling nitrogen deficiency through source sink-imbalance. *Plant, Cell and Environment* 20: 110-116.
- Paul MJ, Foyer CH (2001) Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52: 1383-1400.
- Paul MJ, Pellny TK (2003) Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany* 54: 539-547.
- Pelleschi S, Rocher J-P, Prioul J-L (1997) Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. *Plant, Cell and Environment* 20: 493-503.

- Pérez P, Morcuende R, Martín del Molino I, Martínez-Carrasco R (2005) Diurnal changes of Rubisco in response to elevated CO₂, temperature and nitrogen in wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environmental and Experimental Botany* 53: 13-27.
- Pieters AJ, Paul MJ, Lawlor DW (2001) Low sink demand limits photosynthesis under Pi deficiency. *Journal of Experimental Botany* 52: 1083-1091.
- Pollock CJ, Farrar JF (1996) Source-sink relations: the role of sucrose. In: *Photosynthesis and the environment*. In: Baker NR (Ed) *Advances in Photosynthesis*. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 261-279.
- Poorter L (2001) Light-dependent changes in biomass allocation and their importance for growth of rain forest tree species. *Functional Ecology* 15: 113-123.
- Portis A (1992) Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 415-437.
- Praxedes SC, DaMatta FM, Loureiro ME, Ferrão MAG, Cordeiro AT (2006) Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. *Environmental and Experimental Botany* 56: 263-273.
- Rufty TW, Kerr PS, Huber SC (1983) Characterization of diurnal changes in activities of enzymes involved in sucrose biosynthesis. *Plant Physiology* 73: 428-433.
- Sage RF (2002) Variation in the k_{cat} of Rubisco in C₃ and C₄ plants and some implications for photosynthetic performance at high and low temperature. *Journal of Experimental Botany*. 53: 609-620.
- Sharkey TD, Vassey TL, Vanderveer PJ, Vierstra RD (1991) Carbon metabolism enzymes and photosynthesis in transgenic tobacco having excess phytochrome. *Planta* 185: 287-296.
- Shirke PA, Pathre UV (2004) Influence of leaf-to-air vapour pressure deficit (VPD) on the biochemistry and physiology of photosynthesis in *Prosopis juliflora*. *Journal of Experimental Botany* 55: 2111-2120.
- Silva EA, DaMatta FM, Ducatti C, Regazzi AJ, Barros RS (2004) Seasonal changes in vegetative growth and photosynthesis in Arabica coffee trees. *Field Crops Research* 89: 349-357.
- Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas- SAEG. (1997) version 7.1. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes.
- Stitt M (1990) Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 153-185.

- Stitt M (1991) Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* 14: 741-762.
- Stitt M (1994) Manipulation of carbohydrate partitioning. *Current Opinion in Biotechnology* 5: 137-143.
- Stitt M, Krapp A (1999) The interactions between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant, Cell and Environment* 22: 583-621.
- Stitt M, Lilley RMC, Gerhard R, Heldt HW (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods in Enzymology* 174: 518-552.
- Stitt M, Schulze D (1994) Does Rubisco control the rate of photosynthesis and plant growth? An exercise in molecular ecophysiology. *Plant, Cell and Environment* 17: 465-487.
- Taiz L, Zeiger E (2002) *Plant Physiology*. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 690p.
- Trethewey RN, Geigenberger P, Riedel K, Hajirezaei MR, Sonnewald U, Stitt M, Riesmeier JW, Willmitzer L (1998) Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. *The Plant Journal* 15: 109-118.
- Vassey TL, Quick WP, Sharkey TD, Stitt M (1991) Water stress, carbon dioxide and light effects on sucrose-phosphate synthase activity in *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 81: 37-44.

IV. Conclusões gerais

As baixas taxas fotossintéticas, em café, desde que a irradiância seja adequada, parecem decorrer, principalmente, de baixas condutâncias difusivas, conforme se infere a partir dos valores baixos de g_s e g_m , tanto nas folhas superiores como inferiores, ao longo de todo o dia, mas não necessariamente devido a uma baixa capacidade mesofílica para assimilação de CO_2 . Em adição, as causas da variação espacial das taxas fotossintéticas em folhas recém-expandidas não foram resultantes de limitações bioquímicas ou difusionais, mas, fundamentalmente de limitações fotoquímicas associadas à baixa disponibilidade de luz. A taxa de assimilação líquida de carbono saturada pela luz foi relativamente baixa, mesmo nas folhas superiores, indicando que limitações outras, além da luz, estariam largamente associadas às baixas taxas fotossintéticas do cafeeiro. Apesar de o cafeeiro ser capaz de alterar a absorção da energia radiante, mediante a alteração do ângulo foliar, outras adaptações comuns a baixas irradiâncias, como o aumento na concentração de clorofilas por unidade de massa e na razão clorofila/N, e redução na razão clorofila *a/b*, não foram verificadas, sugerindo que a espécie pode ter baixa capacidade de aclimatação a ambientes com reduzida disponibilidade de luz, ainda que tenha evoluído em ambientes sombreados. Ademais, não houve fotoinibição da fotossíntese, mesmo nas folhas mais expostas a RFA. A menor atividade da Rubisco nas folhas inferiores deve ter sido compensada por um aumento em EA e as maiores atividades da SPS e da FBPase nas folhas superiores, em relação às das inferiores, devem estar fortemente associadas com as maiores taxas fotossintéticas observadas nas primeiras, de modo a garantir-lhes a manutenção da síntese e da exportação de fotoassimilados. As limitações não-estomáticas à fotossíntese ao longo do dia não podem ser atribuídas a retroinibição metabólica da fotossíntese, considerando-se as pequenas variações nas concentrações dos carboidratos e nas atividades de várias enzimas do metabolismo do carbono avaliadas. Concomitantemente, os resultados sugerem que, apesar dos valores relativamente baixos de *A*, o aparelho fotossintético do café exibe uma plasticidade relativamente baixa à redução da RFA.