

ALICE GONTIJO DE GODOY

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE CULTIVARES DE *Coffea arabica*, EM
FUNÇÃO DA DISPONIBILIDADE DE LUZ E NITROGÊNIO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G588r
2014
Godoy, Alice Gontijo de, 1984-
Respostas fisiológicas de cultivares de *Coffea arabica*, em função
da disponibilidade de luz e nitrogênio / Alice Gontijo de Godoy. -
Viçosa, MG, 2014.
vii, 55f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Fábio Murilo DaMatta.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.44-55.

1. Fisiologia vegetal. 2. Café. 3. *Coffea arabica*. 4. Plantas -
Efeito do Nitrogênio. 5. Plantas - Efeito da radiação. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 571.2

ALICE GONTIJO DE GODOY

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE CULTIVARES DE *Coffea arabica*, EM
FUNÇÃO DA DISPONIBILIDADE DE LUZ E NITROGÊNIO**

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

APROVADA: 25 de novembro de 2014.

Paulo Cezar Cavatte

Emerson Alves da Silva

Wagner L. Araújo

Carla Quinhones Godoy Soares

Fábio Murilo DaMatta
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos;
ao meu companheiríssimo Ricardo;
ao meu orientador Fábio DaMatta;
aos amigos que fiz em Viçosa, ao “grupo café” e demais colegas de laboratório;
aos técnicos e funcionários do Departamento de Biologia Vegetal da UFV;
aos professores do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal;
aos amigos do Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid;
à EPAMIG;
à Universidade Federal de Viçosa;
à CAPES e ao CNPq pelas bolsas de estudos;
e a todos que colaboraram para a realização desse trabalho: muito obrigada!!!

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. Introdução	1
2. Materiais e métodos	6
2.1 Condições experimentais e material vegetal	6
2.2 Delineamento experimental e aplicação dos tratamentos	6
2.3 Análises morfológicas	7
2.4 Propriedades ópticas	7
2.5 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila	7
2.6 Análises bioquímicas destrutivas	9
2.7 Partição do nitrogênio	10
2.8 Custos de construção e manutenção do tecido foliar	11
2.9 Análises estatísticas	12
3. Resultados	13
3.1 N e C	13
3.2 Caracterização morfológica	14
3.3 Trocas gasosas	15
3.4 Fluorescência da clorofila a	19
3.5 Limitações à fotossíntese	20
3.6 PNUE e partição do N	21
3.7 Clorofilas	24
3.8 Propriedades ópticas	24
3.9 Enzimas anti-oxidativas e MDA	25
3.10 Composição química	26
3.11 Custos de construção e manutenção	29
3.12 Correlação linear entre as variáveis	33
4. Discussão	35
5. Conclusões	42
6. Referências bibliográficas	44

RESUMO

GODOY, Alice Gontijo de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2014. **Respostas fisiológicas de cultivares de *Coffea arabica*, em função da disponibilidade de luz e nitrogênio.** Orientador: Fábio Murilo DaMatta. Co-orientadores: Paulo Cezar Cavatte e Wagner L. Araújo.

A compreensão dos detalhes que governam o espectro econômico das plantas sob diferentes ambientes é um dos principais objetivos dos estudos atuais em ecologia vegetal, por ser necessária aos modelos preditivos de fluxo de nutrientes e limites vegetacionais em função de alterações nas condições ambientais. A alocação de fotoassimilados e de minerais absorvidos em diferentes compostos químicos influencia diretamente o crescimento e os custos de construção e de manutenção dos tecidos das plantas. Este trabalho teve como objetivo detectar possíveis estratégias diferenciais de uso da radiação solar em cultivares de *Coffea arabica* tradicionalmente cultivadas em ambientes luminosos distintos, assim como os padrões de alocação de recursos entre crescimento e defesa em plantas submetidas a diferentes disponibilidades de nitrogênio e luz. A cultivar KP, com genótipo de ambiente sombreado, apresentou sempre características funcionais morfológicas mais ajustadas ao sombreamento que aquelas exibidas por Catuaí, cultivar selecionada para plantio a pleno sol. Valores de V_{cmax} , J_{max} e A_{max} indicam capacidades fotossintéticas potenciais similares entre as cultivares, quando sob condições não-limitantes de luz e/ou CO_2 . Os dados obtidos indicam que o ambiente de cultivo foi mais determinante nas características de trocas gasosas das cultivares que seu histórico evolutivo, com efeito mais marcante da disponibilidade de nitrogênio que do ambiente luminoso nas características potenciais (medidas sob condições não limitantes) e efeitos similares de ambos os fatores nas condições efetivas de cultivo. Cerca de 60% do nitrogênio foliar das plantas avaliadas esteve alocado em componentes estruturais, dentro dos quais contabilizam-se os compostos de defesa nitrogenados, como alcalóides e metilxantinas. O dreno de nitrogênio para a síntese desses compostos, associadas às baixas taxas de assimilação de carbono decorrentes de limitações difusivas levariam à baixas PNUEs como característica constitutiva da espécie, independentemente das condições ambientais. Observaram-se maiores custos de construção nas plantas a pleno sol que nas sombreadas, positivamente correlacionados à síntese de metilxantinas e fenóis solúveis totais, que poderiam explicar a diferença observada. Os diferentes contextos evolutivos das cultivares avaliadas resultaram em genótipos capazes de se manifestar de forma diferenciada às

variações ambientais, principalmente na magnitude das respostas (plasticidade), não sendo observadas tendências diferenciadas na síntese de grupos de compostos químicos e características morfofisiológicas. As características ecofisiológicas diferenciais entre as cultivares seriam fortemente explicadas pelas diferentes arquiteturas de copa, que resultam em diferentes intensidades de interceptação da irradiância pelas folhas.

ABSTRACT

GODOY, Alice Gontijo de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2014. **Physiological responses of *Coffea arabica* cultivars, according to the availability of light and nitrogen.** Adviser: Fábio Murilo DaMatta. Co-advisers: Paulo Cezar Cavatte and Wagner Luiz Araújo.

Understanding the details that govern the economic spectrum of plants under different environments is a key goal of the current studies in plant ecology, being necessary to predictive models of nutrient flow and vegetation boundaries due to changes in environmental conditions. The allocation of photosynthate and absorbed mineral in different chemical compounds directly influences the growth and the costs of construction and maintenance of plant tissue. This study aimed to detect differential strategies of solar radiation use in *Coffea arabica* cultivars traditionally grown in different light environments, as well as the resource allocation patterns between growth and defense in plants in response to different availabilities of nitrogen and light. The KP cultivar, with shaded environment genotype, always presented morphological functional traits more adjusted to shade than those displayed by Catuaí cultivar, selected for planting in full sun. V_{cmax} , J_{max} and A_{max} values indicate similar potential photosynthetic capacity for the cultivars when under non-limiting conditions of light and/or CO₂. The data indicated that plant growth environment was more decisive in gas exchange traits than the cultivars evolutionary history, with more marked effect of the availability of nitrogen than the light environment on the potential characteristics (measured under non-limiting conditions), and similar effects of both factors on actual growing conditions. About 60% of the evaluated plants' foliar nitrogen was allocated to structural components, which accounts the nitrogen defense compounds, as alkaloids and methylxanthines. Nitrogen drain for the synthesis of these compounds, associated with low carbon assimilation rates due to diffusive limitations, would lead to lower PNUEs as a constituent characteristic of the species, regardless of environmental conditions. We observed higher construction costs in the full sun plants than in shaded ones, positively correlated to the synthesis of methylxanthines and total soluble phenols, which could explain the observed difference. The different evolutionary contexts of the cultivars resulted in genotypes able to manifest differently to environmental changes, especially in the magnitude of responses (plasticity), with no differentiated trends in the synthesis of chemicals groups and morphophysiological characteristics. The differences in ecophysiological features among cultivars were strongly explained by the

different canopy's architectures, which result in different intensities of irradiance interception by leaves.

1. Introdução

Ao longo do ciclo de vida das plantas, os fotoassimilados e minerais investidos na construção de suas folhas retornam como um fluxo de receita, pela síntese de novos fotoassimilados a serem utilizados na construção e manutenção dos tecidos vegetais. A alocação desses recursos em diferentes compostos químicos influencia diretamente o crescimento e os custos de construção e de manutenção dos tecidos das plantas (Merino *et al.*, 1984; Villar *et al.*, 2006). Dessa forma, a compreensão dos detalhes que governam o espectro econômico das plantas sob diferentes ambientes é um dos principais objetivos dos estudos em ecologia vegetal, por ser necessária aos modelos preditivos de fluxo de nutrientes e limites vegetacionais em função de alterações nas condições ambientais (Wright *et al.*, 2004).

Segundo a hipótese da dicotomia entre crescimento e defesa (sobrevivência), o comprometimento energético entre sintetizar compostos de defesa (com alto custo metabólico) ou investir energia em processos relacionados com o crescimento pode levar à competição por substratos (Rhoades e Cates, 1976; Coley, 1988; Westoby *et al.*, 2002). No entanto, poucos estudos examinaram como o desenvolvimento de defesas químicas pode interagir com os atributos funcionais foliares, considerando-se o desvio de recursos para a defesa potencialmente negativo para o crescimento e desempenho da planta (Pujol *et al.*, 2005; Agrawal e Fishbein, 2006; Mondolot *et al.*, 2008; Pujol *et al.*, 2008). Essas defesas, muitas das vezes, são baseadas em metabólitos secundários, cuja capacidade de síntese é inerente a todas as espécies vegetais. Compostos específicos ocorrem em um número restrito de plantas, indicando sua não essencialidade em processos primários do crescimento e desenvolvimento (Wink, 2010). Esses compostos desempenham funções na interação planta-ambiente, tanto em aspectos abióticos como bióticos, como polinização, dispersão, defesa contra herbivoria, competição aleloquímica, sinalização celular e respostas antioxidativas (Kroyman, 2011; Wink, 2010; Edreva *et al.*, 2008). A concentração de vários metabólitos secundários é fortemente dependente das condições de crescimento das plantas, com influência de situações estressantes nas vias de biossíntese e acúmulo desses compostos (Selmar, 2008). Nessas situações, o acúmulo de poder redutor facilita reações que consomem equivalentes de redução, por exemplo, síntese de compostos altamente reduzidos como isoprenóides, fenóis e alcalóides (Wilhelm e Selmar, 2011).

A hipótese do balanço de carbono (C) e nutrientes pressupõe que a composição química e a estratégia de defesa de plantas lenhosas são estabelecidas de acordo com as condições nutricionais do meio em que se desenvolvem (Bryant *et al.*, 1983). Em ambientes com limitação nutricional, as defesas químicas seriam principalmente à base de compostos ricos em carbono, com a produção preferencial de compostos como fenóis e terpenos. Por outro lado, em ambientes com alta disponibilidade de nutrientes ou baixa disponibilidade de carbono (por exemplo, sob limitação luminosa), os carboidratos seriam alocados preferencialmente para crescimento e os compostos secundários contendo nitrogênio (N), como alcalóides e glicosídeos cianogênicos, seriam mais importantes na defesa (Bryant *et al.*, 1983). Embora de grande aceitação, essa hipótese não se confirmou em muitos casos, indicando que o entendimento dos padrões de produção de compostos de defesa em plantas requer a adoção de modelos mais complexos, com uma base mecanicista em fisiologia e sustentação evolutiva (Hamilton *et al.*, 2001).

Aspectos do metabolismo primário, como a fotossíntese líquida e os padrões de alocação de N em diferentes componentes da maquinaria fotossintética, também podem ser alterados como resposta de aclimação a diferentes condições ambientais (Valladares *et al.*, 2000; Rodríguez-López *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2014). A compreensão dos padrões de regulação de rotas metabólicas em função de variações nas condições de crescimento de plantas, como, por exemplo, disponibilidade de N, pode ser obtida mediante a caracterização instantânea do nível de diferentes metabólitos nos tecidos vegetais (Scheible *et al.*, 1997; Kusano *et al.*, 2011). Entretanto, caracterizações fisiológicas e anatômicas de plantas sob diferentes condições ambientais, como ambientes luminosos contrastantes, são bem mais abundantes que aquelas acerca da composição química e dos custos de construção dos tecidos vegetais (Poorter *et al.*, 2006), assim como da dinâmica entre essas características em diferentes situações ecológicas.

O café é a segunda mercadoria comercializada mais valiosa do mundo, sendo o Brasil o principal produtor mundial, seguido por Vietnã e Colômbia. As espécies *Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner são responsáveis por 99% da produção mundial de grãos (DaMatta *et al.*, 2007). Folhas, frutos e flores possuem parte considerável de sua biomassa constituída por metabólitos secundários, ricos tanto em C como em N, relacionados tanto à qualidade da bebida quanto à tolerância das plantas a estresses ambientais (Barros *et al.*, 1994; Close *et al.*, 2003; Salgado *et al.*, 2008,

Hecimovic *et al.*, 2011). Embora seja cultivado com sucesso a pleno sol, *C. arabica* tem suas origens no estrato médio de florestas montanas do Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia. Nas florestas sem intervenção humana, o cafeeiro ocorre em ambientes fortemente sombreados pelos estratos arbóreos superiores, condição intensificada pelo fato de a Etiópia estar em uma das regiões com maior nebulosidade da África. Nessas condições, a produção de frutos é baixa, mas suficiente para garantir a sobrevivência da espécie. A remoção de árvores de estratos superiores da floresta leva ao aumento da produção de frutos, porém as plantas tornam-se enfraquecidas e mais sujeitas a doenças, perdendo o vigor e morrendo após poucos anos (Sylvain, 1955; Alègre, 1959).

Várias evidências sugerem que *C. arabica* tem se adaptado a uma amplitude de condições maior que a encontrada em seu ambiente natural (Sylvain, 1955; DaMatta, 2004). Ao longo do processo de domesticação e de sua introdução no Iêmen e, a partir daí, na Ásia e América do Sul, plantios foram estabelecidos em ambientes diversos, de forma que cultivares modernas e mais produtivas foram selecionadas em ensaios conduzidos a pleno sol e com grande aplicação de insumos (van der Vossen, 2005; DaMatta e Rena, 2002), dando origem a uma série de características diferenciadas dentro da mesma espécie. No Brasil a espécie foi introduzida em 1727, a partir de três plantas (Filho *et al.*, 2008), e todas as cultivares conhecidas são derivados das formas botânicas *typica* e *bourbon* (Anthony *et al.*, 2001). A cultivar Catuaí Vermelho, por exemplo, lançada para fins comerciais em 1972, embora suscetível à ferrugem e a nematoides, é vigorosa e muito produtiva a pleno sol (Carvalho *et al.*, 2008). Já KP, uma linhagem de *bourbon*, é tradicionalmente cultivada sob sombreamento no Quênia e na Tanzânia, na região do Kilimanjaro, apresentando boa produtividade e longevidade também nas condições climáticas da Etiópia (Bettencourt e Carvalho, 1968 e referências citadas).

Em países como Brasil e Colômbia, plantios de café a pleno sol têm resultado em maior produtividade de grãos que aqueles conduzidos sob sombreamento, embora exijam maior demanda por adubação nitrogenada (DaMatta *et al.*, 2004 e 2007; DaMatta e Rodríguez, 2007; Careli *et al.*, 2006). Nessas condições têm sido observada a morte de ramos após a frutificação, associada a estresses ambientais como déficit hídrico, altas temperaturas e alta incidência de luz, que acarretam em desequilíbrios fisiológicos possivelmente associados à deficiência em nutrientes como N e K (Barros *et al.*, 1999, Ramalho *et al.*, 2000, DaMatta *et al.*, 2004; Cavatte *et al.*, 2011).

A disponibilidade de nitrogênio é determinante na adaptação das plantas de café a condições de pleno sol, relacionando-se a defesas contra a fotoinibição da fotossíntese e à reestruturação de componentes bioquímicos e estruturais adequados à condição luminosa de desenvolvimento da planta (Ramalho *et al.*, 1998, 1999, 2000; DaMatta *et al.*, 2002; Pompeli *et al.*, 2010). A aclimação de plantas de café produzidas em viveiro à alta luminosidade está diretamente relacionada à adubação complementar por N (Nunes *et al.*, 1993), associada ao aumento da dissipação não-fotoquímica da energia absorvida, aumento da atividade de enzimas antioxidativas e pigmentos fotoprotetores (Ramalho *et al.*, 2000). Embora o N alocado em componentes do metabolismo primário possa reduzir a pressão de excitação nos fotossistemas (Nunes *et al.*, 2003; Ramalho *et al.*, 1999; DaMatta *et al.*, 2002b;) a demanda de N para outras via metabólicas torna-se evidente pela baixa eficiência fotossintética do uso do N observada em plantas de café (Araújo *et al.*, 2008; DaMatta *et al.*, 2002b).

Apesar da reconhecida importância dos metabólitos secundários nas interações ecológicas das plantas, os padrões que governam a síntese desses compostos ainda não são bem compreendidos. A cafeína, por exemplo, metilxantina com quatro átomos de N em sua estrutura, parece, em alguns casos, ter sua síntese constitutivamente controlada, sem variações em função da disponibilidade de N (Mazzafera, 1999; Gonthier *et al.*, 2011). Em outros estudos, entretanto, tem-se evidenciado que a síntese da cafeína varia tanto em função da disponibilidade de N (Palumbo *et al.*, 2007) como da interação entre N e luz (Pompelli *et al.*, 2013). Embora compostos como alcalóides, metilxantinas e fenóis estejam presentes em altas concentrações em folhas de *C. arabica*, representando estratégias ecológicas na defesa contra a herbivoria e competição com outras espécies de plantas (Nathanson, 1984; Appel, 1993; Hollingsworth *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2011), não se sabe ao certo o papel de diferentes grupos de metabólitos nas respostas de tolerância a altas irradiâncias em *C. arabica*. O entendimento da dinâmica de alocação de recursos nos processos de adaptação e aclimação pode ser de grande valor na busca de características desejáveis em processos de melhoramento e na escolha das cultivares a serem selecionados para cultivo em determinada condição ambiental.

Em estudos recentes, com plantas de *C. arabica* sob diferentes regimes hídricos e luminosos, foi observada correlação positiva entre a síntese de compostos de defesa, como fenóis e alcalóides, e indicadores de produtividade líquida, como fotossíntese, concentração foliar de carboidratos e taxa de crescimento relativo (Cavatte *et al.*, 2012), não sendo observada dicotomia entre crescimento e defesa. Entretanto, como a

disponibilidade de N foi similar e não limitante nas condições avaliadas, a validade da teoria de partição do C e nutrientes não pôde ser testada.

As avaliações descritas nesse trabalho foram desenhadas para testar as seguintes hipóteses:

- Os altos requerimentos de N para a alta produtividade do cafeeiro são resultado da demanda desse elemento tanto para os processos de crescimento (metabolismo primário) como para os de defesa (metabolismo secundário), sendo a partição diferenciada de fotoassimilados e minerais entre essas vias um fator explicativo para a tolerância distinta a altas irradiâncias.
- Sob limitação de N seria ecologicamente mais favorável crescer menos, mas de forma mais segura, ou seja, reduzir o investimento em processos relacionados ao crescimento e aumentar (ou manter) o investimento em defesa.
- O alto investimento de N em compostos do metabolismo secundário, independentemente da condição ambiental, seria um fator explicativo para a baixa eficiência fotossintética do uso do N observada em plantas de café.

Os procedimentos executados tiveram como objetivo detectar e compreender possíveis estratégias diferenciais de uso da radiação em cultivares de *C. arabica* tradicionalmente cultivados em ambientes luminosos distintos, assim como os padrões de alocação de recursos entre crescimento e defesa em plantas submetidas a diferentes disponibilidades de nitrogênio e luz.

2. Materiais e métodos

2.1 Condições experimentais e material vegetal

Os experimentos foram conduzidos em condições semi-controladas em casa de vegetação, em Viçosa (20°45'S, 42°15'W, 650 m de altitude), Minas Gerais.

Mudas de duas cultivares de *C. arabica*, Catuaí Vermelho IAC 44 e KP 423 (mencionados no texto como Catuaí e KP, respectivamente), com tolerâncias contrastantes a altas irradiâncias, foram obtidas a partir de sementes de matrizes do Banco de Germoplasma de Café da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, na Fazenda Experimental de Patrocínio, na região do Alto Paranaíba do Estado de Minas Gerais. Plantas homogêneas, apresentando de 3-4 pares de folhas, foram transferidas para vasos de 24 L, contendo uma mistura de 60% de areia e 40% de solo. Procedeu-se à adubação e correção do pH do substrato, de acordo com recomendações técnicas para a cultura. A umidade do substrato foi mantida próxima à capacidade de campo.

2.2 Delineamento experimental e aplicação dos tratamentos

Durante 12 meses, plantas das duas cultivares foram mantidas a pleno sol e outras em ambiente sombreado, sob telas de poliolefina com atenuação de 80% da radiação solar, valor médio da cobertura do dossel que se sobrepõe à copa das plantas de café nas florestas da Etiópia (Gole *et al.*, 2008). As plantas foram fertiirrigadas quinzenalmente com solução nutritiva completa de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1938).

Após esse período, 250 mL de solução nutritiva de Hoagland, modificada ou completa, foram aplicados semanalmente nas plantas, a pleno sol e sob sombreamento, de modo a obterem-se dois níveis de N, zero e 20 mM, caracterizando níveis de N deficiente e adequado desse nutriente. Dessa forma, foi montado um experimento em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x2 (duas cultivares x duas condições de luminosidade x dois níveis de N), avaliando-se seis repetições por combinação de tratamentos.

As avaliações para a caracterização morfofisiológica dos fenótipos obtidos foram realizadas 178 dias após o início da aplicação das soluções nutritivas diferenciadas, utilizando-se folhas completamente expandidas sob as condições luminosas e nutricionais prevaletentes em cada tratamento.

2.3 Análises morfológicas

Para a caracterização morfológica das plantas, determinou-se a altura máxima (comprimento do ramo ortotrópico), comprimento dos entrenós do ramo ortotrópico e o comprimento dos ramos laterais (ramos plagiotrópicos), medidos com régua (precisão 0,1 cm). O diâmetro da base do ramo ortotrópico, foi medido com paquímetro (precisão de 0,01 mm). O comprimento médio dos entrenós do ramo ortotrópico foi determinado dividindo-se a soma da distância entre cada dois nós consecutivos pelo número total de entrenós.

Para determinação da área foliar específica (AFE), dez discos foliares de 1,4 cm² foram secos em estufa a 70°C, até atingirem massa constante. Utilizou-se então a seguinte fórmula:

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

2.4 Propriedades ópticas

As propriedades ópticas foliares (absortância, reflectância e transmitância) foram obtidas por meio de duas esferas integradoras (Ocean Optics, Inc., Dunedin, Florida, USA) conectadas por fibra óptica a um espectrorradiômetro JAZ (Ocean Optics) com resolução de aproximadamente 0.5 nm. A reflectância e transmitância na faixa da luz visível (400-700nm) foram calculadas utilizando-se o programa SpectraSuite (Ocean Optics). A absortância foi calculada considerando-se:

$$\text{Absortância} = 1 - (\text{reflectância} + \text{transmitância}).$$

2.5 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila

As variáveis de fluorescência e trocas gasosas [taxa de assimilação líquida do carbono (A), condutância estomática (g_s), concentração subestomática de CO₂ (C_i)] foram medidos entre 9:00-11:00 h sob radiação fotossinteticamente ativa (RFA) equivalente aos valores máximos incidentes no ambiente de cultivo das plantas, assim como sob RFA saturante, e pressão parcial de CO₂ de 40 Pa, com um analisador de gases no infravermelho (Li 6400XT, Li-Cor, Lincoln, EUA).

Antes das medições de fluorescência, as folhas foram adaptadas ao escuro por 30 min para que todos os aceptores primários de elétrons estivessem oxidados. A fluorescência mínima (F_0) foi obtida com a excitação da área amostrada por uma luz vermelho-distante (0,03 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e a fluorescência máxima (F_m) pela aplicação de

um pulso de 0,8 s de luz actínica saturante ($>6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A fluorescência variável (F_v) foi determinada pela diferença entre F_0 e F_m e, a partir desses valores, calculou-se o rendimento quântico potencial do fotossistema II (van Kooten e Snel, 1990), conforme a equação:

$$F_v/F_m = F_m - F_0/F_m$$

Em seguida, foram determinadas as variáveis da fase lenta de indução da fluorescência (“variáveis do claro”), mediante a aplicação de uma iluminação actínica, de mesma intensidade da radiação fotossinteticamente ativa ambiente no momento da medição, por 60 s. Após esse tempo, determinou-se a fluorescência em amostra adaptada à luz antes do pulso de saturação (F_t), aplicando-se então um pulso de luz actínica saturante ($>6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de 0,8 s, para a determinação da fluorescência máxima em amostra adaptada à luz (F_m').

O rendimento das três vias concorrentes de desexcitação de clorofilas no fotossistema II, ou seja, o rendimento quântico efetivo do fluxo linear de elétrons, Y(II), rendimento quântico da dissipação regulada de energia não fotoquímica, Y(NPQ) e o rendimento quântico da dissipação não regulada de energia não fotoquímica, Y(NO), foram calculados de acordo com Genty *et al.*, (1989) pelas seguintes equações:

$$Y(\text{II}) = (F_m' - F_t)/F_m'$$

$$Y(\text{NPQ}) = (F_t/F_m') - (F_t/F_m)$$

$$Y(\text{NO}) = F_t/F_m$$

Os processos de dissipação de energia absorvida pelo fotossistema II têm soma igual a um:

$$Y(\text{II}) + Y(\text{NPQ}) + Y(\text{NO}) = 1$$

O Y(II) foi utilizado para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons no fotossistema II (ETR), conforme a equação (Genty *et al.*, 1989),:

$$ETR = Y(\text{II}) \times PAR \times \alpha \times \beta$$

em que PAR é a radiação fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) incidente sobre a folha; e as constantes α (absort\u00e2ncia foliar) e β (propor\u00e7\u00e3o de fotossistemas I e II) foram determinadas para cada tratamento a partir da inclina\u00e7\u00e3o da rela\u00e7\u00e3o entre Φ_{PSII} e Φ_{CO_2} (efici\u00eancia qu\u00e2ntica da assimila\u00e7\u00e3o de CO_2) obtidas mediante curvas de luz sob condi\u00e7\u00f5es n\u00e3o-fotorrespirat\u00f3rias em uma atmosfera contendo menos de 1% de O_2 (Yin *et al* 2009).

Curvas de resposta de A à radiação fotossinteticamente ativa (curva A/RFA) foram obtidas variando-se RFA de 1600 a 0 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a 25°C e 40 Pa de CO_2 (Iio et al., 2005). O rendimento quântico aparente e as irradiâncias de compensação e de saturação foram estimados segundo as equações propostas por Li e Chen (2009).

Curvas de variação da A em função da concentração interna de CO_2 (A/C_i) foram realizadas sob irradiância saturante e não fotoinibitória de 1000 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, variando-se a concentração de CO_2 , de 50 a 2000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Long et al., 2003). Curvas similares também foram realizadas em folhas mortas por fervura, corrigindo-se assim os valores de A e C_i , em função de vazamentos de CO_2 da câmara de medição do analisador de gases, conforme Rodeghiero et al. (2007).

A concentração de CO_2 nos sítios de carboxilação (C_c) e a condutância mesofílica (g_m) foram estimadas conforme Harley et al. (1992). A partir das curvas A/C_i e A/C_c , calculou-se a taxa máxima de carboxilação pela Rubisco (V_{cmax}) e taxa de carboxilação máxima limitada pelo transporte de elétrons (J_{max}), com base em C_i e em C_c , utilizando-se técnicas de regressão não-linear, baseadas nas equações de Farquhar et al. (1980), modificadas por Sharkey (1985) e Harley e Sharkey (1991). Para tal, foram utilizados os parâmetros de cinética da Rubisco determinados *in vitro* para *C. arabica*, a 25°C (Martins et al., 2013), corrigidos para as temperaturas de medição (Bernacchi et al., 2002).

As limitações à fotossíntese foram calculadas de acordo com Grassi e Magnani (2005), em suas frações correspondentes às limitações estomáticas (L_s), mesofílicas (L_m) e bioquímicas (L_b).

A taxa de fotorrespiração (F_R) foi estimada conforme Valentini et al. (1995):

$F_R = 1/12 [\text{ETR} - 4(A + R_L)]$; sendo R_L a respiração diurna, estimada a partir das curvas A/C_i (Martins et al., 2013).

2.6 Análises bioquímicas destrutivas

Folhas completamente expandidas foram coletadas em nitrogênio líquido entre 09:00-10:00 horas, liofilizadas, trituradas em moinho de bola, passadas em peneira de 0,80 mm e, posteriormente, submetidas a nova liofilização, por 48 h. Todas as medições foram realizadas em duplicatas da amostra fracionada.

Nitrogênio e carbono

A concentração total de C e N foi determinada a partir de uma fração de 10mg da amostra, utilizando-se um analisador elementar (Carlo Erba, Itália).

Composição química do tecido foliar

As análises para a determinação dos grandes grupos químicos constituintes do tecido foliar (minerais, ácidos orgânicos, proteínas, carboidratos totais não-estruturais, lipídeos, fenóis solúveis, metilxantinas, lignina e carboidratos totais estruturais) foram realizadas conforme Poorter e Villar (1997), modificadas por Cavatte *et al.* (2012), com algumas alterações. Parte da amostra foi submetidas à extração etanólica a quente, determinando-se, na fração solúvel em etanol, os teores de aminoácidos totais (Gibon *et al.*, 2004), nitrato e clorofilas (Cross *et al.*, 2006). Proteínas foram quantificadas de acordo com Geigenberger e Stitt (1993), mediante curva de calibração com albumina sérica bovina (BSA) (Bradford, 1976).

Atividades de enzimas antioxidativas e indicativo de danos celulares

Em folhas coletadas em nitrogênio líquido, entre 12-13h, e armazenadas a -80°C, determinou-se a atividade das enzimas do sistema antioxidativo dismutase do superóxido (SOD; EC 1.15.1.1), catalase (CAT; EC 1.11.1.6) e peroxidase do ascorbato (APX; EC 1.11.1.11), conforme Pinheiro *et al.* (2004).

A extensão de danos celulares, indicativos de estresse oxidativo, foi determinada pela quantificação de aldeído malônico (MDA), conforme descrito em Lima *et al.* (2002).

2.7 Partição do nitrogênio

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

$$P_r = \frac{V_{c \max}}{6,25 \times 20,5 \times \left(\frac{1}{AFE}\right) \times N_m}$$

em que 6,25 g Rubisco (g N em Rubisco)⁻¹ é um fator para converter o conteúdo de N em proteína; 20,5 μmol CO₂ (g Rubisco)⁻¹ s⁻¹ é a atividade específica da Rubisco; AFE é a área foliar específica; e N_m é o teor de N total em base de massa.

$$P_b = \frac{J_{max}}{8,06 \times 156 \times \left(\frac{1}{AFE}\right) \times N_m}$$

em que 8,06 μmol citocromo f (g N em componentes de transporte de elétrons) $^{-1}$ é um fator de conversão; e 156 mol elétrons ($\text{mol citocromo } f$) $^{-1} \text{ s}^{-1}$ o fator de atividade do transporte de elétrons por unidade de citocromo f .

$$P_t = \frac{C_m}{N_m \times C_B}$$

em que C_m é a concentração de clorofilas totais, e C_B a média ponderada da quantidade de clorofila por quantidade de nitrogênio que há nos fotossistemas (FSII e FSI) e nas antenas do FSII (LHC II). A concentração de cada complexo enzimático por unidade de área e a proporção de clorofila em cada complexo enzimático em relação à concentração total foram calculadas de acordo com Hikosaka e Terashima (1995). A determinação da fração do N em componentes estruturais (P_s) foi determinada conforme equação abaixo:

$$P_s = 100 - P_r - P_b - P_t$$

2.8 Custos de construção e manutenção do tecido foliar

Os custos de construção das folhas (CCO) foram determinados em amostras coletadas entre 09:00-10:00 horas, secas a 60°C, por 72 h, trituradas em moinho de bola e peneiradas em malha de 0,08 mm. Os valores foram calculados conforme a equação abaixo (Williams *et al.*, 1987):

$$CCO = [(0,06968 \times Hc - 0,065)(1 - Cz) + (7,5 \times k \times N_{org}/14,0067)]/Eg$$

em que Hc é o calor de combustão (kJ g^{-1}), determinado via combustão completa de 500 mg do material vegetal em bomba adiabática calorimétrica (Villar e Merino, 2001); Cz é a concentração de cinzas (g g^{-1}), determinada por gravimetria após a queima do material vegetal em mufla; k é o estado de oxidação da fonte de nitrogênio, +5 para nitrato ou -3 para amônio (como a fonte de nitrogênio não era única, foi utilizado o valor médio, +1); N_{org} é a concentração de nitrogênio orgânico (g g^{-1}) determinada conforme DaMatta *et al.* (1999); e Eg é a eficiência de crescimento do tecido foliar, utilizando-se o valor de 0,89 (Williams *et al.*, 1987).

A determinação dos custos de manutenção (CMT) por unidade de massa seca ($\text{g glicose g}^{-1} \text{ MS dia}^{-1}$) foi feita a partir das concentrações foliares de lipídios, proteínas e minerais, considerando-se os seguintes coeficientes de manutenção: 0,0425 (lipídios), 0,0405 (proteínas) e 0,008 (concentração iônica), conforme Merino *et al.* (1984). O CMT foi calculado pela soma do produto de cada coeficiente de manutenção pela

concentração de cada composto correspondente, acrescentando-se os custos de manutenção da concentração iônica (Penning de Vries *et al.*,1974).

2.9 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se um delineamento inteiramente casualizado de um esquema fatorial 2x2x2 (duas cultivares, duas condições luminosas x dois níveis de adubação nitrogenada), com seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA de três vias, com os efeitos principais avaliados como fatores fixos) utilizando-se o programa SAS (versão 9.1) e $\alpha = 0,05$. Para o estudo das relações entre as variáveis, utilizou-se a correlação linear de Pearson (r), calculada através do Excel:mac (2011).

3. Resultados

3.1 N e C

As concentrações de N foram similares entre as duas cultivares, e foram reduzidas significativamente sob omissão de N (-N), especialmente nas plantas ao sol, o que pode ser observado na Figura 1 (interação L x N significativa; Tabela 1). Nas plantas sob suprimento adequado de N (+N), a concentração observada variou de 25 a 28 g N kg⁻¹ MS, enquanto nas -N os valores observados variaram em torno de 15 g N kg⁻¹ MS. As concentrações de N nas plantas ao sol/-N foram menores que nas à sombra/-N (interação L x N significativa; tabela 1).

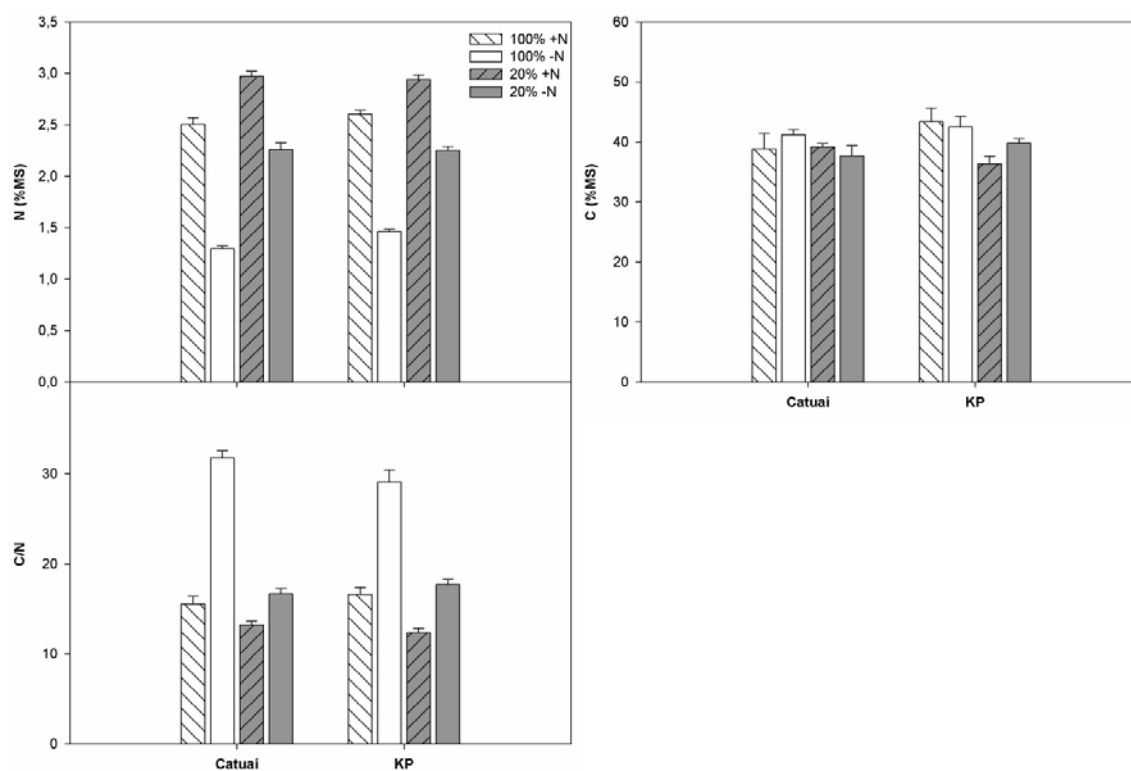


Figura 1 – Concentrações (média ± erro padrão; $n=6$) de nitrogênio (N), carbono (C) e razões entre essas variáveis (C/N) na massa seca foliar das cultivares de *Coffea arabica* L. Catuai e KP, submetidas a condições contrastantes de luz (100% ou 20% da irradiância ambiente) e adubação nitrogenada (suficiente= +N/deficiente= -N).

A concentração total de carbono foi maior nas folhas de plantas cultivadas ao sol que naquelas à sombra. As maiores razões C/N foram observadas nas plantas ao sol/-N de ambas as cultivares (interação L x N significativa; Tabela 1).

3.2 Caracterização morfológica

Sob todas as condições avaliadas, plantas de KP apresentaram maiores valores de comprimento médio dos entrenós, altura máxima e razão altura/ diâmetro do ramo ortotrópico que os observados em indivíduos de Catuai, quando submetidos aos mesmos tratamentos (Figura 2). Plantas sombreadas de ambas as cultivares apresentaram maiores valores dessas variáveis que aquelas cultivadas a pleno sol.

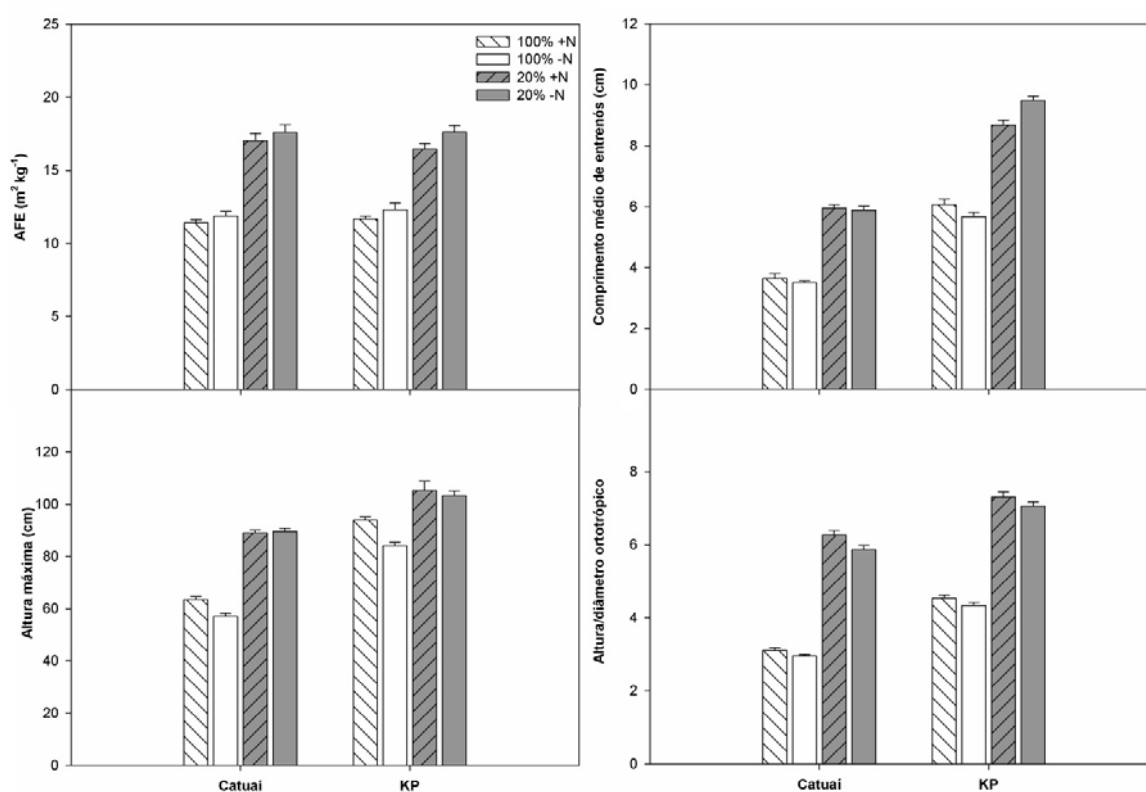


Figura 2 – Variáveis morfológicas avaliadas em plantas das cultivares de *Coffea arabica* L. Catuai e KP, submetidas a condições contrastantes de luz (100% ou 20% da irradiância ambiente) e adubação nitrogenada (suficiente= +N/deficiente= -N);(média ± erro padrão; n= 6). AFE = área foliar específica.

3.3 Trocas gasosas

As trocas gasosas foram medidas nas condições de máxima irradiância efetivamente interceptada pelas folhas. Os valores de A foram maiores ao sol que à sombra (63%, em média, nas plantas +N), com valores significativamente reduzidos nas plantas -N (aproximadamente 50%) (Figura 3; Tabela 1). Nas plantas sombreadas, a omissão de N afetou diferencialmente as duas cultivares, com decréscimos substancialmente maiores nas plantas de KP/-N que de Catuaí/-N (interações C x L e C x N significativas). Um padrão muito similar de resposta foi observado para g_s , resultando em correlações positivas significativas entre essas duas variáveis ($r=0,73$; $p=5,6 \cdot 10^{-9}$). Entretanto, enquanto as diferenças de A entre cultivares foram tênues, quando existentes, g_s foi significativamente maior em Catuaí que em KP, independentemente dos fatores luz e N (interações C x L e C x N não significativas) (Figura 3; Tabela 1). Quanto aos valores de C_i , estes foram menores nas plantas sombreadas que naquelas ao sol, com os valores absolutos máximos observados nas plantas sol/-N, enquanto nas plantas à sombra os valores de C_i não responderam à disponibilidade de N (interação L x N significativa). Nas duas cultivares, os valores de R_d foram significativamente reduzidos pelo sombreamento, independentemente da disponibilidade de N (interações L x N e C x L não significativas) (Figura 3; Tabela 1). A fotorrespiração estimada sob a irradiância máxima efetiva foi, independentemente da cultivar e da luminosidade, menor nas plantas -N que naquelas +N (Figura 3; Tabela 1).

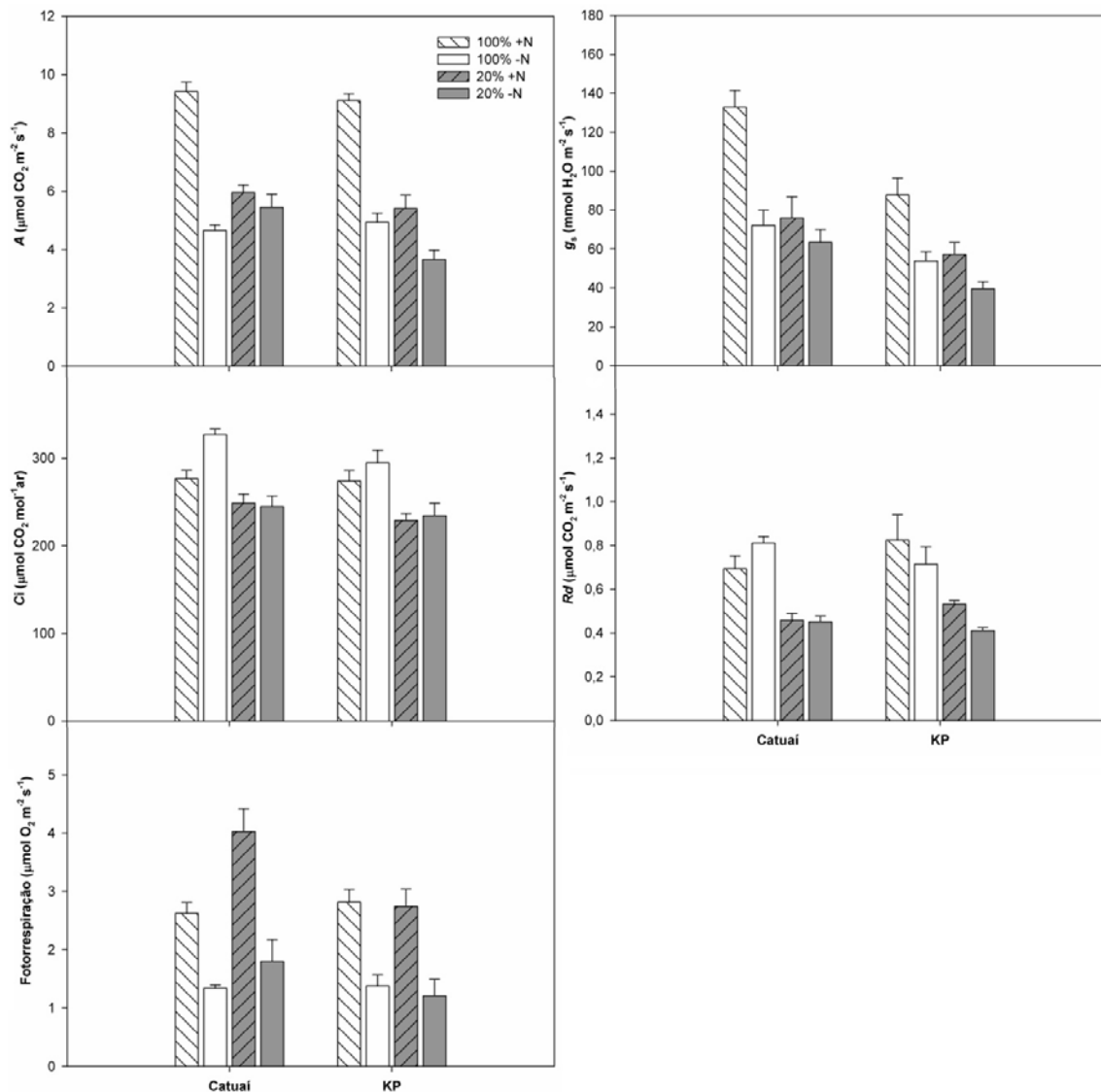


Figura 3 - Variáveis pontuais de trocas gasosas em plantas das cultivares de *Coffea arabica* L. Catuai e KP, submetidas a condições contrastantes de luz (100% ou 20% da irradiância ambiente) e adubação nitrogenada (suficiente= +N/deficiente= -N); (média \pm erro padrão; $n=6$). A taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO_2 (C_i) foram obtidas sob a irradiância máxima incidente em cada tratamento. R_d = respiração foliar noturna.

Os valores de V_{cmax} não variaram entre as cultivares, independentemente dos fatores luz e N (interações C x L e C x N não significativas) (Figura 5; Tabela 1). As plantas -N apresentaram fortes reduções em V_{cmax} , particularmente nas plantas sol/-N (62%, em média). Adicionalmente, observou-se um claro padrão de maiores valores de V_{cmax} nas plantas à sombra em relação àquelas a pleno sol (ANOVA significativa para fator luz). Independentemente da cultivar, J_{max} foi reduzido fortemente pela deficiência de N (47%, em média); o sombreamento promoveu um ligeiro aumento de J_{max} em relação ao observado nas plantas ao sol, exceto em Catuai/+N (Figura 4; Tabela 1).

Destaca-se ainda que g_m foi afetada significativamente apenas pelo fator N, com decréscimos médios de 52,5% nas plantas -N em relação às +N, independentemente dos fatores cultivar e luz (todas as interações possíveis não significativas) (Figura 4; Tabela 1).

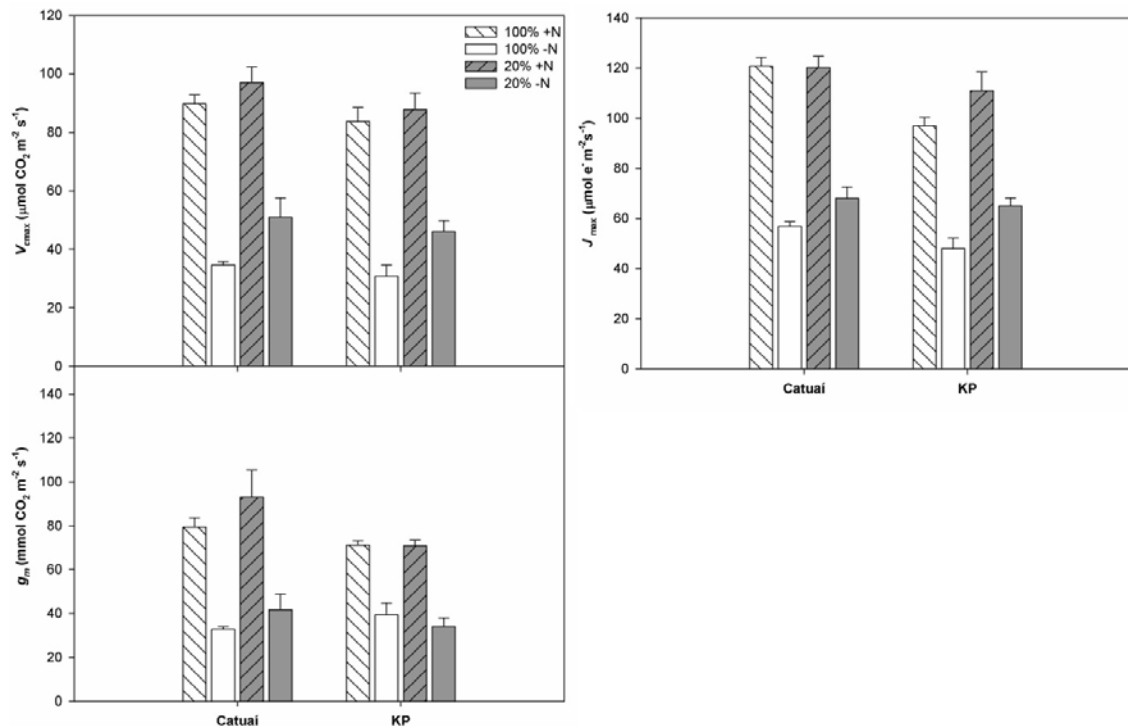


Figura 4 - Variáveis fotossintéticas obtidas a partir de curvas A (taxa de assimilação líquida de CO_2) / C_i (concentração intercelular de CO_2) de duas cultivares de *Coffea arabica* L., Catuaí e KP, submetidas a condições contrastantes de luz (100% ou 20% da irradiância ambiente) e adubação nitrogenada (suficiente= +N/deficiente= -N); (média \pm erro padrão; $n=6$). V_{cmax} = taxa máxima de carboxilação pela rubisco; J_{max} = taxa máxima de transporte de elétrons; g_m = condutância mesofílica.

As variáveis obtidas nas curvas A/PAR estão representadas nos gráficos da figura 5. Os valores de A_{max} das plantas -N foram menores que os das plantas +N, independentemente da cultivar (interação C x N não significativa; Tabela 1). Os decréscimos dessa variável nas plantas à sombra em relação àquelas ao sol foram mais pronunciados em KP que em Catuaí (interações C x L e L x N significativas). De modo geral, pôde-se observar um menor rendimento quântico aparente (Φ) nas plantas -N, embora não tenha sido possível detectar um padrão consistente de variação em função dos tratamentos (interação C x L x N significativa). As plantas ao sol apresentaram, em média, maiores PCL's e PSL's que as sombreadas. As plantas de Catuaí/sol apresentaram maior PCL que as de KP/sol, assim como maior redução dessa variável

sob sombreamento (interação C x L significativa). Plantas de Catuai/-N apresentaram maior PCL que as de Catuai/+N, observando-se, em plantas de KP, uma tendência inversa (interação C x N significativa).

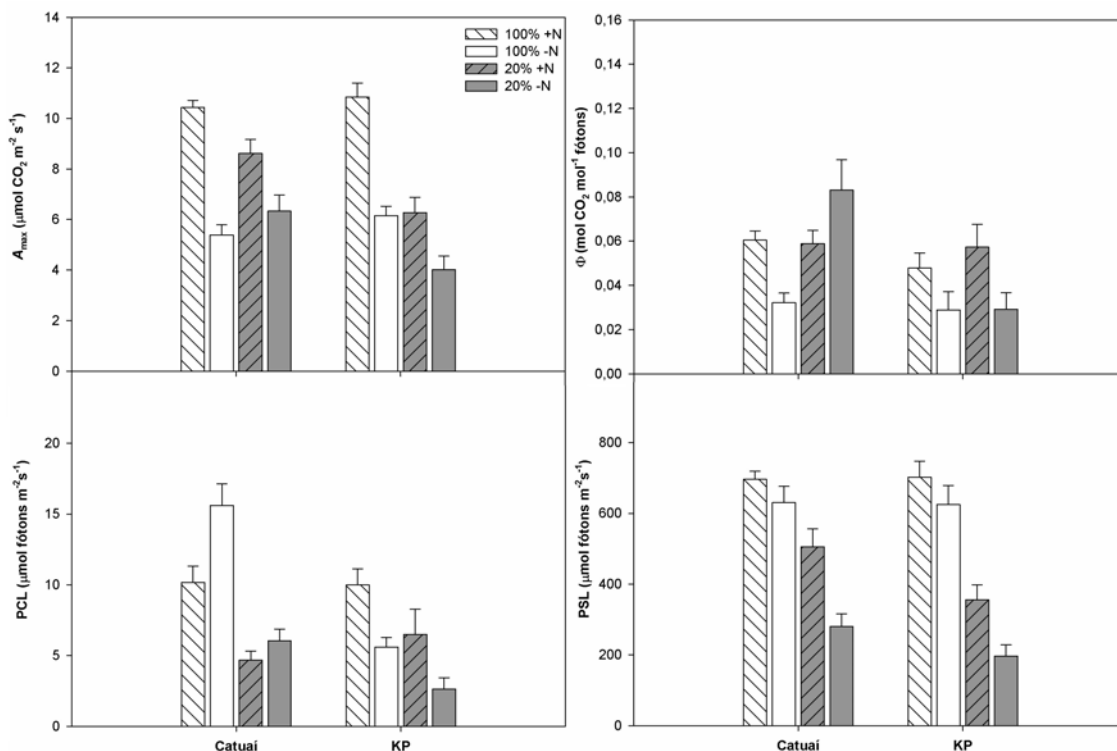


Figura 5 - Variáveis fotossintéticas obtidas a partir de curvas A (taxa de assimilação líquida de CO_2)/ PAR (radiação fotossinteticamente ativa) de duas cultivares de *Coffea arabica* L., Catuai e KP, submetidas a condições contrastantes de luz (100% ou 20% da irradiância ambiente) e adubação nitrogenada (suficiente= +N/deficiente= -N); (média \pm erro padrão; $n=6$). A_{max} = taxa assimilatória máxima sob luz saturante; ϕ = rendimento quântico aparente; PCL= ponto de compensação luminoso; PSL= ponto de saturação luminoso.

3.4 Fluorescência da clorofila a

Ambas as cultivares, sob as diferentes condições avaliadas, apresentaram valores similares de F_v/F_m , sendo estatisticamente menores nas plantas -N quando comparadas às suas equivalentes +N (-7,88% em Catuaí/sol, -7,12% em KP/sol; -8,13% em Catuaí/sombra, -2,6% em KP/sombra) (Figura 6; Tabela 1, assim como os demais dados de *Fluorescência da clorofila*). Em medições sob luz saturante, em todas as condições avaliadas, a maior proporção da irradiância absorvida pelas folhas foi dissipada de forma regulada, Y(NPQ), seguida pela dissipação não regulada, Y(NO), e só estão pela dissipação fotoquímica, Y(II). Em todos os casos, menos de 20% da irradiância absorvida foi dissipada fotoquimicamente. Em ambas as cultivares e condições luminosas, o Y(II) de plantas -N foi menor que o de suas equivalentes +N. A pleno sol, os valores de Y(II) de ambas as cultivares foram similares; sob sombreamento, em contrapartida, o Y(II) de Catuaí/+N foi superior ao de KP/+N, e similar aos valores observados em plantas +N a pleno sol (interação C x L significativa). O Y(NPQ) não foi afetado pelas adubações nitrogenadas. Valores de Y(NPQ) em plantas de Catuaí/sol foram maiores que os de Catuaí/sombra, não sendo observadas variações nessa variável em função da luz em KP (interação C x L significativa). Em geral, Y(NO) foi maior em KP que em Catuaí, e nas plantas -N que nas +N. Observaram-se, em Catuaí ao sol, maiores razões Y(NPQ)/Y(NO) que à sombra. Em KP, a razão Y(NPQ)/Y(NO) não respondeu aos tratamentos aplicados. A ETR foi significativamente menor nas plantas -N quando comparadas às +N (45%, em média).

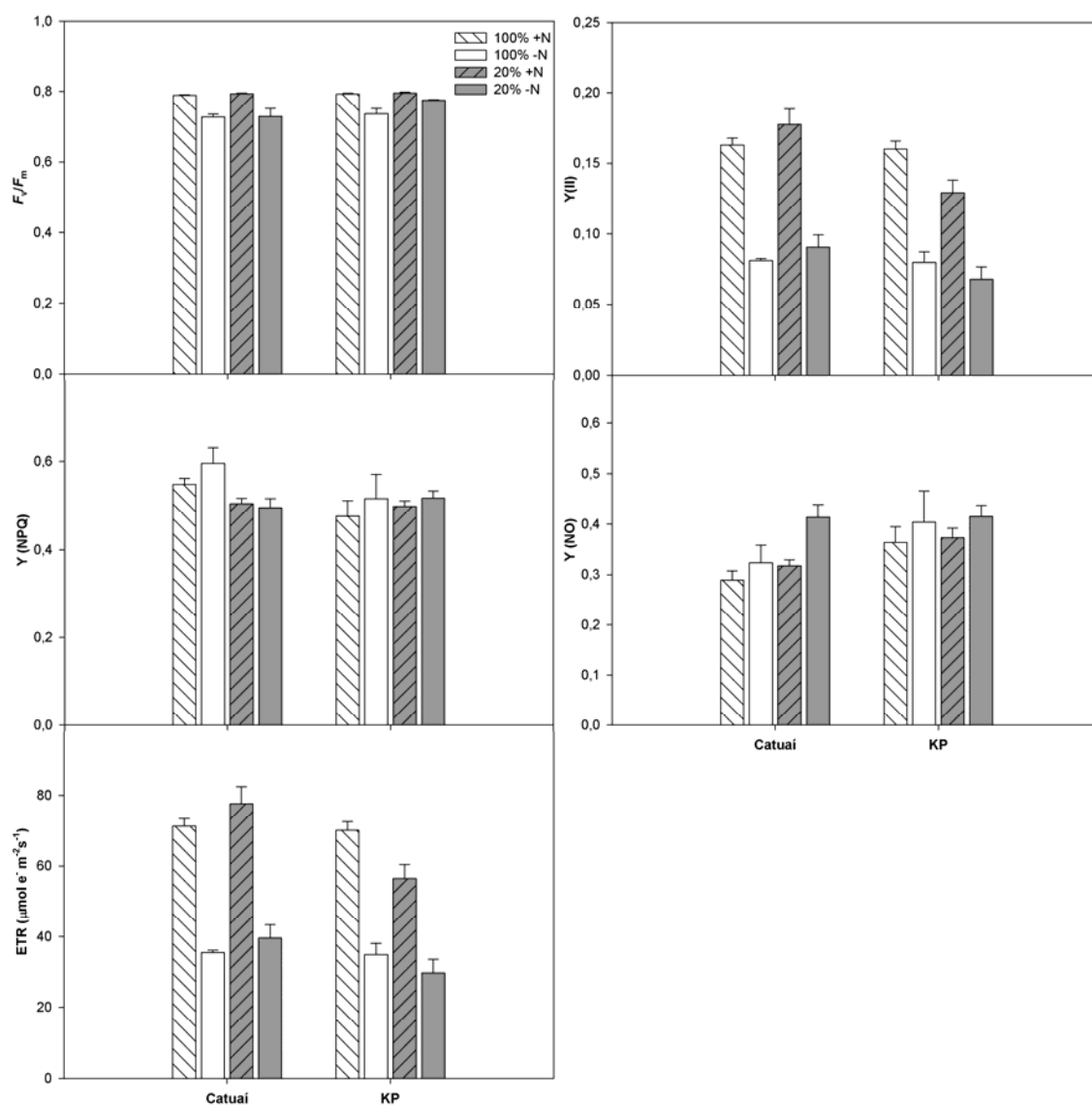


Figura 6 – Fluorescência da clorofila, em plantas de duas cultivares de *Coffea arabica* L., Catuaí e KP, submetidas a condições contrastantes de luz (100% ou 20% da irradiância ambiente) e adubação nitrogenada (suficiente= +N/deficiente= -N);(média \pm erro padrão; $n= 6$). F_v/F_m = eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II; $Y(II)$ = rendimento quântico do fotossistema II; $Y(NPQ)$ = rendimento quântico da dissipação regulada de energia; $Y(NO)$ = rendimento quântico da dissipação não-regulada de energia; ETR=taxa de transporte de elétrons.

3.5 Limitações à fotossíntese

O padrão de limitações à fotossíntese em resposta aos tratamentos impostos não diferiu entre as cultivares avaliadas (Figura 7, Tabela 1). A principal limitação à fotossíntese das plantas sombreadas foi estomática (L_s , 52%, em média), seguida pela mesofílica (L_m , média de 26%) e então pela bioquímica (L_b , média de 22%). Em contrapartida, nas plantas a pleno sol, as diferentes limitações foram muito similares, em torno de 33% cada. As maiores L_b 's foram observadas nas plantas -N a pleno sol,

não diferindo entre as sombreadas nos diferentes regimes de N (interação L x N significativa, Tabela 1).

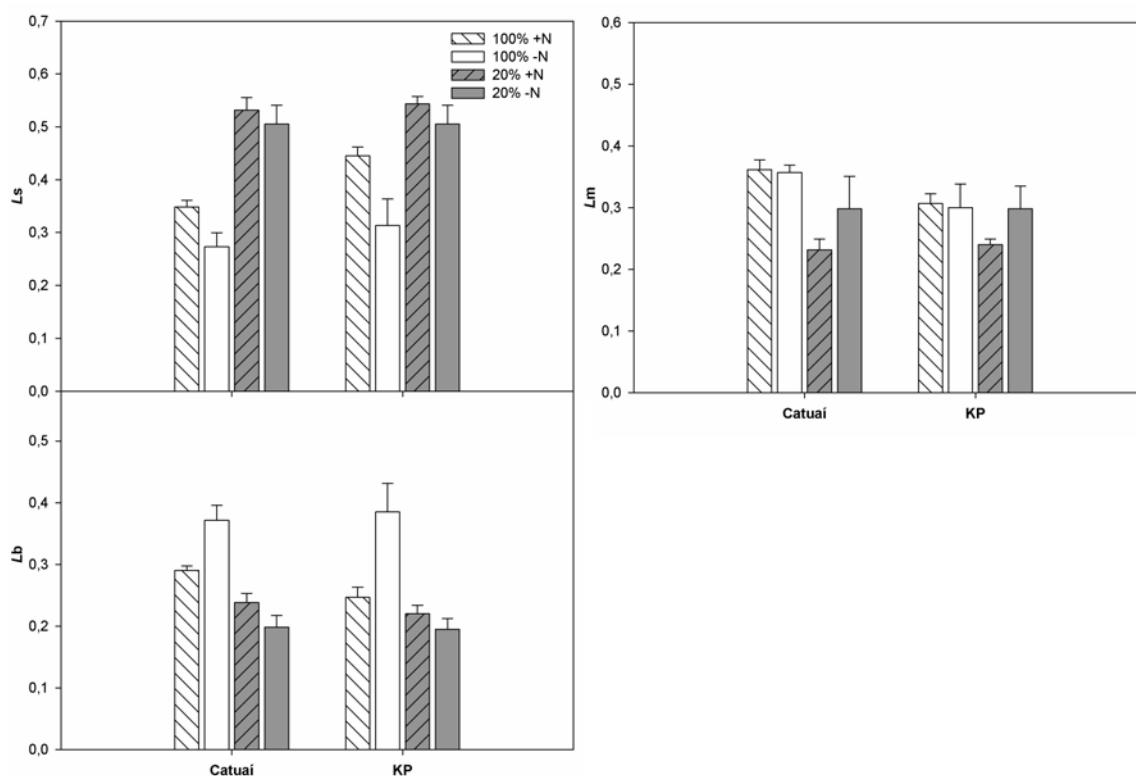


Figura 7 - Limitações estomáticas (L_s), mesofílicas (L_m) e bioquímicas (L_b) à fotossíntese em plantas de duas cultivares de *Coffea arabica* L., Catuai e KP, submetidas a condições contrastantes de luz (100% ou 20% da irradiância ambiente) e adubação nitrogenada (suficiente= +N/deficiente= -N);(média \pm erro padrão; $n=6$).

3.6 PNUE e partição do N

A eficiência fotossintética do uso do N (PNUE) sob a irradiância máxima efetiva incidente em cada tratamento foi, em média, menor nas plantas de sombra que nas de sol (-19%, em média), e menor em KP que em Catuai (-13%). Não foram observados efeitos das diferentes adubações nitrogenadas nessa variável (efeitos de N e todas as interações possíveis não significativos) (Figura 8, Tabela 1).

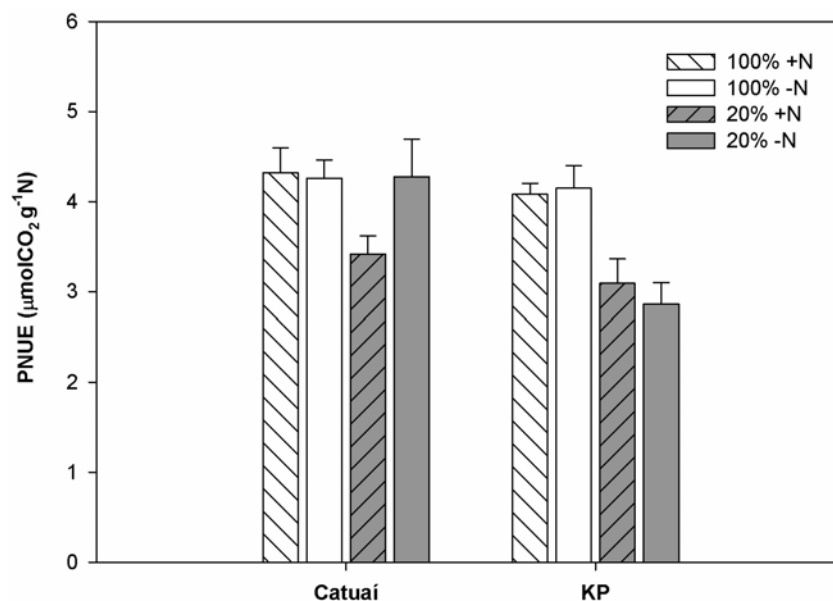


Figura 8 – Eficiência fotossintética do uso do nitrogênio (PNUE; taxa de assimilação líquida de CO₂ por unidade de N orgânico) em plantas de duas cultivares de *Coffea arabica* L., Catuaí e KP, submetidas a condições contrastantes de luz (100% ou 20% da irradiância ambiente) e adubação nitrogenada (suficiente= +N/deficiente= -N);(média ± erro padrão; n= 6).

Em todos os tratamentos avaliados, as maiores frações do N estiveram alocadas em Rubisco (*Pr*) (32%, em média), e componentes estruturais (*Ps*) (58%, em média)(Figura 9). Observou-se maior *Pr* em Catuaí que em KP, nas plantas de sombra que nas de sol e nas +N que nas -N (C, L e N significativos) (Figura 9, Tabela 1).. Plantas de Catuaí apresentaram mais N em proteínas da cadeia de transporte de elétrons (*Pb*) que as de KP. Enquanto nas plantas ao sol *Pb* não se alterou em função de N, sob sombreamento observou-se maior *Pb* nas plantas +N que nas -N (interação L x N significativa). Mais N foi investido em pigmentos de captura de luz (*Pl*) nos indivíduos à sombra que naqueles ao sol. O N alocado em componentes estruturais (*Ps*) foi, em média, maior em Catuaí que em KP. Observou-se maior *Ps* nas plantas -N que nas +N, diferença esta mais evidente nas plantas sombreadas que nas ao sol (interação L x N significativa).

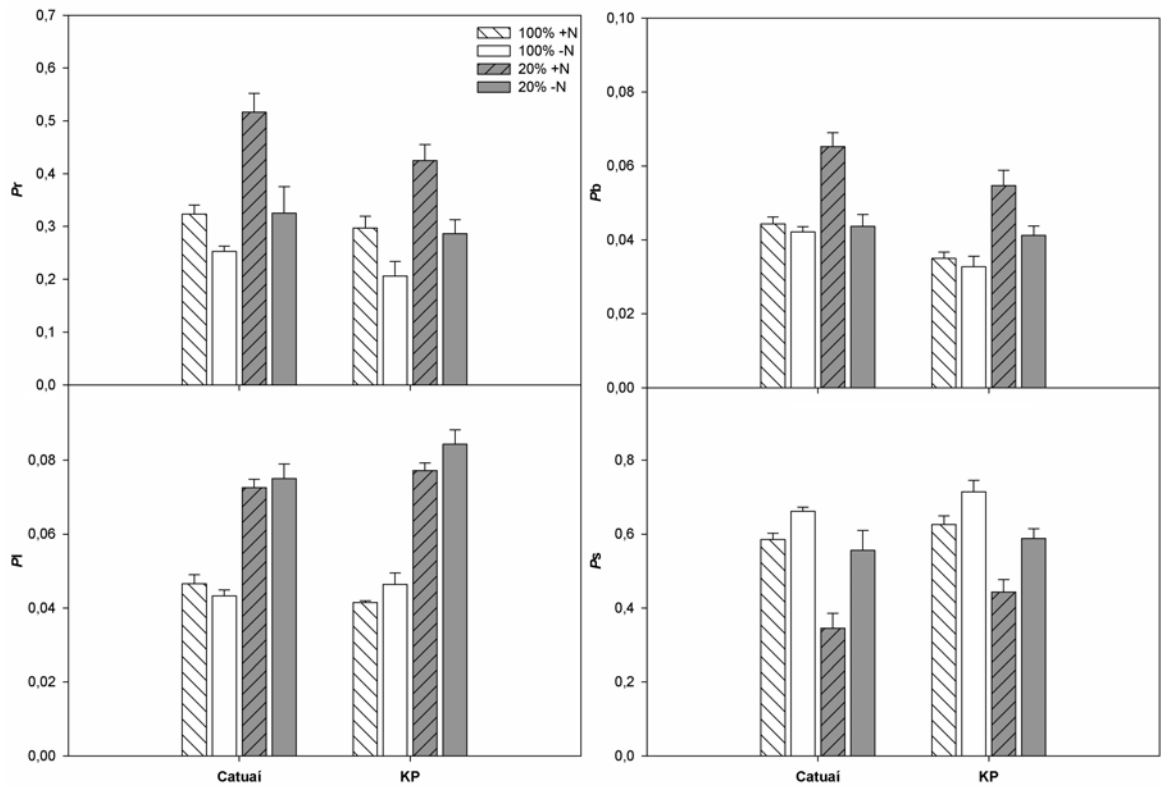


Figura 9 – Partição do nitrogênio foliar de plantas de duas cultivares de *Coffea arabica* L., Catuai e KP, submetidas a condições contrastantes de luz (100% ou 20% da irradiância ambiente) e adubação nitrogenada (suficiente= +N/deficiente= -N), em Rubisco (P_r), componentes da cadeia de transporte de elétrons (P_b), pigmentos envolvidos na captura de luz (P_l) e componentes estruturais (P_s); (média \pm erro padrão; $n=6$).

3.7 Clorofilas

As duas cultivares exibiram maiores teores de clorofilas totais por unidade de massa seca nas folhas sombreadas que nas ao sol, com uma diferença mais expressiva observada em KP que em Catuai (interação C x L significativa). Menores concentrações foliares de clorofila foram detectadas em folhas de plantas -N quando comparadas às +N, principalmente naquelas ao sol (interação L x N significativa) (Figura 10, Tabela 1).

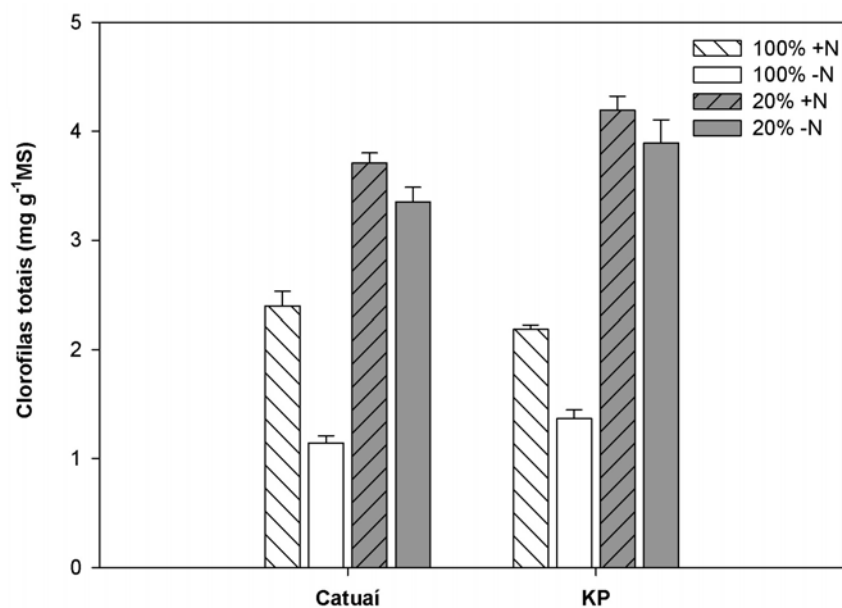


Figura 10 – Concentração foliar (média \pm erro padrão; $n= 6$) de clorofilas totais em plantas de duas cultivares de *Coffea arabica* L., Catuai e KP, submetidas a condições contrastantes de luz (100% ou 20% da irradiância ambiente) e adubação nitrogenada (suficiente= +N/deficiente= -N).

3.8 Propriedades ópticas

Sob todas as condições avaliadas, a maior parte da irradiância foi absorvida pelas folhas (mais de 60%), sendo as menores absorptâncias observadas nas plantas de sol/-N. Nessa combinação de condições foram observadas as maiores transmitâncias e reflectâncias em ambas as cultivares (Figura 11, Tabela 1).

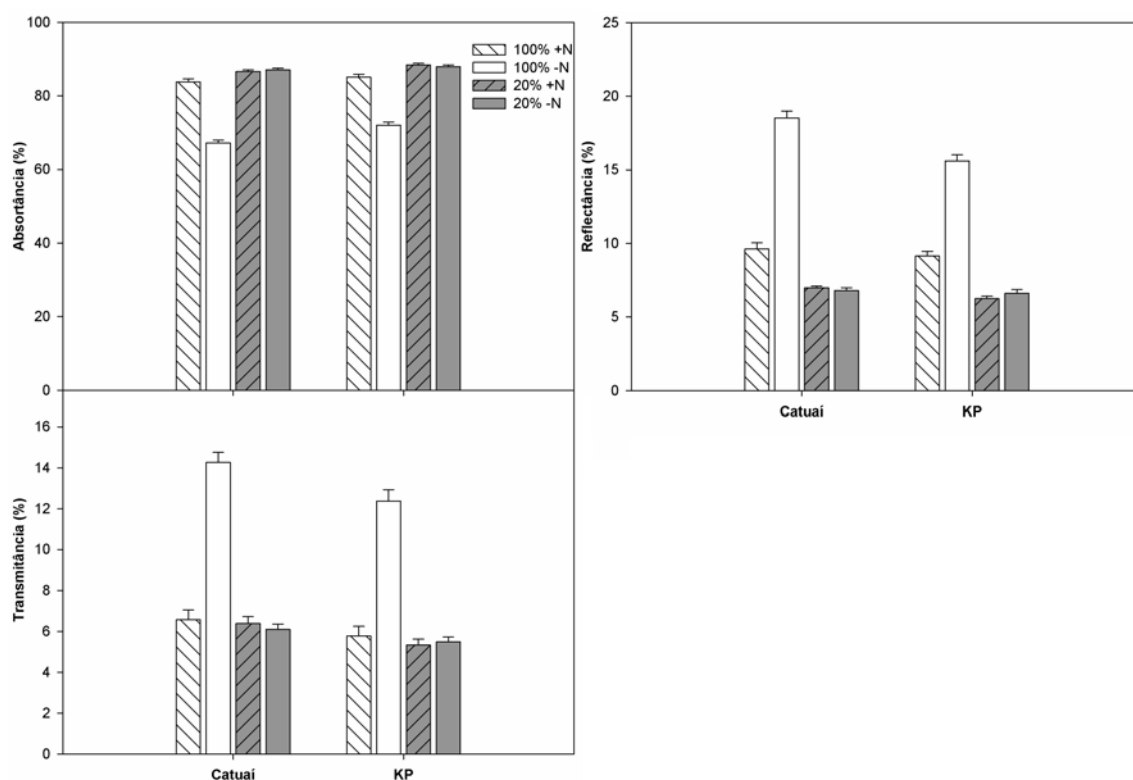


Figura 11 – Propriedades ópticas, na forma da dissipação física diferencial da luz incidente na superfície foliar, de plantas de duas cultivares de *Coffea arabica* L., Catuaí e KP, submetidas a condições contrastantes de luz (100% ou 20% da irradiância ambiente) e adubação nitrogenada (suficiente= +N/deficiente= -N); (média \pm erro padrão; $n= 6$).

3.9 Enzimas anti-oxidativas e MDA

Embora não tenha sido observado um padrão estatístico claro na atividade da SOD (todos os efeitos e interações possíveis significativos), pôde-se perceber maior atividade dessa enzima nas plantas ao sol que naquelas à sombra. Dentre as plantas ao sol, observou-se maior atividade da SOD e CAT em Catuaí que em KP e, em ambas as cultivares, maior atividade da SOD, CAT e APX nas plantas -N que nas +N, diferença não observada nas plantas sombreadas (interação L x N significativa) (Figura 12, Tabela 1).

As concentrações de MDA observadas não apresentaram padrão consistente de variação entre os tratamentos (interação tripla significativa). De modo geral, foi possível observar uma tendência de maiores valores nas plantas ao sol que nas sombreadas (Figura 12, Tabela 1).

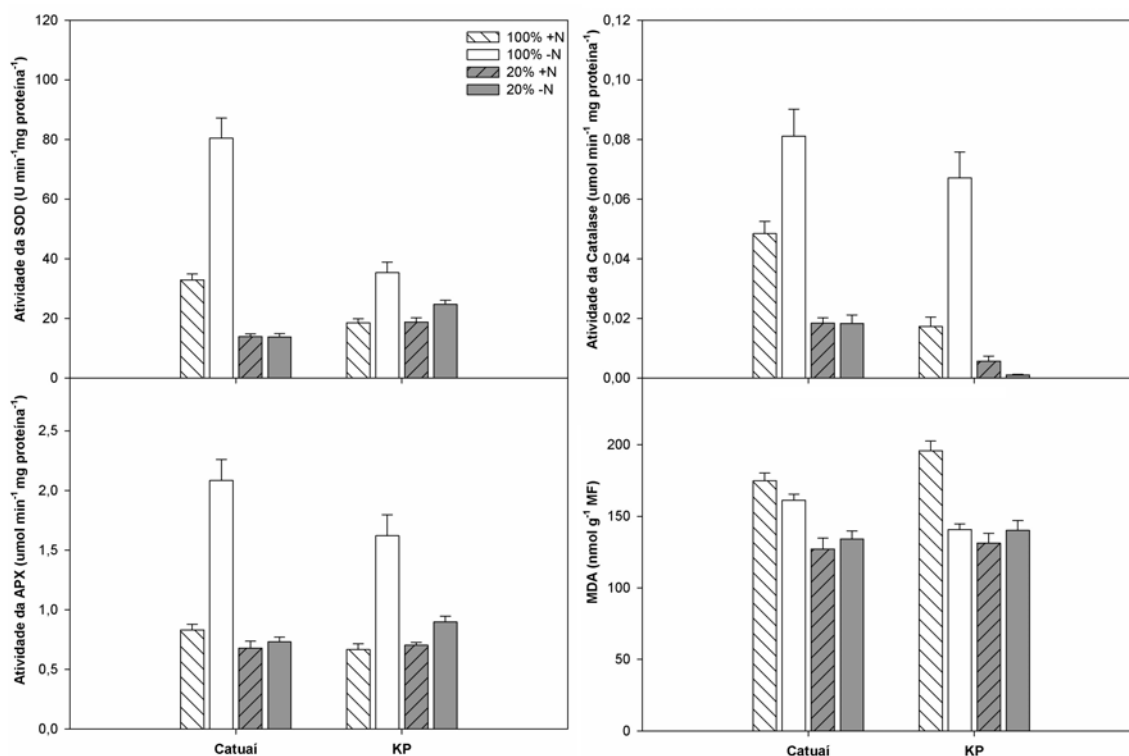


Figura 12 – Variáveis indicativas da ocorrência de estresse oxidativo em folhas de plantas de duas cultivares de *Coffea arabica* L., Catuaí e KP, submetidas a condições contrastantes de luz (100% ou 20% da irradiância ambiente) e adubação nitrogenada (suficiente= +N/deficiente= -N); superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), MDA (aldeído malônico); (média ± erro padrão; $n=6$).

3.10 Composição química

Os padrões mais marcantes de variação da composição química foliar nas plantas sob os tratamentos avaliados foram observados como resposta às diferentes condições luminosas (efeito significativo de L para a maioria dos grupos de compostos avaliados). Os valores médios obtidos para os grupos de compostos avaliados encontram-se na Figura 13, e a significância dos efeitos dos tratamentos na Tabela 1. De maneira geral, Catuaí e KP apresentaram as mesmas tendências na variação da composição química em função dos tratamentos avaliados, sendo as principais diferenças entre as cultivares referentes à magnitude dessas variações. Foram observadas maiores concentrações foliares de metilxantinas, fenóis solúveis, carboidratos solúveis e carboidratos insolúveis nas plantas de sol que nas de sombra. Estas, por sua vez, apresentaram maiores concentrações de lipídeos, proteínas, minerais, ácidos orgânicos totais e aminoácidos livres.

O acúmulo de metilxantinas variou de forma complexa entre as plantas submetidas aos tratamentos (interação tripla significativa), mas de forma geral pôde-se observar uma tendência de redução na concentração desses compostos sob deficiência

de N (exceto em Catuaí/sombra) e, principalmente, nas plantas à sombra em relação àquelas ao sol (redução esta mais intensa em Catuaí que em KP; interação C x L significativa). Os fenóis solúveis, por sua vez, apresentaram tendência inversa no que diz respeito à disponibilidade de N, com aumentos de concentração nas plantas -N. Os maiores valores de fenóis solúveis foram observados em Catuaí ao sol, tendo o sombreamento resultado em menores concentrações, porém similares, em ambas as cultivares (interações C x L e L x N significativas).

Ambas as cultivares exibiram maiores concentrações de proteínas em folhas à sombra que naquelas ao sol, assim como nas +N que nas -N. Ao sol, observou-se maiores concentrações de proteínas em KP que em Catuaí, e as reduções decorrentes da adubação -N foram mais intensas ao sol que na sombra (interações C x L e L x N significativas). A concentração de nitrato nas folhas de plantas de sombra/+N foi maior que nas plantas submetidas aos demais tratamentos em ambas as cultivares, e maior em Catuaí que em KP.

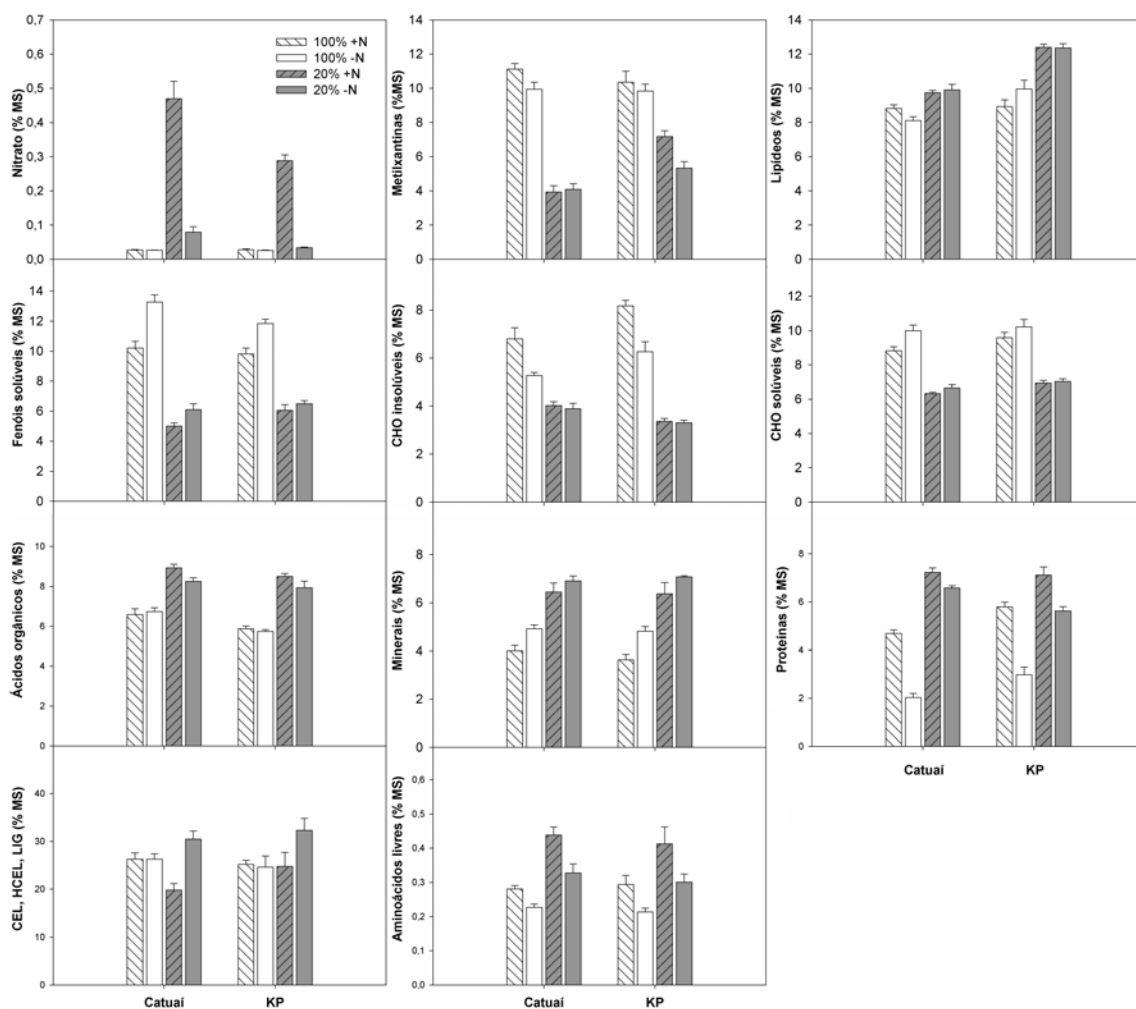


Figura 13 – Composição química da massa seca foliar das cultivares de *Coffea arabica* L. Catuaí e KP, submetidas a condições contrastantes de luz (100% ou 20% da irradiância ambiente) e adubação nitrogenada (suficiente= +N/deficiente= -N). CEL= celulose, HCEL= hemicelulose, LIG= lignina. Média \pm erro padrão; $n=6$.

3.11 Custos de construção e manutenção

Os custos de construção (CCO) das plantas ao sol foram maiores que os das sombreadas, em ambas as cultivares (Figura 14, Tabela 1).. Os custos de manutenção (CMT) foram afetados pelos tratamentos aplicados de forma complexa, sendo maiores, em média, em KP que em Catuai (Figura 14, Tabela 1). Independentemente da cultivar, o CMT foi maior nas plantas à sombra que ao sol (interação C x L não significativa). As plantas -N apresentaram menores CMT's, particularmente nas plantas ao sol (interação L x N significativa), enquanto nas plantas sombreadas a omissão de N afetou CMT apenas em KP (interação CxLxN significativa).

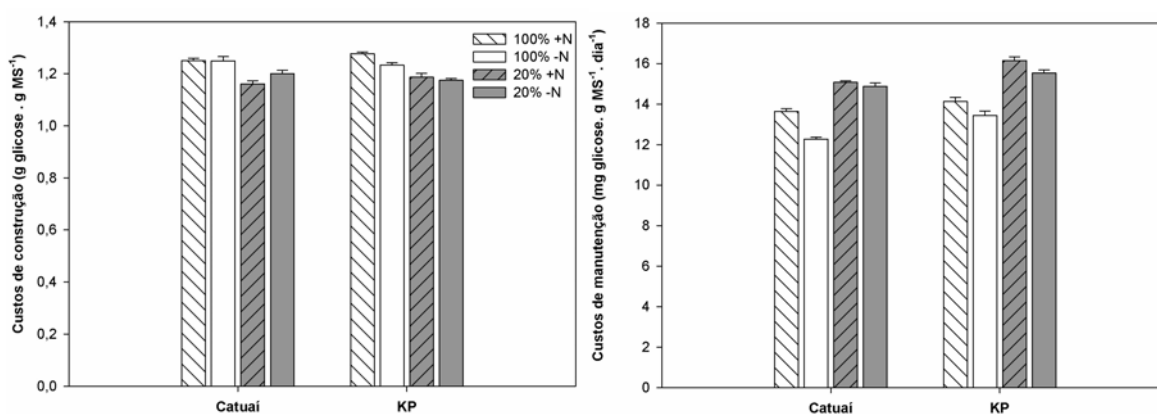


Figura 14 – Custos de construção e manutenção da massa seca foliar das cultivares de *Coffea arabica* L. Catuai e KP, submetidas a condições contrastantes de luz (100% ou 20% da irradiância ambiente) e adubação nitrogenada (suficiente= +N/deficiente= -N). Média ± erro padrão; n= 6.

Tabela 1 - Resultados da ANOVA para os efeitos da cultivar (CT), luz (L) e nitrogênio (N) e suas interações nas variáveis avaliadas (diferenças não significativas = ns; $P < 0,05 = *$), sendo elas a concentração foliar de nitrogênio (N total), concentração de carbono (C total), razão carbono/nitrogênio (C/N), variáveis morfológicas, taxa de assimilação líquida de CO_2 (A_{im}), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO_2 (C_i), respiração noturna (R_d), taxa máxima de carboxilação pela rubisco (V_{cmax}), taxa máxima de transporte de elétrons (J_{max}), condutância mesofílica (g_m), rendimento quântico aparente (ϕ), ponto de compensação luminoso (PCL), ponto de saturação luminoso (PSL), taxa assimilatória máxima sob luz saturante (A_{max}), eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m), taxa de transporte de elétrons (TTE), rendimento quântico do fotossistema II (Y(II)), rendimento quântico da dissipação regulada de energia (Y(NPQ)), rendimento quântico da dissipação não-regulada de energia (Y(NO)), limitações estomáticas (L_s), mesofílicas (L_m) e bioquímicas (L_b) à fotossíntese, eficiência fotossintética do uso do nitrogênio (PNUE), partição do nitrogênio em Rubisco (Pr), componentes da cadeia de transporte de elétrons (Pb), pigmentos envolvidos na captura de luz (Pl) e componentes estruturais (Ps); propriedades ópticas; superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), MDA (aldeído malônico); composição química, custos de construção e de manutenção.

	CT	L	N	C x L	C x N	L x N	C x L x N
Variáveis	Nitrogênio e Carbono						
N total	ns	*	*	*	ns	*	ns
C total	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
C/N	ns	*	*	ns	ns	*	*
	Caracterização morfológica						
Comprimento médio entrenós	*	*	ns	*	ns	*	*
Altura máxima	*	*	*	*	ns	*	ns
Área foliar específica	ns	*	*	ns	ns	ns	ns
Altura/diâmetro ortotropico	*	*	*	ns	ns	ns	ns

continua...

Tabela 1 - Continuação

Variáveis	CT	L	N	C x L	C x N	L x N	C x L x N
Trocas gasosas pontuais							
A_{im}	*	*	*	*	ns	*	ns
g_{sim}	*	*	*	ns	ns	*	*
C_{iim}	*	*	*	ns	ns	*	ns
R_d	ns	*	ns	ns	*	ns	ns
Curva A/Ci							
$V_{cmax} (Cc)$	ns	*	*	ns	ns	ns	ns
$J_{max} (Cc)$	*	*	*	ns	ns	ns	ns
g_m	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
Curva A/PAR							
Φ	*	*	*	ns	ns	ns	*
LCP	*	*	ns	*	*	ns	ns
LSP	ns	*	*	ns	ns	*	ns
A_{max}	*	*	*	*	ns	*	ns
Fluorescência da clorofila a							
F_v/F_m	*	ns	*	ns	ns	ns	ns
ETR_{is}	*	ns	*	*	ns	ns	ns
$\Phi_{PSII is}$	*	ns	*	*	ns	ns	ns
$\Phi_{NPQ is}$	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
$\Phi_{NO is}$	*	ns	*	ns	ns	ns	ns
Limitações à fotossíntese							
L_s	ns	*	*	ns	ns	ns	ns
L_m	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
L_b	ns	*	*	ns	ns	*	ns
Eficiência fotossintética do uso do nitrogênio							
PNUE	*	*	ns	ns	ns	ns	ns
Partição N							
P_r	*	*	*	ns	ns	ns	ns
P_b	*	*	*	ns	ns	*	ns
P_l	ns	*	ns	*	ns	ns	ns
P_s	*	*	*	ns	ns	*	ns

continua...

Tabela 1 - Continuação

Variáveis	CT	L	N	C x L	C x N	L x N	C x L x N
Propriedades ópticas							
Absortância	*	*	*	ns	ns	*	*
Reflectância	*	*	*	*	*	*	*
Transmitância	*	*	*	ns	ns	*	ns
Enzimas antioxidantes e MDA							
SOD	*	*	*	*	*	*	*
CAT	*	*	*	ns	ns	*	ns
APX	ns	*	*	*	ns	*	ns
MDA	ns	*	*	ns	*	*	*
Composição química							
Clorofilas	*	*	*	*	ns	*	ns
Nitrato	*	*	*	*	*	*	*
Metilxantinas	*	*	*	*	ns	ns	*
Lípídeos	*	*	ns	*	ns	ns	*
Fenóis solúveis	ns	*	*	*	ns	*	ns
Carboidratos insolúveis	ns	*	*	*	ns	*	ns
Carboidratos solúveis	*	*	*	ns	ns	ns	ns
Ácidos orgânicos	*	*	*	ns	ns	*	ns
Minerais	ns	*	*	ns	ns	ns	ns
Proteínas	ns	*	*	*	ns	*	ns
Celulose+Hemicelulose+Lignina	ns	ns	*	ns	ns	*	ns
Aminoácidos livres	ns	*	*	ns	ns	ns	ns
Custos de construção e manutenção							
Custos de construção	ns	*	ns	ns	*	*	ns
Custos de manutenção	*	*	*	ns	ns	*	*

3.12 Correlação linear entre as variáveis

Os coeficientes de correlação de Pearson obtidos entre algumas das variáveis avaliadas encontram-se dispostos na Tabela 2. Pôde-se observar que as concentrações foliares de N foram negativamente correlacionadas com as concentrações de fenóis solúveis, metilxantinas e carboidratos solúveis totais e, de modo oposto, positivamente correlacionadas com as concentrações de clorofilas, proteínas e aminoácidos livres, assim como com V_{cmax} e J_{max} .

Evidencia-se também a correlação positiva entre alguns grupos de compostos como proteínas e lipídeos ($r=0,45$), fenóis e metilxantinas ($r=0,78$), minerais e proteínas ($r=0,44$) e minerais e lipídeos ($r=0,53$). Correlações negativas foram observadas entre proteínas e fenóis ($r=-0,88$), proteínas e metilxantinas ($r=-0,63$), lipídeos e fenóis ($r=-0,54$) e lipídeos e metilxantinas ($r=-0,44$), minerais e metilxantinas ($r=-0,80$), e minerais e fenóis solúveis ($r=-0,71$).

Tabela 2 – Correlações lineares de Pearson entre os valores médios da composição química (nitrogênio, N; carbono, C; razão entre as concentrações de carbono e nitrogênio, C/N; clorofilas totais, CLOR; metilxantinas, MET; lipídeos, LIP; fenóis solúveis totais, FST; carboidratos não-estruturais insolúveis, CHOI; carboidratos não-estruturais solúveis (CHOS); ácidos orgânicos, AO; minerais, MIN; proteínas, PRO; celulose+hemicelulose+lignin, C+H+L; aminoácidos livres, AA; assimilação líquida de CO₂ sob irradiância máxima de cultivo, A_{im}; taxa máxima de carboxilação pela Rubisco, V_{cmax}; taxa máxima de transporte de elétrons, J_{max}; custos de construção, CCO e custos de manutenção (CMT) do tecido foliar das cultivares Catuaí e KP de *Coffea arabica* L. cultivadas sob condições contrastantes de luz e adubação nitrogenada.

	N	C	C/N	CLOR	MET	LIP	FST	CHOI	CHOS	AO	MIN	PRO	C+H+L	AA	A _{im}	V _{cmax}	J _{max}	CCO	
C	-0,22 ^{n.s.}																		
C/N	-0,94 ^{***}	0,47 ^{***}																	
CLOR	0,77 ^{***}	-0,38 ^{**}	-0,80 ^{***}																
MET	-0,38 ^{**}	0,26 ^{n.s.}	0,42 ^{**}	-0,69 ^{***}															
LIP	0,35 [*]	-0,27 ^{n.s.}	-0,41 ^{**}	0,66 ^{***}	-0,44 ^{***}														
FST	-0,74 ^{***}	0,33 [*]	0,77 ^{***}	-0,91 ^{***}	0,78 ^{***}	-0,54 ^{***}													
CHOI	-0,18 ^{n.s.}	0,44 ^{**}	0,26 ^{n.s.}	-0,67 ^{***}	0,74 ^{***}	-0,63 ^{***}	0,62 ^{***}												
CHOS	-0,63 ^{***}	0,41 ^{**}	0,70 ^{***}	-0,86 ^{***}	0,80 ^{***}	-0,49 ^{***}	0,92 ^{***}	0,71 ^{***}											
AO	0,53 ^{***}	-0,39 ^{**}	-0,54 ^{***}	0,79 ^{***}	-0,78 ^{***}	0,44 ^{**}	-0,83 ^{***}	-0,76 ^{***}	-0,85 ^{***}										
MIN	0,21 [*]	-0,37 [*]	-0,29 [*]	0,66 ^{***}	-0,80 ^{***}	0,53 ^{***}	-0,71 ^{***}	-0,81 ^{***}	-0,75 ^{***}	0,73 ^{***}									
PRO	0,87 ^{***}	-0,24 ^{n.s.}	-0,86 ^{***}	0,86 ^{***}	-0,63 ^{***}	0,45 ^{**}	-0,88 ^{***}	-0,39 ^{**}	-0,77 ^{***}	0,63 ^{***}	0,44 ^{**}								
C+H+L	-0,17 ^{n.s.}	0,11 ^{n.s.}	0,09 ^{n.s.}	0,07 ^{n.s.}	-0,12 ^{n.s.}	0,11 ^{n.s.}	-0,04 ^{n.s.}	-0,10 ^{n.s.}	-0,09 ^{n.s.}	-0,07 ^{n.s.}	0,27 ^{n.s.}	0,00 ^{n.s.}							
AA	0,72 ^{***}	-0,24 ^{n.s.}	-0,64 ^{***}	0,72 ^{***}	-0,48 ^{***}	0,30 [*]	-0,69 ^{***}	-0,38 ^{**}	-0,63 ^{***}	0,64 ^{***}	0,34 [*]	0,71 ^{***}	-0,26 ^{n.s.}						
A _{im}	0,35 [*]	0,03 ^{n.s.}	-0,35 [*]	-0,16 ^{n.s.}	0,49 ^{***}	-0,43 ^{**}	0,17 ^{n.s.}	0,65 ^{***}	0,25 ^{n.s.}	-0,37 ^{**}	-0,65 ^{***}	0,14 ^{n.s.}	-0,26 ^{n.s.}	0,00 ^{n.s.}					
V _{cmax}	0,83 ^{***}	-0,17 ^{n.s.}	-0,74 ^{***}	0,42 ^{**}	-0,10 ^{n.s.}	0,01 ^{n.s.}	-0,44 ^{**}	0,08 ^{n.s.}	-0,36 [*]	0,27 ^{n.s.}	-0,10 ^{n.s.}	0,63 ^{***}	-0,23 ^{n.s.}	0,50 ^{***}	0,53 ^{***}				
J _{max}	0,81 ^{***}	-0,19 ^{n.s.}	-0,73 ^{***}	0,42 ^{**}	-0,07 ^{n.s.}	0,01 ^{n.s.}	-0,41 ^{**}	0,04 ^{n.s.}	-0,36 [*]	0,28 ^{n.s.}	-0,09 ^{n.s.}	0,59 ^{***}	-0,27 ^{n.s.}	0,52 ^{***}	0,54 ^{***}	0,95 ^{***}			
CCO	-0,35 [*]	0,31 [*]	0,37 ^{**}	-0,65 ^{***}	0,70 ^{***}	-0,51 ^{***}	0,69 ^{***}	0,76 ^{***}	0,73 ^{***}	-0,69 ^{***}	-0,78 ^{***}	-0,47 ^{***}	-0,04 ^{n.s.}	-0,40 ^{**}	0,48 ^{***}	-0,11 ^{n.s.}	-0,13 ^{n.s.}		
CMT	0,73 ^{***}	-0,30 [*]	-0,75 ^{***}	0,89 ^{***}	-0,63 ^{***}	0,84 ^{***}	-0,84 ^{***}	-0,60 ^{***}	-0,75 ^{***}	0,63 ^{***}	0,57 ^{***}	0,87 ^{***}	0,07 ^{n.s.}	0,60 ^{***}	-0,16 ^{n.s.}	0,39 ^{**}	0,36 [*]	-0,57 ^{***}	

n.s. $P > 0,05$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

4. Discussão

Todas as plantas -N apresentaram concentrações de N foliar inferiores a 2,3%, valor médio abaixo do qual pode haver deficiência nutricional para a cultura do café (Guimarães *et al.*, 1999), enquanto todas as plantas +N apresentaram valores acima desse limiar. Em conjunto com esses dados, as maiores razões C/N obtidas nas plantas ao sol em relação às sombreadas indicaram haver disponibilidade nutricional diferencial nos ambientes avaliados, com a possível produção de fenótipos diferenciados no que diz respeito ao destino do C e N assimilados na síntese de diferentes grupos de compostos químicos. Dessa forma, as condições experimentais avaliadas neste ensaio mostraram-se adequadas para que se teste a dicotomia entre crescimento e defesa (Rhoades e Cates, 1976; Coley, 1988; Westoby *et al.*, 2002), bem como a hipótese do balanço de C x nutrientes (Bryant *et al.*, 1983; Hamilton *et al.*, 2001; Lerda *et al.*, 2002).

A caracterização morfológica das cultivares avaliadas corrobora os resultados esperados no que diz respeito a atributos ajustados aos diferentes ambientes luminosos. A cultivar KP, com genótipo de ambiente sombreado, apresentou sempre características funcionais morfológicas mais ajustadas ao sombreamento que aquelas exibidas por Catuaí, cultivar selecionada para plantio a pleno sol. Maior área foliar específica, comprimento médio dos entrenós, altura máxima e razão altura/ diâmetro do ramo ortotrópico são atributos que maximizam a absorção da energia luminosa (Cornelissen *et al.*, 2003; Sterk *et al.*, 2011), escassa no ambiente de sub-bosque. Tanto em Catuaí como em KP, os menores valores observados nessas variáveis nas plantas a pleno sol quando comparadas às sombreadas indicam a existência de plasticidade fenotípica nessas características, maior em Catuaí que em KP. Segundo Lortie e Aarssen (1996), considerando-se a plasticidade fenotípica como uma estratégia de especialização, ambientes mais favoráveis levariam a um incremento nessa estratégia, propiciando a seleção de indivíduos mais plásticos, enquanto ambientes com filtros ambientais mais severos levariam à seleção de genótipos menos plásticos. Dessa forma, a cultivar mais bem adaptada a ambientes com limitação luminosa, como parece ser o caso de KP, apresentaria menor plasticidade que aquela melhorada para produzir sob altas irradiâncias (Catuaí).

Valores de V_{cmax} , J_{max} e A_{max} das cultivares avaliadas indicam capacidades fotossintéticas potenciais similares em Catuaí e KP, quando sob condições não-limitantes de luz e/ou CO_2 . As variações de V_{cmax} , J_{max} e g_m entre os tratamentos

avaliados evidenciam que as características bioquímicas relacionadas à capacidade máxima de fixação do C pela Rubisco e de transporte de elétrons, assim como a condutância mesofílica, foram pouco alteradas em função da luz mas, em contrapartida, reduziram-se drasticamente nas plantas -N. Reduções em A_{max} nas plantas sol/-N deveu-se principalmente à limitação bioquímica (menos Rubisco, maior Lb), enquanto nas plantas sombreadas deveu-se principalmente às limitações estomáticas (maior Ls, independentemente de N). Os resultados obtidos nas medições pontuais de A também podem ser explicados pelos efeitos da luz em g_s e de -N como fator gerador de Lb. Plantas sombreadas apresentaram menores pontos de compensação luminosos e maiores concentrações de clorofila em base de massa, que contribuem para a otimização da captura e aproveitamento fotossintético da luz (Sterk *et al.*, 2008; Valladares e Niinemets, 2008). Dessa forma, os dados indicam que o ambiente de cultivo das plantas foi mais determinante nas características de trocas gasosas das cultivares que seu histórico evolutivo, com efeito mais marcante da disponibilidade de N que do ambiente luminoso nas características potenciais (medidas sob condições não limitantes) e de ambos os fatores nas condições efetivas de cultivo.

Os valores de F_v/F_m , indicativos da eficiência quântica potencial do fotossistema II, embora inferiores ao valor ótimo para plantas não estressadas, de 0,83 (Björkman e Demmig, 1987; Johnson *et al.*, 1993) são similares aos observados em outros trabalhos para plantas de café sob condições não estressantes (Martins *et al.*, 2013 e 2013b; Rodríguez-López *et al.*, 2014). Embora maiores concentrações de MDA tenham sido observadas nas plantas ao sol, a amplitude da variação observada nos níveis de MDA nos diferentes tratamentos foi inferior ao observado entre plantas estressadas e não estressadas de café em outros trabalhos (Lima *et al.*, 2002; Pompelli *et al.*, 2010). As maiores pressões de excitação nos fotossistemas a pleno sol justificam a maior atividade das enzimas antioxidantes sob essas condições. Além da maior atividade da CAT, SOD e APX nas plantas ao sol/-N, a inexistência de indícios de estresse oxidativo sob essas condições também pode ser explicada pelas maiores reflectâncias e transmitâncias observadas. Assim, a menor absorção da energia luminosa reduziria a possibilidade de formação de espécies reativas de oxigênio.

Os maiores valores de $Y(II)$ mostram que Catuaí, melhorado para cultivo a pleno sol, manteve maior capacidade de aproveitamento fotossintético da luz, mesmo quando cultivado sob sombreamento; já KP, a pleno sol, apresentou resposta plástica de incremento nessa variável. O $Y(NPQ)$, indicativo da dissipação do excesso de energia

de forma controlada pelas xantofilas, pigmentos acessórios não nitrogenados, não foi comprometido sob menores concentrações foliares de N. Conforme Klughammer e Schreiber (2008), $Y(NO)$ corresponde à fração da energia luminosa absorvida dissipada, de forma não regulada, como calor e fluorescência, como consequência do fechamento dos centros de reação do fotossistema II. Ainda de acordo com aqueles autores, sob alto fluxo fotônico, enquanto altos valores de $Y(NPQ)$ indicam alta capacidade fotoprotetora, altos valores de $Y(NO)$ indicam inabilidade dos tecidos fotossintéticos em dissipar o excesso de energia e evitar fotodanos. Dessa forma, os valores de $Y(NPQ)$ maiores que $Y(NO)$ observados indicariam a capacidade das reações de fotoproteção via ciclo das xantofilas em evitar o fotodano, que de fato não foi constatado nas condições avaliadas. A maior razão $Y(NPQ)/Y(NO)$ observada nas plantas de Catuaí/sol, independentemente da adubação nitrogenada, indica a maior atuação fotoprotetora do ciclo das xantofilas, baseado em compostos de C, para essa cultivar a pleno sol. Já KP não exibiu plasticidade na razão $Y(NPQ)/Y(NO)$, apresentando valores mais baixos que os de Catuaí/sol em todas as condições avaliadas. Assume-se, portanto, que a dissipação regulada de energia pelo ciclo das xantofilas não é uma estratégia de defesa passível de ajuste em função das condições ambientais para KP, e que atua nesse cultivar com menor intensidade que em Catuaí.

Cerca de 60% do N foliar das plantas avaliadas esteve alocado em componentes estruturais (Ps), dentro dos quais contabilizam-se os compostos de defesa nitrogenados, como alcalóides e metilxantinas. Este padrão de alocação de N, conservado independentemente das condições de cultivo, pode ser um dos responsáveis pela baixa PNUE observada em plantas de *Coffea arabica*, diferentemente de outras espécies que costuma apresentar até 75% de seu N alocado em maquinaria fotossintética (Evans & Seemann 1989, Poorter e Evans, 1998). Plantas a pleno sol apresentaram menor flexibilidade metabólica na partição do N, com maior fração desse elemento alocada em Ps, independentemente da adubação nitrogenada, indicando a essencialidade da manutenção da síntese desses compostos. Consistentemente, observaram-se a pleno sol as maiores concentrações de metilxantinas (independentemente de N), negativamente correlacionadas às proteínas ($r=-0,63$), sendo proteínas, A , V_{cmax} e J_{max} reduzidas sob -N. Em suma, sob condições de sol/-N, independentemente da cultivar, observou-se uma tendência de manutenção das vias de síntese de compostos nitrogenados estruturais e de defesa, acompanhada de redução de variáveis relacionadas à fotossíntese. Maiores teores de fenóis solúveis, compostos não-nitrogenados altamente reduzidos, também

foram observados nas plantas de sol, indicando a atuação das vias de síntese desses compostos na dissipação do excesso de poder redutor.

Em plantas de sombra/+N, o aumento de P_r , P_l e P_b , acompanhados pelo decréscimo de P_s , indica uma maior alocação proporcional de N para a fotossíntese, em detrimento da síntese de compostos estruturais e de defesa. Maiores concentrações de proteínas em plantas que se desenvolveram sob baixa irradiância também foram observadas em outros estudos com espécies lenhosas (Poorter *et al.*, 2006), enquanto outros observaram aumentos nessas concentrações (Evans e Poorter, 2001). De fato, plantas de sombra exibiram menores concentrações de metilxantinas que aquelas ao sol, acompanhadas de maiores concentrações de proteínas (reforça correlação negativa entre esses compostos, acima citada), minerais, ácidos orgânicos e aminoácidos livres. Nas plantas sob limitação simultânea de N e luz, entretanto, observa-se um maior investimento proporcional em P_s , sugerindo a importância da manutenção das defesas nitrogenadas quando há limitação de N à sombra.

Observou-se neste trabalho uma forte correlação negativa entre as concentrações de proteínas e fenóis solúveis totais ($r = -0,88$). Ao tentar explicar a síntese diferencial dos compostos de defesa deve-se considerar, além da teoria no balanço de C/N, que pode haver competição entre a síntese de compostos fenólicos e proteínas, visto que ambas as vias metabólicas utilizam os aminoácidos tirosina e fenilalanina. Dessa forma, sob condições favoráveis à síntese de proteínas, esses aminoácidos seriam incorporados em proteínas, enquanto em condições desfavoráveis poderiam ser direcionados à síntese de compostos fenólicos (Margna, 1977; Lambers, 1993).

Em síntese, Catuaí e KP exibiram tendências similares na variação da proporção de diferentes classes de compostos nos tecidos foliares, assim como no desempenho de variáveis relacionadas à fotossíntese. Considerando-se a concentração foliar de compostos de defesa nitrogenados (metilxantinas; N em defesa) e não nitrogenados (fenóis solúveis; C em defesa) e variáveis relacionadas à capacidade fotossintética (proteínas; N em fotossíntese); V_{cmax} (N em fotossíntese), essas variações, de forma geral, seguem os seguintes padrões:

- Folhas expandidas em ambiente sem limitação por luz e N têm favorecidos acúmulo de compostos de defesa ricos em C e N, e menores concentrações totais de proteínas. Essas concentrações, mesmo relativamente baixas, são suficientes para permitir um alto V_{cmax} (para plantas de *C. arabica*, em comparação a valores

observados em outras situações ambientais). O alto dreno de N para defesa acarreta em baixa PNUE.

- A pleno sol e sob limitação de N, as concentrações dos compostos de defesa com base em N são mantidas altas, contradizendo a hipótese do balanço de C x nutrientes. A baixa concentração de proteínas já não consegue sustentar um alto V_{cmax} . Dessa forma, a planta mantém suas defesas e reduz seu crescimento. As baixas concentrações foliares de N acompanhadas por baixas taxas fotossintéticas mantém uma baixa PNUE.
- À sombra (potencialmente limitante em C, visto que baixas luminosidades podem reduzir sua fixação fotossintética) e sem limitação de N, as concentrações foliares de compostos de defesa com base em C e N são reduzidas, mais uma vez contradizendo a hipótese do balanço de C x N. As concentrações de proteínas são altas, assim como o V_{cmax} . Assim, aparentemente, as plantas sacrificariam suas defesas químicas em prol de maior fotossíntese. Fotossíntese e N aumentam proporcionalmente, mantém-se baixa PNUE.
- À sombra com limitação de N, a síntese de metilxantinas e fenóis solúveis é reduzida, observando-se alta concentração de proteínas e baixo V_{cmax} . A planta apresenta baixa produtividade líquida e menor defesa contra possíveis estresses ambientais. Baixa A associada a baixas concentrações de N também refletem baixa PNUE.

Acredita-se que o principal fator determinante das diferentes PNUEs observadas entre espécies de plantas seja a alocação do N na maquinaria fotossintética (Hikosaka *et al.* 1998; Poorter & Evans 1998; Westbeek *et al.* 1999), sem que se compreenda exatamente em quais compostos estaria alocado o N das plantas que apresentam baixa PNUE, assim como a funcionalidade ecológica da redução de tal eficiência. Onoda *et al.* (2004) associaram a redução de PNUE à maior alocação de N em compostos de parede celular, produzidos em maior proporção em situações ambientais que demandem a manutenção de folhas por um maior período de tempo. No presente trabalho, entretanto, acredita-se que a maior parte do N estaria alocado em, além de proteínas de parede celular, metabólitos secundários nitrogenados, como alcalóides e metilxantinas. O dreno de N para a síntese desses compostos, associadas às baixas taxas de assimilação de carbono decorrentes de limitações difusivas (Martins *et al.*, 2013) levariam à baixas

PNUEs como característica constitutiva da espécie, independentemente das condições ambientais.

Respostas plásticas a diferentes disponibilidades ambientais de luz incidente nas folhas durante sua expansão levariam a diferentes padrões de alocação de N (Poorter e Evans, 1998). Entretanto, em estudos anteriores com plantas de Catuaí, avaliadas a pleno sol e sob 90% de sombreamento (Cavatte, 2011; dados não publicados), não foram observadas diferenças na partição do N, assim como Katahata *et al.* (2007), ao avaliarem o desenvolvimento de um arbusto perene de sub-bosque ao longo de um gradiente luminoso natural, também não observaram diferenças em *Pr* e *Pb*. Os dados obtidos neste trabalho mostram que houve plasticidade nos padrões de alocação de N em diferentes grupos de compostos, o quê, em alguns casos, parece gerar um fenótipo mal ajustado. Entretanto, se considerarmos o ecossistema agrícola e o florestal como ambientes sem limitação de N (seja por aplicação de insumos ou por ciclagem de nutrientes), os fenótipos de sol e de sombra de ambas as cultivares parecem ecologicamente adequados: ambos mantêm alta capacidade fotossintética relativa (para *C. arabica*), sendo os fenótipos de sol melhor guarnecidos de defesas com base em C e N, que poderiam atuar na fotoproteção contra o excesso de radiação. As plantas de sombra mantiveram concentrações menores desses compostos, mas que poderiam ter sua síntese induzida por pressão de herbivoria (Fernandes *et al.*, 2011). Dessa forma, os fenótipos “mal-ajustados” não existiriam nos ecossistemas para os quais a seleção natural ou artificial (melhoramento genético) atuou.

Assim como Poorter e Villar (1997) e Cavatte *et al.* (2012), observaram-se maiores custos de construção (CCO) nas plantas a pleno sol que nas sombreadas. CCO está positivamente correlacionado à síntese de metilxantinas ($r=0,70$) e fenóis solúveis totais ($r=0,69$), que poderiam explicar a diferença observada. CCO foi negativamente correlacionados aos custos de manutenção (CMT) ($r=-0,57$). CMTs foram estimados a partir das concentrações foliares de lipídeos, proteínas e minerais (Merino, 1984), que se correlacionaram negativamente com o CCO. A baixa variação de CCO em plantas sob diferentes condições ambientais foi justificada, em outros trabalhos, pela correlação negativa entre compostos de alto custo energético, como proteínas, lipídios, fenóis e metilxantinas; ou por correlações positivas entre compostos com alto e baixo custo, como entre os grupos anteriormente citados e minerais (Martinez *et al.*, 2002; Villar *et al.*, 2006). Neste estudo, entretanto, observou-se correlação positiva entre alguns grupos de compostos energeticamente caros, como proteínas e lipídeos ($r=0,45$), e

fenóis e metilxantinas ($r=0,78$). Observou-se também correlação negativa entre minerais e metilxantinas ($r=-0,80$), e minerais e fenóis solúveis totais ($r=-0,71$). Em outros casos, entretanto, as correlações esperadas foram encontradas, como as negativas entre proteínas e fenóis ($r=-0,88$), proteínas e metilxantinas ($r=-0,63$), lipídeos e fenóis ($r=-0,54$) e lipídeos e metilxantinas ($r=-0,44$), e as positivas entre minerais e proteínas ($r=0,44$) e minerais e lipídeos ($r=0,53$). Esse padrão aparentemente inconsistente de variações da composição química, assim como observado por Cavatte *et al.* (2013), pode ter sido responsável pelas diferenças observadas em CCOs de plantas submetidas aos diferentes tratamentos.

A R_d é um reflexo do gasto de fotoassimilados no metabolismo foliar, principalmente no *turn-over* de proteínas e no carregamento do floema (Cannell e Thornley, 2000). Maiores R_d 's seriam esperadas em plantas com o maior custo de manutenção (CMT), como forma de disponibilizar energia para esse processo. No entanto, no presente trabalho, maiores CMTs foram observados nas plantas de sombra, que apresentaram menor R_d (assim como observado por Martins, 2013b). Para o cálculo do CMT são consideradas as concentrações de diferentes classes de metabólitos no tecido vegetal, mas não sua natureza específica. Considerando-se que, conforme a equação de Merino *et al.* (1984), as proteínas seriam o segundo principal grupo químico determinante do CMT, e que a concentração proteica total das folhas de sombra é maior que das de sol, seria esperada um maior CMT nas mesmas. No entanto, considerando-se que as folhas de sombra apresentam grande parte dessas proteínas compostas por Rubisco (como sugerem os maiores valores de V_{cmax} em base massa; dados não mostrados), que por sua vez apresenta baixo *turn over* (Millard *et al.*, 2007), o custo de manutenção das mesmas não seria tão elevado, como comprovam as baixas taxas de R_d .

5. Conclusões

Os diferentes contextos evolutivos de Catuaí e KP resultaram em genótipos capazes de se manifestar de forma diferenciada às variações ambientais, mais especificamente a diferentes disponibilidades de luz e N. Essas respostas, entretanto, diferiram entre as cultivares principalmente em sua magnitude (plasticidade), não sendo observadas tendências diferenciadas na síntese de grupos de compostos químicos e características morfofisiológicas. Embora sejam cultivares com histórico evolutivo muito distinto, trata-se da mesma espécie, *Coffea arabica*, que manteve conservados certos padrões de resposta ao meio. A baixa PNUE, observada sob todas as condições avaliadas, indica a existência constitutiva de drenos de N foliar para estruturas não fotossintéticas, como defesas bioquímicas que estariam relacionadas à maior duração da folha na copa. Mesmo em ambiente sombreados, onde observou-se a menor síntese desses compostos associada a maiores investimentos em proteínas, limitações difusivas impedem o desenvolvimento de alta PNUE.

As diferenças morfológicas observadas entre as cultivares resultam em diferentes graus de exposição das folhas à irradiância ambiente. Dessa forma, acredita-se que plantas de Catuaí, cultivar de baixo porte com entrenós mais curtos que os de KP, tenda a apresentar maior auto-sombreamento na copa. Consequentemente, na copa de Catuaí as folhas estariam expostas a um maior gradiente luminoso que na copa de KP, que por sua vez apresenta copa com arquitetura típica de plantas de sub-bosque (mais aberta, resultando em menor auto-sombreamento). Como a maioria das características avaliadas mostraram-se plásticas em resposta às variações na luz, espera-se que as diferentes cultivares sustentem folhas morfofisiologicamente distintas, visto que estarão expostas a diferentes ambientes luminosos dentro da copa, mesmo quando sob mesma irradiância exterior. A maior plasticidade morfológica observada em Catuaí explicaria, dessa forma, sua alta capacidade de aclimação a plantios a pleno sol e adensados (auto-sombreados). KP, em contrapartida, tende a manter a arquitetura da copa mais constante, reduzindo a possibilidade de criação de micro-climas que permitem ajustes metabólicos a diferentes ambientes.

Acredita-se também que, embora alguns padrões de variação na composição química das folhas sob os tratamentos avaliados tenham sido similares entre as cultivares, compostos específicos dentro de cada grupo químico avaliado possam ter variação diferencial, responsável por ajustes metabólicos mais sutis com vistas em garantir a homeostase dos indivíduos sob diferentes situações ambientais. Dessa forma

sugere-se, como forma de avançar na elucidação das perguntas propostas neste trabalho, estudos mais aprofundados do perfil dos metabolismos primário e secundário de plantas submetidas a diferentes condições de luz e N.

6. Referências bibliográficas

Alègre C (1959) Climates et caféiers d'Arabie. *L'Agronomie tropicale* 14: 23-58.

Agrawal AA, Fishbein M (2006) Plant defense syndromes. *Ecology*. 87: S132–S149.

Anthony F, Bertrand B, Quiros O, Wilches A, Lashermes P, Berthaud J, Charrier A (2001) Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica*. 118: 53-65.

Antunes WC, Pompelli MF, Carretero DM, DaMatta FM (2008) Allometric models for non-destructive leaf area estimation in coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*). *Annals of Applied Biology*. 153: 33-40.

Appel HM (1993) Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *Journal of Chemical Ecology*. 19: 1521-1551.

Araujo WL, Dias PC, Moraes GABK, Celin EF, Cunha RL, Barros RS, DaMatta FM (2008) Limitations to photosynthesis in coffee leaves from different canopy positions. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46:884-890.

Barros RS, Maestri M, Rena A (1994) Purine alkaloids in *Coffea*. *Journal of Coffee Research*. 24: 55-86.

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 limitations to photosynthesis in vivo. *Plant Physiology*. 130: 1992-1998.

Bettencourt AJ, Carvalho A (1968) Melhoramento visando a resistência do cafeeiro à ferrugem. *Bragantia*. 27 (4): 35-68.

Bilger W, Schreiber U, Bock M (1995). Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia*. 102: 425-432.

Björkman O, Demmig B (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence at 77k among vascular plants free-air carbon dioxide enrichment affect photochemical of diverse origins. *Planta* .170: 489-504.

Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37: 911-917.

Bradford MM (1976) Rapid and quantitative method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-252.

Bryant JP, Chapin FS, Klein DR (1983) Carbon/ nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *OIKOS*. 40: 357-368.

Carelli MLC, Fahl JI, Ramalho JDC (2006) Aspects of nitrogen metabolism in coffee plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 18(1):9-21.

Carvalho CHS, Fazuoli LC, Carvalho GR, Filho OG, Pereira AA, Almeida SR, Matiello JB, Bartholo GF, Sera T, Moura WM, Mendes ANG, Rezende JC, Fonseca AFA, Ferrão AMG, Ferrão RG, Nacif AP, Silvarolla MB, Braghini MT (2008) Cultivares de Café Arábica de Porte Baixo. In: Carvalho CHS, ed. *Cultivares de café: origem, características e recomendações*. Embrapa Café. Brasília, DF. 157-226.

Cataldo DA, Aaron M, Schrader LE, Youngs V (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 6: 71-80.

Cavatte PC, Oliveira AAG, Morais LE, Martins SCV, Sanglard LMVP, DaMatta FM (2011) Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee? A morphophysiological analysis. *Physiologia Plantarum*.

Cavatte PC, Rodríguez-López NF, Martins SCV, Mattos MS, Sanglard LMVP, DaMatta FM (2012) Functional analysis of the relative growth rate, chemical composition, construction and maintenance costs, and the payback time of *Coffea arabica* L. leaves in response to light and water availability. *Journal of Experimental Botany*. 8: 3071–3082.

Close D, McArthur C, Paterson S, Fitzgerald H, Walsh A, Kincade T (2003) Photoinhibition: a link between effects of the environment on eucalypt leaf chemistry and herbivory. *Ecology*. 84: 2952-2966.

Coley PD (1988) Effects of plant growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defence. *Oecologia* 74: 531–536.

Cornelissen JHC, Lavorel S, Garnier E, Díaz S, Buchmann N, Gurvich DE, Reich

- PB, ter Steege H, Morgan HD, van der Heijden MGA, Pausas JG, Poorter H** (2003) A handbook of protocols for standardized and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*. 51: 335-380.
- Cross JM, von Korff M, Altmann T, Bartzetko L, Sulpice R, Gibon Y, Palacios N, Stitt M** (2006) Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology*. 142: 1574-1588.
- Cruz JL, Mosquin PR, Pelacani CR, Araújo WL, DaMatta FM** (2004) Effects of nitrate nutrition on nitrogen metabolism in cassava. *Biologia Plantarum*. 48: 67-72.
- 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: 223-229.
- DaMatta FM, Rena AB** (2002) Ecofisiologia de cafezais sombreados e a pleno sol. In: Zambolim L, ed. *O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café*. Viçosa, UFV. 93-135.
- DaMatta FM, Loos RA, Silva EA, Loureiro ME** (2002b) Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *Journal of Plant Physiology*. 159: 975-981.
- DaMatta FM** (2004) Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. *Field Crops Research*. 86:99-114.
- DaMatta FM, Rodríguez N** (2007) Producción sostenible de cafetales en sistemas agroforestales del Neotrópico: una visión agronómica y ecofisiológica. *Agronomía Colombiana*. 25(1), 113-123.
- DaMatta FM, Ronchi CP, Maestri M, Barros RS** (2007) Ecophysiology of coffee growth and production. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 19(4):485-510.
- Edreva A, Velikova V, Tsonev T, Dagnon S, Gürel A, Aktaş L, Gesheva E** (2008) Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *General and Applied Plant Physiology*. 34 (1-2), 67-78.
- Fales FW** (1951) The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 113-124.

- Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA** (1980) A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta*. 149: 78-90.
- Fernandes FL, Picanço MC, Gontijo PC, Fernandes MES, Pereira EJJ, Semeão AA** (2011) Induced responses of *Coffea arabica* to attack of *Coccus viridis* stimulate locomotion of the herbivore. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 139:120–127.
- Filho OG, Mendes ANG, Carvalho GR, Silvarolla MB, Botelho CE, Fazuoli LC** (2008) Origem e classificação botânica do cafeeiro. In: Carvalho CHS (ed.) *Cultivares de café: origem, características e recomendações*. Embrapa Café. Brasília, DF. 27-34.
- Flexas J, Dias-Espejo A, Berry JA, Cifre J, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbó M** (2007) Analysis of leakage in IRGA's leaf chambers of open gas exchange systems: quantification and its effects in photosynthesis parameterization. *Journal of Experimental Botany*. 58: 1533-1543.
- Geigenberger P, Stitt M** (1993) Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and in the other plant tissues. *Planta*. 189: 329-339.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR** (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*. 990: 87-92.
- Gianoli E K, Palacio-López K** (2009) Phenotypic integration may constrain phenotypic plasticity in plants. *Oikos*. 118: 1924-1928.
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Höhne M, Hendriks JHM, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M** (2004) A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell*. 16:3304-3325.
- Gole TW, Borsch T, Denich M, Teketay D** (2008). Floristic composition and environmental factors characterizing coffee forests in southwest Ethiopia. *Forest Ecology and Management*. 255: 2138-2150.
- Gonthier DJ, Witter JD, Spongberg AL, Philpott SM** (2011) Effect of nitrogen fertilization on caffeine production in coffee (*Coffea arabica*). *Chemoecology*. 21:123-130.

Grassi G, Magnani F (2005) Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant, Cell and Environment*. 28: 834-849.

Guimarães PTG, Garcia AWR, Alvarez VH, Prezotti LC, Viana AS, Miguel AE, Malavolta E, Corrêa JB, Lopes AS, Nogueira FD, Monteiro AVC, Oliveira JA. Cafeeiro. In: Ribeiro AC, Guimarães PTG, Alvarez VH (Ed.). *Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5a aproximação*. Viçosa, MG: UFV, 1999. 289-302.

Hamilton JG, Zangerl AR, DeLucia EH, Berenbaum MR (2001) The carbon-nutrient balance hypothesis: its rise and fall. *Ecology Letters*. 4:86-95.

Harley PC, Loreto F, Di Marco G, Sharkey TD (1992) Theoretical considerations when estimating the mesophyll conductance to CO₂ flux by analysis of the response of photosynthesis to CO₂. *Plant Physiology*. 98: 1429-1436.

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.

Hecimovic I, Belscak-Cvitanovic A, Horzic D, Komes D (2011) Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chemistry*. 129: 991–1000.

Hikosaka K, Terashima I (1995) A model of the acclimation of photosynthesis in the leaves of C₃ plants to sun and shade with respect to nitrogen use. *Plant, Cell and Environment*. 18: 605-618.

Hoagland DR, Arnon DI (1938) The water culture method for growing plants without soil. Berkeley: Univ. of California. Circular of Agricultural Experimentation Station. 347: 1–39.

Hollingsworth RG, Armstrong JW, Campbell E (2002) Caffeine as a repellent for slugs and snails. *Nature*. 417: 915-916.

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.

- Jaworski EG** (1971) Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 43: 1274-1290.
- Johnson GN, Young AJ, Scholes JD, Horton P** (1993) The dissipation of excess excitation energy in British plant species. *Plant, Cell and Environment*. 16: 673-679.
- Katahata S, Naramoto M, Kakubari Y, Mukai Y** (2007) Photosynthetic capacity and nitrogen partitioning in foliage of the evergreen shrub *Daphniphyllum humile* along a natural light gradient. *Tree Physiology*. 27: 199-208.
- van Kooten O, Snel JFH** (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*. 25:147-150.
- Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmuller E, Dormann P, Weckwerth W, Gibon Y, Stitt M, Willmitzer L, Fernie AR, Steinhauser D** (2005) The Golm metabolome database. *Bioinformatics*. 21: 1635-1638.
- Kroymann J** (2011) Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*. 14:246–251.
- Kusano M, Fukushima A, Redestig H, Saito K** (2011) Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. *Journal of Experimental Botany*. 62(4): 1439-1453.
- Laisk A, Loreto F** (1996) Determining photosynthetic parameters from leaf CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology*. 110: 903-912.
- Lambers H** (1993) Rising CO₂, secondary plant metabolism, plant herbivore interactions and litter composition. *Vegetatio*. 104/105: 263-271.
- Li X, Chen S** (2009) Diurnal changes in gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters of *Fritillaria cirrhosa* and *F. delavayi* under field conditions. *Photosynthetica*. 47: 191-198.
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME** (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environment Experimental Botany*. 47: 239-247
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*. 1: 387-396.

Long SP, Bernacchi CJ (2003) Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany*. 54: 2393-2401.

Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J (2008) TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics*. 24: 732-737.

Margna U (1977). Control at the level of substrate supply—An alternative in the regulation of phenolpropanoid accumulation in plant cells. *Phytochemistry*. 16: 419-426.

Martins SVC, Galmés J, Molins A, DaMatta FM (2013) Improving the estimation of mesophyll conductance: on the role of electron transport rate correction and respiration. *Journal of Experimental Botany*. 64: 3285-3298.

Martins SCV, Detmann KC, Reis JV, Pereira LF, Sanglard LMVP, Rogalski M, DaMatta FM (2013) Photosynthetic induction and activity of enzymes related to carbon metabolism: insights into the varying net photosynthesis rates of coffee sun and shade leaves. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*. 25(1): 62-69.

Martins SCV, Galmés J, Cavatte PC, Pereira LF, Ventrella MC, DaMatta, FM (2014) Understanding the low photosynthetic rates of sun and shade coffee leaves: bridging the gap on the relative roles of hydraulic, diffusive and biochemical constraints to photosynthesis. *Plos One*. 9: e94862.

Mazzafera P (1999) Mineral nutrition and caffeine content in coffee leaves. *Bragantia* 58:387–391.

Mendes ANG, Carvalho GR, Botelho CE, Fazuoli LC, Silvarolla MB (2008) História das Primeiras Cultivares de Café Plantadas no Brasil. In: Carvalho CHS, ed. *Cultivares de café: origem, características e recomendações*. Embrapa Café. Brasília, DF. 69-78.

Mendes ANG, Carvalho GR, Botelho CE, Fazuoli LC, Silvarolla MB (2008) Mutantes de *Coffea arabica* L. e Cultivares de Importância Histórica. In: Carvalho CHS, ed. *Cultivares de café: origem, características e recomendações*. Embrapa Café. Brasília, DF. 281-298.

- Merino JA, Field CB, Mooney HA** (1984) Construction and maintenance costs of mediterranean-climate evergreen and deciduous leaves. II. Biochemical pathway analysis. *Acta Oecologica*. 5: 211-229.
- Mertens DR** (2002) Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC International*. 85: 1217-1240.
- Mondolot L, Marlas A, Barbeau D, Gargadenec A, Pujol B, McKey D** (2008) Domestication and defence: Foliar tannins and C/N ratios in cassava and a close wild relative. *Acta Oecologica* 34: 147-154.
- Nathanson JA** (1984) Caffeine and related methylxanthines: possible naturally occurring pesticides. *Science*. 226: 184-187.
- Niinemets Ü, Tenhunen JD** (1997) A model separating leaf structural and physiological effects on carbon gain along light gradients for the shade-tolerant species *Acer saccharum*. *Plant, Cell and Environment*. 20:845-866.
- Nunes MA, Ramalho JDC, Dias MA** (1993) Effect of nitrogen supply on the photosynthetic performance of leaves from coffee plants exposed to bright light. *Journal of Experimental Botany*. 44:893-899.
- Palumbo MJ, Putz FE, Talcott ST** (2007) Nitrogen fertilizer and gender effects on the □secondary metabolism of yaupon, a caffeine-containing North American holly. *Oecologia*. 151: 1-9.
- Penning de Vries FWT, Brunsting AHM, van Laar HH** (1974) Products, requirements and efficiency of biosynthesis: a quantitative approach. *Journal of Theoretical Biology*. 45: 339-377.
- 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.
- Pinheiro HA, DaMatta FM, Chaves ARM, Loureiro ME, Ducatti C** (2005) Drought tolerance is associated with root depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. *Annals of Botany*. 96: 101-108.

- Pompelli MF, Martins SCV, Antunes WC, Chaves ARM, DaMatta FM (2010)** Photosynthesis and photoprotection in coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions. *Journal of Plant Physiology*. 167:1052-1060.
- Pompelli MF, Pompelli GM, Oliveira AFM, Antunes WC (2013)** The effect of light and nitrogen availability on the caffeine, theophylline and allantoin contents in the leaves of *Coffea arabica* L. *AIMS Environmental Science*. 1: 1-11.
- Poorter H, Evans JR (1998)** Photosynthetic nitrogen-use efficiency of species that differ inherently in specific leaf area. *Oecologia*. 116:26 -37.
- Poorter H, Pepin S, Rijkers T, Jong Y, Evans JR, Körner C (2006)** Construction costs, chemical composition and payback time of high and low irradiance leaves. *Journal of Experimental Botany*. 57 (2): 355-371.
- Poorter H, Villar R (1997)** The fate of acquired carbon in plants: Chemical composition and construction costs. *In: Bazzaz FA, Grace J, eds. Resource allocation in plants*. San Diego, Academic Press, pp. 39-72.
- Pujol B, Mühlen G, Garwood N, Horoszowski Y, Douzery EJP, McKey D (2005)** Evolution under domestication: contrasting functional morphology of seedlings in domesticated cassava and its closest wild relatives. *New Phytologist*. 166: 305-318.
- Pujol B, Salager JL, Beltran M, Bousquet S, McKey (2008)** Photosynthesis and leaf structure in domesticated cassava (Euphorbiaceae) and a close wild relative: Have leaf photosynthetic parameters evolved under domestication? *Biotropica*. 40: 305-312.
- Rajendra P, Sujatha HN, Devendranath D, Gunasekaran B, Sashidhar RB, Subramanyam C, Channakeshava C (2004)** Biological effects of power frequency magnetic fields: Neurochemical and toxicological changes in developing chick embryos. *Biomagnetic Research and Technology*. 2: 1-9.
- Ramalho JC, Campos PS, Quartin 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.
- Ramalho JC, Campos PS, Teixeira M, Nunes MA (1998)** Nitrogen dependent changes in antioxidant systems and in fatty acid composition of chloroplast membranes from *Coffea arabica* L. plants submitted to high irradiance. *Plant Science*. 135:115-124.

Ramalho JC, Pons TL, Groeneveld HW, Azinheira HG, Nunes MA (2000) Photosynthetic acclimation of 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, Groeneveld 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.

Rhoades DF, Cates RG (1976) Towards a general theory of plant antiherbivore chemistry. In: Wallace JW, Mansell RL, eds. Biochemical interactions between plants and insects: Recent advances in phytochemistry. New York, Plenum Press.168-213.

Rodeghiero M, Niinemets Ü, Cescatti A (2007) Major diffusion leaks of clamp-on leaf cuvettes still unaccounted: how erroneous are the estimates of Farquhar *et al.* model parameters? Plant, Cell and Environment. 30: 1006 -1022.

Rodríguez-López NF, Martins SCV, Cavatte PC, Silva PEM, Morais LE, Pereira LF, Reis JV, Ávila RT, Godoy AG, Lavinski AO, DaMatta FM (2014) Morphological and physiological acclimations of coffee seedlings to growth over a range of fixed or changing light supplies. Environmental and Experimental Botany. 102: 1-10.

SAEG (2007) Sistema de análises estatísticas e genéticas: versão 9.1. Viçosa, Fundação Arthur Bernardes.

Salgado PR, Favarin JL, Leandro RL, Lima Filho OF (2008) Total phenol concentrations in coffee tree leaves during fruit development. Scientia Agricola. 65: 354-359.

Schauer N, Steinhauser D, Strelkov S, Schomburg D, Allison G, Moritz T, Lundgren K, Roessner U, Forbes MG, Willmitzer L, Fernie AR, Kopka J (2005) GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. FEBS Letters. 579: 1332-1337.

Scheible WR, Lauerer M, Schulze ED, Caboche M, Stitt M (1997) Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot– root allocation in tobacco. The Plant Journal. 11: 671-691.

- Selmar D** (2008) Potential of salt and drought stress to increase pharmaceutical significant secondary compounds in plants. *Agriculture and Forestry Research*. 58:139-44.
- Sharkey TD** (1985) Photosynthesis in intact leaves of C3 plants: physics, physiology and rate limitations. *Botanical Review*. 51: 53-105.
- van Soest PJ, Robertson JB** (1985). *Analysis of forages and fibrous foods*. Ithaca, Cornell University.
- Sterck F, Markesteijn L, Schieving F, Poorter L** (2011) Functional traits determine trade-offs and niches in a tropical forest community. *Proceedings of the National Academy of Science*. 108 (51): 20627–20632.
- Sterck FJ, Duursma RA, Pearcy RW, Valladares F, Cieslak M, Weemstra M** (2013) Plasticity influencing the light compensation point offsets the specialization for light niches across shrub species in a tropical forest understory. *Journal of Ecology*. 101: 971-980.
- Sylvain P** (1955). Some observations on *Coffea arabica* L. in Ethiopia. *Turrialba* 5: 37-53.
- Valentini R, Epron D, De Angelis P, Matteucci G, Dreyer E** (1995) *In situ* estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant, Cell and Environment*. 18:631-640.
- Valladares F, Niinemets U** (2008) Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. *Annual Review of Ecology, Systematics and Evolution*. 39:237-257.
- Valladares F, Wright SJ, Lasso E, Kitajima K, Pearcy RW** (2000) Plastic phenotypic response to light of 16 congeneric shrubs from a Panamanian rainforest. *Ecology*. 81: 1925-1936.
- Villar R, Merino J** (2001) Comparison of leaf construction costs in woody species with differing leaf life-spans in contrasting ecosystems. *New Phytologist*. 151: 213-226.
- Villar R, Robleto JR, DeJong Y, Poorter H** (2006) Differences in construction costs and chemical composition between deciduous and evergreen woody species are small as compared to differences among families. *Plant, Cell and Environment*. 29: 1629-1643.

van der Vossen HAM (2005) A critical analysis of the agronomic and economic sustainability of organic coffee production. *Experimental Agriculture*. 41:449-473.

Westoby M, Falster DS, Moles AT, Vesk PA, Wright IJ (2002) Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 33: 125-159.

Wright IJ, Reich PB, Westoby M, Ackerly DD, Baruch Z, Bongers F, Cavendar-Bares J, Chapin T, Cornelissen JHC, Diemer M, Flexas J, Garnier E, Groom PK, Gulias J, Hikosaka K, Lamont BB, Lee T, Lee B, Lusk C, Midgley JJ, Navas M-L, Niinemets Ü, Oleksyn J, Osada N, Poorter H, Poot P, Prior L, Pyankov VI, Roumet C, Thomas SC, Tjoelker MG, Veneklaas EJ, Villar R (2004) The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*. 428: 821-827.

Wink M (2010) Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. In *Annual Plant Reviews*, vol 40. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, edn 2. Edited by Wink M. Wiley-Blackwell.

Wilhelm C, Selmar D (2011) Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: The physiological limits of improved photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*. 168:79-87.

Williams K, Percival F, Merino J, Mooney HA (1987) Estimation of tissue construction cost from heat of combustion and organic nitrogen content. *Plant, Cell and Environment*. 10: 725-734.

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