

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais
Programa Integrado de Pós-Graduação em Botânica

**Condutância do mesofilo e velocidade máxima de carboxilação da Rubisco
em função do horário do dia e da espessura foliar de espécies arbóreas em
ambiente de sub-bosque na Amazônia Central**

Helena Cristina Santos Nascimento

Manaus, Amazonas
Fevereiro, 2013

Helena Cristina Santos Nascimento

**Condutância do mesófilo e velocidade máxima de carboxilação da Rubisco
em função do horário do dia e da espessura foliar de espécies arbóreas em
ambiente de sub-bosque na Amazônia Central**

**Fonte de financiamento:
FAPEAM PIPT-1746/08/UA-062.03164.12**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia e Recursos Naturais (PPG-BTRN-INPA), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Botânica.

Orientador: Dr. Ricardo Antônio Marenco

**Manaus, Amazonas
Fevereiro, 2013**

FICHA CATALOGRÁFICA

N244 Nascimento, Helena Cristina Santos
Condutância do mesofilo e velocidade máxima de carboxilação da Rubisco em função do horário do dia e da espessura foliar de espécies arbóreas em ambiente de sub-bosque na Amazônia Central / Helena Cristina Santos Nascimento. --- Manaus : [s.n.], 2013.
xxii, 111 f. : il. color.

Tese (doutorado) --- INPA, Manaus, 2013.
Orientador : Ricardo Antonio Marengo
Área de Concentração : Biodiversidade Vegetal da Amazônia, Reprodução e Crescimentos de Vegetais.

1. Condutância do mesofilo. 2. Cloroplasto – Concentração de CO₂. 3. Carboxilação do Rubisco (proteína). 4. Características foliares – Amazônia. 5. Transporte de elétrons. I. Título.

CDD 19. ed. 634.95

Sinopse:

Estudou-se como a condutância do mesofilo se altera em função das variações ambientais e das diferenças morfoanatômicas em espécies arbóreas da Amazônia em condição de sub-bosque.

Palavras-chave: Crescimento de arvoetas, dissipação fotoquímica, fluorescência da clorofila, fotossíntese, taxa de transporte de elétrons.

Key words: sapling growth, photochemical quenching, chlorophyll fluorescence, photosynthesis, electron transport rate.

*Aos meus pais Cleomar e Antonio,
Por todo o incentivo que recebi durante toda minha vida;
Ao meu irmão Arthur, por estar sempre ao meu lado;
Ao meu esposo Jefferson,
pelo apoio e compreensão durante esta jornada.
Dedico!*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, saúde e por estar sempre comigo.

Ao Dr. Ricardo A. Marengo, meu orientador e amigo, pela confiança e credibilidade em mim depositados, pelo incentivo e apoio a minha pesquisa e pelo conhecimento que construí através de seus ensinamentos.

À minha querida equipe, amiga e companheira Keila Mendes, pela valorosa amizade construída ao longo dos seis anos de pós-graduação, que mesmo nos momentos difíceis de coleta em campo nos contagiava com sua alegria. Muito obrigada por sua ajuda física, emocional e psicológica durante este período, estou certa que a amizade aqui firmada não será esquecida nesta nova fase de nossas vidas.

Ao Curso de Pós-graduação em Botânica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, pela possibilidade de ter realizado o curso de doutorado.

Ao Coordenador do Curso de Botânica, Dr. Alberto Vicentini, pelo empenho em buscar o melhor para o curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro sob a forma de concessão de bolsa de mestrado.

À toda equipe do laboratório de ecofisiologia de árvores, aos que já não se fazem presentes Simone Verdes, Marlene, Enedina, Estephane, José Cintra, Dra. Daniela e aos que ainda permanecem fielmente Gracilene Fernandes, Saul Antezzana, Nilvanda Magalhães e Giordane Martins, pela ajuda dispensada em especial aos amigos Miguel Ângelo e Marcos Bento pela grande ajuda no campo, mesmo que só pela presença física.

Aos pesquisadores e amigos do Laboratório de Fitopatologia – INPA - Dra Rosalee A. Coelho Netto, MS Luiz Alberto G. Assis e Sra. Marilene.

Ao laboratório temático de solos, em especial ao Sr. Evandro por liberar o laboratório e alguns reagentes essenciais para análise de alguns nutrientes, aos Técnicos Orando F. C. Júnior, principalmente ao Raimundo Nonato de Abreu Aquino pela atenção e ajuda com as análises nutricionais.

À equipe do LABAF – UFAM, em especial à Dra. Silvia e ao técnico Manuel, por sua ajuda nos cortes foliares e na confecção das lâminas para análise anatômica das espécies estudadas.

À todas as secretárias do Curso de Botânica, as que já se fazem presentes Giselle e Jéssica, a novíssima Léia e em especial a Neide que foi guerreira e não nos abandonou, que está sempre ajudando os alunos e por toda sua dedicação em pró da melhoria do curso.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação do CFT-INPA, especialmente a Sra. Valdecira e o Sr. Alcione que ajudaram durante maior parte deste percurso, também a Sra. Edilene que ajudou bastante no final deste estudo, por terem minimizado os tramites burocráticos para transporte até o local de coleta, a todos os motoristas da unidade INPA-V8, em especial ao Sr. Jesus que foi quase único durante o mestrado e ao Sr. Haroldo, que foi excepcional durante as coletas de dados da tese de doutorado, que por diversas vezes nos ajudou mesmo em feriados e finais de semana. Muito obrigada a todos!

Ao Dr. Joaquim dos Santos, pela imensa ajuda com a liberação de carro e motorista, sempre esteve disposto a apoiar minha pesquisa. Muito obrigada por sempre se preocupar com minha segurança em campo, que Deus abençoe grandemente sua vida!

Aos professores do curso de Botânica pelos ensinamentos transmitidos e aos alunos desse curso que de alguma forma contribuíram nesses quatro anos de curso.

À banca examinadora do meu projeto de tese, Dr. Rafael Ribeiro, Dr. Jaume Flexas, Rejane Mansur pelas sugestões valiosas que contribuíram para o desenvolvimento da minha pesquisa.

À banca avaliadora da minha aula de qualificação Dra. Maria Piedade, Dra. Rosalee Coelho, Dr. Niro, Dr. Hiroshi Noda e Dr. Luiz Cândido.

Aos doutores Jair Maia, Maria Piedade, Joaquim dos Santos, Diolina Silva, Zilvanda Melo por terem aceitado participar como membros da banca julgadora da minha defesa da tese.

À FAPEAM pelo recurso financeiro do projeto PIPT 1746/08.

E a toda minha família que mesmo de longe sempre me deram força nos momentos de angústia para que esse sonho fosse realizado.

Um pouco de ciência nos afasta de Deus, muito nos aproxima!

RESUMO

Nas últimas décadas muitos estudos sobre os processos fisiológicos das plantas têm sido realizados a fim de prognosticar os efeitos das mudanças climáticas na floresta Amazônica. Entretanto, os modelos climáticos poderão prognosticar com maior precisão o comportamento fotossintético da Floresta Amazônica, quando os dados de V_{cmax} e J_{max} forem calculados com base nas concentrações de CO_2 dentro dos cloroplastos (C_c). Isto faz-se necessário, em virtude da diferença entre as concentrações de CO_2 nos espaços intercelulares e a do sítio de carboxilação no cloroplasto. Esta diferença é imposta pela condutância do mesofilo. Assim, este estudo tem como objetivo principal determinar a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) e a taxa de transporte de elétrons (J_{max}) utilizando os valores de concentrações de CO_2 no cloroplasto, bem como investigar se a condutância do mesofilo varia em função das condições ambientais e das características foliares. Foram utilizadas cinco espécies arbóreas em condição de sub-bosque (*Myrcia paivae*, *Miconia guianensis*, *Eschweleira bracteosa*, *Faramea juruana* e *Psychotria carthagenensis*). Os parâmetros fotossintéticos foram mensurados utilizando um analisador de gás infravermelho (irga). A condutância do mesofilo (g_m) foi determinada utilizando medidas de trocas gasosas em conjunto com dados de fluorescência obtidos utilizando um fluorômetro acoplado à câmara do irga. Além disso, g_m também foi determinada usando apenas dados do irga. Também foram mensurados a espessura da folha, a área foliar específica (AFE), os conteúdos de nitrogênio e fósforo foliar, taxas de incremento anual em diâmetro (IAD) e altura (IAA), índice de área foliar (IAF) e a fração de céu visível. A média de g_m determinada com o irga-fluorômetro foi de $0,06 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $0,1 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ utilizando apenas os dados do irga. V_{cmax} e J_{max} determinados utilizando valores C_c foram em média 30% e 12%, respectivamente, maiores do que os valores obtidos com C_i , o que destaca a importância do uso C_c nestes cálculos. A média de incremento anual em diâmetro (IAD) foi de $0,67 \text{ mm ano}^{-1}$, enquanto que incremento anual em altura (IAA) as médias atingiram $75,7 \text{ mm ano}^{-1}$. O efeito do horário do dia foi significativo para g_m , g_s , fotossíntese saturada por luz (A_{max}) e para taxa de transporte de elétrons calculada pelo fluorômetro (J_F). Entretanto, não houve efeito do horário do dia em V_{cmax} . A espessura da folha e AFE não afetaram nenhum dos parâmetros analisados. A média de g_m calculada utilizando apenas dados do irga foi quase o dobro daquela obtida utilizando o método irga-fluorômetro. A condutância do mesofilo foi afetada pelo conteúdo de N foliar e pela espessura

da folha, mas a altura das arvores não afetou os valores de g_m , o que denota a sensibilidade desta resistência apenas nas variações anatômicas das folhas.

Palavras-chave: condutância estomática, a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco, taxa de transporte de elétrons, concentração de CO_2 nos cloroplastos.

Mesophyll conductance and maximum carboxylation velocity of Rubisco as a function of the time of day and leaf thickness in forest tree species in Central Amazonia

ABSTRACT

In recent decades many studies on the physiological processes of plants have been conducted to predict the effects of climate change on the Amazon rainforest. In the majority of these studies intercellular $[CO_2]$ at the intercellular spaces (C_i) have been used. However, climate models could predict with greater accuracy the photosynthetic capacity of the Amazonian rainforest ecosystem should V_{cmax} and J_{max} were calculated on the basis of chloroplast $[CO_2]$ concentrations (C_c) instead C_i . This is because of the difference in CO_2 concentrations between the intercellular spaces and that at the carboxylation site in the chloroplast. This difference is imposed by mesophyll resistance. Thus, this study aims to determine the maximum carboxylation velocity of Rubisco (V_{cmax}) and electron transport rate (J_{max}) using the values of CO_2 concentrations in the chloroplast, and also to investigate whether the mesophyll conductance varies with environmental conditions and leaf characteristics. A total of five tree species in the juvenile stage and growing under understory conditions were used. The species were *Myrcia paivae*, *Minuartia guianensis*, *Eschweleira bracteosa*, *Faramea juruana* and *Psychotria carthagenensis*. The photosynthetic parameters were measured using an infrared gas analyzer (IRGA). The mesophyll conductance (g_m) was determined using gas exchange measurements in conjunction with fluorescence data obtained using a fluorometer coupled to IRGA head. Furthermore, g_m was also determined using IRGA data alone. We also measured leaf thickness, specific leaf area (AFE), leaf nitrogen and phosphorus contents, annual increment in diameter (IAD) and height (IAA), leaf area index (LAI) and the fraction of sky visible. The average g_m -IRGA determined with the irga/fluorometer was $0.06 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and $0.1 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ when it was determined using IRGA data alone. V_{cmax} and J_{max} determined using C_c values were on average 30% and 12%, respectively, higher than the values obtained using C_i values, which highlights the importance of using C_c for V_{cmax} and J_{max} calculations. The average annual increment in diameter (IAD) and annual increment in height (IAA) were 0.67 mm yr^{-1} and 75.7 mm yr^{-1} , respectively. The effect of time of day was significant for g_m , g_s , light saturated photosynthesis (A_{max}) and electron transport rate obtained with the fluorometer (J_F). However, there was no effect of time of day on V_{cmax} . Leaf thickness and AFE did not affect any of the parameters analyzed. Mean g_m calculated using IRGA data alone was almost twice as high the values obtained with the IRGA-fluorometer

method. Mesophyll conductance was affected by leaf nitrogen content and the leaf thickness, but sapling height did not affect g_m values, which indicates the sensitivity of mesophyll resistance is mainly related to the anatomical characteristics of the leaves.

Key words: stomatal conductance, maximum carboxylation velocity of Rubisco, electron transport rate, CO₂ concentration in the chloroplasts.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. HIPÓTESE	3
3. OBJETIVOS:	3
3.1 Objetivo geral	3
3.2. Objetivos específicos	3
4. MATERIAL E MÉTODOS	4
4.1. Área de estudo	4
4.2. Espécies estudadas	4
4.3. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila	5
4.4. Coleta de dados climáticos	9
4.5. Índice de área foliar e fração de céu visível	9
4.6. Características foliares	10
4.7. Determinação dos nutrientes foliares e teores de clorofila	11
4.8. Delineamento Experimental e análise estatística	11
CAPÍTULO 1	13
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	16
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
3. RESULTADOS	20
4. DISCUSSÃO	34
5. CONCLUSÃO	36
CAPÍTULO 2	37
RESUMO	37
ABSTRACT	38
1. INTRODUÇÃO	40
2. MATERIAL E MÉTODOS	41
3. RESULTADOS	46
4. DISCUSSÃO	54
5. CONCLUSÃO	57
CAPÍTULO 3	58
RESUMO	58
ABSTRACT	59
1. INTRODUÇÃO	60
2. MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1. Material vegetal	62
2.2. Medidas de trocas gasosas	62
2.3. Determinação dos nutrientes foliares e teores clorofila	63
2.4. Análise estatística	64
3. RESULTADOS	64
4. DISCUSSÃO	74

5. CONCLUSÃO.....	76
CAPÍTULO 4	77
RESUMO.....	77
ABSTRACT	78
1. INTRODUÇÃO.....	79
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	80
2.1. Ambiente físico e Material vegetal	80
2.2. Taxas de crescimento.....	81
2.3. Características foliares	81
3. RESULTADOS	82
4. DISCUSSÃO	91
5. CONCLUSÃO.....	93
5. SÍNTESE	94
6. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXO	109

ABREVIATURAS

α – absorvância da folha

Φ - Rendimento quântico aparente

I^* - Ponto de compensação de CO_2 na ausência de respiração e na presença de luz

Φ_{FSII} - Rendimento quântico do fotossistema II

Φ_{CO_2} - Eficiência quântica da fotossíntese

A – Fotossíntese

A_{max} – Fotossíntese máxima ($380 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ e $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ luz)

A_{pot} – Fotossíntese potencial ($2000 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ e $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ luz)

AFE - Área foliar específica

Ca – Cálcio

C_a - Concentração de CO_2 no ambiente

C_c - Concentração de CO_2 nos cloroplastos

C_i – Concentração de CO_2 nos espaços intercelulares

CV - Coeficiente de variação

D_0 - Diâmetro inicial

D_1 - Diâmetro final

H_0 - Altura inicial

H_1 - Altura final

EUN - Eficiências no uso do nitrogênio

EUP - Eficiências no uso do fósforo

EUCa - Eficiências no uso do cálcio

EUMg - Eficiências no uso do magnésio

EUK - Eficiências no uso do potássio

F - Fluorescência da clorofila a

F_s - Fluorescência no estado de equilíbrio dinâmico

F_0' - Fluorescência mínima na presença de luz

F_m' - Fluorescência máxima da folha em ambiente iluminado

FCV - Fração de céu visível

FSII – Fotossistema 2

g_m – Condutância do mesófilo

g_s – Condutância estomática

I_c - Irradiância de compensação

I_e - Radiação fotossinteticamente ativa absorvida pela folha
IAF - Índice de área foliar
IAD - Incremento anual em diâmetro
IAA - Incremento anual em altura
 J_c - Fluxo de elétrons direcionados para carboxilação da RuBP
 J_o - Fluxo de elétrons direcionados para oxigenação da RuBP
 J_F - Taxa de transporte de elétrons (calculada pelo fluorômetro)
 J_{F-cal} - Taxa de transporte de elétrons corrigida
 J_{max} - Taxa máxima de transporte de elétrons
K - Potássio
 K_c - Constantes de Michaelis-Mentem da Rubisco para CO_2
 K_o - Constantes de Michaelis-Mentem da Rubisco para O_2
Mg - Magnésio
 M_u - Massa do solo úmido
 M_s - Massa do solo seco
N - Nitrogênio
NPQ - Dissipação não fotoquímica
 O_2 - Oxigênio
P - Fósforo
qP - Dissipação fotoquímica
 R_d - Respiração no escuro
RFA - Radiação fotossinteticamente ativa
S - Fator de especificidade da Rubisco *in vitro* ($2560 \text{ mol mol}^{-1}$)
 S^* - Fator de especificidade da Rubisco calculado
 S_u - Umidade do solo
T - Temperatura do ar
 t - tempo em anos
UR - Umidade Relativa do ar
 V_{cmax} - Velocidade máxima de carboxilação da Rubisco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.

Ilustração do cálculo da declividade (valor de 1701,2) da relação entre J_c/J_o e C_i/O em uma folha de *Myrcia paivae*. Os parâmetros J_c e J_o referem-se ao fluxo de elétrons direcionados para a carboxilação e oxigenação da RuBP (equações 8 e 9) e a relação C_i/O refere-se à fração molar entre a $[CO_2]$ e $[O_2]$ nos espaços intercelulares.....07

Figura 2.

Visualização do corte anatômico da espécie *M. paivae* inserido no programa ANATI QUANTI para medição da espessura foliar. A linha vermelha indica os limites para a determinação da espessura, fotografia em objetiva 10X.....10

CAPÍTULO 1

Figura 1.

Fotossíntese (A) em função da radiação fotossinteticamente ativa (RFA). A linha contínua representa o ajuste dos dados. Os símbolos mostram a média dos dados observados em cinco espécies e quatro plantas por espécie. A linha tracejada vertical indica o ponto de saturação da fotossíntese por luz e o número dentro do painel mostra o valor de RFA em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 21

Figura 2.

Média por espécie da fotossíntese saturada por luz (A_{max} - **A**), fotossíntese saturada por luz e CO_2 (A_{pot} - **B**), condutância estomática (g_s - **C**) e condutância do mesofilo (g_m - **D**). No painel “A” cada box representa a média de quatro plantas e 2 folhas por planta. Nos painéis **B**, **C** e **D** cada box representa a média de quatro plantas e duas folhas coletados em três horários. Médias seguidas de letras iguais nos boxes não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.....22

Figura 3.

Média por espécie da respiração foliar (R_d - **A**), rendimento quântico aparente (Φ - **B**) e a irradiância de compensação (I_c - **C**). Cada box representa a média de quatro plantas e 2 folhas por planta. Médias seguidas de letras iguais nos boxes não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.....23

Figura 4. Condutância do mesofilo (g_m) em função da concentração de CO_2 nos espaços intercelulares (C_i - **A, C**) e no cloroplasto (C_c - **B, D**) cinco espécies florestais em condição de sub-bosque. Cada símbolo representa a média de cinco espécies sendo quatro plantas por espécie e duas folhas por planta.....25

Figura 5.

Fotossíntese em resposta a concentração de CO_2 intercelular (C_i - **A**) e no cloroplasto (C_c - **B**) de *M. Paivae*. A linha tracejada mostra a limitação da fotossíntese imposta pela taxa de carboxilação da Rubisco (A_c) e a linha contínua a limitação pelo transporte de elétrons (A_j). A linha contínua vertical indica o valor de C_i ou C_c em que ocorre a transição da limitação da fotossíntese pela A_c para A_j27

Figura 6.

Fotossíntese em resposta a concentração de CO_2 intercelular (C_i - **A**) e no cloroplasto (C_c - **B**) de *M. guianensis*. A linha tracejada mostra a limitação da fotossíntese imposta pela taxa de carboxilação da Rubisco (A_c) e a linha contínua a limitação pelo transporte de elétrons (A_j). A linha contínua vertical indica o valor de C_i ou C_c em que ocorre a transição da limitação da fotossíntese pela A_c para A_j28

Figura 7.

Fotossíntese em resposta a concentração de CO_2 intercelular (C_i - **A**) e no cloroplasto (C_c - **B**) de *F. juruana*. A linha tracejada mostra a limitação da fotossíntese imposta pela taxa de carboxilação da Rubisco (A_c) e a linha contínua a limitação pelo transporte de elétrons (A_j). A linha contínua vertical indica o valor de C_i ou C_c em que ocorre a transição da limitação da fotossíntese pela A_c para A_j29

Figura 8.

Fotossíntese em resposta a concentração de CO₂ intercelular (C_i – **A**) e no cloroplasto (C_c – **B**) de *E. bracteosa*. A linha tracejada mostra a limitação da fotossíntese imposta pela taxa de carboxilação da Rubisco (A_c) e a linha contínua a limitação pelo transporte de elétrons (A_j). A linha contínua vertical indica o valor de C_i ou C_c em que ocorre a transição da limitação da fotossíntese pela A_c para A_j.....30

Figura 9.

Fotossíntese em resposta a concentração de CO₂ intercelular (C_i – **A**) e no cloroplasto (C_c – **B**) de *P. carthagenensis*. A linha tracejada mostra a limitação da fotossíntese imposta pela taxa de carboxilação da Rubisco (A_c) e a linha contínua a limitação pelo transporte de elétrons (A_j). A linha contínua vertical indica o valor de C_i ou C_c em que ocorre a transição da limitação da fotossíntese pela A_c para A_j.....31

Figura 10.

Velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax-Cc}) e taxa máxima de transporte de elétrons (J_{max-Cc}) calculados com a concentração de CO₂ dos cloroplastos (C_c) e V_{cmax-Ci} (**A**) e J_{max-Ci} (**B**) calculados com base na concentração de CO₂ dos espaços intercelulares (C_i). Dados em coletadas em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque. Valores normalizados a 25 ° C.....32

Figura 11.

Fotossíntese saturada por luz (A_{max} - **A**, **C**) e fotossíntese saturada por luz e CO₂ (A_{pot} - **B**, **D**) em função da velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) e taxa máxima de transporte de elétrons (J_{max}). Dados em coletadas cinco espécies florestais em condição de sub-bosque. Cada símbolo representa média de duas folhas por planta. Significativo a 1% (**) e 5% (*) de probabilidade; ns: não significativo a 5% de probabilidade. Valores V_{cmax} e J_{max} calculado normalizados a 25 ° C.....33

CAPÍTULO 2

Figura 1.

Precipitação (barras), temperatura (T_{ar}) e umidade relativa do ar (RH) semanal no período do estudo (22 de agosto – semana 34 a 10 de outubro de 2010; **A**) e média da radiação fotossinteticamente ativa (RFA), T_{ar} e RH para cada horário do dia durante a coleta de dados de trocas gasosas (**B**). Dados coletados no sub-bosque da floresta (~ 1 m de altura do chão).....47

Figura 2.

Efeito do horário do dia na condutância estomática (g_s , **A**) e na fotossíntese saturada pela luz (A_{max} , **B**) em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque. Cada barra representa a média de cinco espécies, sendo quatro plantas por espécie e duas folhas por planta. Barras com as letras iguais (maiúsculas para horários) não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.....49

Figura 3.

Efeito do horário do dia na velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax} - **A**) e na taxa de transporte de elétrons (J_{F-cal} - **B**) em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque. Cada barra representa a média das cinco espécies sendo quatro plantas por espécie e duas folhas por planta. Barras com as letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.....50

Figura 4.

Efeito do horário do dia na condutância do mesofilo (g_m) determinada pelo método de trocas gasosas e fluorescência da clorofila (**A**) e somente utilizando dados de trocas gasosas (**B**) em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque. Cada barra representa a média de quatro plantas por espécie e duas folhas por planta. Barras com as letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.....51

Figura 5.

Efeito do horário do dia na eficiência quântica da fotossíntese (Φ_{CO_2} - **A**), dissipação fotoquímica (qP - **B**), eficiência quântica do fotossistema 2 (Φ_{FSII} - **C**) e em dissipação não fotoquímica (NPQ - **D**) em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque. Cada barra representa a média de quatro plantas por espécie e duas folhas por planta. Barras com as letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade. Condições dentro da câmara de medição, RFA $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura ambiente $\sim 27^\circ\text{C}$53

Figura 6.

Eficiência da fotossíntese (Φ_{CO_2}) em função da condutância estomática (g_s) e do mesofilo (g_m) em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque. Cada barra representa a média de quatro plantas por espécie e duas folhas por planta. Não significativo a 5% (ns); significativo a 1% de probabilidade (**)......54

CAPÍTULO 3

Figura 1.

Médias de radiação fotossinteticamente ativa (RFA) diária para cada espécie. Cada valor representa a média de quatro plantas por espécie coletados durante cinco dias. Dados observados durante os meses de coleta dos dados de trocas gasosas (agosto a outubro de 2010).....65

Figura 2.

Relação entre fósforo foliar (P) e a razão entre os conteúdos de nitrogênio e P (N/P) foliar. Dados coletados em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque, sendo quatro plantas por espécie; *: significativo a 5% de probabilidade.....69

Figura 3.

Relação entre condutância do mesofilo (g_m) e os conteúdos de nitrogênio (N - **A**) e fósforo (P - **B**) foliar. Dados coletados em cinco espécies arbóreas na fase juvenil, sendo quatro plantas por espécie; **: significativo a 1% e (ns) não significativo a 5% de probabilidade.....70

Figura 4.

Taxa de transporte de elétrons (J_F - **A**, **C**) e velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax} - **B**, **D**) em função do nitrogênio (N) e fósforo (P) foliar. Dados coletados em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque, sendo quatro plantas por espécie; **: significativo a 1% e (ns) não significativo a 5% de probabilidade.....71

Figura 5.

Relação entre a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) e os teores de clorofilas $a+b$. Dados coletados em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque, sendo quatro plantas por espécie. Significativo a 5% (*) de probabilidade.....72

Figura 6.

Relação entre os conteúdos de nitrogênio (N - **A**) foliar, conteúdos de clorofilas $a+b$ (**B**) e a dissipação não fotoquímica (NPQ - **C**) com os valores do SPAD. Dados coletados em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque, sendo quatro plantas por espécie. Os valores do SPAD foram coletados separadamente para cada variável. Significativo a 1% (**) e 5% (*) de probabilidade.....73

CAPÍTULO 4

Figura 1.

Média por espécie do incremento anual em diâmetro (IAD - **A**) e altura (IAA - **B**). Cada barra representa a média de quatro plantas por espécie. Barras seguidas pela mesma letra não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.....83

Figura 2.

Média por espécie da condutância do mesófilo (g_m - **A**) e da densidade foliar (**B**). Cada barra representa a média de quatro plantas e 2 folhas por planta. Barras seguidas pela mesma letra não diferem ao nível de 5% de probabilidade.....85

Figura 3.

Condutância do mesofilo (g_m – **A**, **D**), velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax} – **B**, **E**) e taxa de transporte de elétrons (J_F – **C**, **F**) em função da espessura e densidade foliar. Dados coletados em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque, sendo quatro plantas por espécie. Significativo a 1% (**) e 5% (*) de probabilidade e não significativo ao nível de 5% (ns).....87

Figura 4.

Condutância do mesofilo (g_m – **A**), condutância estomática (g_s – **B**), velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax} – **C**) e taxa de transporte de elétrons (J_F – **D**) em função do incremento anual em altura (IAA). Dados coletados em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque, sendo quatro plantas por espécie. Significativo a 1% (**) e 5% (*) de probabilidade e não significativo ao nível de 5% (ns).....88

Figura 5.

Incremento anual em altura (IAA - **A**), incremento anual em diâmetro (IAD - **B**), área foliar específica (AFE – **C**) e espessura foliar (**D**) em função da fração de céu visível. Dados coletados em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque, sendo quatro plantas por espécie. Significativo a 5% (*) de probabilidade e não significativo ao nível de 5% (ns).....90

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Amazônia brasileira abriga um terço das florestas tropicais do mundo e desempenha função importante tanto na manutenção dos ciclos hidrológicos (Veríssimo e Amaral, 1996) quanto no balanço global do carbono (Falkowski et al., 2000). No entanto não há consenso sobre o verdadeiro papel das florestas no que se refere ao balanço global da concentração de dióxido de carbono (CO_2) na atmosfera. Nas últimas décadas o efeito do aumento da concentração de CO_2 na fisiologia das plantas tem sido estudado intensivamente. Sabe-se que a $[\text{CO}_2]$ na atmosfera (em torno de $380 \mu\text{mol mol}^{-1}$) está bem abaixo da saturação para a maioria das plantas. O aumento na concentração de CO_2 , geralmente, promove maior produtividade biológica, ou seja, aumento na taxa fotossintética das plantas.

O aumento na assimilação de CO_2 está relacionado ao declínio da fotorrespiração que ocorre quando há um aumento na relação CO_2/O_2 no cloroplasto. Em baixas concentrações de CO_2 a fotossíntese é limitada pela capacidade de carboxilação da ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco), enquanto que em concentrações elevadas, a fotossíntese é limitada pela capacidade do ciclo de Calvin de regenerar a molécula aceptora ribulose 1,5-bisfosfato (RuBP), que depende da taxa de transporte de elétrons. Neste contexto os estômatos desempenham função significativa, servindo como porta de entrada do CO_2 da atmosfera para os sítios de carboxilação no cloroplasto, cuja assimilação é mediada pela enzima Rubisco. Com base no modelo bioquímico de fotossíntese em plantas C_3 proposto por Farquhar et al. (1980), a taxa de assimilação pode ser limitada por três fatores: i) a quantidade e/ou o estado de ativação da Rubisco, ii) a regeneração da Ribulose 1,5-bisfosfato (aceptor primário do CO_2) ou iii) a capacidade do cloroplasto em trocar trioses fosfato/ P_i (fosfato inorgânico) com o citoplasma (von Caemmerer, 2000). Além disso, outros fatores, entre externos e internos, podem afetar a atividade fotossintética e entre eles, a condutância estomática (g_s) está entre os mais estudados (Kumar et al., 1999; Park e Furukawa, 1999; Marengo et al., 2006).

A condutância do mesofilo (g_m) também afeta a capacidade fotossintética da folha, porém, tem recebido pouca atenção. Estudos recentes relatam a importância do efeito da condutância do mesofilo (g_m) nas trocas gasosas (Flexas et al., 2007; Warren, 2007). A g_m é um parâmetro que define a transferência do CO_2 das cavidades subestomática para os sítios de carboxilação da rubisco. A difusão de CO_2 no interior do mesofilo depende, entre outros fatores, da anatomia foliar e da organização interna (Rand, 1978; Nobel, 1991; Parkhurst, 1994). A maioria dos estudos sobre condutância do mesofilo concentrou-se em comparações

interespecíficas evidenciando correlação significativa com a capacidade fotossintética, assim como ocorre com g_s (Evans e Loreto, 2000).

Acreditou-se inicialmente que g_m mantinha-se estável ao longo do dia (Evans e von Caemmerer, 1996), porém estudos mais recentes relatam que a g_m pode variar em função do CO_2 e da irradiância (Flexas et al., 2007b), o que levaria a uma instabilidade no período diurno (Grassi et al., 2009). Há poucos estudos sobre como g_m varia em espécies tropicais, particularmente da Amazônica. Em alguns trabalhos tem-se estudado o efeito da idade da folha em g_m (Loreto et al., 1994; Miyazawa e Terashima, 2001), já em outros, tem-se avaliado as variações de g_m em respostas a fatores de estresse, tais como, alta irradiância (Lloyd et al., 1992), estresse salino (Delfine et al., 1999) e estresse hídrico (Loreto et al., 2003). Outros estudos também têm demonstrado que g_m pode ser afetada por algumas variáveis ambientais e podem mudar rapidamente, por exemplo, em resposta a temperatura foliar (Bernacchi et al., 2002) e estresse hídrico (Flexas et al., 2004). Fatores bioquímicos tais como a anidrase carbônica ou aquaporinas são, provavelmente, responsáveis por essas mudanças rápidas (Warren, 2007). Dessa forma a g_m pode limitar de maneira significativa a fotossíntese (Evans et al., 1986; Di Marco et al., 1990; Harley et al., 1992; Warren, 2006).

As fortes variações na anatomia foliar (p.ex. espessura foliar), devido a fatores ambientais (irradiância) ou genética, estão associadas por um efeito significativo da transferência de CO_2 (condutância do mesofilo), daí a importância deste parâmetro nas trocas gasosas, particularmente em g_m (Hanba et al., 1999). Este é um parâmetro importante a ser considerado, visto que, esta resistência influencia a transferência do CO_2 dos espaços intercelulares para os sítios de carboxilação nos cloroplastos. Praticamente todos os modelos climáticos, mais recentes (SiB2, IbiS, CLM; Sellers et al., 1997), utilizam dados da velocidade máxima de carboxilação da rubisco (V_{cmax}) e as taxas máximas de transporte de elétrons (J_{max}) calculados com base nas equações de Farquhar et al. (1980). Entretanto, grande parte dos dados de V_{cmax} e J_{max} , é proveniente de estudos realizados a partir das concentrações de CO_2 nos espaços intercelulares (C_i). No entanto, estudos recentes indicam que a concentração de CO_2 encontrada dentro do sítio de carboxilação (nos cloroplastos - C_c) é menor do que a encontrada nos espaços intercelulares (C_i), nas espécies até hoje estudadas (Harley et al., 1992; Lloyd et al., 1992; Warren et al., 2003). Desse modo, os modelos climáticos poderão prognosticar com maior precisão o comportamento fotossintético da Floresta Amazônica, quando os dados de V_{cmax} e J_{max} forem calculados com base nas concentrações de CO_2 dentro dos cloroplastos (C_c). Neste contexto o estudo da condutância do mesofilo em espécies da Amazônia é fundamental para determinação dos valores reais de

V_{cmax} e J_{max} a serem incorporados em estudo de modelagem. Assim, este estudo tem como objetivo principal determinar a velocidade máxima de carboxilação da rubisco (V_{cmax}) utilizando os valores de concentrações de CO_2 no cloroplasto, bem como investigar se a condutância do mesofilo varia em função das condições ambientais e das características foliares.

2. HIPÓTESE

- Há influencia do horário do dia na condutância do mesofilo (g_m), assim como ocorre com a condutância estomática;
- As taxas de transporte de elétrons (J_F) e a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) são influenciadas pelo efeito do horário do dia;
- A anatomia da folha (área foliar específica e espessura da folha) influencia os valores g_m .
- As taxas de V_{cmax} e J_F e a condutância do mesofilo são influenciadas positivamente pelos conteúdos nutrientes minerais foliares entre as espécies;

3. OBJETIVOS:

3.1 Objetivo geral

Gerar conhecimento sobre como o crescimento e a fixação de CO_2 as espécies de árvores em condição de sub-bosque na Amazônia respondem as pequenas variações dos fatores ambientais.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar o efeito da concentração de CO_2 na condutância do mesofilo.
- Avaliar como V_{cmax} e a taxa máxima de transporte de elétrons (J_{max}), calculado a partir de $[\text{CO}_2]$ no espaço intercelular (C_i) difere da obtida com C_c .
- Determinar o efeito do horário do dia na condutância do mesofilo (g_m), condutância estomática (g_s), velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) e na taxa de transporte de elétrons (J_F);

- Determinar como as variações nos conteúdos de nutrientes foliares entre as espécies influenciam na assimilação de CO₂.
- Determinar como o crescimento das plantas de sub-bosque responde as pequenas oscilações nos níveis de luminosidade no interior da floresta.
- Finalmente, determinar o efeito da anatomia foliar (área foliar específica e espessura foliar) em g_m e nas taxas de V_{cmax} e J_F .

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

O estudo foi realizado na Estação Experimental de Silvicultura Tropical (Núcleo ZF2), área de Pesquisa do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), localizada à 60 km (em linha reta) ao norte de Manaus (02° 36' 21" Sul, 60° 08' 11" Oeste). A vegetação é caracterizada como floresta densa de terra-firme (Higuchi et al., 1997) e os solos são classificados como latossolos, com baixa fertilidade e alta acidez (Ferraz et al., 1998). A temperatura média anual é de 26,7°C, apresentando valores médios para as máximas e mínimas de 31,2°C e 23,5°C, respectivamente. A precipitação anual é em torno de 2.240 mm (Instituto Nacional de Meteorologia - INMET, 2012), distribuídos em duas épocas durante o ano, uma chuvosa que ocorre entre outubro e junho e a outra entre os meses de julho a setembro, em geral com menos de 100 mm mês. A umidade relativa apresenta uma média anual de 84%, variando de 77% a 88%, podendo alcançar 95%, conforme descrito por Nascimento (2009).

4.2. Espécies estudadas

Para o estudo foram selecionadas cinco espécies de árvores de dossel na fase juvenil, as repetições foram formadas por quatro arvoretas por espécie. Devido à alta biodiversidade (mais de 5000 espécies de árvores em toda a região da Amazônia), as árvores de uma determinada espécie são distribuídas em uma ampla área geográfica, com uma faixa elevada de idades e tamanhos diferentes. Após uma extensa pesquisa sobre uma área de cerca de 50 ha, quatro mudas (repetições) de cada espécie, de 1 a 3 m de altura e 8 a 19 mm de diâmetro (0,5 m a partir do solo) foram finalmente selecionadas para as medições das variáveis

estudadas. Vale ressaltar que plantas destes tamanhos possuem cerca de 10 a 20 anos de idade. As espécies estudadas são: *Eschweilera bracteosa* Poepp. ex O. Berg (Lecythidaceae), *Miquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae), *Myrcia Paivae* O.Berg (Myrtaceae), *Faramea juruana* K. Krause (Rubiaceae) e *Psychotria carthagenensis* (Rubiaceae).

4.3. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila

Para as medições de trocas gasosas, foram selecionadas folhas totalmente expandidas com bom aspecto fitossanitário, sendo duas folhas por planta. O efeito do horário do dia nas variáveis: condutância do mesófilo (g_m), fotossíntese (A) e condutância estomática (g_s), foi determinado mediante coletas dos dados de trocas gasosas e fluorescência em três horários (08:00-09:30, 12:00-13:30 e 15:00-16:30 h). As coletas foram realizadas durante os meses de agosto a outubro de 2010, época de menor precipitação, que em estudos prévios constatou-se que os valores de trocas gasosas são similares entre os períodos de maior e menor precipitação.

As medidas de trocas gasosas e da fluorescência da clorofila a foram realizadas usando um sistema de trocas gasosas (Li-6400, Li-Cor, Lincoln, NE, EUA), com câmara foliar de 2 cm^2 e um fluorômetro acoplado (Li-6400-40, Li-Cor). As taxas fotossintéticas foram determinadas em diferentes concentrações de CO_2 (curvas da relação A/C_i) em condição de luz saturante ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, valor determinado em experimentos preliminares).

Para determinar a fotossíntese saturada por luz (A_{max}), foi determinada utilizando luz saturante ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e concentração de CO_2 ambiente ($380 \mu\text{mol mol}^{-1}$). O protocolo utilizado para a construção da curva A/C_i foi conforme o descrito por Long e Bernachi (2003). V_{cmax} foi calculado conforme Farquhar *et al.* (1980) utilizando a concentração de CO_2 do cloroplasto (C_c).

$$A_c = [V_{\text{cmax}} (C_c - I^*)] / [C_c + K_c(1 + O/K_o)] \quad \text{Equação (01)}$$

Onde: I^* é o ponto de compensação de CO_2 na ausência de respiração e na presença de luz; K_c (404,9) e K_o (278,4) representam as constantes de Michaelis-Mentem da Rubisco para CO_2 e O_2 , respectivamente e O representa a concentração de oxigênio nos espaços intercelulares. Os valores de V_{cmax} foram normalizados a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ utilizando as equações descritas por Medlyn *et al.* (1999).

A fluorescência da clorofila (F) foi determinada aplicando um pulso de luz saturante de $6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com duração de 1 seg. Os dados de fluorescência foram utilizados para calcular Φ_{FSII} , Φ_{CO_2} , qP e NPQ conforme a seguir (Maxwell e Johnson, 2000):

$$\Phi_{\text{FSII}} = (F_m' - F_s) / F_m' \quad \text{Equação (02)}$$

Em que: F_s , indica a fluorescência no estado de equilíbrio dinâmico (folha iluminada) e F_m' , a fluorescência máxima da folha em ambiente iluminado. A eficiência de assimilação do CO_2 (Φ_{CO_2}) como: $\Phi_{\text{CO}_2} = (A + R_d) / I\alpha$, onde R_d é a respiração no escuro, I a radiação fotossinteticamente ativa e α a absorvância da folha (calculada conforme equação 4). A dissipação fotoquímica (qP) foi calculada como $(F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$ onde F_0' indica a fluorescência mínima na presença de luz. A dissipação não fotoquímica (NPQ) foi calculada como $[\text{NPQ} = (F_m - F_m') / F_m']$, onde F_m a fluorescência máxima. A taxa de transporte de elétrons (J_F) foi calculada de acordo com Maxwell e Johnson (2000):

$$J_F = (I_e \times \Phi_{\text{FSII}}) * 0,5 \quad \text{Equação (03)}$$

Em que, J_F é a taxa de transporte de elétrons; I_e , radiação fotossinteticamente ativa absorvida pela folha; 0,5 é a fração de fótons absorvidos que é utilizado pelo FSII. I_e foi calculada conforme a seguir:

$$I_e = \text{RFA} * \alpha \quad \text{Equação (04)}$$

Alfa (α) foi calculado como sendo $\alpha = \chi / (\chi + 76)$, em que: χ representa o conteúdo de clorofila por unidade de área (Evans e Poorter, 2001). Como uma fração dos elétrons gerados na fase fotoquímica é utilizada em reações alternativas que reduzem O_2 (eg. ciclo água-água), os valores de J_F foram corrigidos conforme a seguir (Gilbert *et al.*, 2012):

$$J_{F\text{-cal}} = m J_F \quad \text{Equação (05)}$$

Em que:

$$m = 4(A + R_d) / 0,425 I_e \Phi_{\text{FSII}} \quad \text{Equação (06)}$$

Onde, A representa a taxa de fotossíntese e R_d a taxa de respiração (durante a fotossíntese), ambos os parâmetros foram obtidos em condição não-fotorrespiratória (1% de O_2 e 99% N_2); 0,425 é a fração de fótons absorvida pelo FSII, levando em consideração de a absorbância da folha é de 0,85. Os valores de C_c foram determinados conforme a seguir (Epron et al., 1995):

$$C_c = C_i (S^*/S) \quad \text{Equação (07)}$$

Em que S^* denota o fator de especificidade da Rubisco calculado como a declividade (coeficiente) da regressão linear da relação entre J_c/J_o e C_i/O (ilustração do cálculo mostrado na Figura 1) e S a especificidade da Rubisco *in vitro* (2560 mol mol⁻¹, Harley et al., 1992). Os parâmetros J_c e J_o representam o fluxo de elétrons direcionados para carboxilação e oxigenação da RuBP, respectivamente. J_c e J_o foram calculados conforme a seguir (Epron et al., 1995):

$$J_c = 1/3 [J_{F-cal} + 8 (A + R_d)] \quad \text{Equação (08)}$$

$$J_o = 2/3 [J_{F-cal} - 4 (A + R_d)] \quad \text{Equação (09)}$$

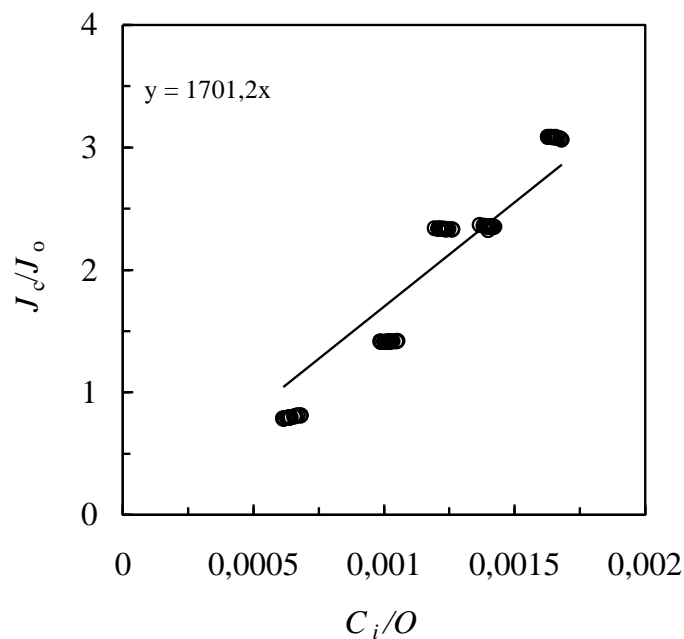


Figura 1. Ilustração do cálculo da declividade (valor de 1701,2) da relação entre J_c/J_o e C_i/O . Os parâmetros J_c e J_o referem-se ao fluxo de elétrons direcionados para a carboxilação e oxigenação da RuBP (equações 8 e 9) e a relação C_i/O refere-se à fração molar entre a $[CO_2]$ e $[O_2]$ nos espaços intercelulares.

Em que J_{F-cal} corresponde o somatório de J_c e J_o (i.e. $J_{F-cal} = J_c + J_o$), ou seja, refere-se ao fluxo total de elétrons utilizados na atividade da Rubisco (Genty et al., 1989), A representa a taxa de fotossíntese e R_d a taxa de respiração. Os valores de J_{F-cal} foram determinados conforme descrito previamente (com a câmara de fluorescência acoplada ao medidor de fotossíntese). A relação C_i/O denota a relação entre os valores de C_i e a concentração de oxigênio nos espaços intercelulares (O_2 , $0,21 \text{ mol mol}^{-1}$, Evans e von Caemmerer, 1996). A g_m foi determinada conforme Epron et al. (1995), considerando que:

$$g_m = A/(C_i - C_c) \quad \text{Equação (10)}$$

Em que A , representa a taxa de fotossíntese, C_i e C_c a concentração de CO_2 nos espaços intercelulares e no cloroplasto, respectivamente. Para fins comparativos, g_m também foi calculada utilizando apenas os dados de trocas gasosas (curva $A-C_i$) na expectativa que este método resulte em valores semelhantes aqueles determinados pelo método do irga-fluorômetro. Neste método os valores de g_m foram calculados seguindo o protocolo de Sharkey et al. (2007; <http://www.blackwellpublishing.com/plantsci/pcecalculation/>).

Parâmetros estimados a partir da curva A(RFA): A_{max} , Φ , R_d e I_c

Foi construída uma curva de resposta à luz [A-RFA], em condições de $[CO_2]$ ambiente ($380 \mu\text{mol mol}^{-1}$). Os valores de fotossíntese (A) foram registrados em irradiâncias de 2000, 1500, 1000, 500, 250, 100, 75, 50, 25 e $0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. A partir da curva A-RFA foram determinados a fotossíntese saturada por luz (A_{max}), o rendimento quântico aparente (Φ) e o ponto de irradiância de compensação (I_c). Os dados de trocas gasosas foram obtidos quando o coeficiente de variação (CV) total (somatório dos CV dos deltas de CO_2 , H_2O e fluxo) foi menor que 0,7% (Long e Bernacchi, 2003). Os valores da relação A-RFA foram ajustadas utilizando a equação de von Bertalanffy (Horton e Neufeld, 1998)

$$A = R_d + A_{max}(1 - \exp^{-\Phi \cdot \text{RFA}}) \quad \text{Equação (11)}$$

Em que: R_d é a respiração no escuro; A_{max} , a fotossíntese saturada por luz; Φ é o rendimento quântico aparente ($A+R_d/\text{RFA}$); A_{max} é a taxa fotossintética em luz saturante; RFA é a radiação fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e R_d é a taxa de respiração da folha no

escuro. O Φ foi determinado por regressão linear (A em função de RFA), utilizando irradiâncias abaixo de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (na parte linear da relação A-RFA); R_d foi estimado como o intercepto da parte linear da curva A-RFA (em baixas irradiâncias, no eixo “y”, pelo método de Kok (Kok, 1948) R_d e Φ foram determinados como o intercepto da linha de regressão A-RFA no eixo y. O ponto de compensação por luz aqui chamado de irradiância de compensação (I_c) foi calculado dividindo R_d/Φ .

4.4. Coleta de dados climáticos

Durante o período do estudo foram coletados dados de irradiância, umidade relativa do ar (UR), temperatura do ar (T) e de precipitação. A irradiância, UR e T foram coletados utilizando sensores específicos (Humitter 50Y, Vaisala Oy, Finland; Li-190SA, Li-Cor, NE, EUA) conectados a um datalogger (Li-1400, Li-Cor, NE, EUA). Para caracterizar as condições ambientais, um sensor foi posicionado a poucos metros de distância em uma das 20 plantas, previamente selecionadas para o estudo (~ 1 m acima do chão da floresta). O sensor permaneceu instalado por uma semana (quando foram recolhidos dados desta planta), então o mesmo sensor foi transferido para outra planta, para os sete dias seguintes, e assim por diante até que o ciclo fosse completado.

Os dados de precipitação foram coletados com um pluviômetro convencional, instalado numa torre de observação a 40 metros de altura, a 3,3 km da área do estudo. As coletas dos dados climáticos foram realizadas semanalmente. Também foi determinada a umidade do solo (S_u) coletando-se amostras de solo próximo às plantas estudadas. S_u foi determinada como $M_u - M_s / M_s$, em que M_u e M_s representam a massa do solo úmido e seco, respectivamente.

4.5. Índice de área foliar e fração de céu visível

O índice de área foliar (IAF) e a fração de céu visível (FCV) foram estimados utilizando-se um analisador de dossel (LAI-2000, Plant Canopy Analyser - Li-Cor, NE, EUA), durante o período de coleta dos dados de trocas gasosas. Os dados de IAF e FCV foram coletados no início da manhã, com céu nublado para otimizar a precisão do aparelho. Um dos sensores foi instalado acima do dossel da floresta numa torre de observação próximo

da área do estudo e outro foi levado para o sub-bosque para a coleta dos dados. No sub-bosque, a FCV foi registrada coletando seis leituras no microsítio em torno de cada planta (total de 20 microsítios). Cada leitura foi coletada a uma distância de aproximadamente 1,5 m da haste, formando um círculo ao redor da planta.

4.6. Características foliares

Nas mesmas plantas utilizadas para a coleta de dados de trocas gasosas também foram determinadas as características foliares. A espessura foliar foi determinada em duas folhas por planta e dois pontos por folha, na região mediana, com as folhas ainda frescas. Foram realizadas secções transversais com auxílio de um micrótomo de mesa. Os cortes foram observados em microscópio Olympus CX-31 e fotografados, acoplando uma câmera fotográfica Olympus SC-35. Em seguida, as imagens foram inseridas no programa ANATI QUANT versão 2.0 da Universidade Federal de Viçosa, conforme ilustrado na figura 2.



Figura 2. Visualização do corte anatômico da espécie *M. paivae* inserido no programa ANATI QUANTI para medição da espessura foliar. A linha vermelha indica os limites para a determinação da espessura, fotografia em objetiva 10X.

A área foliar foi determinada com um medidor de área (Li-3000, Li-Cor, EUA), em seguida as folhas (duas por planta) foram levadas à estufa a 72 °C onde permaneceram até atingirem peso constante. A área foliar específica (AFE) foi determinada como a razão entre área e massa foliar. A densidade foliar foi determinada dividindo a massa seca/volume, para isso, também foi determinado o volume foliar (área foliar* espessura da folha).

4.7. Determinação dos nutrientes foliares e teores de clorofila

Os teores de clorofila e os conteúdos de nutrientes foliares foram determinados em folhas similares àquelas utilizada para as medições das trocas gasosas. O critério para a seleção das folhas foi o valor de SPAD (igual o similar ao da folha utilizada para medir trocas gasosas). A concentração de clorofila foi determinada pelo método de Arnon (1949) utilizando acetona 80% (10 mL / amostra) e posterior determinação espectrometricamente (SP-2000 UV, Spectrum, Shanghai, China). O conteúdo do nitrogênio (N) foliar foi determinado pelo método de Kjeldahl (Passos, 1996). As concentrações de macronutrientes no tecido foliar foram determinadas conforme descrito por Rorison et al. (1993). Isto é: fósforo (P), pelo método do molibdato de amônio; potássio (K) por fotometria de chama e cálcio (Ca) e magnésio (Mg) por espectrofotometria de absorção atômica.

4.8. Delineamento Experimental e análise estatística

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado. Para os dados de trocas gasosas, os tratamentos foram as cinco espécies (diferentes espessuras de folha) e os horários do dia (três horários de medição), as repetições foram formadas por quatro arvoretas por espécie (duas folhas por planta). As diferenças entre espécies e horários foram analisadas mediante análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey ($p \leq 0,05$) foi utilizado para testar a diferença entre espécies nos parâmetros mensurados. O efeito das variáveis quantitativas (espessura foliar, nutrientes etc.) em g_s , g_m , V_{cmax} , e outras variáveis das trocas gasosas foram examinadas mediante análise de regressão. Para as outras variáveis estudadas (área foliar específica, teores de N etc), os tratamentos foram às espécies com quatro repetições, e como no caso anterior, as diferenças entre espécies foram examinadas mediante análise de variância (ANOVA), em delineamento inteiramente casualizado.

Os dados de fotossíntese em função da $[CO_2]$ foram analisados mediante análise de regressão para determinar o valor ajustado da fotossíntese potencial (A_{pot}) e do ponto de compensação por CO_2 (Γ). Análise de regressão também foi utilizada para ajustar os valores de A_{max} , I_c e os parâmetros da curva A -RFA, conforme descrito na Equação 11. Para as análises estatísticas utilizou-se o programa estatístico SAEG 9.0 da Universidade Federal de Viçosa, MG.

Efeito da concentração de CO₂ na condutância do mesofilo em cinco espécies arbóreas em condição de sub-bosque na Amazônia Central

*Manuscrito a ser submetido
(formatado com normas da revista Acta Amazônica)*

RESUMO

O mesofilo da folha é uma das barreiras que mais limitam a entrada de CO₂ nos sítios de carboxilação no cloroplasto. Assim, a diferença significativa da concentração de CO₂ que esta nos cloroplastos (C_c) e nos espaços intercelulares (C_i) tem implicações no modelo bioquímico que ajusta os dados de trocas. Dessa forma, este estudo objetivou determinar o efeito da concentração de CO₂ na condutância do mesofilo e avaliar como a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) e a taxa máxima de transporte de elétrons (J_{max}), calculado a partir de [CO₂] no espaço intercelular (C_i) difere da obtida com C_c . Foram utilizadas espécies de árvores na Amazônia em condição de sub-bosque (*Myrcia paivae*, *Minquartia guianensis*, *Eschweleira bracteosa*, *Faramea juruana* e *Psychotria carthagenensis*). Os parâmetros fotossintéticos e de fluorescência foram determinados utilizando um analisador de gases por infravermelho (IRGA) com um fluorômetro acoplado à câmara do irga. A condutância do mesofilo (g_m) foi determinada utilizando parâmetros da fluorescência da clorofila em conjunto com medidas de trocas gasosas. Em média a fotossíntese saturou com irradiância de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A g_m atingiu seu valor máximo em concentração de CO₂ ambiente e declinou entorno de 40% no ponto máximo de saturação de CO₂. Os valores dos parâmetros fotossintéticos obtidos nas curvas A- C_c foram diferentes daqueles observados nas curvas A- C_i , onde os valores V_{cmax} e J_{max} calculados utilizando C_c

foram maiores do que os valores obtidos com C_i , o que destaca a importância do uso C_c nos cálculos destes parâmetros.

Palavras-chave: fotossíntese saturada por luz, concentração de CO_2 no cloroplasto, velocidade máxima de carboxilação da Rubisco, taxa de transporte de elétrons.

Effect of CO_2 concentration on mesophyll conductance in five forest tree species in Central Amazonia

ABSTRACT

Leaf mesophyll is one of the barriers that limits free-passage of intercellular CO_2 to the site of carboxylation in the chloroplast. Thus, the difference in CO_2 concentration between the chloroplasts (C_c) and that at intercellular spaces (C_i) has implications on the outcome of biochemical models. Thus, this study aimed to determine the effect of CO_2 concentration on mesophyll conductance and evaluate how the maximum carboxylation velocity of Rubisco (V_{cmax}) and the maximum electron transport rate (J_{max}), calculated from $[\text{CO}_2]$ in intercellular space (C_i) differs from that obtained using C_c . We used saplings of five Amazon species (*Myrcia paivae*, *Miconia guianensis*, *Eschweleira bracteosa*, *Faramea juruana* and *Psychotria carthagenensis*). Fluorescence and photosynthetic parameters were determined using an infrared gas analyzer (IRGA) with a fluorometer coupled to the IRGA head. The mesophyll conductance (g_m) was determined using chlorophyll fluorescence parameters together with gas exchange data. On average photosynthesis saturated at irradiance of $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The g_m reached its peak under ambient CO_2 concentrations and declined to around 40% of maximum values at CO_2 saturation (380 ppm). Photosynthetic parameters obtained using $A-C_i$ curves differed from those determined using $A-C_c$. V_{cmax} and J_{max} values

calculated using C_c were higher than those obtained with C_i , which highlights the importance of using C_c for calculations of these parameters.

Keywords: light saturated photosynthesis, CO_2 concentration in the chloroplast, maximum carboxylation velocity of Rubisco, electron transport rate.

1. INTRODUÇÃO

A fotossíntese é influenciada, principalmente, pela disponibilidade de luz e pela concentração de CO_2 (De Pury e Farquhar 1997). Em ambas variáveis o efeito está diretamente relacionado a modulação estomática. A primeira vem sendo estudada como consequência de fatores endógenos, relacionados ao ritmo circadiano (Doughty *et al.* 2006). A segunda envolve a abertura e o fechamento dos estômatos, pois em baixas $[\text{CO}_2]$ os estômatos tendem a abrir e o efeito contrário é observado em concentrações elevadas de CO_2 (Morison e Gifford 1983). Recentemente, um estudo demonstrou que as limitações da fotossíntese foram agrupadas em três componentes: mesófilo, estômatos e limitação bioquímica (Grassi e Magnani 2005).

Para ocorrer a fotossíntese o CO_2 percorre da atmosfera até os cloroplastos, onde ele é carboxilado pela Rubisco. De acordo com Farquhar *et al.* (1980) dois parâmetros fundamentais utilizados nos modelos de fotossíntese são: a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) e a taxa máxima de transporte de elétrons (J_{max}), que juntos descrevem com precisão a capacidade fotossintética de plantas no nível folha. A correlação entre estes parâmetros e a capacidade fotossintética tem sido o assunto de grande investigação em diversos tipos de plantas e tem sido amplamente aplicada para outros modelos de ecossistemas terrestres (Harley e Tenhunen 1991; Harley *et al.* 1992; Sharkey *et al.* 2007).

De acordo com Farquhar *et al.* (1980) em baixas $[\text{CO}_2]$ atmosférica a fotossíntese é limitada pela atividade da Rubisco. A Rubisco possui afinidade tanto ao CO_2 como ao O_2 , dessa forma opera com apenas uma fração de sua capacidade catalítica em folhas de plantas C_3 (Evans e von Caemmerer 1996). A situação é agravada pelo fato que a concentração de CO_2 nos sítios de carboxilação é em média 50% das concentrações atmosféricas (Warren 2008). Isso ocorre porque durante este percurso o CO_2 passa por diversas barreiras desde a fase gasosa até a sua diluição no meio líquido no cloroplasto (Warren 2004). Neste percurso,

uma das resistências encontrada pelo CO₂ é a condutância do mesofilo (g_m) que é responsável por, aproximadamente, 40% da redução do CO₂ nos sítios de carboxilação.

Embora muitos estudos (Lloyd *et al.* 1992; Poorter e Evans 1998; Warren e Adams 2006) tenham comprovado que g_m é finita, o cálculo tradicional para obter V_{cmax} e J_{max} na curva A-C_i assume que não há diferença entre C_i e C_c, ou seja, assume-se que a g_m é infinita (Long e Bernacchi 2003). Dessa forma, o declínio significativo da concentração de CO₂ nos cloroplastos (C_c) para aquela que está nos espaços intercelulares (C_i) tem implicações nos resultados de V_{cmax} e J_{max} calculados pelo modelo bioquímico de Farquhar *et al.* (1980). Uma vez que tem sido demonstrado que g_m é finito, tornou-se importante determinar o real efeito do CO₂ na condutância do mesoflio. Também, não há consenso sobre o efeito da [CO₂] em g_m , pois embora muitos trabalhos (Bunce 2010, Douthe *et al.* 2011; Hassiotou *et al.* 2009) tenham relatado uma correlação negativa entre a g_m e concentração de CO₂ (C_a, C_i e C_c) em muitas espécies, algumas exceções foram publicadas (Tazoe *et al.* 2009), levando a uma controvérsia se as respostas observadas são reais ou um erro de medição (Flexas *et al.* 2012). Dessa forma, este estudo objetivou determinar o efeito da concentração de CO₂ na condutância do mesoflio e avaliar como a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) e a taxa máxima de transporte de elétrons (J_{max}), calculados a partir da [CO₂] no espaço intercelular (C_i) difere da obtida com C_c.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Estação Experimental de Silvicultura Tropical (Núcleo ZF-2, 02° 36' 21" S, 60° 08' 11" W) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em 2010. A vegetação é caracterizada como floresta densa de terra-firme. A temperatura média anual está entorno de 27 °C. A precipitação média anual é de, aproximadamente, 2.240 mm

(INMET 2012). A umidade relativa apresenta uma média anual de 84%. Para o estudo foram utilizadas cinco espécies: *Myrcia paivae* Berg. (Myrtaceae), *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae), *Eschweleira bracteosa* Poepp. ex O. Berg (Lecythidaceae), *Faramea juruana* K. Krause (Rubiaceae) e *Psychotria carthagenensis* (Rubiaceae) utilizando como repetições quatro plantas em condição natural de sub-bosque (entre 1 e 3 m de altura) para cada espécie, no sub-bosque da floresta. Estas espécies foram escolhidas em virtude da disponibilidade de repetições com altura semelhante na área do estudo.

As medidas de trocas gasosas e de fluorescência foram realizadas usando um analisador de gases por infravermelho (Li-6400, Li-Cor, Lincoln, NE, EUA), com câmara foliar de 2 cm² e um fluorômetro acoplado (Li-6400-40, Li-Cor). As coletas dos dados foram realizadas em folhas completamente expandidas sendo duas folhas por planta entre agosto e outubro de 2010 (época de menor precipitação).

Curvas A x RFA

Curvas resposta à luz [curva A-RFA] foram construídas a uma concentração de CO₂ de 380 μmol mol⁻¹. Antes do início das medições da relação A-RFA, as folhas foram estabilizadas durante 15 min a condição de luz de 500 μmol m⁻² s⁻¹. Após a estabilização das folhas os valores A foram registrados em fluxo de fótons (RFA) de 2000, 1500, 1000, 500, 250, 100, 75, 50 e 0 μmol m⁻² s⁻¹. A partir da curva A-RFA foram determinados a fotossíntese saturada por luz (A_{\max}), Φ , e I_c . Os valores da relação A-RFA foram ajustadas utilizando a equação de von Bertalanffy (Horton e Neufeld 1998).

$$A = R_d + A_{\max}(1 - \exp^{-\Phi \cdot \text{RFA}}) \quad \text{Equação (01)}$$

Em que: R_d é a respiração no escuro; A_{\max} , a fotossíntese saturada por luz; Φ é o rendimento quântico aparente ($(A+R_d)/RFA$); A_{\max} é a taxa fotossintética em luz saturante; RFA é a radiação fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e R_d é a taxa de respiração da folha no escuro. O Φ foi determinado por regressão linear (A em função de RFA), utilizando irradiâncias abaixo de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (na parte linear da relação A-RFA); R_d foi estimado como o intercepto da parte linear da curva A-RFA (em baixas irradiâncias, no eixo “y”, pelo método de Kok (Kok 1948) R_d e Φ foram determinados como o intercepto da linha de regressão A-RFA no eixo y. O ponto de compensação por luz aqui chamado de irradiância de compensação (I_c) foi obtido a partir da divisão R_d/Φ .

Curvas A x C_i

Curvas de resposta ao CO_2 nos espaços intercelulares (C_i) foram construídas em condição de luz saturante ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, valor determinado em experimentos preliminares; Nascimento 2009; Mendes 2009) em diferentes $[\text{CO}_2]$. O protocolo utilizado para determinar à relação A- C_i foi conforme o descrito por Long e Bernachi (2003). A partir dos valores da relação A- C_i obtiveram-se os dados de A_{pot} e das limitações bioquímicas expressas pela velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) e pela taxa máxima de transporte de elétrons (J_{max}). Os valores de V_{cmax} e J_{max} foram calculados conforme Farquhar *et al.* (1980) utilizando a concentração de CO_2 do cloroplasto (C_c) e normalizados a 25°C , utilizando as equações descritas por Medlyn *et al.* (1999).

Com o objetivo de obter valores mais reais, a curva de A em resposta a C_i foi reajustada para A- C_c , onde C_c é a concentração de CO_2 presente no sítio de carboxilação da Rubisco (cloroplasto), conforme modelo proposto por Epron *et al.* (1995). Para determinar V_{cmax} utilizou-se a equação de Farquhar *et al.* (1980). Os valores de V_{cmax} foram normalizados

a 25 °C, utilizando as equações descritas por Medlyn *et al.* (1999). Os dados de C_c também foram utilizados para calcular os valores de g_m ($g_m = A/C_i - C_c$; Ethier e Livingston 2004), onde A , representa a taxa de fotossíntese, C_i e C_c a concentração de CO_2 nos espaços intercelulares e no cloroplasto, respectivamente.

Para examinar as diferenças médias entre as espécies, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). O efeito das condições ambientais (luminosidade, temperatura e umidade relativa do ar) em g_s , g_m , A_{max} , e outras variáveis das trocas gasosas foram examinados mediante análise de regressão. As análises estatísticas foram examinadas no programa estatístico SAEG 9.0 da Universidade Federal de Viçosa, MG.

3. RESULTADOS

As diferenças entre as espécies foram significativas ($p < 0,05$) para A_{pot} , g_s , g_m , R_d e I_c . Entretanto, os valores de fotossíntese saturada por luz (A_{max}) e do rendimento quântico aparente (Φ) não diferiram entre as espécies ($p > 0,05$). Em todas as espécies observou-se que os valores máximos de A_{max} foram atingidos em irradiância de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 1), com R_d e Φ em média de $0,05 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e de $0,04 \text{ mol de } CO_2 \text{ mol f\u00f3tons}$.

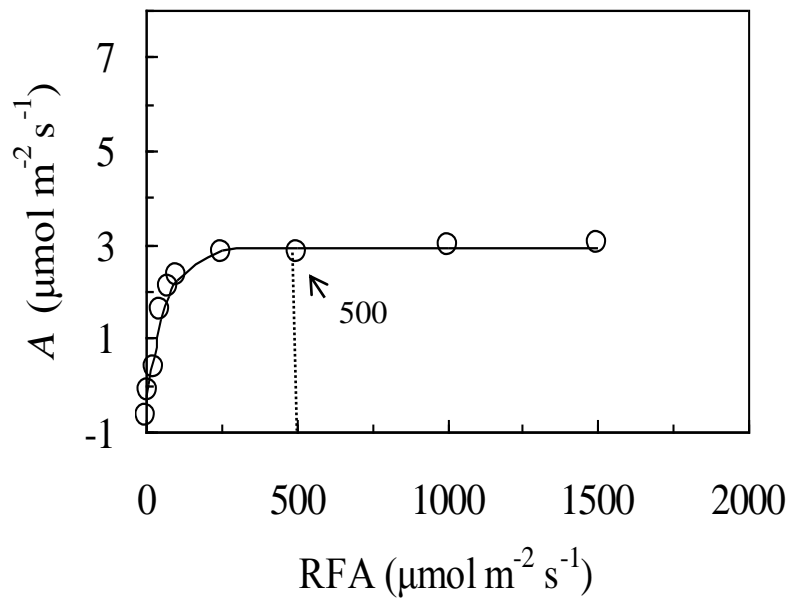


Figura 1. Fotossíntese (A) em função da radiação fotossinteticamente ativa (RFA). A linha contínua representa o ajuste dos dados. Os símbolos mostram a média dos dados observados em cinco espécies e quatro plantas por espécie. A linha tracejada vertical indica o ponto de saturação da fotossíntese por luz e o número dentro do painel mostra o valor de RFA em $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Myrcia paivae superou as outras espécies apresentando os maiores valores de A_{pot} , g_s , R_d e I_c sendo que para A_{pot} o valor foi o dobro daquele observado em *E. bracteosa* (Figura 2B). Contrário ao que ocorreu com g_s , *M. paivae* apresentou o menor valor de g_m , onde os valores máximos foram observados em *P. carthagenensis* (Figura 2C). Os menores valores de R_d e I_c foram observados em *M. guianensis* (Figura 3). A irradiância de compensação média para cada espécie também foram baixas, cuja média foi de $11,3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3C).

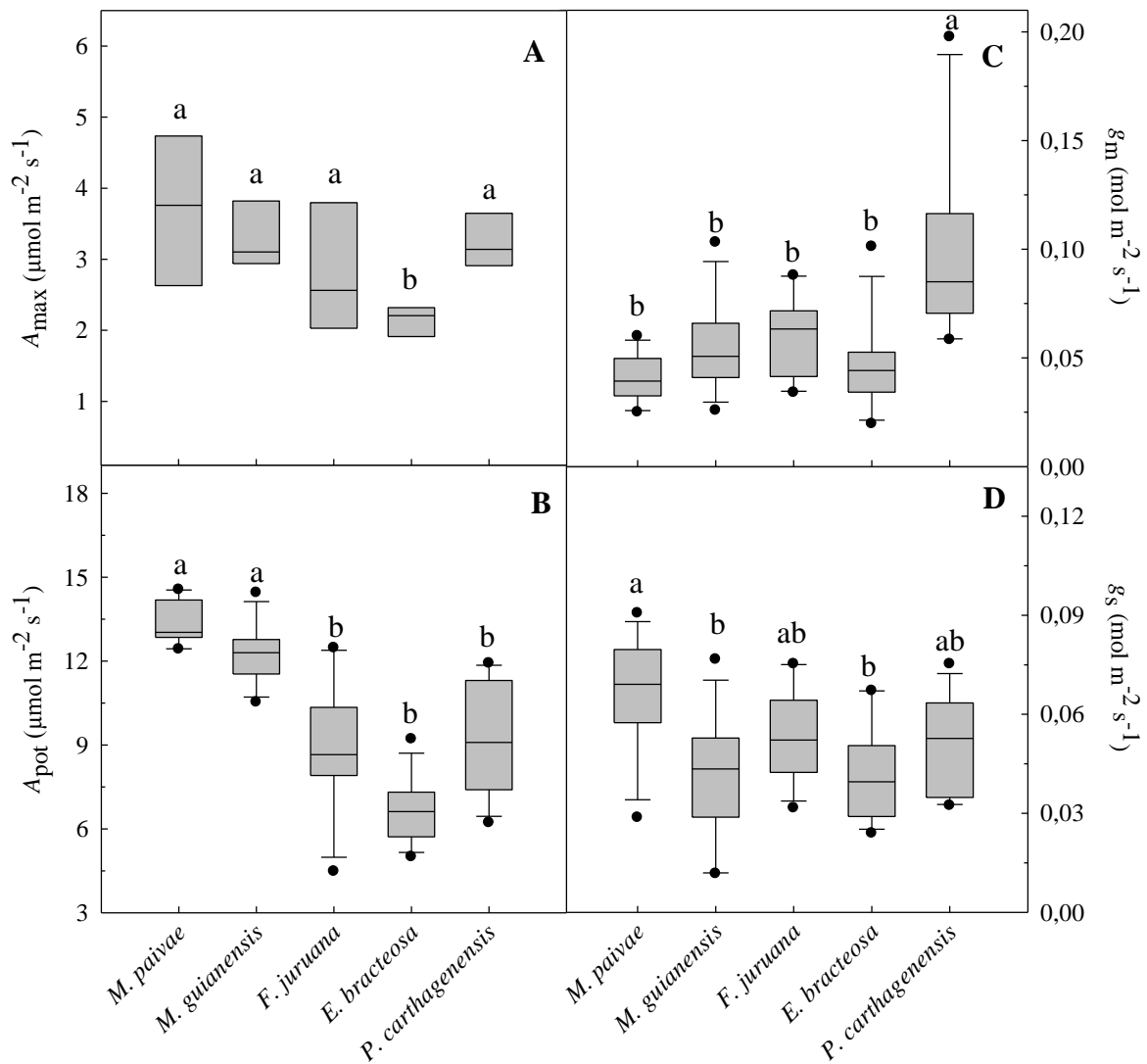


Figura 2. Média por espécie da fotossíntese saturada por luz (A_{max} - **A**), fotossíntese saturada por luz e CO_2 (A_{pot} - **B**), condutância estomática (g_s - **C**) e condutância do mesofilo (g_m - **D**). No painel “**A**” cada box representa a média de quatro plantas e 2 folhas por planta. Nos painéis **B**, **C** e **D** cada box representa a média de quatro plantas e duas folhas coletados em três horários. Médias seguidas de letras iguais nos boxes não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

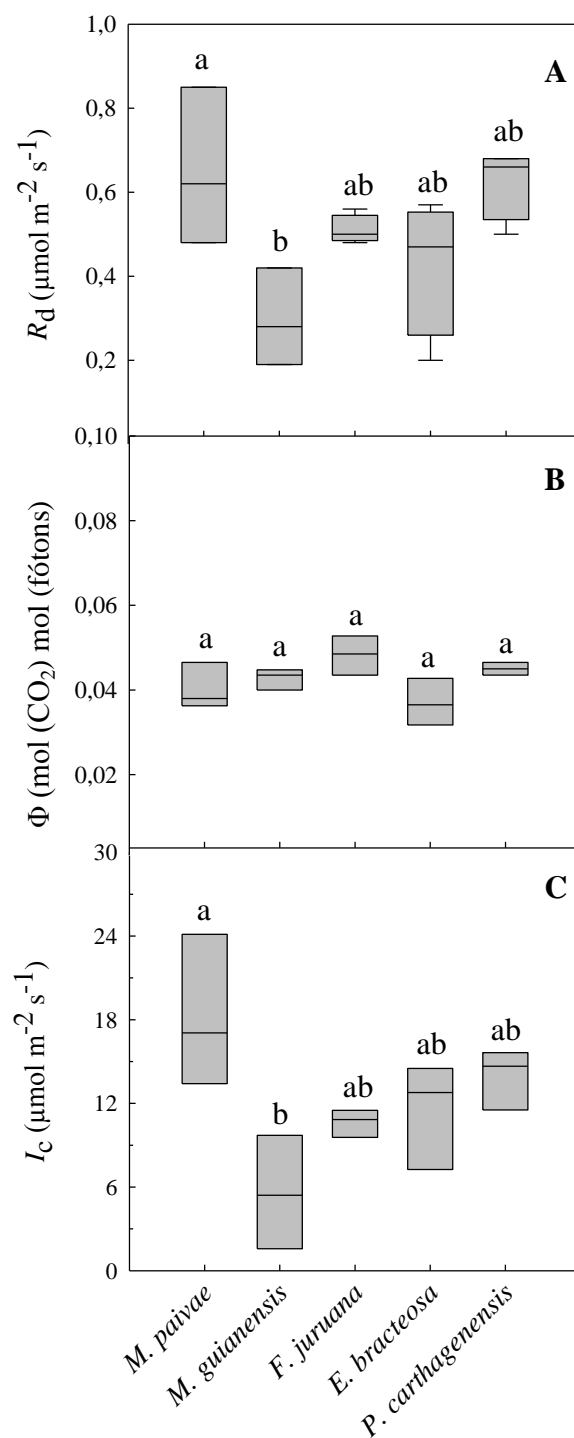


Figura 3. Média por espécie da respiração foliar (R_d -**A**), rendimento quântico aparente (Φ - **B**) e a irradiância de compensação (I_c - **C**). Cada box representa a média de quatro plantas e 2 folhas por planta. Médias seguidas de letras iguais nos boxes não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Em $[\text{CO}_2]$ ambiente, g_m variou de $0,04 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ em *M. Paivae* para $0,1 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ em *P. carthagenensis* (Figura 2). A condutância do mesófilo não foi constante ao longo dos valores das relações $A-C_i$ e $A-C_c$, demonstrando forte dependência a $[\text{CO}_2]$ (Figura 4). Observou-se que em baixas concentrações de CO_2 (até $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) g_m aumentou linearmente com C_i ou C_c , o efeito contrário foi observado em concentrações elevadas de CO_2 , quando g_m declinou com o aumento da $[\text{CO}_2]$.

No ponto máximo de saturação de CO_2 (isto é $2000 \mu\text{mol mol}^{-1}$) g_m apresentou redução entorno de 40% em comparação àquela observada em $[\text{CO}_2]$ ambiente.

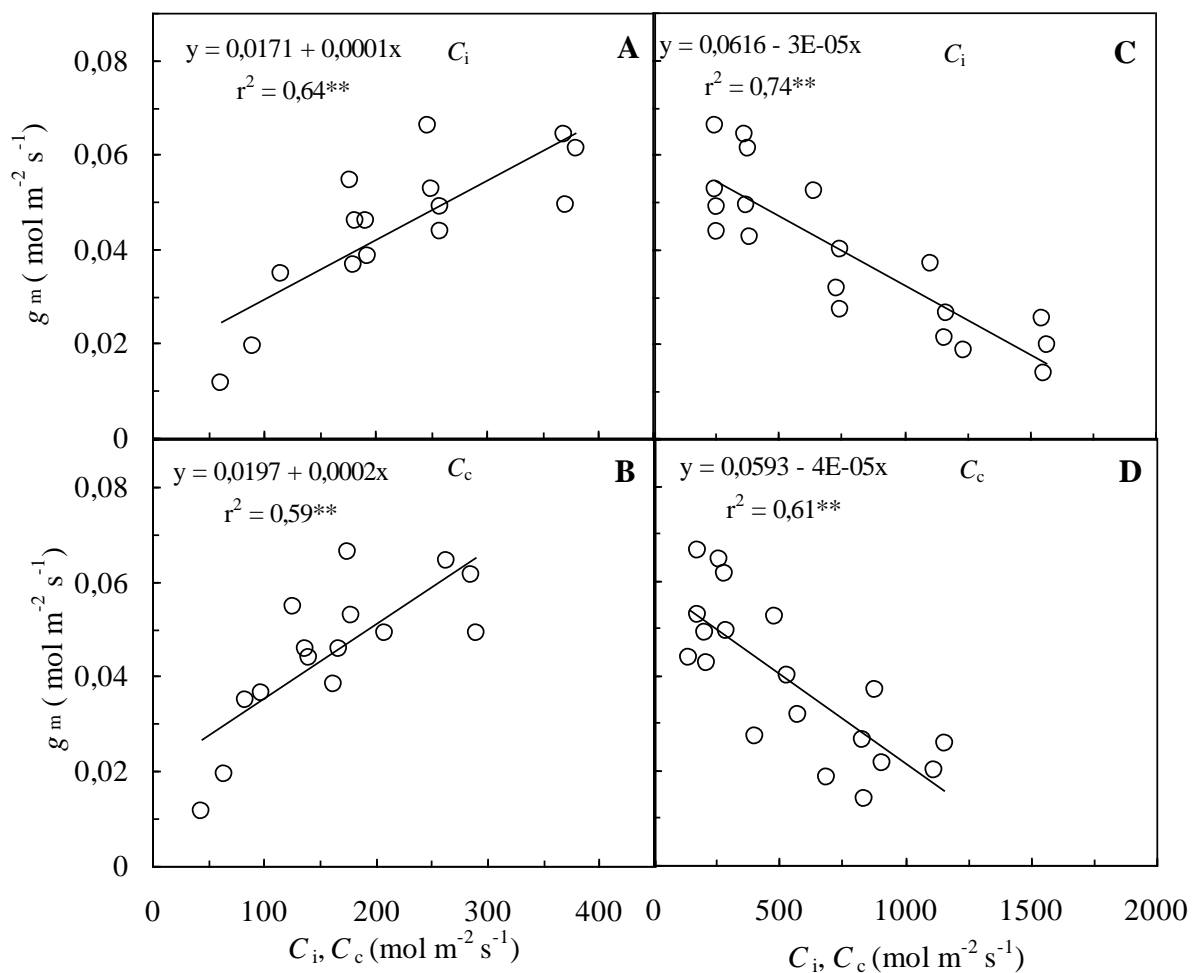


Figura 4. Condutância do mesofilo (g_m) em função da concentração de CO₂ nos espaços intercelulares (C_i – **A**, **C**) e no cloroplasto (C_c – **B**, **D**) em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque. Cada símbolo representa a média de cinco espécies sendo quatro plantas por espécie e duas folhas por planta.

As curvas $A-C_i$ e $A-C_c$ foram analisadas separadamente nas cinco espécies. A parte inicial da curva mostrou dependência quase linear de A versus C_i ou C_c , indicando limitação por carboxilação da Rubisco (A_c). Uma segunda parte foi claramente limitada de forma curvilínea (Figuras 5-9).

Em todas as curvas $A-C_i$ observou-se que a transição da fotossíntese limitada por A_c para a limitada por A_j foi superior a observada nas curvas $A-C_c$. Nas espécies *M. paivae* e *F. juruana* as curvas $A-C_c$ mostram que em baixa $[CO_2]$ a fotossíntese estava limitada tanto por A_c quanto por A_j (Figuras 5 e 8B).

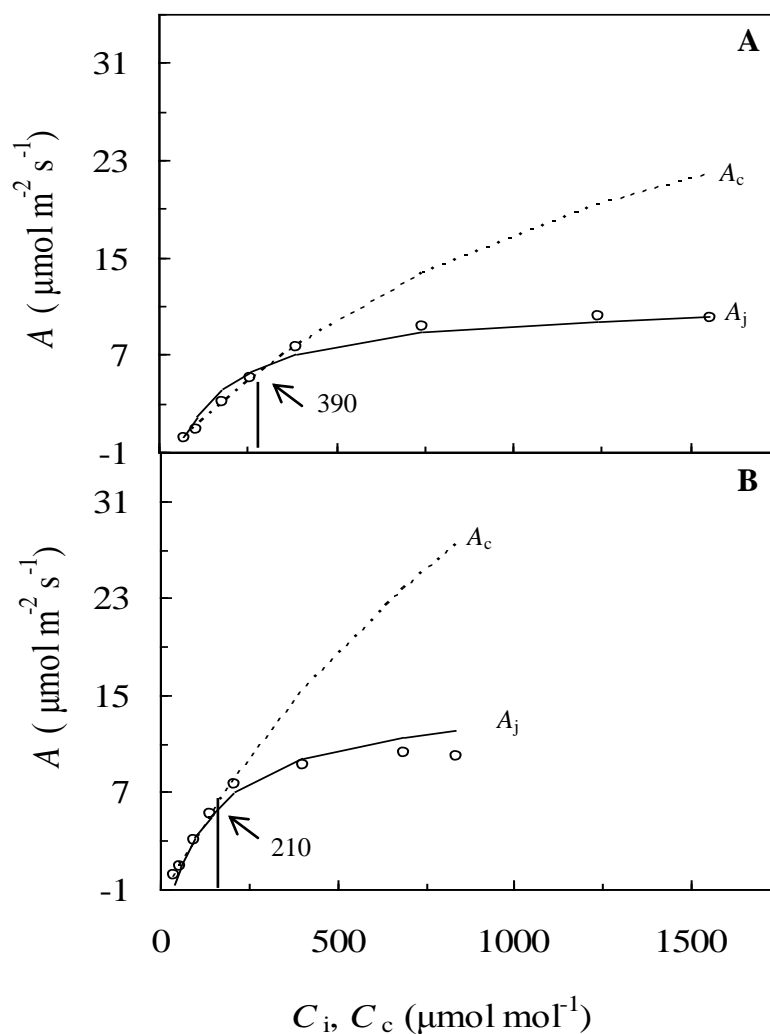


Figura 5. Fotossíntese em resposta a concentração de CO₂ intercelular (C_i – **A**) e no cloroplasto (C_c – **B**) de *M. Paivae*. A linha tracejada mostra a limitação da fotossíntese imposta pela taxa de carboxilação da Rubisco (A_c) e a linha contínua a limitação pelo transporte de elétrons (A_j). A linha contínua vertical indica o valor de C_i ou C_c em que ocorre a transição da limitação da fotossíntese pela A_c para A_j .

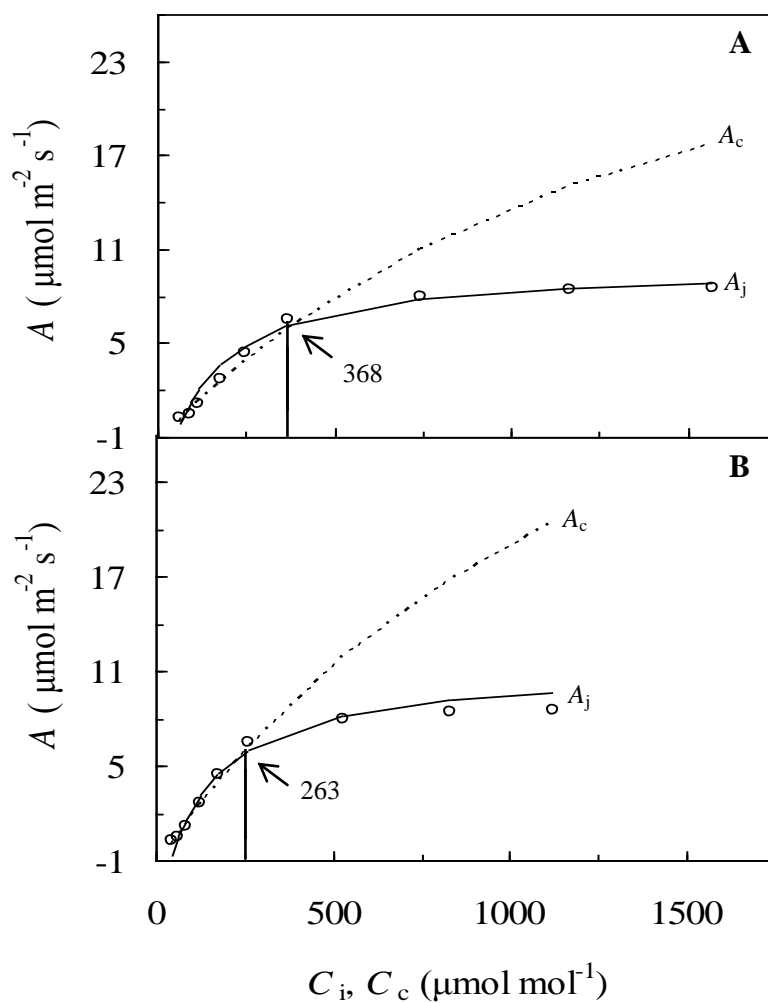


Figura 6. Fotossíntese em resposta a concentração de CO_2 intercelular (C_i – **A**) e no cloroplasto (C_c – **B**) de *M. guianensis*. A linha tracejada mostra a limitação da fotossíntese imposta pela taxa de carboxilação da Rubisco (A_c) e a linha contínua a limitação pelo transporte de elétrons (A_j). A linha contínua vertical indica o valor de C_i ou C_c em que ocorre a transição da limitação da fotossíntese pela A_c para A_j .

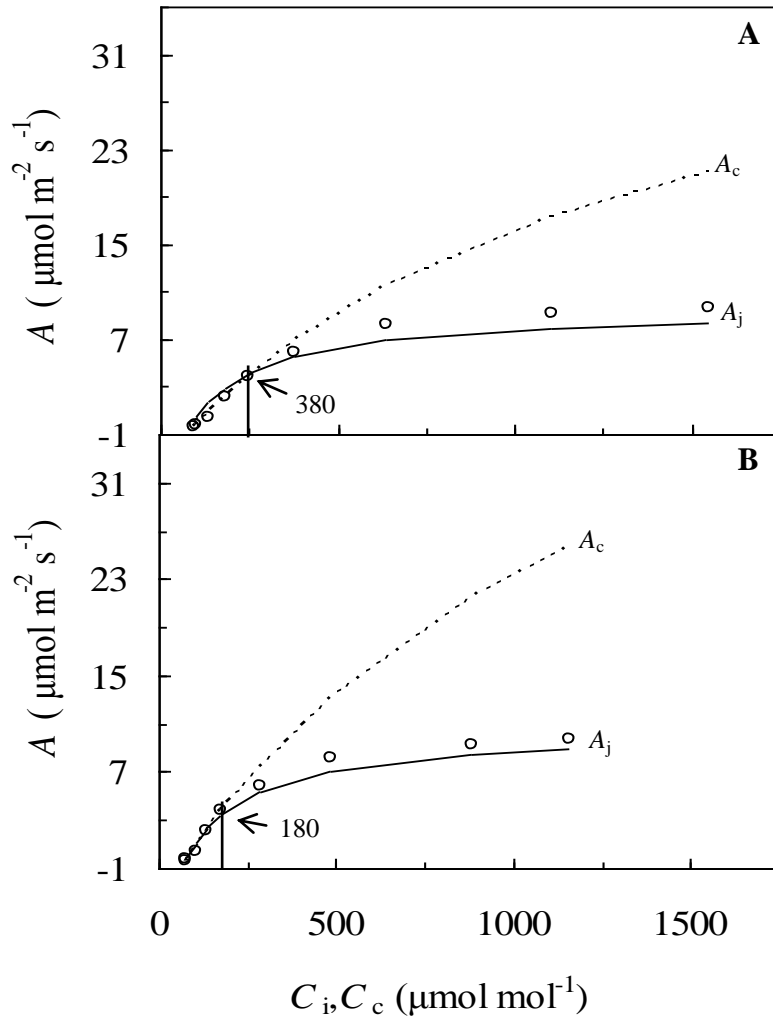


Figura 7. Fotossíntese em resposta a concentração de CO_2 intercelular (C_i – **A**) e no cloroplasto (C_c – **B**) de *F. juruana*. A linha tracejada mostra a limitação da fotossíntese imposta pela taxa de carboxilação da Rubisco (A_c) e a linha contínua a limitação pelo transporte de elétrons (A_j). A linha contínua vertical indica o valor de C_i ou C_c em que ocorre a transição da limitação da fotossíntese pela A_c para A_j .

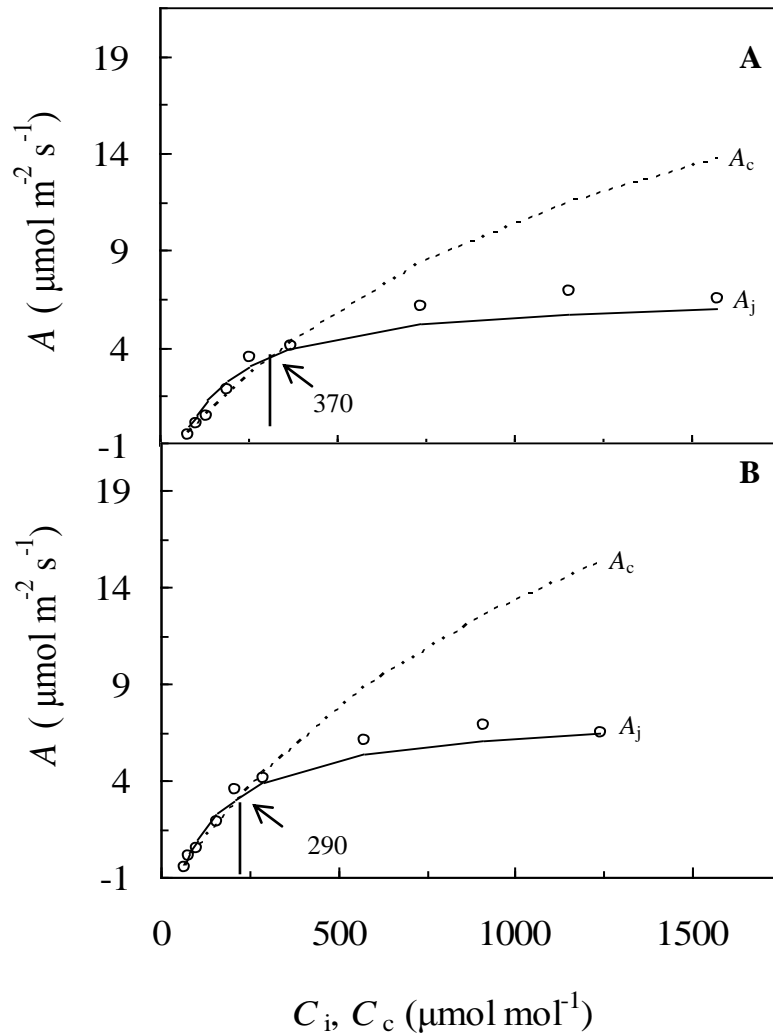


Figura 8. Fotossíntese em resposta a concentração de CO_2 intercelular (C_i – **A**) e no cloroplasto (C_c – **B**) de *E. bracteosa*. A linha tracejada mostra a limitação da fotossíntese imposta pela taxa de carboxilação da Rubisco (A_c) e a linha contínua a limitação pelo transporte de elétrons (A_j). A linha contínua vertical indica o valor de C_i ou C_c em que ocorre a transição da limitação da fotossíntese pela A_c para A_j .

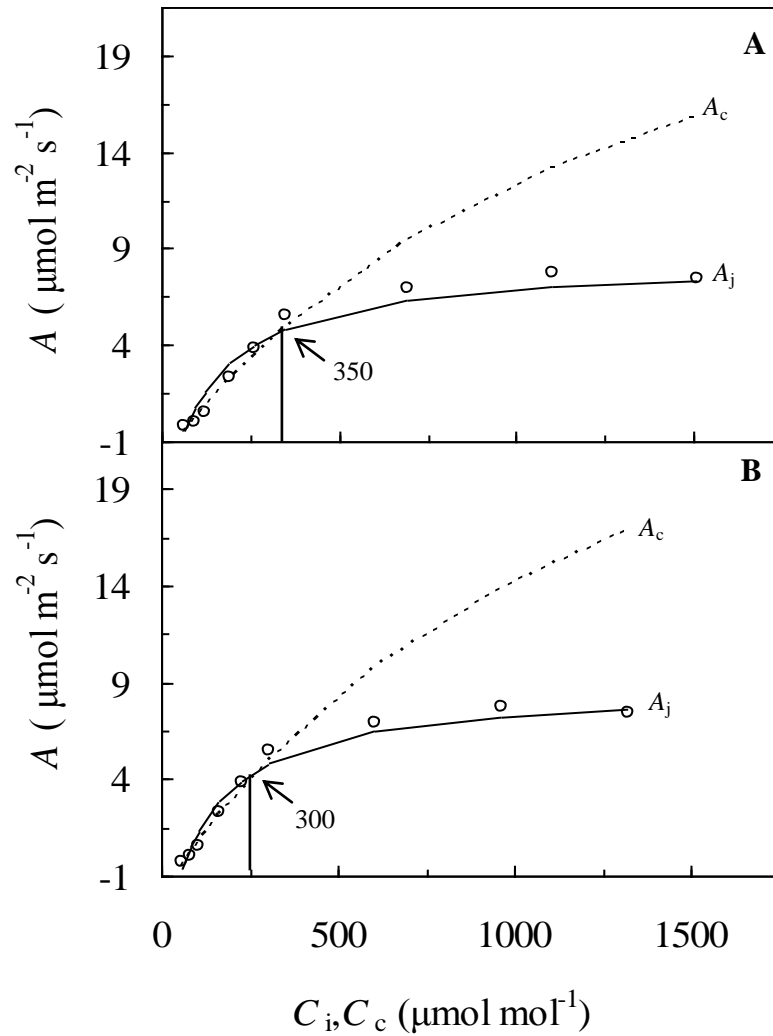


Figura 9. Fotossíntese em resposta a concentração de CO_2 intercelular (C_i – **A**) e no cloroplasto (C_c – **B**) de *P. carthagenensis*. A linha tracejada mostra a limitação da fotossíntese imposta pela taxa de carboxilação da Rubisco (A_c) e a linha contínua a limitação pelo transporte de elétrons (A_j). A linha contínua vertical indica o valor de C_i ou C_c em que ocorre a transição da limitação da fotossíntese pela A_c para A_j .

Em média os valores de V_{cmax} calculados com a concentração de CO_2 dos cloroplastos ($V_{\text{cmax-Cc}}$) foram 30% maiores em relação aos valores calculados com a concentração de CO_2 dos espaços intercelulares ($V_{\text{cmax-Ci}}$). Entretanto, a diferença entre J_{max} calculado com C_c e C_i ficou entorno de 12% (Figura 10).

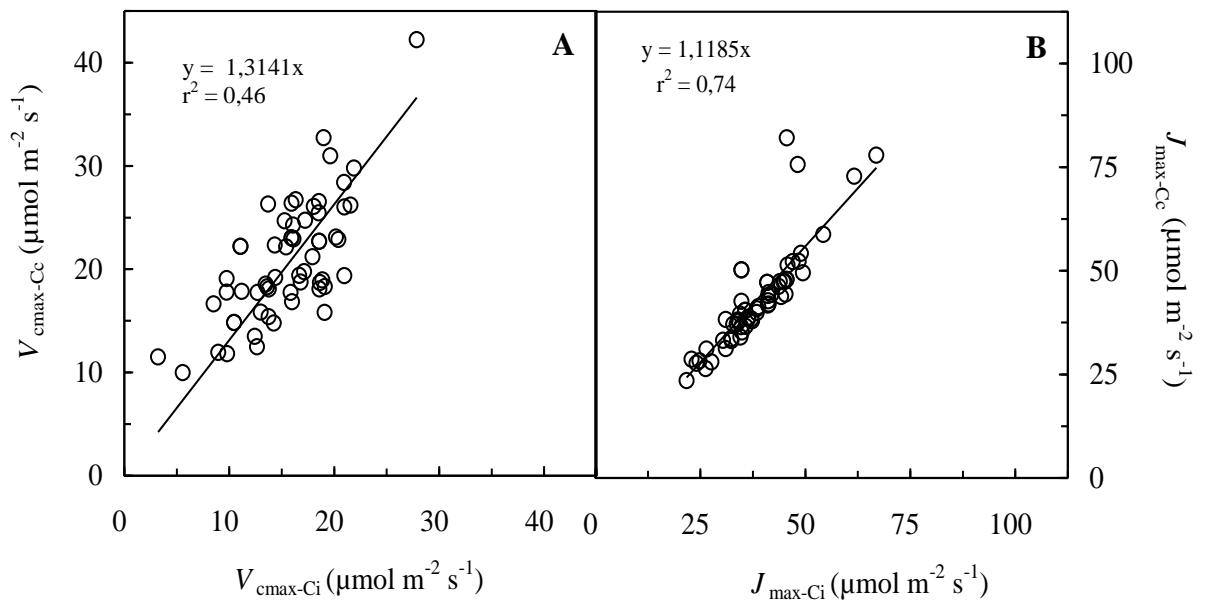


Figura 10. Velocidade máxima de carboxilação da Rubisco ($V_{\text{cmax-Cc}}$) e taxa máxima de transporte de elétrons ($J_{\text{max-Cc}}$) calculados com a concentração de CO_2 dos cloroplastos (C_c) e $V_{\text{cmax-Ci}}$ (A) e $J_{\text{max-Ci}}$ (B) calculados com base na concentração de CO_2 dos espaços intercelulares (C_i). Dados em coletadas em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque. Valores normalizados a 25°C .

Também foi observada uma relação significativa ($p < 0,01$) entre A_{\max} e V_{cmax} (Figura 11 A,B), o oposto é observado com a regeneração da Ribulose 1,5 bisfosfato, cuja relação mais acentuada ($p < 0,01$) foi observada entre A_{pot} e J_{max} do que em relação a V_{cmax} (Figura 11 C,D).

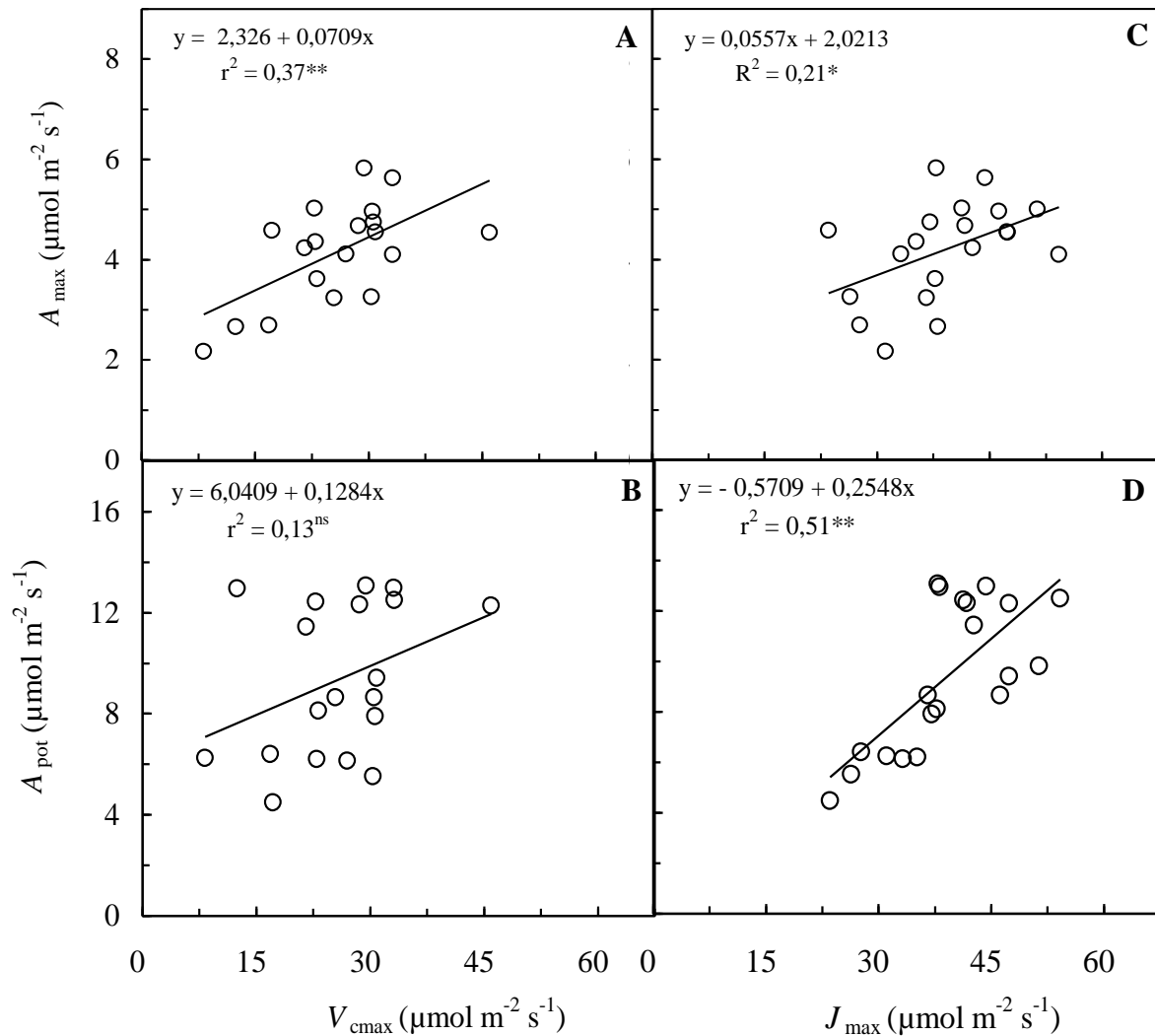


Figura 11. Fotossíntese saturada por luz (A_{\max} - **A**, **C**) e fotossíntese saturada por luz e CO_2 (A_{pot} - **B**, **D**) em função da velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) e taxa máxima de transporte de elétrons (J_{max}). Dados em coletadas em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque. Cada símbolo representa média de duas folhas por planta. Significativo a 1% (**) e 5% (*) de probabilidade; ns: não significativo a 5% de probabilidade. Valores de V_{cmax} e J_{max} calculado normalizados a 25°C .

4. DISCUSSÃO

Os valores de A_{\max} , Φ e R_d observados estão dentro da faixa de valores encontrados em outras espécies florestais, tais como *M. guianensis*, *Hydrophyllum virginianum*, *Quercus rubra* e *Aesculus glabra* (Bazzaz e Carlson 1982; Azevedo e Marengo 2012). Marengo e Vieira (2005) também encontraram em espécies jovens de sucessão tardia valores de A_{\max} e Φ similares aos relatados neste estudo, onde a média de A_{\max} para *Minquartia guianensis* foi $2,97 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O baixo ponto de saturação da fotossíntese juntamente com baixo R_d e I_c são condizentes para plantas tolerantes a sombra. Em geral plantas aclimatadas a baixa luminosidade maximizam a captura de luz para utiliza-la na fotossíntese, em contrapartida minimizam a perda por respiração (Valladares e Niinemets 2008).

A baixa taxa fotossintética reflete os mecanismos de plantas desenvolvidas à sombra, cujo investimento é maior em complexos coletores de luz do que em proteínas do ciclo de Calvin e do transporte de elétrons (Laisk *et al.* 2005). Os valores de A_{pot} relatados neste estudo são semelhantes aos descritos por outros autores (Mendes 2009; Nascimento 2009) em espécies no sub-bosque da floresta. Magalhães (2010) em estudo com cinco espécies da Amazônia, inclusive *Minquartia guianensis*, também encontrou valores de A_{pot} (6,75 a $11,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) semelhantes aos relatados neste trabalho.

Embora seja conhecida que g_m apresenta rápidas mudanças em resposta ao CO_2 (Centritto *et al.* 2003; Flexas *et al.* 2007) não está claro se esta resposta é um padrão efetivo das plantas, no tocante para a Amazônia. Pois, embora quatro espécies tenham apresentado este padrão, a falta de resposta em *P. carthagenensis* mostra que este efeito não é uma regra entre as espécies. Nas espécies onde foi possível observar esta variação, g_m variou em um curto período de tempo (em minutos) durante as mudanças nas concentrações de CO_2 nas curvas $A-C_i$ e $A-C_c$. Esta mudanças rápidas de g_m em um curto período de exposição a diferentes $[\text{CO}_2]$ parece seguir uma tendência em diferentes espécies e tipos de vegetação

(Bunce 2010; Douthe *et al.* 2011; Flexas *et al.* 2007; Vrabl *et al.* 2009; Flexas *et al.* 2012) onde uma correlação negativa é observada entre g_m e C_i e C_c , o que mostrou um declínio acentuado de g_m em altas concentrações de C_i e C_c , isto é, quando a fotossíntese não é mais limitada pela disponibilidade de CO_2 . Este resultado mostra que neste ponto da curva a fotossíntese não é mais limitada pela disponibilidade de CO_2 e sim pela resistência do mesófilo que por sua vez influencia a atividade da Rubisco.

Esta grande diferença nos valores de g_m só é possível observar quando se tem os extremos de um gradiente de concentração de CO_2 (0-2000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Por outro lado, a variação de g_m dentro de uma pequena faixa de concentrações de CO_2 tende a ser menor (por exemplo, na faixa de C_i ou C_c 300-500 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Isto é particularmente importante mediante as projeções para as mudanças na $[CO_2]$ para as próximas décadas, quando a concentrações de CO_2 ambiental poderá atingir cerca de 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Cox *et al.* 2004; Malhi *et al.* 2008).

Várias explicações para o declínio de g_m com o aumento de CO_2 tem sido propostas que vão desde o ajuste para o equilíbrio entre C_i e C_c , evitando grandes reduções no pH celular (Flexas *et al.* 2012) aos vazamentos que ocorrem em concentrações elevadas de CO_2 (Tholen e Zhu 2011). Além disso, outros fatores internos tais como a respiração também podem afetar a determinação da g_m com as variações das $[CO_2]$, onde R_d pode ser reduzido em até 30% em altas concentrações de CO_2 (Bruhn *et al.* 2007). Entretanto, além da fotossíntese e da fotorrespiração, outros processos tais como a reação Mehler ou redução de nitrito demonstraram consumir até 10% do total do transporte de elétrons (Miyake e Yokota 2000).

Os baixos valores de $V_{c_{max}}$ calculados a partir da curva $A-C_i$ ($V_{c_{max}-C_i}$) em relação aqueles obtidos pelas curvas $A-C_c$ indicam que os valores de $V_{c_{max}}$ obtidos por C_i são subestimados. De acordo com Manter e Kerrigan (2004), a resistência mesófilica pode estar

relacionada à baixa estimativa de V_{cmax} calculada pela curva A/C_i em comparação aos valores obtidos pela curva A/C_c .

A relação positiva entre A_{max} vs V_{cmax} e não significativa entre A_{max} vs J_{max} mostra que, nas plantas aqui estudadas apenas a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco foi limitante para a taxa fotossintética em $[\text{CO}_2]$ ambiente o que está de acordo com Sage e Kubien (2007). O oposto parece ocorrer em altas concentrações de CO_2 quando J_{max} é o fator mais limitativo, e, assim, uma correlação mais estreita entre A_{pot} e J_{max} foi observada.

5. CONCLUSÃO

1. As diferenças entre as curvas de resposta ao CO_2 obtidas por C_i e C_c , mostram como a resistência do mesofilo influencia a passagem do CO_2 até os sítios de carboxilação da Rubisco. Desta forma, é recomendado sempre que possível à utilização dos valores g_m para os cálculos relacionados a trocas gasosas, para a obtenção de valores mais realísticos.
2. Neste estudo em baixas $[\text{CO}_2]$ apenas a atividade da Rubisco foi limitante para a fotossíntese saturada por luz, mas em altas $[\text{CO}_2]$ a fotossíntese potencial (A_{pot}) está limitada não mais por este agente, mas pela baixa condutância do mesofilo observada em concentrações elevadas de CO_2 .
3. Mudanças significativas nas concentrações de CO_2 causam efeito na condutância do mesofilo. Na concentração de CO_2 ambiente (~ 380 ppm) a condutância do mesofilo apresenta seu ápice nas plantas estudadas. Entretanto, caso haja um drástico acréscimo na concentração de CO_2 atmosférico é possível que a resistência do mesofilo seja elevada em mais de 50%.
4. Os maiores valores de V_{cmax} e J_{max} calculado com valores C_c mostra que os valores obtidos C_i são subestimados, o que destaca a importância do uso C_c no cálculo V_{cmax} e J_{max} .

Condutância do mesofilo e parâmetros de trocas gasosas em função do horário do dia em espécies florestais na Amazônia Central

Parte do capítulo aceito para publicação na revista Photosynthetica

RESUMO

Um dos fatores que determinam a concentração de CO₂ nos cloroplastos (C_c) é a condutância do mesofilo (g_m). A determinação precisa de C_c é essencial para parametrizar modelos que visam estimar as taxas de assimilação de carbono nos ecossistemas florestais. Os objetivos deste estudo foram determinar o efeito do horário do dia nos parâmetros fotossintéticos e de fluorescência e avaliar como a condutância do mesofilo obtida pelo método irga-fluorômetro difere da calculada utilizando apenas os dados de trocas gasosas (método-irga). Foram utilizadas cinco espécies de árvores em condição de sub-bosque na Amazônia Central (*Myrcia paivae*, *Minquartia guianensis*, *Eschweleira bracteosa*, *Faramea juruana* e *Psychotria carthagenensis*). Os parâmetros fotossintéticos foram determinados utilizando um analisador de gases por infravermelho (IRGA). A condutância do mesofilo (g_m) foi determinada utilizando medidas de trocas gasosas em conjunto com dados de fluorescência obtidos utilizando um fluorômetro acoplado à câmara do irga. Além disso, g_m também foi determinada usando apenas dados do IRGA. A média de g_m determinada com o IRGA-fluorômetro foi de 0,06 mol m⁻² s⁻¹ e 0,1 mol m⁻² s⁻¹ utilizando apenas os dados do irga. Os valores de g_m , condutância estomática (g_s), taxa de transporte de elétrons (J_F) e fotossíntese saturada por luz (A_{max}) foram menores no período da tarde em relação ao da manhã. Entretanto, não houve efeito do horário do dia em V_{cmax} . Os valores de g_m calculados utilizando apenas dados do irga foram o dobro do que os obtidos utilizando o método IRGA-

fluorômetro, o que ressalta a importância da utilização do método de fluorescência da clorofila para a obtenção de dados g_m mais robustos.

Palavras-chave: condutância estomática, a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco, taxa de transporte de elétrons, concentração de CO₂ nos cloroplastos.

Mesophyll conductance and gas exchange parameters as a function of time of day in forest tree species in Central Amazonia

ABSTRACT

One of the factors that determine CO₂ concentration in the chloroplast (C_c) is mesophyll conductance (g_m). Accurate determination of C_c is essential to determine photosynthetic parameters used to model carbon assimilation in forest ecosystems. The aims of this study were to determine the effect of time of day on photosynthetic parameters and to assess how mesophyll conductance determined using gas exchange combined with fluorescence differs from that obtained using gas exchange data alone. We used saplings of Amazonian tree species (*Myrcia paivae*, *Miconia guianensis*, *Eschweleira bracteosa*, *Faramea juruana* e *Psychotria carthagenensis*). Photosynthetic parameters were measured using an infrared gas analyzer (IRGA). Mesophyll conductance (g_m) was determined using gas exchange combined with fluorescence data obtained using a fluorometer coupled to the IRGA head. In addition, g_m was also determined using gas exchange data alone. Mean of g_m determined with the irga-fluorometer was 0.06 mol m⁻² s⁻¹ and 0.1 mol m⁻² s⁻¹ for the irga method. Mesophyll conductance, stomatal conductance (g_s), electron transport rate (J_F) and light saturated

photosynthesis (A_{\max}) were lower in the afternoon than in the morning. However, no effect of time of day was observed on V_{cmax} . Values of g_m calculated using gas exchange data alone was almost the double those obtained using the IRGA-Fluorescence method, which emphasizes the importance of using the irga/chlorophyll fluorescence method to obtain more robust g_m data.

Key words: stomatal conductance, maximum carboxylation velocity of Rubisco, electron transport rate, CO₂ concentration in the chloroplasts.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os fatores que afetam a fotossíntese, a condutância estomática (g_s) está entre os mais estudados (Kumar *et al.* 1999; Park e Furukawa 1999; Massacci *et al.* 2008). Vários fatores podem afetar a abertura estomática, dentre eles concentração de CO_2 , luz e umidade relativa. Embora a fotossíntese seja um dos parâmetros fisiológicos mais importantes, nos modelos matemáticos que visam prognosticar a taxa de assimilação de carbono dos ecossistemas, a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) é utilizada como parâmetro principal, pois utiliza a concentração de CO_2 nos espaços intercelulares (C_i) e não a concentração de CO_2 do ambiente (C_a), minimizando assim o efeito da condutância estomática (g_s).

Em muitos estudos tem-se utilizado o modelo de Farquhar *et al.* (1980), o qual implicitamente assume-se que a concentração de CO_2 nos espaços intercelulares é a mesma dos cloroplastos ($C_i = C_c$). Este modelo tem sido utilizado por décadas devido à dificuldade em determinar a concentração de CO_2 nos cloroplastos (C_c), o que normalmente envolve a determinação da condutância do mesofilo (g_m).

Os valores de g_m podem ser determinados utilizando: (i) a técnica dos isótopos estáveis (Evans *et al.* 1986); (ii) dados das trocas gasosas (método Iriga; Ethier e Livingston 2004) e (iii) dados de trocas gasosas e da fluorescência da clorofila (Bongi e Loreto 1989; Di Marco *et al.* 1990) chamado aqui de método iriga-fluorômetro. Este último método tem como base a relação que existe entre o rendimento quântico do fotossistema II (Φ_{FSII}) e eficiência quântica da fotossíntese (Φ_{CO_2} ; Genty *et al.* 1989). Embora alguns métodos utilizados para calcular C_c sejam conhecidos há décadas (Evans 1986), uma das limitações para a sua determinação tem sido a dificuldade em calcular a condutância do mesofilo (g_m). Esta situação tem mudado com o surgimento de equipamentos portáteis que permitem determinação de parâmetros necessários para o cálculo de g_m .

Valores de g_m em plantas superiores mostram oscilação de $0,09 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (gimnospermas) a $0,45 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (herbáceas; Flexas *et al.* 2008). Entretanto, ao nosso conhecimento, há poucos (se algum) registro de valores de g_m e parâmetros fotossintéticos calculados utilizando C_c para a Amazônia central. A determinação precisa de C_c é essencial para parametrizar modelos (eg. SiB2, IbiS, CLM) que visam estimar as taxas de assimilação de carbono nos ecossistemas florestais (Sellers *et al.* 1997). Com isso, partimos das seguintes hipóteses; que os valores de g_m são influenciados pela variação diurna da mesma forma que tem sido relatado para os estômatos. A segunda hipótese é que esta variação independe da espécie estudada. Dessa forma, os objetivos deste estudo foram determinar o efeito do horário do dia nos parâmetros fotossintéticos e avaliar como a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}), calculado a partir de $[\text{CO}_2]$ no espaço intercelular (C_i) difere da obtida com C_c .

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Estação Experimental de Silvicultura Tropical (Núcleo ZF-2, $02^\circ 36' 21'' \text{ S}$, $60^\circ 08' 11'' \text{ W}$) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em 2010. A vegetação é caracterizada como floresta densa de terra-firme. A temperatura média anual está entorno de 27°C . A precipitação média anual é de, aproximadamente, 2.240 mm (INMET 2012). A umidade relativa apresenta uma média anual de 84%. As árvores na fase adulta podem atingir cerca de 30 m de altura com folhas hipoestomáticas (Camargo e Marengo 2011). Para o estudo utilizou-se as espécies *Myrcia paivae* Berg. (Myrtaceae), *Minqartia guianensis* Aubl. (Olacaceae), *Eschweleira bracteosa* Poepp. ex O. Berg (Lecythidaceae), *Faramea juruana* K. Krause (Rubiaceae) e *Psychotria carthagenensis* (Rubiaceae) utilizando como repetições quatro árvores sob condição de sub-bosque (entre 1 e

3 m de altura) para cada espécie, no sub-bosque da floresta. Estas espécies foram escolhidas em virtude da disponibilidade de repetições com altura semelhante na área do estudo.

As medidas de trocas gasosas e de fluorescência foram realizadas usando um sistema de trocas gasosas (Li-6400, Li-Cor, Lincoln, NE, EUA), com câmara foliar de 2 cm² e um fluorômetro acoplado (Li-6400-40, Li-Cor). As coletas dos dados foram realizadas em folhas completamente expandidas sendo duas folhas por planta entre agosto e outubro de 2010 (época de menor precipitação). As taxas fotossintéticas foram determinadas em diferentes concentrações de CO₂ (curvas da relação A/C_i) em condição de luz saturante (500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, valor determinado em experimentos preliminares).

Para determinar a fotossíntese saturada por luz (A_{max}), foi determinada utilizando luz saturante (500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e concentração de CO₂ ambiente (380 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). O protocolo utilizado para determinar a relação A/C_i foi conforme o descrito por Long e Bernachi (2003). V_{cmax} foi calculado conforme Farquhar *et al.* (1980) utilizando a concentração de CO₂ do cloroplasto (C_c). Os valores de V_{cmax} foram normalizados a 25 °C, utilizando as equações descritas por Medlyn *et al.* (1999).

A fluorescência da clorofila (F) foi determinada aplicando um pulso de luz saturante de 6000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os dados de fluorescência foram utilizados para calcular Φ_{FSII} , Φ_{CO_2} , qP e NPQ conforme a seguir (Maxwell e Johnson 2000):

$$\Phi_{\text{FSII}} = (F_m' - F_s) / F_m' \quad \text{Equação (1)}$$

Em que: F_s , indica a fluorescência no estado de equilíbrio dinâmico (folha iluminada) e F_m' , a fluorescência máxima da folha em ambiente iluminado. A eficiência quântica da fotossíntese (Φ_{CO_2}) como: $\Phi_{\text{CO}_2} = (A + R_d) / I\alpha$, onde R_d é a respiração no escuro, I a radiação fotossinteticamente ativa e α a absorvância da folha (calculada conforme equação 3). A

dissipação fotoquímica (qP) foi calculada como $(F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$ onde F_0' indica a fluorescência mínima na presença de luz. A dissipação não fotoquímica (NPQ) foi calculada como $[NPQ = (F_m - F_m')/F_m']$, onde F_m a fluorescência máxima. A taxa de transporte de elétrons (J_F) foi calculada de acordo com Maxwell e Johnson (2000):

$$J_F = (I_e \times \Phi_{FSII}) * 0,5 \quad \text{Equação (2)}$$

Em que, J_F é a taxa de transporte de elétrons; I_e , radiação fotossinteticamente ativa absorvida pela folha; 0,5 é a fração de fótons absorvidos que é utilizado pelo FSII. I_e foi calculada conforme a seguir:

$$I_e = RFA * \alpha \quad \text{Equação (3)}$$

Alfa (α) foi calculado como sendo $\alpha = \chi / (\chi + 76)$, em que: χ representa o conteúdo de clorofila por unidade de área (Evans e Poorter 2001). Como uma fração dos elétrons gerados na fase fotoquímica é utilizada em reações alternativas que reduzem O_2 (eg. ciclo água-água), os valores de J_F foram corrigidos conforme a seguir (Gilbert *et al.* 2012):

$$J_{F-cal} = mJ_F \quad \text{Equação (4)}$$

Em que:

$$m = 4(A + R_d) / 0,425 I_e \Phi_{FSII} \quad \text{Equação (5)}$$

Onde, A representa a taxa de fotossíntese e R_d a taxa de respiração (durante a fotossíntese), ambos os parâmetros foram obtidos em condição não-fotorrespiratória (1% de O_2 e 99% N_2); R_d foi determinado em baixa intensidade de luz, como o intercepto da linha de regressão

A/RFA no eixo y (Kok 1948). Os valores de C_c foram determinados conforme a seguir (Epron *et al.* 1995):

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

Em que S^* denota o fator de especificidade da Rubisco calculado como a declividade (coeficiente) da regressão linear da relação entre J_c/J_o e C_i/O e S a especificidade da Rubisco *in vitro* ($2560 \text{ mol mol}^{-1}$, Harley *et al.* 1992). Os parâmetros J_c e J_o representam o fluxo de elétrons direcionados para carboxilação e oxigenação da RuBP, respectivamente. J_c e J_o foram calculados conforme a seguir (Epron *et al.* 1995):

$$J_c = 1/3 [J_{F-cal} + 8 (A + R_d)] \quad \text{Equação (7)}$$

$$J_o = 2/3 [J_{F-cal} - 4 (A + R_d)] \quad \text{Equação (8)}$$

Em que J_{F-cal} corresponde o somatório de J_c e J_o (i.e. $J_{F-cal} = J_c + J_o$), ou seja, refere-se ao fluxo total de elétrons utilizados na atividade da Rubisco (Genty *et al.* 1989), A representa a taxa de fotossíntese e R_d a taxa de respiração. Os valores de J_{F-cal} foram determinados conforme descrito previamente (com a câmara de fluorescência acoplada ao medidor de fotossíntese). A relação C_i/O denota a relação entre os valores de C_i e a concentração de oxigênio nos espaços intercelulares (O_2 , $210 \text{ mmol mol}^{-1}$, Evans e von Caemmerer 1996). A g_m foi determinada conforme Epron *et al.* (1995), considerando que:

$$g_m = A/(C_i - C_c) \quad \text{Equação (9)}$$

Em que A , representa a taxa de fotossíntese, C_i e C_c a concentração de CO_2 nos espaços intercelulares e no cloroplasto, respectivamente. Para fins comparativos, g_m também foi calculada utilizando apenas os dados de trocas gasosas (curva $A-C_i$) na expectativa que este método resulte em valores semelhantes aqueles determinados pelo método do irga-fluorômetro. Neste método os valores de g_m foram calculados seguindo o protocolo de Sharkey *et al.* (2007; <http://www.blackwellpublishing.com/plantsci/pcecalculation/>). O efeito do horário do dia em g_m , g_s , A , V_{cmax} e $J_{\text{F-cal}}$ foi determinado em três horários (08:00-09:30, 12:00-13:30 e 15:00-16:30 h).

Para caracterizar o ambiente físico da área do estudo, foram coletados dados de luminosidade, umidade (UR) e temperatura do ar (T) e de precipitação. A luminosidade, UR e T foram obtidos utilizando sensores específicos (Humitter 50y, Vaisala Oy, Finlândia; Li-190 SA, Li-Cor, NE, EUA) conectados a um datalogger (Li-1400, Li-Cor, NE, EUA). Os sensores foram instalados próximos às plantas estudadas, onde permaneceram durante todo o período do estudo. A precipitação foi medida com um pluviômetro convencional, instalado numa torre de observação a 40 metros de altura, a 3,3 km da área do estudo. Durante o estudo também foi determinada a umidade do solo (S_u) coletando-se amostras de solo próximo às plantas estudadas. S_u foi determinada como $M_u - M_s / M_s$, em que M_u e M_s representam a massa do solo úmido e seco, respectivamente.

Para examinar as diferenças entre as espécies e o efeito do horário do dia, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey ($p \leq 0,05$) foi utilizado para testar a diferença entre os horários do dia nos parâmetros mensurados. O efeito das condições ambientais (luminosidade, temperatura e umidade relativa do ar) em g_s , g_m , A_{max} , e outras variáveis das trocas gasosas foram examinados mediante análise de regressão. As análises estatísticas foram examinadas no programa estatístico SAEG 9.0 da Universidade Federal de Viçosa, MG.

3. RESULTADOS

Durante o estudo (ano de 2010) a precipitação anual foi de 2800 mm. As médias semanais de temperatura e umidade relativa do ar foram semelhantes durante as semanas de coletas dos dados de trocas gasosas (Figura 1A). No período do estudo as médias durante o dia nos valores de RFA, temperatura e umidade relativa do ar são apresentadas na Figura 2B. A média de umidade do solo foi 65%, próximo ao ponto de saturação do solo (umidade de 74%).

As diferenças entre as espécies foram significativas ($p < 0,05$) para g_s e g_m . Entretanto, os valores de A_{max} , J_{F-cal} , $V_{cmax-Cc}$, $V_{cmax-Ci}$, qP , NPQ , Φ_{FSII} e Φ_{CO_2} não diferiram entre as espécies ($p > 0,05$). *M. paivae* superou as outras espécies apresentando os maiores valores de g_s . Em contrapartida, *M. paivae* apresentou o menor valor de g_m -IF, ainda que não diferiu entre as espécies, exceto para *P. carthagenensis* onde a média atingiu $0,1 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Tabela 1).

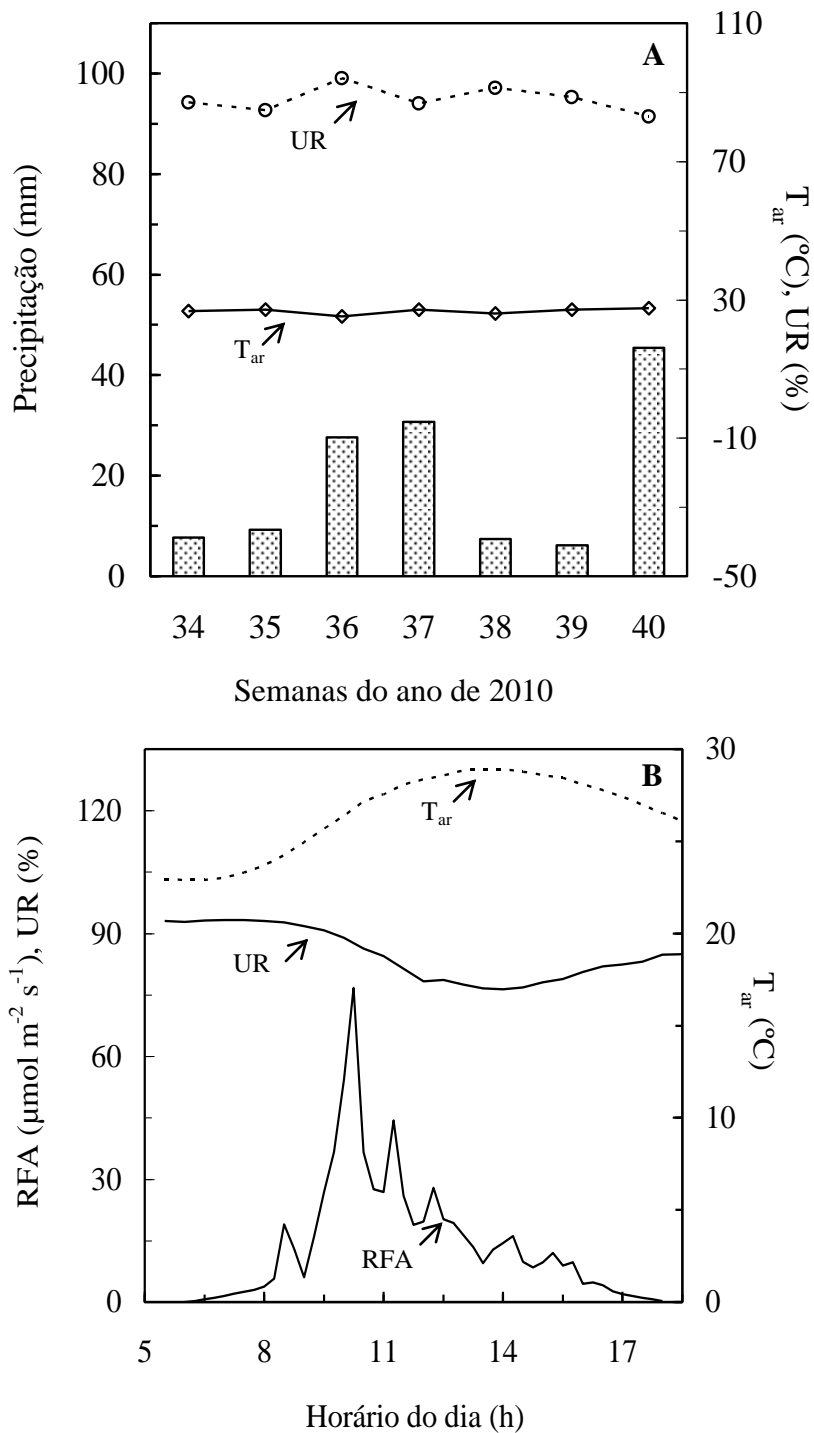


Figura 1. Precipitação (barras), temperatura (T_{ar}) e umidade relativa do ar (RH) semanal no período do estudo (22 de agosto – semana 34 a 10 de outubro de 2010; **A**) e média da radiação fotossinteticamente ativa (RFA), T_{ar} e RH para cada horário do dia durante a coleta de dados de trocas gasosas (**B**). Dados coletados no sub-bosque da floresta (~ 1 m de altura do chão).

Tabela 1. Média por espécie da fotossíntese saturada por luz (A_{\max}), condutância estomática (g_s), condutância do mesofilo calculada pelo método irga-fluorômetro (g_{m-IF}) e método irga (g_{m-I}), taxa de transporte de elétrons (J_{F-cal}), velocidade máxima de carboxilação da rubisco calculada com C_c ($V_{cmax-Cc}$) e C_i ($V_{cmax-Ci}$), dissipação fotoquímica (qP) e não fotoquímica (NPQ), eficiência quântica do fotossistema 2 (Φ_{FSII}), eficiência de assimilação de CO_2 (Φ_{CO_2}).

Variável	Espécie					Média	CV (%)
	<i>M. paivae</i>	<i>M. guianensis</i>	<i>F. juruana</i>	<i>E. bracteosa</i>	<i>P. carthagenensis</i>		
A_{\max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	4,07a	3,73a	3,46a	3,02a	3,86a	3,6	13,8
g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	0,066a	0,040b	0,053ab	0,041b	0,051ab	0,05	18,0
g_{m-IF} ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	0,040b	0,054b	0,060b	0,046b	0,100a	0,06	19,3
g_{m-I} ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	0,10a	0,09a	0,10a	0,14a	0,08a	0,1	35,6
J_{F-cal} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	22,4a	25,6a	22,4a	23,4a	22,9a	23,1	12,7
$V_{cmax-Cc}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	19,0a	18,9a	20,5a	22,0a	24,1a	20,9	17,6
$V_{cmax-Ci}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	15,8a	13,2a	16,5a	14,4a	17,8a	15,6	17,7
qP	0,16a	0,20a	0,23a	0,22a	0,27a	0,22	36,0
NPQ	1,59a	1,95a	1,74a	1,59a	2,07a	1,8	21,4
Φ_{FSII}	0,09a	0,11a	0,10a	0,08a	0,08a	0,09	27,0
Φ_{CO_2}	0,013a	0,012a	0,013a	0,011a	0,013a	0,012	15,9

Valores nas colunas seguidos pela mesma letra não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O efeito do horário do dia foi significativo ($p < 0,05$) tanto para g_s como para A_{max} , mas a interação entre espécie x horário do dia não foi significativa ($p > 0,05$). Os maiores valores de g_s foram encontrados no período da manhã (Figura 2A). Ao final do dia os estômatos responderam apenas parcialmente aos estímulos luminosos, tendo g_s diminuído em torno de 50% no período da tarde em comparação aos valores observados pela manhã o mesmo padrão de declínio foi observado para A_{max} (Figura 2B).

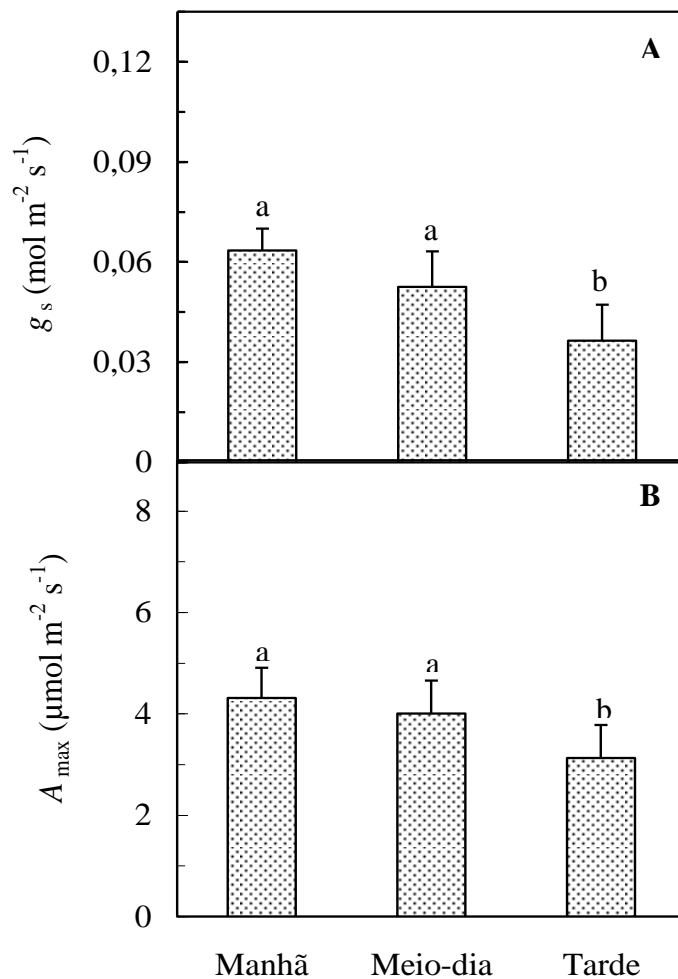


Figura 2. Efeito do horário do dia na condutância estomática (g_s , **A**) e na fotossíntese saturada pela luz (A_{max} , **B**) em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque. Cada barra representa a média de cinco espécies, sendo quatro plantas por espécie e duas folhas por planta. Barras com as letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Os valores de V_{cmax} calculados com C_c e C_i foram similares entre os horários do dia ($p > 0,05$; Figura 3) e a interação entre os fatores espécie e horário do dia também não foi significativa ($p > 0,05$). Entretanto, o transporte de elétrons ($J_{\text{F-cal}}$) oscilou de forma significativa ($p < 0,01$) ao longo do dia. Os valores de V_{cmax} calculados a partir da curva A- C_i ($V_{\text{cmax-Ci}}$) foram em média 30 % menores do que aqueles calculados utilizando C_c (Figura 3A). Os maiores valores de $J_{\text{F-cal}}$ observados nos períodos da manhã e meio-dia. Ao final do dia observou-se um declínio de aproximadamente 25% em relação aos valores obtidos nos horários de maior transporte de elétrons (Figura 3B).

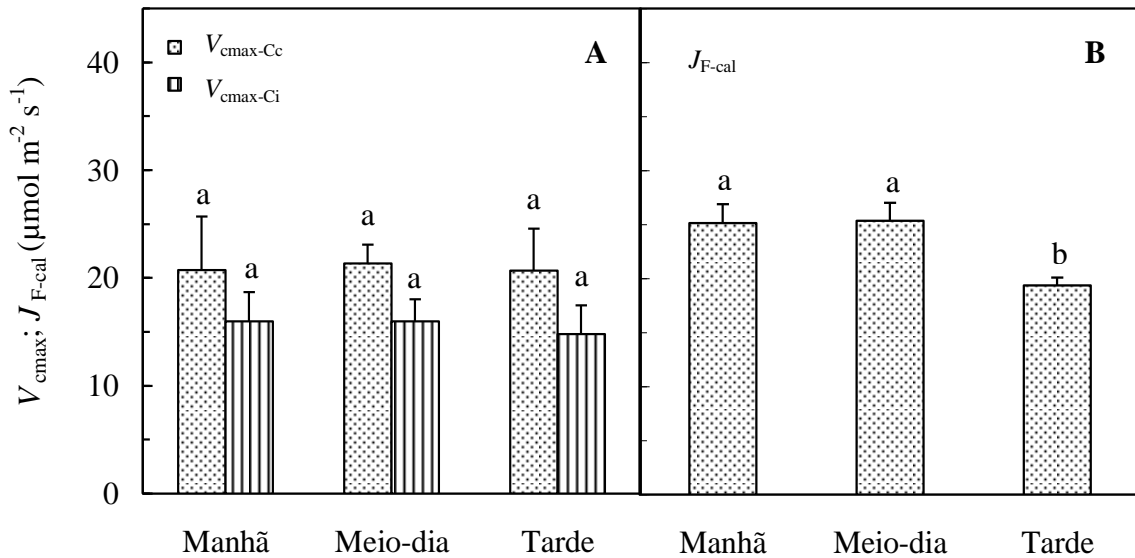


Figura 3. Efeito do horário do dia na velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax} - **A**) e na taxa de transporte de elétrons ($J_{\text{F-cal}}$ - **B**) em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque. Cada barra representa a média das cinco espécies sendo quatro plantas por espécie e duas folhas por planta. Barras com as letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

No que se refere à condutância do mesofilo, houve diferença entre os horários do dia ($p < 0,05$; Figura 4), porém a interação entre espécie e horários do dia não foi significativa ($p > 0,05$). Não houve correlação significativa entre g_m e temperatura e umidade relativa do ar e nem com a luminosidade do ambiente das plantas ($p > 0,05$). Os valores de g_m calculados pelo método de trocas gasosas (irga) foram supra estimados (Figura 4B), onde os valores foram o dobro daqueles determinados pelo método da fluorescência.

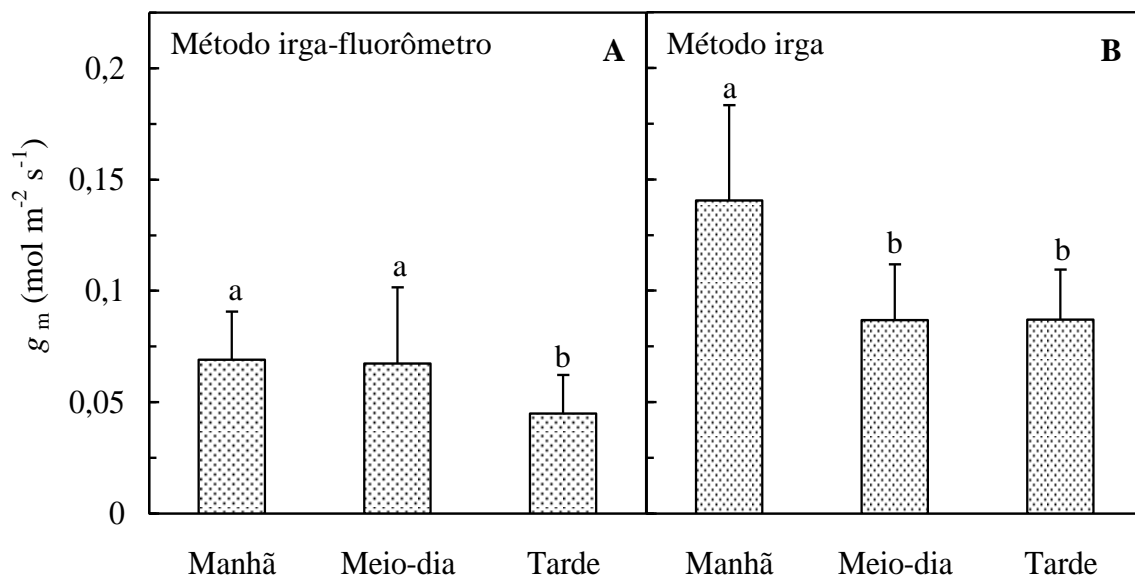


Figura 4. Efeito do horário do dia na condutância do mesofilo (g_m) determinada pelo método de trocas gasosas e fluorescência da clorofila (A) e somente utilizando dados de trocas gasosas (B) em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque. Cada barra representa a média de quatro plantas por espécie e duas folhas por planta. Barras com letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Com relação aos parâmetros de fluorescência, o horário do dia causou efeito significativo ($p < 0,05$) em Φ_{CO_2} e qP (Figura 5A, B). Entretanto nenhum efeito ($p > 0,05$) foi observado em Φ_{FSII} e NPQ (Figura 5C, D). Os valores de Φ_{CO_2} ao longo do dia seguiram o mesmo padrão de declínio apresentado por A_{max} e J_{F-cal} , onde os valores mínimos foram observados no período da tarde. Todavia, contrário a este padrão de resposta, os menores valores de qP foram observados pela manhã. A eficiência de assimilação de CO_2 (Φ_{CO_2}) foi positivamente correlacionada com g_s ($p > 0,01$), mas não o foi com a condutância do mesofilo (Figura 6).

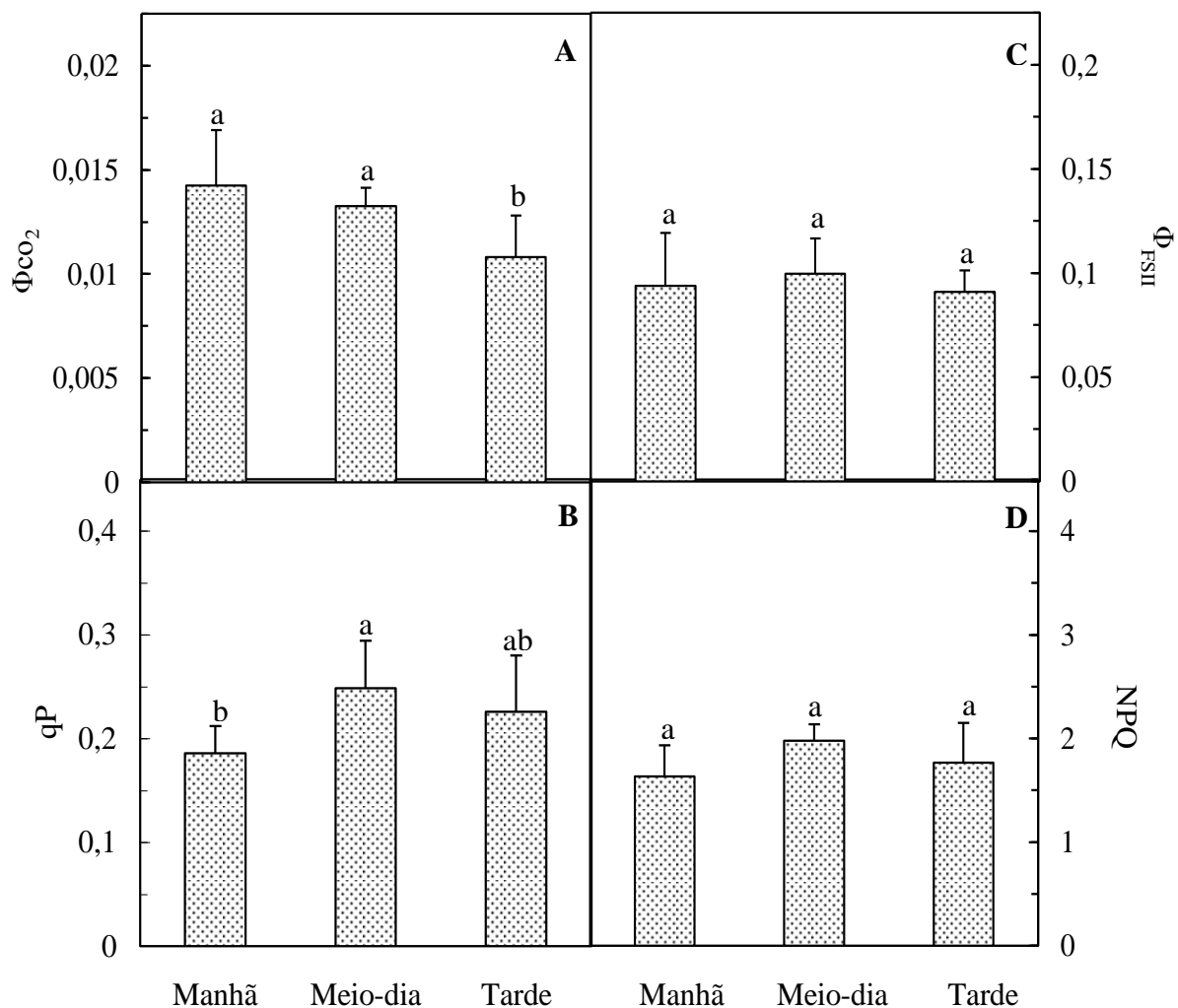


Figura 5. Efeito do horário do dia na eficiência quântica da fotossíntese (Φ_{CO_2} - **A**), dissipação fotoquímica (qP - **B**), eficiência quântica do fotossistema 2 (Φ_{FSII} - **C**) e em dissipação não fotoquímico (NPQ - **D**) em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque. Cada barra representa a média de quatro plantas por espécie e duas folhas por planta. Barras com as letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade. Condições dentro da câmara de medição, RFA $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura ambiente $\sim 27^\circ\text{C}$.

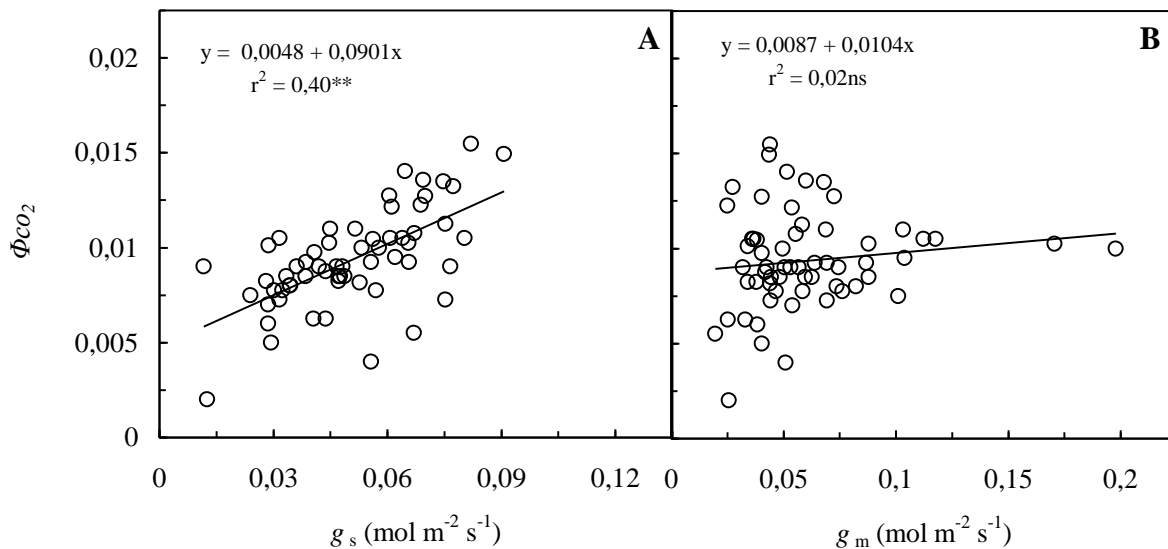


Figura 6. Eficiência da fotossíntese (Φ_{CO_2}) em função da condutância estomática (g_s) e do mesofilo (g_m) em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque. Cada barra representa a média de quatro plantas por espécie e duas folhas por planta. Não significativo a 5% (ns); significativo a 1% de probabilidade (**).

4. DISCUSSÃO

A precipitação anual em 2010 está dentro da média relatada para a Amazônia Central (Dias 2009). No período do estudo as médias durante o dia nos valores de RFA, temperatura e umidade relativa do ar (Figura 1) foram similares às apresentadas por Nascimento (2009) durante a época de menor precipitação.

A média de g_s observada no período da manhã foi similar ao relatado por Magalhães (2010) para espécies de árvores na fase juvenil na mesma área do estudo. A tendência de baixo g_s no período da tarde foi observada por Mendes e Marengo (2010) em espécies da Amazônia e outros grupos de plantas (Kaiser e Kappen 2000). Os menores valores de g_s ao final do dia não poderiam ser atribuídos à baixa disponibilidade de água no

solo, haja vista que durante todo o estudo o solo encontrou-se úmido (65%) próximo da capacidade de campo, devido às chuvas que ocorreram nesse período, o que descarta a possibilidade das plantas terem apresentado estresse hídrico ao longo do dia.

Para as espécies da Amazônia a modulação da abertura e fechamento dos estômatos pode estar relacionada a fatores endógenos conforme mostrado por Doughty *et al.* (2006). Estes autores relatam que a condutância estomática é regida pelo ritmo circadiano. Isso explicaria a falta de resposta de g_s ao final do dia, mesmo utilizando RFA saturante na câmara foliar. Os menores valores de A_{max} foram encontrados ao final do dia, quando a irradiância é menor no interior da floresta o que está de acordo com valores observados em plantas jovens da Amazônia (Carswell *et al.* 2000).

Os valores de V_{cmax} observados neste estudo (Figura 3A) estão dentro da faixa registrada para espécies da floresta tropical, onde os valores oscilaram entre 14 e 28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Magalhães 2010). O declínio de A_{max} no período da tarde pode ser atribuído tanto por fatores difusivos (g_s e g_m ; Figuras 2A, 4A) quanto a menor eficiência de assimilação de CO_2 neste período do dia (Figura 5A), o que concorda com Flexas *et al.* (2007) e Evans e Loreto (2000) que observaram declínio em A_{max} associado ao declínio em g_s ou g_m . Embora g_m possa representar até 40% da limitação da fotossíntese (Warren 2008), neste estudo A_{max} parece ser mais afetada pela g_s do que pela g_m , que está associada a boa relação encontrada entre Φ_{CO_2} e g_s a falta de correlação com g_m (Figura 6).

Como V_{cmax} não foi afetada pelo horário do dia, a redução de A_{max} parece estar relacionada à fatores difusivos e não às variações nas propriedades das enzimas do ciclo de Calvin. Alguns estudos têm mostrado que a atividade da Rubisco oscila durante o dia apresentando baixa atividade nos horários próximos ao meio dia (Hrstka *et al.* 2007; Parry *et al.* 1993) o que parece não ter ocorrido neste estudo. Assim, a ausência de efeito do horário do dia em V_{cmax} sugere que fatores que influenciam a Rubisco, como por exemplo a

ativação da enzima, não tiveram variação nos diferentes horários do dia, o que resultou em V_{cmax} estável. O padrão de declínio do transporte de elétrons mostrado neste estudo é semelhante ao relatado por Ishida *et al.* (1999) em espécies florestais, onde os valores foram mínimos após as 14:00 h. Esta variação nos valores de $J_{\text{F-cal}}$ indica que conforme diminui a fotossíntese o transporte de elétrons declina. A estreita relação entre A_{max} e J_{F} tem sido mostrada em vários estudos. Por exemplo, declínio proporcional em $J_{\text{F-cal}}$ e A_{max} ao final do dia foram relatados em outros tipos de vegetação (Flexas *et al.* 1999; Medrano *et al.* 2002).

Na ausência de informação sobre g_m para espécies da Amazônia, apenas para comparação mencionam-se outras espécies. Para g_m os valores observados neste estudo foram menores do que aqueles relatados para *Eucalyptus globulus* 0,12 mol m⁻² s⁻¹ e laranjeira, cujos valores oscilaram entre 0,12 e 0,24 mol m⁻² s⁻¹ em mudas aclimatadas a 30 °C (Magalhães-Filho *et al.* 2009). A oscilação de g_m ao longo do dia seguiu o mesmo padrão apresentado em g_s , sendo os maiores valores encontrados no período da manhã.

O efeito da luminosidade e temperatura em g_m foi observado em outros estudos (Flexas *et al.* 2007b; Bernacchi *et al.* 2002). Entretanto, a resistência mesofílica não correlacionou com a temperatura e umidade relativa do ar e nem com a luminosidade do ambiente das plantas ($p > 0,05$). Isto sugere que as variações ambientais não foram amplas o suficiente para causar efeito ou que outros fatores, provavelmente relacionado a fatores endógenos, estão envolvidos na resistência do mesofilo. Algumas plantas possuem efeito circadiano na fotossíntese (McClung 2000) o qual abre possibilidades para a resistência mesofílica também ser influenciada por esses fatores.

Outros estudos sugerem que alterações no funcionamento das aquaporinas podem influenciar g_m (Gaspar 2011; Sarda *et al.* 1997). As aquaporinas são as proteínas mais abundantes na membrana plasmática das plantas e além de transferir H₂O parece estar

relacionada também no transporte de CO₂ (Terashima e Ono 2002; Flexas *et al.* 2006). A ampla diferença entre os valores obtidos pelos métodos do irga e irga-fluorômetro contraria nossa expectativa inicial. Entretanto, Flexas *et al.* (2008) encontraram boa relação entre os valores de g_m calculados somente com dados de trocas gasosas e os que foram calculados pela fluorescência da clorofila. Contudo, Pons *et al.* (2009) apenas observaram boa correlação entre ambos os métodos em algumas concentrações de CO₂.

Os baixos valores de qP no período da manhã não influenciaram a assimilação de CO₂ (A_{max}). Isto mostra que a baixa dissipação fotoquímica foi compensada pela alta em g_s e pela maior eficiência da fotossíntese (Φ_{CO_2}) neste período do dia. Embora alguns estudos (González-Rodríguez *et al.* 2004; Rubio-Casal *et al.* 2010) tenham relatado efeito do horário do dia em NPQ, esta oscilação não foi observada nas espécies aqui estudadas. Esta estabilidade em NPQ denota que ao longo do dia a dissipação da energia absorvida por calor (ou outro processo não fotoquímico) permanece inalterada, talvez em virtude das oscilações ambientais ao longo do dia não serem forte suficientes para causar qualquer efeito nesta rota de dissipação energética.

5. CONCLUSÃO

1. O efeito do horário do dia no sub-bosque da floresta causa modificações nas condutâncias mesofílica e estomática. Porém, a atividade da Rubisco não segue o mesmo padrão e mantém-se estável ao longo do dia, mas o aumento das resistências difusivas no período da tarde determina os valores finais da fotossíntese.
2. A condutância do mesofilo (g_m) calculada apenas com dados de trocas gasosas (método irga) mostra valores superestimados, o qual sugere que, na medida do possível, seja utilizada a fluorescência da clorofila como complemento às trocas gasosas para a obtenção de dados g_m mais robustos.

Condutância do mesofilo e parâmetros fotossintéticos em função dos conteúdos de nutrientes minerais foliares em espécies florestais na Amazônia Central

*Manuscrito a ser submetido
(formatado pelas normas da revista Acta Amazonica)*

RESUMO

Alguns elementos minerais tais como nitrogênio e fósforo, são essenciais para a planta, participando, direta ou indiretamente em processos fisiológicos envolvidos na assimilação de CO₂ e crescimento da planta. Os objetivos deste estudo foram determinar o efeito dos nutrientes foliares na condutância do mesofilo e na assimilação de CO₂. Foram utilizadas cinco espécies arbóreas (*Myrcia paivae*, *Miquartia guianensis*, *Eschweleira bracteosa*, *Faramea juruana* e *Psychotria carthagenensis*) crescendo em condição de sub-bosque da Amazônia Central. A condutância do mesofilo (g_m) foi determinada utilizando medidas de trocas gasosas em conjunto com dados de fluorescência obtidos utilizando um fluorômetro acoplado à câmara do irga. Os conteúdos de nitrogênio (N) e fósforo (P) foliar foram determinados pelos métodos de Kjeldahl e do molibdato de amônio respectivamente. Também foram determinados os conteúdos absolutos e relativos (SPAD-502) de clorofilas. A média do conteúdo de N foliar foi de 11,1 mg g⁻¹ contra 0,46 mg g⁻¹ determinado para P . A média do conteúdo de clorofila $a+b$ foi 384 $\mu\text{mol m}^{-2}$ e a relação a/b ficou próximo de 2. A condutância do mesofilo variou em função do conteúdo de N , mas não houve efeito deste nutriente nas taxas fotossintéticas. Isto indica que uma porção considerável deste nutriente está direcionada a partes estruturais da planta e não a maquinaria fotossintética.

Palavras-chave: Clorofila, SPAD-502, cálcio, magnésio, eficiência no uso do nitrogênio.

Mesophyll conductance and photosynthetic parameters in relation to leaf mineral contents in Amazonian tree species

ABSTRACT

Some mineral elements such as nitrogen and phosphorus are essential to plants because they are involved in physiological processes and plant growth. The objectives of this study were to determine the effect of leaf nutrient contents on mesophyll conductance and CO₂ assimilation. A total of five tree species (*Myrcia paivae*, *Minuartia guianensis*, *Eschweleira bracteosa*, *Faramea juruana* and *Psychotria carthagenensis*) growing under understory condition in the Central Amazon was used. The mesophyll conductance (g_m) was determined using gas exchange and fluorescence data. Fluorescence was measured using a fluorometer coupled to the IRGA head. The contents of leaf nitrogen (N) and phosphorus (P) were determined by the Kjeldahl and the ammonium molybdate method, respectively. We also determined the absolute and relative content (SPAD-502) of chlorophylls. The average leaf nitrogen and P content were 11.1 mg g⁻¹ and 0.46 mg g⁻¹, respectively. The average content of $a+b$ chlorophylls was 384 mol m⁻² and the chlorophyll a/b ratio was about 2. Mesophyll conductance varied depending on leaf N content, but there was no effect of this nutrient in photosynthetic rates. This indicates that a considerable fraction of this nutrient is directed to structural parts of the plant and not the photosynthetic apparatus.

Key words: Chlorophyll, SPAD-502, calcium, magnesium, nitrogen use efficiency.

1. INTRODUÇÃO

A assimilação de CO₂ de espécies florestais é limitada por diversos fatores ambientais que vão desde luminosidade (Piel *et al.* 2002; Azevedo e Marengo 2012) até a disponibilidade de nutrientes minerais (Carswell *et al.* 2000; Mendes e Marengo 2010). Dentre os nutrientes disponíveis para a planta o nitrogênio e o fósforo estão entre os mais estudados, possivelmente, pela grande importância no processo de assimilação de carbono.

O nitrogênio é um dos elementos minerais de maior essencialidade para o vegetal. Do total de nitrogênio encontrado nos vegetais, cerca de 60% está localizado nas folhas, sendo que a proporção de *N* pode alcançar 75% no processo fotossintético, particularmente, nas enzimas do ciclo de Calvin e nos componentes do transporte de elétrons (Warren e Adams 2006). Além disso, o nitrogênio tem participação na síntese de aminoácidos, é constituinte de proteínas, atua na formação de ácidos nucleicos e outros compostos importantes no metabolismo celular (Evans 1989). Dessa forma, o nitrogênio foliar possui forte relação com a capacidade de carboxilação da Rubisco e a taxa de transporte de elétrons (Hikosaka 2004).

O fósforo (*P*) forma parte de fosfolipídios, açúcares fosfatados, nucleotídeos (NAD, FAD, ATP), coenzimas e ácidos nucleicos (DNA, RNA). Outros elementos de essencialidade são: cálcio (*Ca*), magnésio (*Mg*) e o potássio (*K*), que participam de maneira direta ou indireta dos processos fisiológicos do vegetal (Marengo e Lopes 2009). Muitos Estudos concentraram-se em mostrar o efeito destes nutrientes nas taxas fotossintéticas (Field e Mooney 1986; Evans 1989; Reich *et al.* 1994; 1995a,b) e as relações assimilação de carbono e a eficiência no uso de *N* e *P* em árvores (Reich *et al.* 1991; Poorter e Evans 1998) e em plantas herbáceas (Poorter *et al.* 1990; Mulkey *et al.* 1991) que de modo geral associam aumento da fotossíntese com altos conteúdos de *N*.

Outra variável importante para o vegetal é a clorofila, que são os pigmentos fotossintéticos que possuem em sua composição alguns nutrientes minerais, como Nitrogênio e o Magnésio. As clorofilas são pigmentos importantes para a conversão da radiação luminosa em energia, sob a forma de ATP e NADPH, por essa razão, são estreitamente relacionadas com a eficiência fotossintética das plantas (Almeida *et al.* 2004). Também os teores de clorofilas estão relacionados com a adaptação da planta a diversos ambientes. Assim, uma planta com alto teor de clorofila é potencialmente capaz de atingir taxas fotossintéticas mais altas (Chappelle e Kim 1992). Em condições de baixa luminosidade (p. ex., o sub-bosque da floresta amazônica) as folhas podem apresentar maior concentração de clorofila (unidade de massa) do que folhas desenvolvidas sob alta irradiância (Boardman 1977; Oguchi *et al.* 2005). A influência do *N* e do *P* sobre assimilação de carbono e em algumas características foliares (p.ex. área foliar específica e espessura foliar; Mendes e Marengo 2010), o efeito destes nutrientes na condutância do mesófilo (g_m) tem recebido pouca atenção, especialmente em espécies arbóreas da Amazônia. Dessa forma, este estudo visa determinar o efeito dos conteúdos de *N* e *P* foliares e dos teores de clorofila em g_m e como a eficiência no uso destes nutrientes influenciam a assimilação de carbono em espécies florestais em condições de sub-bosque na Amazônia Central.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Estação Experimental de Silvicultura Tropical (Núcleo ZF-2, 02° 36' 21" S, 60° 08' 11" W) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em 2010. A vegetação é caracterizada como floresta densa de terra-firme. A temperatura média anual está entorno de 27 °C. A precipitação média anual é de

aproximadamente 2.240 mm (INMET 2012). A umidade relativa apresenta uma média anual de 84%.

2.1. Material vegetal

Para o estudo foram utilizadas cinco espécies: *Myrcia paivae* Berg. (Myrtaceae), *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae), *Eschweleira bracteosa* Poepp. ex O. Berg (Lecythidaceae), *Faramea juruana* K. Krause (Rubiaceae) e *Psychotria carthagenensis* (Rubiaceae) utilizando como repetições quatro árvores na fase juvenil (entre 1 e 3 m de altura) para cada espécie, no sub-bosque da floresta. Estas espécies foram escolhidas em virtude da disponibilidade de repetições com altura semelhante na área do estudo. As determinações dos conteúdos de macronutrientes e de clorofila foram realizadas em laboratórios específicos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em Manaus.

2.2. Medidas de trocas gasosas

As medidas de trocas gasosas e de fluorescência foram realizadas usando um analisador de gases por infravermelho (Li-6400, Li-Cor, Lincoln, NE, EUA), com câmara foliar de 2 cm² e um fluorômetro acoplado (Li-6400-40, Li-Cor). As coletas dos dados foram realizadas em folhas completamente expandidas sendo duas folhas por planta entre agosto e outubro de 2010 (época de menor precipitação). As variáveis de trocas gasosas mensuradas foram: fotossíntese saturada por luz (A_{max}); fotossíntese saturada por luz e CO₂ (A_{pot}); condutância estomática (g_s) e concentração de CO₂ intercelular (C_i). O protocolo utilizado para determinar realizar as curvas $A-C_i$ foi o descrito por Long e Bernachi (2003).

A partir dos valores da relação $A-C_i$ obteve-se os valores de A_{pot} e da velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}). Para determinar V_{cmax} utilizou-se a equação de Farquhar *et al.* (1980). Os valores de V_{cmax} foram normalizados a 25 °C, utilizando as equações descritas por Medlyn *et al.* (1999). A taxa de transporte de elétrons (J_F) foi obtida a partir dos dados de fluorescência conforme descrito por Maxwell e Johnson (2000) e os valores de J_F foram corrigidos (J_{F-cal}) de acordo com Gilbert *et al.* (2012). Os valores de C_c foram obtidos de acordo com Epron *et al.* (1995) e a partir destes valores construiu-se as curvas de resposta ao CO_2 ($A-C_i$). $V_{cmax-Cc}$ foi calculado com os dados da curva $A-C_c$. Os dados de C_c também foram utilizados para calcular os valores de g_m ($g_m = A/C_i - C_c$; Ethier e Livingston 2004).

2.3.Determinação dos nutrientes foliares e teores clorofila

Os teores de clorofila e os conteúdos de nutrientes foliares foram determinados em folhas similares àquelas utilizada para as medições das trocas gasosas. O critério para a seleção das folhas foi o valor de SPAD (igual o similar ao da folha utilizada para medir trocas gasosas). A concentração de clorofila foi determinada pelo método de Arnon (1949) utilizando acetona 80% (10 mL/amostra) e posterior determinação espectrofotometricamente (SP-2000 UV, Spectrum, Shangai, China). O conteúdo do nitrogênio (N) foliar foi determinado pelo método de Kjeldahl (Passos 1996).

As concentrações dos outros macronutrientes no tecido foliar foram determinadas conforme descrito por Rorison *et al.* (1993). Isto é: fósforo (P), pelo método do molibdato de amônio; potássio (K) por fotometria de chama e cálcio (Ca) e magnésio (Mg) por espectrofotometria de absorção atômica. Adicionalmente foram determinados os valores de área foliar específica (AFE) para cada planta, que foram utilizados para calcular os

conteúdos de nutrientes em nível de área e para determinar as taxas fotossintéticas por massa.

A área foliar foi determinada com um medidor de área (Li-3000, Li-Cor, EUA), em seguida as folhas (duas por planta) foram levadas a estufa a 72 °C onde permaneceram até atingirem peso constante. A área foliar específica (AFE) foi determinada como a razão entre área e massa foliar seca.

Para determinar os índices de luminosidade na área do estudo utilizou-se sensor específico (Li-190 SA, Li-Cor, NE, EUA) conectado a um datalogger (Li-1400, Li-Cor, NE, EUA). O sensor foi instalado próximo às plantas estudadas, onde permaneceram durante todo o período do estudo. Para obter a média de irradiância para cada espécie o sensor de luminosidade ficou próximo de cada planta durante uma semana.

2.4. Análise estatística

Para examinar as diferenças entre as espécies os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). O efeito da luminosidade nos conteúdos de nutrientes e clorofilas e suas correlações entre os parâmetros de trocas gasosas foram examinados mediante análise de regressão. As análises estatísticas foram examinadas no programa estatístico SAEG 9.0 da Universidade Federal de Viçosa, MG.

3. RESULTADOS

Durante o estudo a média de radiação fotossinteticamente ativa (RFA) diária foi de 0,40 mol m⁻² dia⁻¹ com oscilação de 0,29 a 0,45 mol m⁻² dia⁻¹ para as espécies *F. juruana* e *E. bracteosa* respectivamente (Figura 1). Entretanto, esta variação nos valores de luminosidade não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

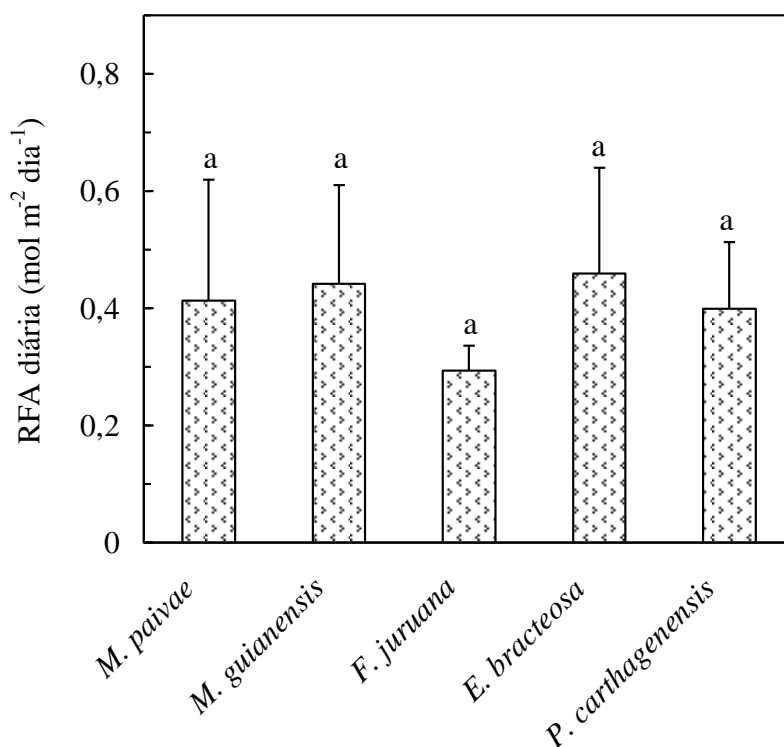


Figura 1. Médias de radiação fotossinteticamente ativa (RFA) diária para cada espécie. Cada valor representa a média de quatro plantas por espécie coletados durante cinco dias. Dados observados durante os meses de coleta dos dados de trocas gasosas (agosto a outubro de 2010).

Todos os conteúdos de nutrientes analisados apresentaram diferenças significativas entre as espécies ($p < 0,01$; Tabela 1). Em média, *P. carthagenensis* apresentou as maiores concentrações de *N* e *Ca*, do que as demais espécies estudadas, em contrapartida, os menores valores de *P* foram observados nesta espécie (Tabela 1). A espécie *F. juruana* apresentou os maiores valores de *Mg* e os menores valores de *K*. A relação *N/P* apresentou variação significativa entre as espécies ($p < 0,01$) com a média superior a 25 sobre base de massa (Tabela 1).

A menor relação *N/P* foi observada na espécie *M. Guianensis* (16,1), enquanto que *P. carthagenensis* apresentou a maior relação (44,5). As eficiências no uso dos nutrientes analisados (*N*, *P* *Ca*, *Mg* e *K*) diferiram ($p < 0,01$) entre as cinco espécies. Na espécie *M. Paivae* foram observados os maiores de valores de EUN e EUP que em média foram quase três superiores daqueles apresentados por *E. bracteosa*. Para EUCa e EUMg os maiores resultados foram obtidos em *M. guianensis* e os valores mínimos nas espécies *E. bracteosa* e *F. juruana* respectivamente. Embora *F. juruana* tenha apresentado menor EUMg, em EUK seus valores superaram as outras espécies e em média foi 43% maior do valor apresentado por *E. bracteosa*.

Tabela 1. Média por espécie dos conteúdos de nitrogênio (*N*), fósforo (*P*), cálcio (*Ca*), magnésio (*Mg*) e potássio (*K*) por massa foliar e as eficiências no uso do *N* (EUN), *P* (EUP), *Ca* (EUCa), *Mg* (EUMg) e *K* (EUK).

Espécie	N	P	Ca	Mg	K	N/P	EUN	EUP	EUCa	EUMg	EUK
	mg g ⁻¹						μmol mol ⁻¹ s ⁻¹				
<i>M. paivae</i>	7,83bc	0,40bc	3,50b	1,73b	2,06a	20b	368,3a	16083,1a	2678,3ab	3000,6a	3965,7ab
<i>M. guianensis</i>	9,55b	0,61a	2,55bc	1,23b	2,46a	16,1c	296,1ab	9890,9bc	3590,6a	3863,1a	3258,8ab
<i>F. juruana</i>	8,32b	0,39d	2,07bc	3,60a	1,33b	23,5b	237,8bc	11377,1ab	2642,4ab	973,4b	4057,5a
<i>E. bracteosa</i>	13,32ab	0,52ab	5,17ab	2,11a	1,97a	25,6b	93,1d	5272,2c	761,8b	1067,1b	1766,1b
<i>P. carthagenensis</i>	16,45a	0,36d	8,07a	2,67a	1,68b	44,5a	126,0cd	11710,8ab	1111,3b	1277,2b	3583,7ab
Média	11,1	0,46	4,27	2,27	1,90	26,0	224,2	10866,8	2156,9	2036,3	3326,4
CV	39,2	29,1	75,5	42,1	31,9	27,3	26,1	22,8	48,3	31,9	30,3

Valores nas colunas seguidos pela mesma letra não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Para g_m e A_{pot} as diferenças entre as espécies foram significativas ($p < 0,01$; ver Figura 2B-C do Capítulo 1). Porém para A_{max} , V_{cmax} , J_F , AFE, teores de clorofilas e valores do SPAD foram estatisticamente similares entre as espécies. As médias da clorofila $a+b$ e da razão clorofila a/b foram $384,7 \mu\text{mol m}^{-2}$ e $1,96$ respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Média com desvio padrão (DP) dos valores da fotossíntese saturada por luz (A_{max}), fotossíntese saturada por luz e CO_2 por área (A_{pot}) e por massa ($A_{pot\text{-massa}}$), velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}), taxa de transporte de elétrons (J_F), condutância do mesofilo (g_m), área foliar específica (AFE), clorofilas a , b e $a+b$, razão clorofila a/b e os valores do SPAD. Cada valor corresponde à média de cinco espécies, sendo quatro plantas por espécie e duas folhas por planta ($n = 40$).

Variáveis	Médias \pm DP	CV (%)
A_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	$3,6 \pm 0,4$	20,5
A_{pot} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	$10,0 \pm 2,7$	13,8
$A_{pot\text{-massa}}$ ($\text{nmol g}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$151,7 \pm 48,1$	17,0
V_{cmax} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	$20,9 \pm 3,8$	17,6
J_F ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	$23,1 \pm 2,9$	12,7
g_m ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	$0,06 \pm 0,02$	19,3
AFE (g m^{-2})	$15,0 \pm 1,7$	11,2
Clorofila a ($\mu\text{mol m}^{-2}$)	$250,2 \pm 50,4$	18,9
Clorofila b ($\mu\text{mol m}^{-2}$)	$134,4 \pm 35,4$	27,4
Clorofila $a+b$ ($\mu\text{mol m}^{-2}$)	$384,7 \pm 57,1$	15,9
Razão a/b	$1,96 \pm 0,5$	22,2
SPAD (unidades relativas)	$54,4 \pm 5,1$	7,8

A taxa de fotossíntese saturada por luz (A_{max}), tanto para os valores por unidade de área como também para aqueles utilizando massa foliar, não foi afetada significativamente pelos conteúdos de N e P foliares ($p > 0,05$, dados não mostrados). A relação N/P aumentou significativamente ($p < 0,05$) com o declínio no conteúdo de fósforo foliar (Figura 2).

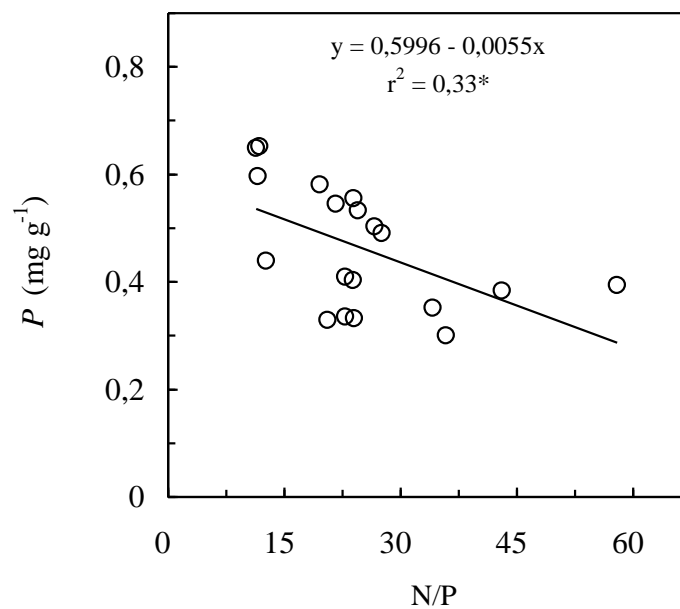


Figura 2. Relação entre fósforo foliar (P) e a razão entre os conteúdos de nitrogênio e (N/P) foliar. Dados coletados em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque, sendo quatro plantas por espécie; *: significativo a 5% de probabilidade.

Dos nutrientes analisados apenas o conteúdo de N correlacionou significativamente ($p < 0,01$) com g_m , onde foi observada uma tendência linear positiva de g_m com o aumento de N (Figura 3A). Embora o P não tenha causado efeito significativo ($p > 0,05$; Figura 3B) na resistência do mesofilo, nota-se que houve uma tendência contrária àquela observada na relação g_m-N .

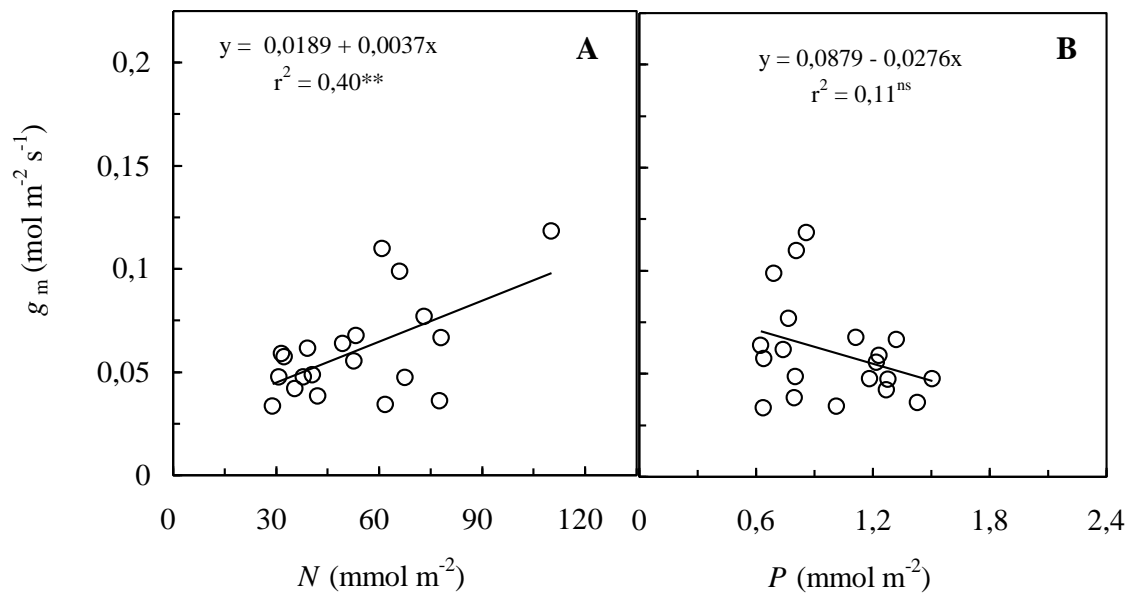


Figura 3. Relação entre condutância do mesofilo (g_m) e os conteúdos de nitrogênio (N - **A**) e fósforo (P - **B**) foliar. Dados coletados em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque, sendo quatro plantas por espécie; **: significativo a 1% e (ns) não significativo a 5% de probabilidade.

A relação entre J_F e V_{cmax} com conteúdo de N foi significativa ($p < 0,05$; Figura 4A, B), mas o conteúdo de P não causou qualquer efeito ($p > 0,05$) nestes fatores bioquímicos (Figura 4C, D).

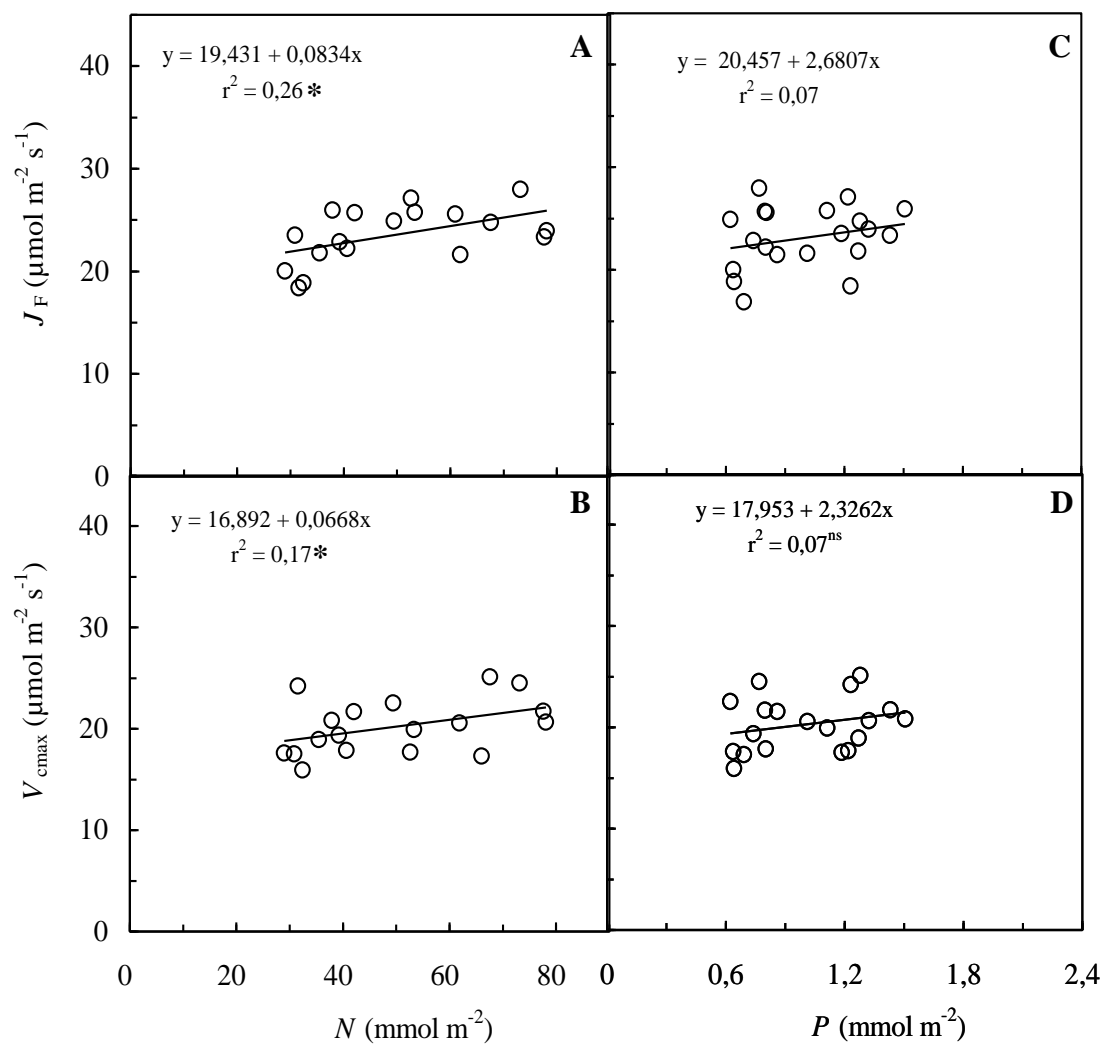


Figura 4. Taxa de transporte de elétrons (J_F – **A**, **C**) e velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax} – **B**, **D**) em função do nitrogênio (N) e fósforo (P) foliar. Dados coletados em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque, sendo quatro plantas por espécie; **: significativo a 1% e (ns) não significativo a 5% de probabilidade.

Os teores absolutos de clorofilas $a+b$ correlacionaram positivamente ($p < 0,05$) com V_{cmax} (Figura 5). Quanto aos teores relativos de clorofilas determinados pelos valores do SPAD, tanto os conteúdos de N quanto os teores absolutos de clorofila $a+b$ e a dissipação não fotoquímica (NPQ) aumentaram significativamente ($p < 0,05$) com o acréscimo dos valores do SPAD (Figura 6).

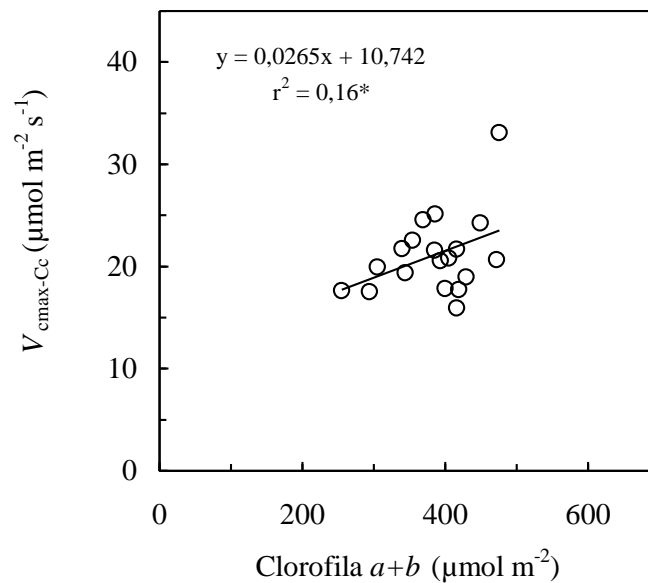


Figura 5. Relação entre a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) e os conteúdos de clorofilas $a+b$. Dados coletados em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque, sendo quatro plantas por espécie. Significativo a 5% (*) de probabilidade.

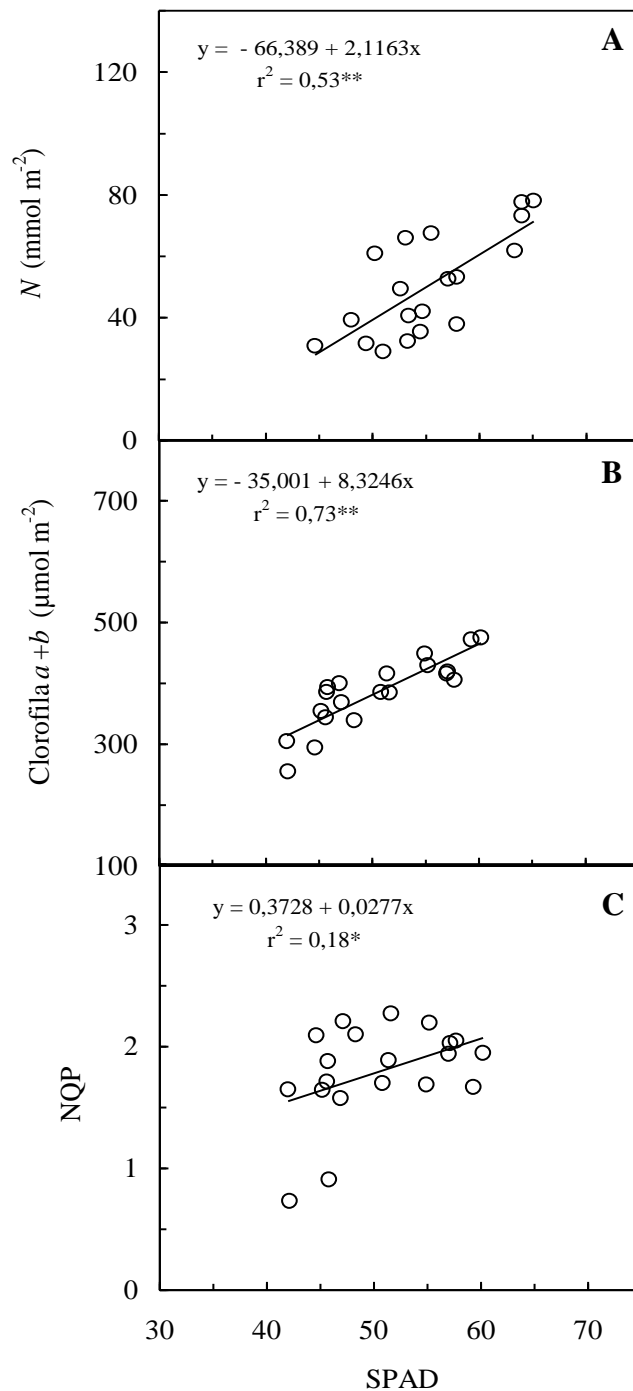


Figura 6 Relação entre o conteúdo de nitrogênio (N - **A**) foliar, conteúdo de clorofilas $a+b$ (**B**) e a dissipação não fotoquímica (NPQ - **C**) com os valores do SPAD. Dados coletados em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque, sendo quatro plantas por espécie. Os valores do SPAD foram coletados separadamente para cada variável. Significativo a 1% (**) e 5% (*) de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

As médias de irradiância observadas neste estudo são condizentes com a quantidade de luz que atinge o no sub-bosque da floresta Amazônica (Molion 1987; Nascimento 2009; Marengo e Vieira 2005) e confirmam que as plantas que crescem no sub-bosque recebem baixos níveis de luminosidade. O conteúdo de Ca nas folhas nas plantas analisadas foi diferente mostrando que cada espécie absorve este nutriente forma particular. Os valores de *K* são de suma importância para os estudos fisiológicos das plantas, pois ele interage com quase todos os macronutrientes essenciais, secundários e micronutrientes, podendo aumentar ou reduzir a absorção e a utilização de alguns nutrientes pelas plantas (Theodoro e Maringoni 2006).

De acordo com Malavolta e Crocomo (1982), o potássio (*K*) participa diretamente ou indiretamente de diversos processos bioquímicos envolvidos com o metabolismo de carboidratos, como a fotossíntese e a respiração, atuando como ativador de um grande número de enzimas encontradas na célula vegetal. Além disso, acredita-se que o *K* esteja envolvido em mecanismos de abertura e fechamento dos estômatos e que, ao apresentarem deficiência deste nutriente, os vegetais passam a absorver mais ativamente nitrogênio (*N*), magnésio (*Mg*) e cálcio (*Ca*), com acúmulo de compostos nitrogenados livres.

Os teores de *N* foliar por unidade de massa encontrados no presente estudo foram mais baixos dos relatados para espécies da floresta tropical e da Amazônia (Fyllas *et al.* 2009). Reich *et al.* (1999) estudando seis biomas diferentes também não encontraram relação significativa entre as taxas fotossintéticas e os conteúdos de *N* foliar em árvores da floresta tropical venezuelana. Tanto *N* quanto *P* são macronutrientes essenciais para o aparato fotossintético da planta. Pois *P* é indispensável para produção e exportação da triose-P, que é o maior produto fotossintético exportado para o cloroplasto enquanto que *N* é responsável pela construção de proteínas (presentes no ciclo de Calvin), enzima e clorofilas (Marengo e

Lopes 2009) que participam de forma direta ou indireta do processo de assimilação de carbono. Entretanto, a ausência de correlação entre ambos N e P e taxas fotossintéticas está relacionada à baixa variação nos valores destes nutrientes entre as espécies e a uniformidade do ambiente na área do estudo.

A relação negativa entre o conteúdo de P foliar e a razão N/P corrobora com os resultados encontrados por Güsewell (2004) que observou uma tendência similar à relatada neste estudo. A alta relação N/P encontradas nestas espécies sugere que o fósforo está em quantidade limitante para planta conforme relatado por Koerselman e Meuleman (1996). De acordo com Güsewell (2004) uma relação N/P igual a 16 mostra pó ponto de co-limitação entre N e P , dessa forma, uma relação superior a 16 indica deficiência de P . Muitos estudos (Evans 1989; Evans e Poorter 2001; Harley *et al.* 1992) tem mostrado a relação positiva entre o conteúdo de nitrogênio foliar e os parâmetros bioquímicos relacionados à V_{cmax} ou J_F em diferentes níveis de luminosidade (Sims e Pearcy 1989; Wullschleger 1993; Evans e von Caemmerer 1996) o que corrobora com os resultados encontrados neste estudo.

Alguns autores (Evans *et al.* 1994; Syvertsen *et al.* 1995) têm relatado que a relação positiva entre g_m e N pode estar indiretamente relacionada a componentes estruturais da folha. Isto ocorre porque g_m é determinada por estruturas foliares tais como parede celular, espessura e área de superfície dos cloroplastos, que por sua vez, apresentam nitrogênio em suas composições. Assim, a correlação entre g_m e N e V_{cmax} pode estar refletindo uma correlação subjacente entre estas variáveis e as características anatômicas e morfológicas (Singsaas *et al.* 2004). Além disso, esse nutriente é elemento essencial da enzima Rubisco, componente chave na fixação de carbono.

Outro estudo mostra que a relação entre estas variáveis está condicionada aos efeitos da anidrase carbonica e/ou aquaporinas (Terashima e Ono 2002). Porém, nossos resultados parecem estar relacionados a primeira teoria, além disso, não temos como atribuir esta relação

a segunda teoria, visto que, não foram determinados os dados de anidrase carbonica e aquaporinas.

Os valores do SPAD têm sido intensivamente investigados (Marquard e Tipton 1987; Schaper e Chacko 1991; Smeal e Zhang 1994, Peng *et al.* 1995; Nascimento e Marengo 2010; Marengo *et al.* 2009) como uma alternativa para determinar parâmetros que até então utilizam metodologia destrutiva para a obtenção de resultados e que passaria então a obtê-los apenas com um aparelho de medição instantânea e não destrutiva (SPAD). Dessa forma, muitos estudos têm mostrado a relação positiva entre os teores de clorofilas determinados em laboratório e os valores do SPAD (Marquard e Tipton 1987, Nascimento e Marengo 2010) o que simplifica a determinação destes pigmentos *in locus*. Também, alternativamente os valores do SPAD podem ser utilizados para estimar a dissipação não fotoquímica (NPQ; Netto *et al.* 2002; Shrestha *et al.* 2012). Entretanto, são necessários mais estudos para verificar se o valor do SPAD é tão eficiente na determinação de NPQ quanto se tem relatado para os conteúdos de clorofila e nitrogênio.

5. CONCLUSÃO

Nas espécies estudadas e nas condições em que este estudo foi conduzido, os conteúdos de nutrientes foliares são utilizados de forma similar nos processos fotossintéticos entre as espécies, o que está relacionado a uniformidade do ambiente na área do estudo, o que influenciou na falta de relação entre estes nutrientes com a atividade fotossintética. Dessa forma, o efeito positivo na correlação positiva entre a condutância do mesófilo e o conteúdo de *N* foliar pode ser uma função de outros componentes como as aquaporinas.

Características de crescimento e condutância do mesofilo em resposta a variações na irradiância do sub-bosque em espécies arbóreas da Floresta Amazônica

Manuscrito a ser submetido

(formatado pelas normas da revista Acta Amazonica)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito da disponibilidade de luz do sub-bosque da floresta no crescimento das árvores e nas características morfo-anatômicas e as consequências destes parâmetros na condutância do mesofilo. O estudo foi realizado com cinco espécies arbóreas, na fase juvenil, em condições naturais, com altura de até 3 m. A condutância do mesofilo (g_m) foi determinada utilizando medidas de trocas gasosas em conjunto com dados de fluorescência obtidos utilizando um fluorômetro acoplado à câmara do irga. Os dados de crescimento foram coletados entre os anos de 2010 e 2012. A espessura da folha foi determinada em lâminas de cortes transversais analisados em microscópio óptico e a área foliar específica como a razão entre área e massa foliar. A irradiância do microsítio de cada planta foi obtida através da FCV que estima as aberturas do dossel da floresta. A média de incremento anual em diâmetro (IAD) foi de 0,67 mm ano⁻¹, enquanto que incremento anual em altura (IAA) as médias atingiram 75,7 mm ano⁻¹. Apenas a espessura da folha foi sensível as pequenas oscilações nos níveis de luminosidade do sub-bosque da floresta. A condutância do mesofilo não mudou em função da altura das arvoretas, mas respondeu positivamente a espessura foliar, o que reforça a importância da estrutura foliar na difusão interna do CO₂.

Palavras-chave: Área foliar específica, condutância estomática, espessura foliar, fração de céu visível, índice de área foliar

Growth characteristics and mesophyll conductance in response to variation in understory irradiance in Amazonian forest tree species

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of light availability in the forest understory on sapling growth and the morpho-anatomical leaf traits, and also to determine how sapling height and leaf thickness affect mesophyll conductance. The study was conducted with five tree species at the juvenile stage (up to 3 m height) under natural conditions. The mesophyll conductance (g_m) was determined using gas exchange measurements in conjunction with fluorescence data obtained using a fluorometer coupled to the IRGA head. Growth data were collected between 2010 and 2012. Leaf thickness was determined on leaf cross-sections with an optical microscope and the specific leaf area was determined as the ratio between area and leaf mass. The irradiance at each plant microsite was obtained using FCV (an estimate of openings of the forest canopy) and irradiance data collected above the forest canopy. The average annual increment in diameter (IAD) and annual increment in height (IAA) were 0.67 mm yr⁻¹ and 75.7 mm yr⁻¹, respectively. Only leaf thickness was sensitive to small variations in understory irradiance. Mesophyll conductance was not affected by variations in sapling height, but it positively responded to variation in leaf thickness, which highlights the importance of leaf internal structure on CO₂ diffusion.

Key words: Specific leaf area, stomatal conductance, leaf thickness, fraction of sky visible, leaf area index

1. INTRODUÇÃO

O acúmulo de biomassa pelas plantas é determinado por vários fatores, incluindo a área foliar, a capacidade fotossintética individual das folhas e a disponibilidade de luz (Marengo e Lopes 2009). Desse modo, os ganhos de biomassa e o crescimento das plantas estão fortemente relacionados à atividade fotossintética. No entanto esse processo fisiológico depende de alguns fatores ambientais tais como, disponibilidade de água (Valladares e Pearcy 1997), concentração de CO₂ (Warren 2008), temperatura (Lloyd e Farquhar 2008) e luminosidade (Azevedo e Marengo 2012; Piel *et al.* 2002), sendo este último um dos principais fatores que limitam a atividade fotossintética e o crescimento de árvores em condições de sub-bosque de florestas densas, como é o caso das florestas tropicais. Como consequência, o crescimento de muitas plântulas nestas florestas pode ser limitado pela quantidade de luz disponível e muitas desenvolvem estratégias para sobreviverem e se estabelecerem neste ambiente de pouca luz (Osunkoya *et al.* 1994, Claussen 1996).

Vários estudos têm documentado o efeito do ambiente luminoso, a que as plantas estão adaptadas, em algumas características tais como: mudanças na organização das células do mesófilo juntamente com as mudanças nas características bioquímicas e fotossintéticas (Boardman 1977; Chazdon e Kaufmann 1993). De modo geral plantas cultivadas sob baixa luminosidade apresentam menor área foliar, espessura da folha e massa foliar por área juntamente com menor quantidades de nitrogênio e área Rubisco por folha, menores capacidade fotossintética em uma base de área foliar e menores condutância estomática (Kappel e Flore 1983; Niinemets e Tenhunen 1997; Le Roux *et al.* 2001).

Como a espessura da folha influencia na trajetória a ser percorrida por uma molécula de CO₂ até atingir os cloroplastos (Hanba *et al.* 1999; Flexas *et al.* 2008), as características morfo-anatômicas observadas em plantas adaptadas a baixa luminosidade, podem causar efeitos significativo em g_m e nos parâmetros da Rubisco. Assim este estudo teve como

objetivo determinar se a luminosidade do sub-bosque em diferentes micro-sítios de cada planta causa modificações no crescimento e nas características foliares e de alguma forma estas modificações sejam refletidas na condutância do mesofilo nos parâmetros bioquímicos envolvidos na assimilação de carbono.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Ambiente físico e Material vegetal

O estudo foi realizado na Estação Experimental de Silvicultura Tropical (Núcleo ZF-2, 02° 36' 21" S, 60° 08' 11" W) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em 2010. A vegetação é caracterizada como floresta densa de terra-firme. Para o estudo foram utilizadas cinco espécies: *Myrcia paivae* Berg. (Myrtaceae), *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae), *Eschweleira bracteosa* Poepp. ex O. Berg (Lecythidaceae), *Faramea juruana* K. Krause (Rubiaceae) e *Psychotria carthagenensis* (Rubiaceae) utilizando como repetições quatro árvores na fase juvenil (entre 1 e 3 m de altura) para cada espécie, no sub-bosque da floresta. Estas espécies foram escolhidas em virtude da disponibilidade de repetições com altura semelhante na área do estudo.

Para caracterizar o ambiente físico e os níveis de luminosidade no micrositio de cada planta foram coletados dados de índice de área foliar (IAF) e fração de céu visível (FCV), que é a quantidade de aberturas e mini-aberturas no dossel da floresta. O índice de área foliar (IAF) e FCV foram estimados utilizando um analisador de dossel (LAI - 2000, Plant Canopy Analyser - Li-Cor, NE, EUA). Um dos sensores foi instalado acima do dossel da floresta em uma torre de observação próximo da área do estudo e outro foi utilizado na área experimental onde as leituras foram realizadas simultaneamente. A coleta dos dados de IAF e FCV foram realizadas durante a coleta dos dados de trocas gasosas, no início da manhã para evitar reflexos de raios solares nas folhas do dossel, o que levaria a um erro nas medições.

2.2. Taxas de crescimento

Dados em crescimento em diâmetro e altura foram coletados a cada dois meses durante 24 meses, entre julho de 2010 e junho de 2012. Para o diâmetro as medidas foram coletadas a uma altura de 50 cm acima do solo, com auxílio de um paquímetro digital (precisão de 0,01mm). A altura foi mensurada no ponto mais alto da planta (gema apical), utilizando uma trena de 3 m. Para determinar o incremento anual e mensal em diâmetro e altura foram calculadas seguintes equações: $IAD = (D_1 - D_0)/t$ e $IAH = (H_1 - H_0)/t$, em que, IAD, incremento anual em diâmetro (mm), IAA, incremento anual em altura (mm), D_1 e H_1 correspondem ao diâmetro e altura final, D_0 e H_0 , diâmetro e altura inicial; t corresponde ao tempo em anos.

2.3. Características foliares

A espessura foliar foi determinada em duas folhas por planta e dois pontos por folha, com as folhas ainda frescas. Foram realizadas secções transversais com auxílio de um micrótomo de mesa. Os cortes foram observados em microscópio Olympus CX-31 e fotografados, acoplado uma câmara fotográfica Olympus SC-35. Em seguida, as imagens foram inseridas no programa ANATI QUANT versão 2.0 da Universidade Federal de Viçosa.

A área foliar foi determinada com um medidor de área (Li-3000, Li-Cor, EUA), em seguida as folhas (duas por planta) foram levadas à estufa a 72 °C onde permaneceram até atingirem peso constante. A área foliar específica (AFE) foi determinada como a razão entre área e massa foliar. A densidade foliar foi determinada dividindo a massa seca/volume, para isso, também foi determinado o volume foliar (área foliar* espessura da folha).

3. RESULTADOS

As taxas de incremento anual em diâmetro (IAD) e altura (IAA) não apresentaram diferenças significativas entre as espécies ($p > 0,05$). A média de IAD foi de $0,67 \text{ mm ano}^{-1}$, enquanto que para altura (IAA) a média atingiu $75,7 \text{ mm ano}^{-1}$ (Figura 1). Os valores máximos e mínimos do incremento em diâmetro foram observados nas espécies *M. paivae* e *M. guianensis* respectivamente. Porém para IAA os maiores valores foram observados em *E. bracteosa* cuja média ficou próximo de 100 mm ano^{-1} (Figura 1B).

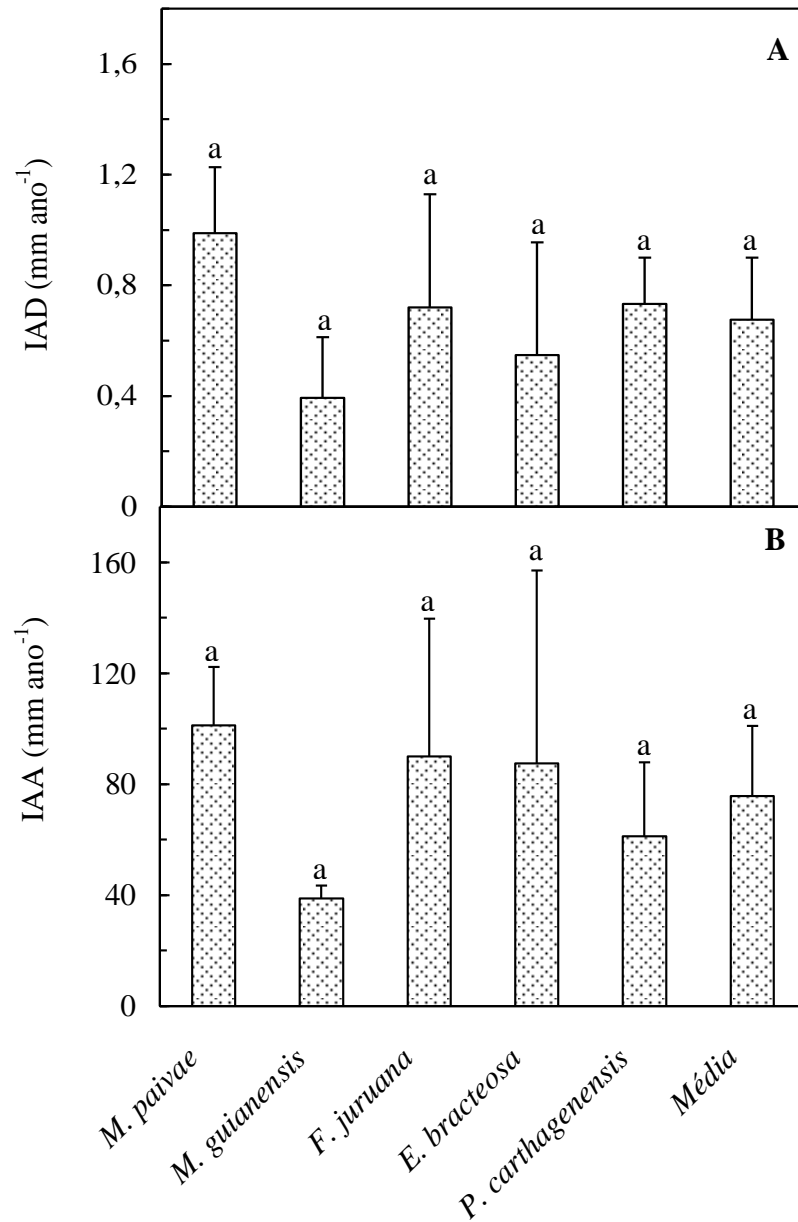


Figura 1. Média por espécie do incremento anual em diâmetro (IAD - **A**) e altura (IAA - **B**). Cada barra representa a média de quatro plantas por espécie. Barras seguidas pela mesma letra não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Para as características foliares os valores de densidade foliar foram estatisticamente diferentes entre as espécies ($p < 0,01$). Porém para espessura foliar, área foliar específica (AFE), velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) e taxa de transporte de elétrons (J_F) as médias foram semelhantes entre as espécies ($p > 0,05$; Tabela 1). Para a condutância do mesofilo (g_m) apenas *P. carthagenensis* diferiu entre as espécies ($p > 0,05$; Figura 2A), em contrapartida para a densidade foliar os valores oscilaram de 0,08 a 0,24 g cm³, onde os menores valores foram observados em *M. paivae*, *M. guianensis* e *F. juruana* (Figura 2B).

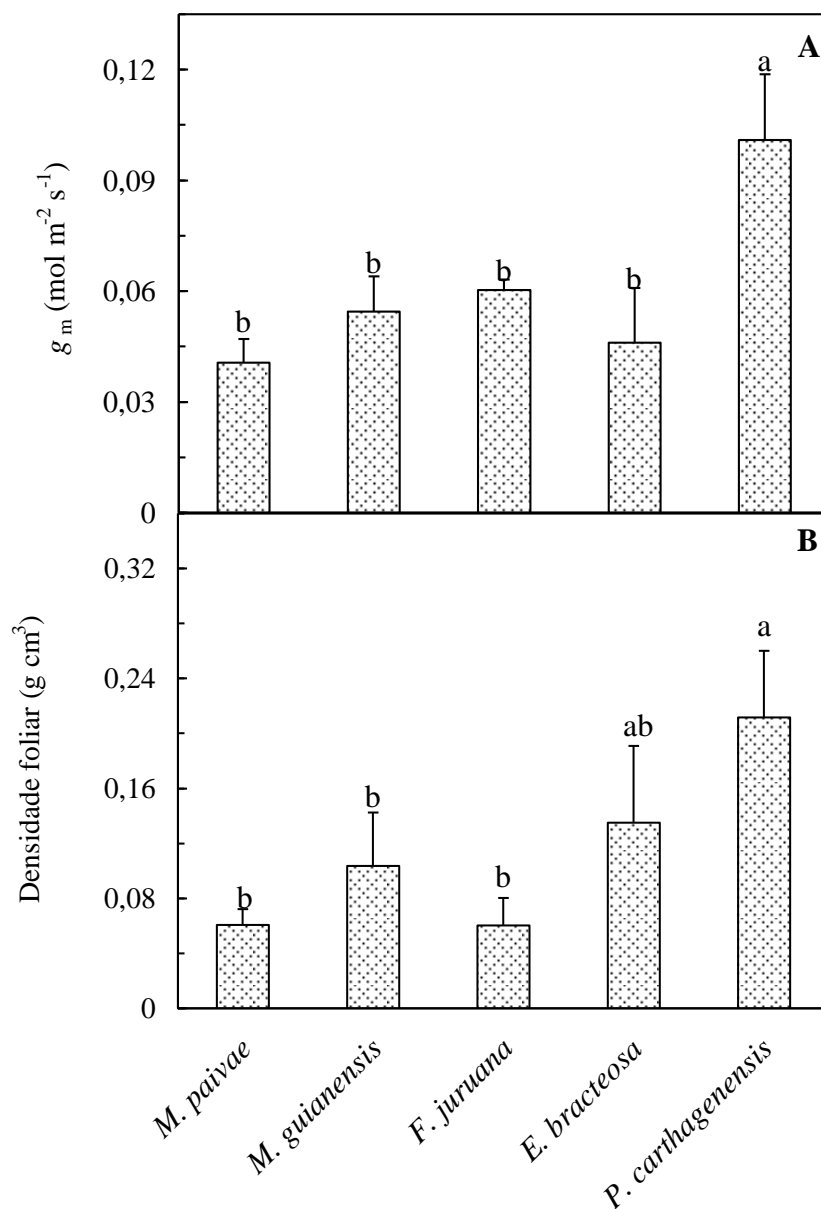


Figura 2. Média por espécie da condutância do mesofilo (g_m - **A**) e da densidade foliar (**B**). Cada barra representa a média de quatro plantas e 2 folhas por planta. Barras seguidas pela mesma letra não diferem ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 1. Média com desvio padrão (DP) dos valores de área foliar específica (AFE), espessura e densidade foliar, índice de área foliar (IAF), fração de céu visível, velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) e taxa de transporte de elétrons (J_{F}). Cada valor corresponde à média de cinco espécies, sendo quatro plantas por espécie e duas folhas (exceto para IAF e FCV).

Variável	Média \pm DP	CV (%)
AFE (g m^{-2})	15,0 \pm 0,8	11,2
Espessura foliar (mm)	0,19 \pm 0,01	13,6
Densidade foliar (g cm^3)	0,11 \pm 0,05	33,9
IAF	5,0 \pm 0,5	10,1
FCV	0,016 \pm 0,008	48,0
V_{cmax} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	20,9 \pm 3,8	17,6
J_{F} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	23,1 \pm 2,9	12,7

O efeito da espessura foliar foi observado apenas na condutância do mesofilo (Figura 3A), onde uma tendência linear crescente foi observada. Entretanto, a densidade foliar causou efeito positivo tanto em g_{m} quanto em V_{cmax} (Figura 3B-D). A taxa de transporte de elétrons (J_{F}) não foi influenciada significativamente ($p > 0,05$) pela espessura e densidade da folha (Figura E,F).

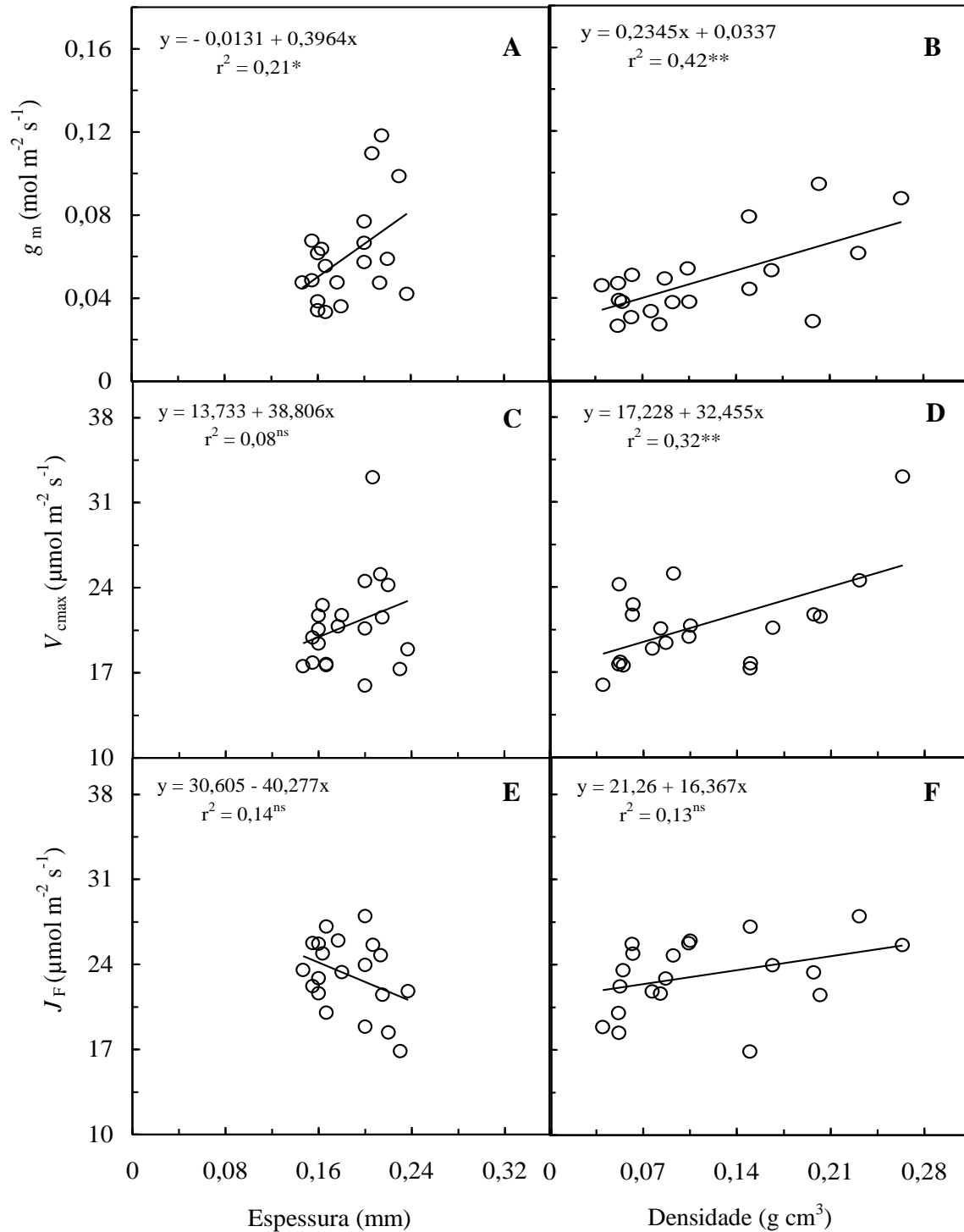


Figura 3. Condutância do mesofilo (g_m – **A**, **D**), velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax} – **B**, **E**) e taxa de transporte de elétrons (J_F – **C**, **F**) em função da espessura e densidade foliar. Dados coletados em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque, sendo quatro plantas por espécie. Significativo a 1% (**) e 5% (*) e não significativo ao nível de 5% (ns).

A altura das árvores não afetou significativamente ($p > 0,05$) os processos difusivos tais como g_m e g_s (Figura 4A,B), em os parâmetros bioquímicos envolvidos no ciclo de Calvin, tais como V_{cmax} e J_{max} (Figura 4C,D).

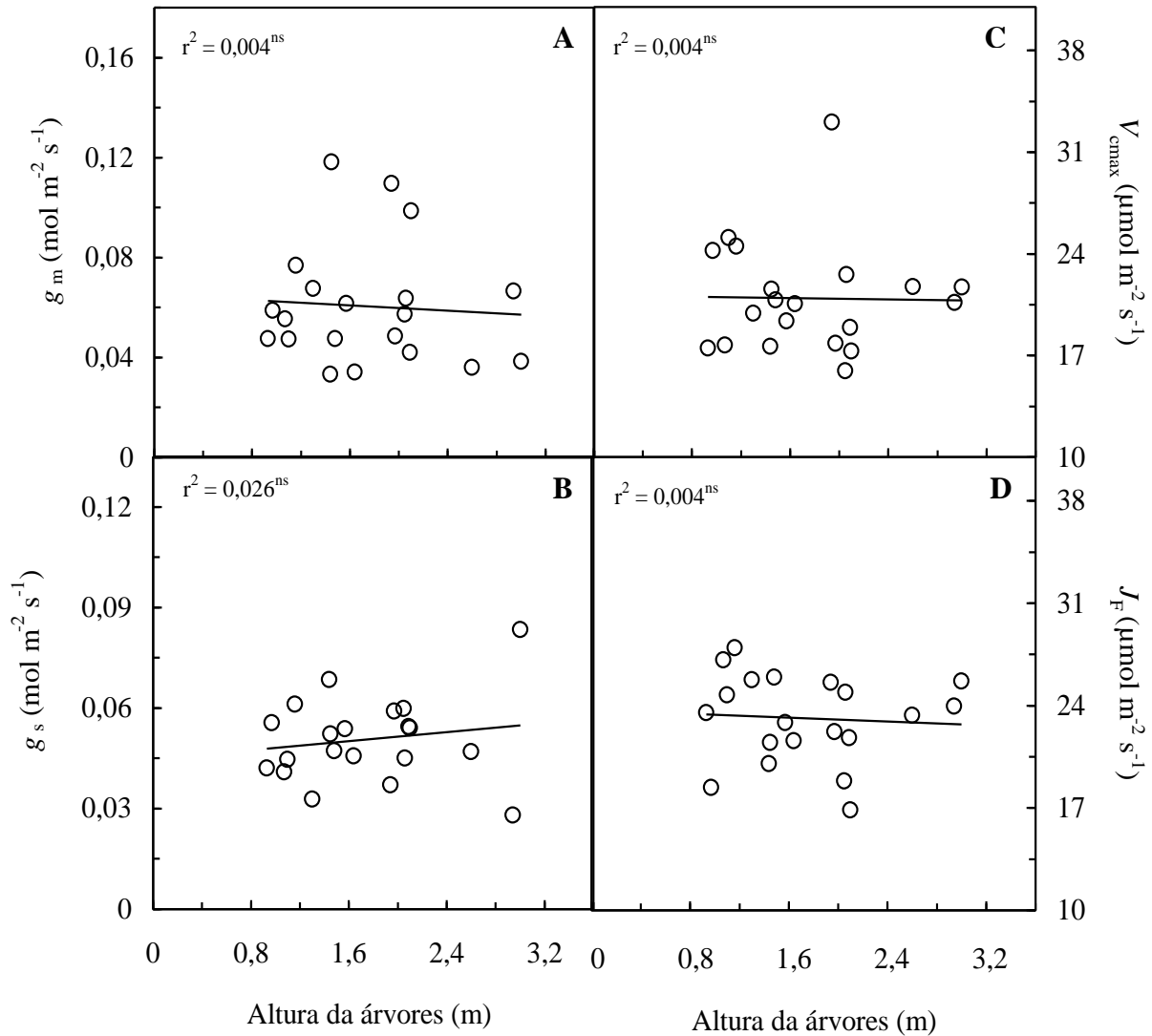


Figura 4. Condutância do mesofilo (g_m – **A**), condutância estomática (g_s – **B**), velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax} – **C**) e taxa de transporte de elétrons (J_F – **D**) em função do incremento anual em altura (IAA). Dados coletados em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque, sendo quatro plantas por espécie. Significativo a 1% (**) e 5% (*) de probabilidade e não significativo ao nível de 5% (ns).

Efeito da luminosidade do sub-bosque

O índice de área foliar (IAF) e a fração de céu visível (FCV) não foram significativas ($p > 0,05$) entre os microsítios de cada espécie (Tabela 1). A média do IAF e de FCV foram $5,0 \pm 0,5$ e $0,016 \pm 0,008$, respectivamente. Não houve efeito do ambiente luminoso expresso pela fração de céu visível nas taxas de incremento anual em altura (IAA) e diâmetro (IAD) nem na área foliar específica (Figura 5). Entretanto as pequenas variações nos níveis de luminosidade em cada microsítio causaram efeito significativo na espessura foliar (Figura 5D).

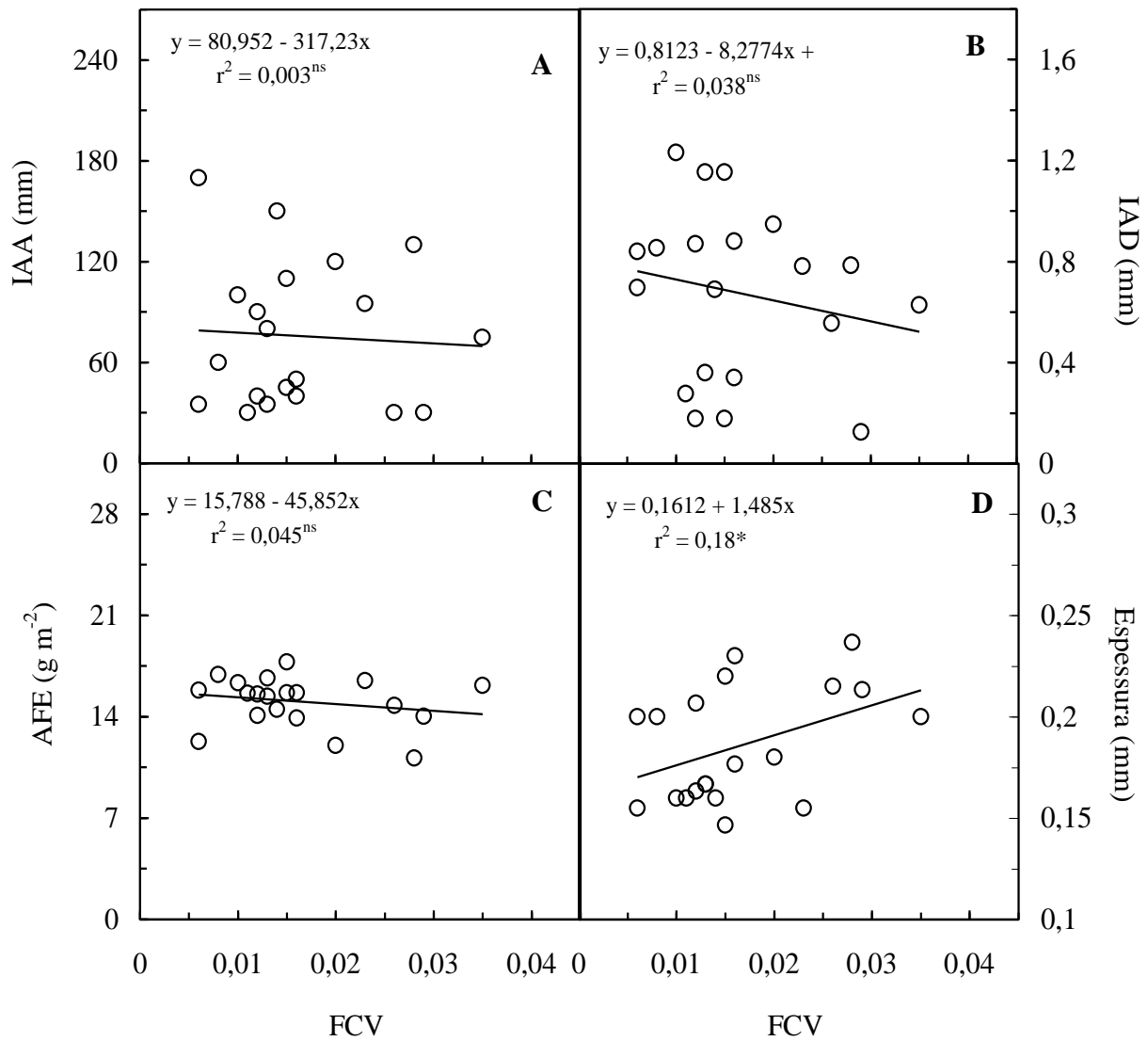


Figura 5. Incremento anual em altura (IAA - **A**), incremento anual em diâmetro (IAD - **B**), área foliar específica (AFE - **C**) e espessura foliar (**D**) em função da fração de céu visível. Dados coletados em cinco espécies florestais em condição de sub-bosque, sendo quatro plantas por espécie. Significativo a 5% (*) de probabilidade e não significativo ao nível de 5% (ns).

4. DISCUSSÃO

As médias de incremento em diâmetro relatadas nesse estudo são menores do que as médias descritas para espécies com DAP (diâmetro acima do peito) ≥ 10 cm em florestas tropicais (Clark e Clark 2001) e para Amazônia, 1 mm ano^{-1} (Vieira *et al.* 2005). Os baixos valores de incremento em espécies de sub-bosque podem estar relacionados à baixa luminosidade, a que as plantas em condição de sub-bosque estão expostas. Entretanto neste estudo não foi possível observar esta relação entre as taxas de crescimentos com a luminosidade do sub-bosque em virtude dos níveis de FCV terem sido semelhantes entre os microsítios de cada planta, o que tornou o ambiente luminoso uniforme no sub-bosque da floresta.

Os valores de IAA e IAD relatados neste estudo são bastante valorosos, visto que, apesar de haver muitos estudos sobre o crescimento em diâmetro em árvores adultas da Amazônia (Vieira *et al.* 2005; Silva *et al.* 2002) ainda são escassos estudos envolvendo crescimento em altura e diâmetro das espécies arbóreas no ambiente de sub-bosque. A baixa variação nos dados IAF e FCV entre os microsítios de cada planta mostra que o ambiente luminoso no sub-bosque da floresta, na área do estudo, foi bastante uniforme. O IAF encontrado neste estudo é menor do que o valor descrito para uma floresta tropical da Costa Rica (Clark *et al.* 2008), onde obtiveram média de IAF de 6,0. Entretanto, estão dentro da faixa descrita para a Amazônia, onde valores entre 5,0 e 6,0 foram observados (Asner *et al.* 2004; Mendes e Marengo 2010).

Para espessura da folha e área foliar específica (AFE) os valores encontrados são comparáveis aos descritos para espécies de sub-bosque da Amazônia central (Marengo e Vieira 2005; Nascimento 2009; Magalhães 2010). As folhas de árvores adaptadas a ambientes com baixa luminosidade podem apresentar algumas modificações na forma, na organização das células do mesofilo juntamente com alteração nos processos bioquímicos e nas

características fotossintéticas em relação a plantas crescidas sob alta luminosidade (Boardman 1977). Tais modificações incluem maior área foliar específica e menor espessura foliar (Oguchi *et al.* 2005), o que explicaria a relação positiva entre espessura e FCV. Isso aumentaria o número de cloroplastos e a quantidade de enzimas fotossintetizantes, dessa forma, a capacidade fotossintética por unidade de área foliar é otimizada.

A relação positiva entre espessura foliar e a fração de céu visível mostrou que nos micro ambientes onde havia maior abertura do dossel e conseqüentemente maior incidência luminosa a espessura foi maior do que aquele micro ambiente que recebiam menor quantidade de luz, o que está de acordo com a literatura (Boardman 1977; Roderick *et al.* 2000; Oguchi *et al.* 2005).

Syvertsen *et al.* (1995), apontaram uma relação importante entre condutância mesófila e algumas características morfológicas, como a área de superfície mesófila, espessura e densidade do tecido foliar, o que está de acordo com nossos resultados. Este autores atribuíram as variações da condutância mesófila às mudanças tanto na massa foliar específica quanto para os teores de proteína solúvel na folha, indicando que as folhas mais grossas têm maior atividade fotossintética e geralmente g_m mais elevada. Além disso, g_m é fortemente relacionado com a espessura da folha e com o conteúdo de nitrogênio das folhas, o que provavelmente reflete na carboxilação da Rubisco.

Hanba *et al.* (1999) também desenvolveram estudo sobre a influencia da anatomia foliar nos valores de g_m . Em folhas anfiestomáticas (tabaco), Evans *et al.* (1994) relataram que g_m não foi afetada pelas estruturas internas da folha. Entretanto, alguns estudos realizados com folhas extremamente grossas (plantas CAM), indicaram que o aumento da espessura foliar pode ocasionar queda nas resistências de transferência do CO_2 (Maxwell *et al.* 1997; Teeri *et al.* 1981). Nossos dados parecem concordar com a teoria de Nobel (1991) onde uma relação positiva entre a condutância de difusão interna foi corretada com a espessura do

mesofilo. Segundo o autor, uma folha mais espessa pode apresentar maior área de difusão do CO₂ nas células do mesofilo em relação a folhas mais finas, que provavelmente apresentam a área do mesofilo mais compactada.

Alguns estudos (Han 2011; Whitehead *et al.* 2011; Woodruff *et al.* 2008) tem mostrado a relação significativa entre g_m e a altura das árvores. Woodruff *et al.* (2008) em estudo realizado com coníferas mostraram que g_m diminui com a altura das arvores, estes autores sugerem que a gravidade e a distância do percurso da água foram provavelmente os principais determinantes nesta tendência, em virtude desses efeitos no potencial hídrico da folha. Além disso, as mudanças em g_m com a altura das árvore podem ocorrer em proporção às mudanças de g_s e das taxas fotossintéticas, que declinam com o altura das árvores (Niinemets *et al.* 2009; Steppe *et al.* 2011). Entretanto, baixa variação entre a altura das arvoretas, ou seja, as repetições apresentavam características morfológicas e fisiológicas semelhantes, explicaria a falta de relação entre g_m e a altura das arvoretas.

5. CONCLUSÃO

1. Variações mínimas na luminosidade do sub-bosque não são suficientes para causar efeito nas taxas de incremento em altura e diâmetro das espécies condicionadas a este tipo de ambientes na floresta Amazônica nas espécies aqui estudadas. Porém, a espessura foliar parece ser sensível às oscilações de luz que ocorrem em cada microsítio.
2. Não é possível observar grandes mudanças na resistência mesofílica quando as árvores apresentam condições fisiológicas semelhantes. Entretanto, a condutância do mesofilo responde bem as pequenas oscilações nas características foliares tais como espessura e densidade foliar, o que reforça a importância da estrutura foliar na difusão interna do CO₂.

5. SÍNTESE

Estudar a magnitude que envolve o deslocamento do CO₂ da atmosfera até os sítios de carboxilação nos cloroplastos é um grande desafio. A obtenção de valores da condutância do mesofilo e da concentração de CO₂ presente nos cloroplastos (C_c) em espécies amazônicas é o ponto de partida para que outros estudos relacionados ao tema sejam realizados a fim de preencher as lacunas abertas neste estudo. A partir dos dados de C_c , alguns parâmetros fotossintéticos tais como a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) e a taxa de transporte de elétrons (J_{max}) poderão ser calculadas para obterem-se valores mais realísticos sobre o estado fisiológico das plantas.

No capítulo 1 estudou-se como a condutância do mesofilo (g_m) varia em função das mudanças nas concentrações de CO₂, bem como a diferença entre a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco e a taxa de transporte de elétrons calculados com a concentração de CO₂ nos espaços intercelulares (C_i) e aqueles calculados utilizando C_c . No capítulo 2, determinou-se o efeito do horário do dia nos parâmetros de trocas gasosas e da fluorescência da clorofila. No capítulo 3, foram investigados os efeitos de componentes minerais foliares tais como nitrogênio, fósforo, magnésio, cálcio e potássio na condutância do mesofilo. E por fim, no capítulo 4 estudou-se como as pequenas variações de luminosidade a que as plantas em condições de sub-bosque estão expostas influenciam no crescimento e nas características foliares, também se a altura das árvores estudadas influenciam nos valores de g_m .

Concluiu-se, que os valores de V_{cmax} e J_{max} calculados com C_i são subestimados em relação àqueles valores obtidos quando os cálculos foram realizados utilizando C_c , o que denota a grande importância da utilização desses valores nos modelos que prognosticam as mudanças climáticas. A condutância do mesofilo dessas espécies adaptadas a condições de sub-bosque mostraram ser sensíveis às mudanças nas concentrações de CO₂, ao horário do dia, ao conteúdo de nitrogênio e a espessura da folha mostrando a sensibilidade desta resistência nas variações anatômicas das folhas e ambientais.

6. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, L.P.; Alvarenga, A.A.; Castro, E.M.; Zanela, S.M.; Vieira, C.V. 2004. Crescimento inicial de plantas de *Cryptocaria aschersoniana* Mez. submetidas a níveis de radiação solar. *Ciência Rural*, 34: 83- 88.
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24: 1-15.
- Asner, G.P.; Keller, M.; Silva, J.N.M. 2004. Spatial and temporal dynamics of forest canopy gaps following selective logging in the eastern Amazon. *Glob Change Biol* 10:765–83.
- Azevedo, G.F.C.; Marengo, R.A. 2012. Growth and physiological changes in saplings of *Minuartia guianensis* and *Swietenia macrophylla* during acclimation to full sunlight. *Photosynthetica*, 50: 86-94.
- Bazzaz, F.A.; Carlson, R.W. 1982. Photosynthetic acclimation to variability in the light environment of early and late successional plants. *Oecologia*, 54:313-316.
- Bernacchi, C.J.; Portis, A.R.; Nakano, H.; VonCaemmerer, S.; Long, S.P. 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.
- Boardmann, N.K. 1977. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 28: 355-377.
- Bongi, G; Loreto, F. 1989. Gas-exchange properties of salt-stressed olive (*Olea europea* L.) leaves. *Plant Physiology*, 90: 1408–1416.
- Bruhn, D.; Egerton, J.G.; Loveys, B.R.; Ball, M.C. 2007. Evergreen leaf respiration acclimates to long-term nocturnal warming under field conditions. *Global Change Biology*, 13: 1216–1223.
- Bunce, J.A. 2010. Variable responses of mesophyll conductance to substomatal carbon dioxide concentration in common bean and soybean. *Photosynthetica*, 48: 507–512.
- Camargo, M.A.; Marengo, R.A. 2011. Densidade, tamanho e distribuição estomática em 35 espécies de árvores na Amazônia Central. *Acta Amazonica*, 41: 205-212.
- Carswell, F.E.; Meir, P.; Wandelli, E.V.; Bonates, L.C.M.; Kruijt, B.; Barbosa, E.M.; Nobre, A.D.; Grace, J.; Jarvis, P.G. 2000. Photosynthetic capacity in a central Amazonian rain forest. *Tree Physiology*, 20: 179–186.
- Centritto, M.; Loreto, F.; Chartzoulakis, K. 2003. The use of low [CO₂] to estimate diffusional and non-diffusional limitations of photosynthetic capacity of saltstressed

- olive saplings. *Plant, Cell and Environment*, 26: 585–594.
- Chappelle, E.W.; Kim, M.S. 1992. Ratio analysis of reflectance spectra (RARS): na algorithm for a remote estimation of the concentrations of chlorophyll A, chlorophyll B, and carotenoids in soybean leaves. *Remote Sensing of Environment*, 39: 239-247.
- Chazdon, R.L.; Kaufmann, S. 1993. Plasticity of leaf anatomy of two rain forest shrubs in relation to photosynthetic light acclimation. *Functional Ecology*, 7:385-394.
- Clark, D.A.; Clark, D.B. 2001. Getting to the canopy: Tree height growth in a neotropical rain forest. *Ecology*, 82: 1460-1472.
- Clark, D.B.; Olivas, P.C.; Oberbauer, S.F.; Clark, D.A.; Ryan, M.G. 2008. First direct landscape-scale measurement of tropical rain forest leaf area index, a key driver of global primary productivity. *Ecology Letters*, 11: 163–172.
- Claussen, J.W. 1996. Acclimation abilities of three tropical rainforest seedlings to an increase in light intensity. *Forest Ecology and Management*, 80: 245:255.
- Cox, P.M.; Betts, R.A.; Collins, M.; Harris, P.P.; Huntingford, C.; Jones, C.D. 2004. Amazonian forest dieback under climate–carbon cycle projections for the 21st century. *Theoretical and Applied Climatology*, 78: 137–156.
- Delfine, S.; Alvino, A.; Concetta-Villani, M.; Loreto, F. 1999. Restriction to carbon dioxide conductance and photosynthesis in spinach leaves recovering from salt stress. *Plant Physiology*, 119: 1101-1106.
- De Pury, D.G.G.; Farquhar, G.D. 1997. Simple scaling of photosynthesis from leaves to canopies without the errors of big-leaf models models. *Plant Cell and Environment*, 20: 537-557.
- Di Marco, G.; Manes, F.; Tricoli, D.; Vitale, E. 1990. Fluorescence parameters measured concurrently with net photosynthesis to investigate chloroplastic CO₂ concentration in leaves of *Quercus ilex* L. *Journal of Plant Physiology*, 136: 358–543.
- Dias, D.P. 2009. *Fotossíntese e crescimento em diâmetro de árvores em função da temperatura e da precipitação numa floresta primária de terra-firme na Amazônia central*. Tese de doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas.
- Doughty, C.E.; Goulden, M.L.; Miller, S.D.; DA Rocha, H.R. 2006. Circadian rhythms constrain leaf and canopy gas exchange in an Amazonian Forest. *Geophysical Research Letters*, 33: 1-5. doi: 10.1029/2006GL026750
- Douthe, C.; Dreyer, E.; Epron, D.; Warren, C.R. 2011. Mesophyll conductance to CO₂, assessed from online TDL-AS records of 13CO₂ discrimination, displays small but

- significant short-term responses to CO₂ and irradiance in Eucalyptus seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 62: 5335–5346.
- Epron, D.; Godard, D.; Cornic, G.; Genty, B. 1995. Limitation of net CO₂ assimilation rate by internal resistances to CO₂ transfer in the leaves of two tree species (*Fagus sylvatica* L. and *Castanea sativa* Mill.). *Plant, Cell and Environment*, 18: 43-51.
- Ethier, G.J.; Livingston, N.J. 2004. On the need to incorporate sensitivity to CO₂ transfer conductance into the Farquhar-von Caemmerer-Berry leaf photosynthesis model. *Plant, Cell and Environment*, 27: 137-153.
- Evans, J.R. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. *Oecologia* 78:9-19
- Evans, J.R.; Loreto F. 2000. Acquisition and diffusion of CO₂ in higher plant leaves. In: Leegood R.C, Sharkey TD, Von Caemmerer S, eds. *Photosynthesis: physiology and metabolism*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 321-351.
- Evans, J.R.; Sharkey, T.D.; Berry, J.A.; Farquhar, G.D. 1986. Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas exchange to investigate CO₂ diffusion in leaves of higher plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 110: 339–346.
- Evans, J.R.; von Caemmerer, S. 1996. Carbon dioxide diffusion inside leaves. *Plant Physiology*, 110: 339–346.
- Evans, J.R.; von Caemmerer, S.; Setchell, B.A.; Hudson, G.S. 1994. The relationship between CO₂ transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of Rubisco. *Australian Journal of Plant Physiology*, 21: 475-495.
- Evans, J.R.; Poorter, H. 2001. Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen in maximizing carbon gain. *Plant Cell Environment*, 24: 755–67.
- Farquhar, G.D.; von Caemmerer, S.; Berry, J.A. 1980. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta*, 149: 78–90.
- Falkowski, P.; Scholes, R.J.; Boyle, E.; Canadell, J.; Canfield, D.; Elser, J.; Gruber, N.; Hibbard, K.; Hogberg, P.; Linder, S.; Mackenzie, F.T.; Moore, B.; Pedersen, T.; Rosenthal, Y.; Seitzinger, S.; Smetacek, V.; Steffen, W. 2000. The global carbon cycle: A test of our knowledge of earth as a system. *Science*, 290: 291-296.
- Ferraz, J.; Ohta, Salles, P.C. 1998. Distribuição dos solos ao longo de dois transectos em floresta primária ao norte de INPA, Manaus, AM. In: Higuchi, N., Campos, M.A.A., Sampaio, P.T.B., dos Santos, J. (Eds), *Pesquisas Florestais para conservação da floresta e reabilitação de áreas degradadas da Amazônia*, p. 111-143.

- Field, C.; Mooney, H.A. 1986. The photosynthesis-nitrogen relationship in wild plants. In: Givnish TJ (ed) *On the economy of plant form and function*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 25±55
- Flexas, J.; Barbourb, M.M.; Brendelc, O.; Cabreraa, H.M.; Carriquía, M.; Díaz-Espejof, A.; Douthecc, C.; Dreyer, E.; Ferriio, J.P.; Gago, J.; Gallé, A.; Galmés, J.; Kodamah, N.; Medrano, H.; Niinemetsi, Ü.; Peguero-Pinaa, J.J.; Pou, A.; Ribas-Carbó, M.; Tomás, M.; Tosensi, T.; Warren, C.R. 2012. Mesophyll diffusion conductance to CO₂: An unappreciated central player in Photosynthesis. *Plant Science*, 193: 70– 84.
- Flexas, J.; Escalona, J.M.; Medrano, H. 1999. Water stress induces different levels of photosynthesis and electron transport rate regulation in grapevines. *Plant Cell Environment*, 22: 39-48.
- Flexas, J.; Ribas-Carbó, M.; Bota, J.; Galmés, J.; Henkle, M.; Martínez-Canellas, S.; Medrano, H. 2006. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytologist*, 172: 73–82.
- Flexas, J.; Ribas-Carbo, M.; Diaz-Espejo, A.; Galmes, J.; Medrano, H. 2008. Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. *Plant, Cell and Environment*, 31, 602–621.
- Flexas, J.; Ribas-Carbo, M.; Diaz-Espejo, A., Galmes, J.; Medrano, H. 2007. Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. *Plant, Cell and Environment*, 30: 1284–1298.
- Flexas, J.; Diaz-Espejo, A.; Galmes, J.; Kaldenhoff, R.; Medrano, H.; Ribas-Carbo, M. 2007b. Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. *Plant, Cell and Environment*, 30: 1284–1298.
- Flexas, J.; Bota, J.; Loreto, F.; Cornic, G.; Sharkey, T.D. 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C₃ plants. *Plant Biology*, 6: 269–279.
- Fyllas, N.M.; Patino, S.; Baker, T.R.; Bielefeld Nardoto, G.; Martinelli, L.A.; Quesada, C.A.; Paiva, R.; Schwarz, M.; Horna, V.; Mercado, L.M.; Santos, A.; Arroyo, L.; Jiménez, E.M.; Luizão, F.J.; Neill, D.A.; Silva, N.; Prieto, A.; Rudas, A.; Silviera, M.; Vieira, I.C.G.; Lopez-Gonzalez, G.; Malhi, Y.; Phillips, O.L.; Lloyd, J. 2009. Basin-wide variations in foliar properties of Amazonian forest: phylogeny, soils and climate. *Biogeosciences Discuss*, 6: 3707–3769.

- Gaspar, M. 2011. Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas. *Revista Brasileira de Botânica*, 34: 481-491.
- Genty, B.; Briantais, J.M.; Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990: 87-92.
- Gilbert, M.E.; Pou, A.; Zwieniecki, M.A.; Holbrook, N.M. 2012. On measuring the response of mesophyll conductance to carbon dioxide with the variable *J* method. *Journal of Experimental Botany*, 63: 413-425.
- González-Rodríguez, A.; Arias, D.M.; Valencia, S.; Oyama, K. 2004. Morphological and RAPD analysis of hybridization between *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), two Mexican red oaks. *American Journal of Botany*, 91: 401-409.
- Grassi, G.; Ripullone, F.; Borghetti, M.; Raddi, S.; Magnani, F. 2009. Contribution of diffusional and non-diffusional limitations to midday depression of photosynthesis in *Arbutus unedo* L. *Trees – Structure and Function*, 23: 1149-1161.
- 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.
- Güsewell, S. 2004. N:P ratios in terrestrial plants: variation and functional significance. *New Phytologist*, 164: 243-266.
- Han, Q. 2011. Height-related decreases in mesophyll conductance, leaf photosynthesis and compensating adjustments associated with leaf nitrogen concentrations in *Pinus densiflora*. *Tree Physiology*, 31: 976-984.
- Hanba, Y.T.; Miyazawa, S.I.; Terashima, I. 1999. The influence of leaf thickness on the CO₂ transfer conductance and leaf stable carbon isotope ratio for some evergreen tree species in Japanese warm-temperate forests. *Functional Ecology*, 13: 632-639.
- Harley, P.C.; Tenhunen, J.D. 1991. Modeling the photosynthetic response of C₃ leaves to environmental factors K.J. Boote, R.S. Loomis (Eds.), *Modeling Crop Photosynthesis: From Biochemistry to Canopy*, CSSA Special Publication, Madison, WI, pp. 1-16.
- Harley, P.C.; Loreto, F.; Di Marco, G.; Sharkey, T.D. 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.
- Hassiotou, F.; Ludwig, M.; Renton, M.; Veneklaas, E.J.; Evans, J.R. 2009. Influence of leaf dry mass per area, CO₂, and irradiance on mesophyll conductance in sclerophylls. *Journal of Experimental Botany*, 60: 2303-2314.

- Higuchi, N.; Santos, J.; Ribeiro, R.J.; Freitas, J.V.; Vieira, G.; Coic, A.; Minette, L.J. Crescimento e incremento de uma floresta amazônica de terra-firme manejada experimentalmente. In: *Biomassa de nutrientes florestais*. INPA/DFID, p.89-132, 1997.
- Hikosaka, K. 2004. Interspecific difference in the photosynthesis-nitrogen relationship: patterns, physiological causes, and ecological importance. *Journal of Plant Research*, 117: 481-494.
- Horton, J.L.; Neufeld, H.S. 1998. Photosynthetic responses of *Microstegium vimineum* (Trin.) A. Camus, a shade-tolerant, C4 grass, to variable light environments. *Oecologia*, 114: 11-19.
- Hrstka, M.; Urban, O.; Petru, E.; Babák, L. 2007. Diurnal regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity and its content in Norway spruce needles. *Photosynthetica*, 45: 334-339.
- INMET. Clima (www.inmet.gov.br/clima). Acesso: 15/05/2012.
- Ishida, A.; Toma, T.; Marjenah. 1999. Limitation of leaf carbon gain by stomatal and photochemical processes in the top canopy of *Macaranga conifera*, a tropical pioneer tree. *Tree Physiology*, 19: 467-473.
- Kaiser, H.; Kappen, L. 2000. In situ observation of stomatal movements and gas exchange of *Aegopodium podagraria* L. in the understorey. *Journal of Experimental Botany*, 51: 1741-1749.
- Kappel, F.; Flore, J.A. 1983. Effect of shade on photosynthesis, specific leaf weight chlorophyll content of leaves and morphology of young peach trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 108: 541-544.
- Koerselman, W.; Meuleman, A.F.M. 1996. The vegetation N:P ratio: a new tool to detect the nature of nutrient limitation. *Journal of Apply Ecology*, 33:1441-1450.
- Kok, B. 1948. A critical consideration of the quantum yield of *Chlorella* photosynthesis. *Enzymologia* 13: 1-56.
- Kumar, A.; Turner, N.C.; Singh, D.P.; Singh, P.; Barr, M. 1999. Diurnal and seasonal patterns of water potential, photosynthesis, evapotranspiration and water use efficiency of clusterbean. *Photosynthetica*, 37: 601-607.
- Laisk, A.; Eichelmann, H.; Oja, V.; Rasulov, B.; Padu, E.; Bichele, I.; Pettai, H.; Kull, O. 2005. Adjustment of leaf photosynthesis to shade in a natural canopy: rate parameters. *Plant, Cell and Environment*, 28: 375-388.
- Lake, J.A.; Quick, W.P.; Beerling, D.J.; Woodward, F.I. 2001. Plant development: Signals from mature to new leaves. *Nature*, 411: 154-154.

- Le Roux, Walcroft, A.S.; Daudet, F.A.; Sinoquet, H.; Chaves, M.M.; Rodrigues, A.; Osório, L. 2001. Photosynthetic light acclimation in peach leaves: importance of changes in mass: area ratio, nitrogen concentration, and leaf nitrogen partitioning. *Tree Physiology*, 21: 377–386.
- Lloyd, J.; Farquhar, G.D. 2008. Effects of rising temperatures and [CO₂] on the physiology of tropical forest trees. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Biological Sciences*, 363: 1811–1817.
- Lloyd, J.; Syvertsen, J.P.; Kriedemann, P.E.; Farquhar, G.D. 1992. Low conductance for CO₂ diffusion from stomata to the sites of carboxylation in leaves of woody species. *Plant, Cell and Environment*, 15: 873-899.
- Long, S.P.; Bernacchi, C.J. 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.
- Loreto F, Centritto M, Chantzoulakis K. 2003. Photosynthetic limitations in olive cultivars with different sensitivity to salt stress. *Plant, Cell and Environment*, 26: 595–601.
- Loreto, F.; Di Marco, G.; Tricoli, D.; Sharkey, T.D. 1994. Measurements of mesophyll conductance, photosynthetic electron transport and alternative electron sinks of field grown wheat leaves. *Photosynthesis Research*, 41: 397–403.
- Magalhães, N.S. 2010. *Crescimento e variação diurna da condutância estomática e taxas fotossintéticas de cinco espécies arbóreas da flora amazônica*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 77pp.
- Magalhães Filho, J.R.; Machado, E.C.; Machado, D.F.S.P.; Ramos, R.A.; Ribeiro, R.V. 2009. Variação da temperatura do substrato e fotossíntese em mudas de laranjeira 'Valência'. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 44: 1118-1126.
- Malavolta, E.; Crocomo, O.J. O potássio e a planta. In: Yamada, T.; Igue, K.; Muzilli, O.; Usherwood, N.R. (Ed.) *O potássio na agricultura brasileira*. Piracicaba: Instituto da Potassa & Fosfato: Instituto Internacional da Potassa, 1982. p.95-162.
- Malhi, Y.; Timmons, R.J.; Betts, R.A.; Killeen, T.J.; Li, W.; Nobre, C.A. 2008. Climate change, deforestation and the fate of the Amazon. *Science*, 319: 169–172.
- Manter, D.K.; Kerrigan, J. 2004. A/C_i curve analysis across a range of woody plant species: influence of regression analysis parameters and mesophyll conductance. *Journal of Experimental Botany*, 55: 2581-2588.
- Massacci, A.; Nabiev, S.M.; Pietrosanti, L.; Nematov, S.K.; Chernikova, T.N.; Thor, K.; Leipner, J. 2008. Response of the photosynthetic apparatus of cotton (*Gossypium*

- hirsutum*) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas-exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46: 189–195.
- Marenco, R.A.; Antezana-Vera, S.A.; Nascimento, H.C.S. 2009. Relationship between specific leaf area, leaf thickness, leaf water content and SPAD-502 readings in six Amazonian tree species. *Photosynthetica*, 47: 184-190.
- Marenco, R.A.; Lopes, N.F. Fisiologia vegetal. 2009. *Fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral*. 3ª ed, Viçosa: UFV, 451pp.
- Marenco, R.A.; Vieira, G. 2005. Specific leaf area and photosynthetic parameters of tree species in the forest understorey as a function of the microsite light environment in central Amazonia. *Journal of Tropical Forest Science*, 17: 265-278.
- Marenco, R.A.; Siebke, K.; Farquhar, G. D.; Ball, M. C. 2006. Hydraulically based stomatal oscillations and stomatal patchiness in *Gossypium hirsutum*. *Functional Plant Biology*, 33: 1103-1113.
- Maquard, R.D.; Tipton, J.L. 1987. Relationship between extractable chlorophyll and an *in situ* method to estimate leaf greenness. *Hortscience*, 22:1327.
- Maxwell, K.; Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51: 659-668.
- McClung, C.R. 2000. Circadian rhythms in plants: a millennial view. *Physiologia Plantarum*, 109: 359–371.
- Medrano, H.; Escalona, J.M.; Bota, J.; Gulias, J.; Flexas, J. 2002. Regulation of photosynthesis of C-3 plants in response to progressive drought: Stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany*, 89: 895-905.
- Medlyn, B.E.; Badeck, F.W.; DE Pury, D.G.G.; Barton, C.V.M.; Broadmeadow, M.; Ceulemans, R.; DE Angelis, P.; Forstreuter, M.; Jach, M.E.; Kellomäki, S.; Laitat, E.; Marek, M.; Philippot, S.; Rey, A.; Strassemeier, J.; Laitinen, K.; Liozon, R.; Portier, B.; Roberntz, P.; Wang, K.; Jarvis, P.G. 1999. Effects of elevated [CO₂] on photosynthesis in European forest species: a meta-analysis of model parameters. *Plant Cell and Environment*, 22: 1475-1495.
- Mendes, K.R. 2009. *Efeito da sazonalidade da precipitação no crescimento e trocas gasosas em espécies arbóreas numa floresta de terra-firme da Amazônia Central*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA, Manaus, Amazonas. 82 pp.
- Mendes, K.R.; Marenco, R.A. 2010. Leaf traits and gas exchange in saplings of native tree species in the Central Amazon. *Scientia Agricola*, 67: 624-632.

- Miyake, C.; Yokota, A. 2000. Determination of the rate of photoreduction of O₂ in the water–water cycle in watermelon leaves and enhancement of the rate by limitation of photosynthesis. *Plant Cell Physiology*, 41: 335–343.
- Miyazawa S.I.; Terashima I. 2001. Slow development of leaf photosynthesis in an evergreen broad-leaved tree, *Castanopsis sieboldii*: relationships between leaf anatomical characteristics and photosynthetic rate. *Plant, Cell and Environment*, 24 : 279–291.
- Molion, L.C.B. 1987. Climatologia Dinâmica da região Amazônica: mecanismos de precipitação. *Revista Brasileira de Meteorologia*, 2: 107 – 117.
- Morison, J.I.L.; Gifford, R.M. 1983. Stomatal Sensitivity to Carbon Dioxide and Humidity: A comparison of two C₃ and two C₄ grass species. *Plant Physiology*, 71: 789-796.
- Mulkey, S.S, Smith, A.P., Wright, S.J. 1991. Comparative life history and physiology of two understorey neotropical herbs. *Oecologia* 88: 263-273.
- Nascimento, H.C.S. 2009. *Influência da luminosidade no crescimento e características foliares em espécies arbóreas da Amazônia Central na fase juvenil*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 71pp.
- Nascimento, H.C.S.; Marengo, R.A. 2010. SPAD-502 readings in response to photon fluence in leaves with different chlorophyll content. *Ceres*, 57: 614-620.
- Netto, A.T.; Campostrini, E.; Oliveira, J.G.; Yamanishi, O.K. 2002. Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14: 203-210.
- Niinemets, Ü.; Tenhunen, J.D. 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.
- Nobel P.S. 1991. Leaves and fluxes. Chapter 8. *In: Physicochemical and Environmental Plant Physiology*, Academic Press, San Diego, CA. pp. 393-472.
- Oguchi, R.; Hikosaka, K.; Hirose, T. 2005. Leaf anatomy as a constraint for photosynthetic acclimation: differential responses in leaf anatomy to increasing growth irradiance among three deciduous trees. *Plant, Cell and Environment*, 28: 916-927.
- Osunkoya, O.O.; Ash, J.E.; Graham, A. 1994. Influence of seed size and seedling ecological attributes on shade tolerance tree species in Northern Queensland. *Journal Ecology*, 82: 149-163.
- Park, S.Y; Furukawa, A. 1999. Photosynthetic and stomatal responses of two tropical and two temperate trees to atmospheric humidity. *Photosynthetica*, 36: 181-186.

- Parkhurst, D.F. 1994. Tansley review no. 65: Diffusion of CO₂ and other gases inside leaves. *New Phytologist*, 126: 449-479.
- Parry, M.A.J.; Delgado, E.; Vadell, J.; Keys, A.J.; Lawlor, D.W.; Medrano, H. 1993. Water stress and the diurnal activity of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase in field *Nicotina tabacum* genotypes selected for survival at low CO₂ concentrations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 31: 113-120.
- Passos, L.P. 1996. Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 223pp.
- Peng, S.; Laza, R.C.; Garcia, F.C.; Cassman, K.G. 1995. Chlorophyll meter estimates leaf area-based N concentration of rice. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 26:927-935.
- Piel, C.; Frank, E.; Le Roux, X.; Genty, B. 2002. Effect of local irradiance on CO₂ conductance of mesophyll in walnut. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2423-2430.
- Pons, T.L.; Flexas, J.; von Caemmerer, S.; Evans, J.R.; Genty, B.; Ribas-Carbo, M.; Bruognoli, E. 2009 Estimating mesophyll conductance to CO₂: methodology, potential errors, and recommendations. *Journal of Experimental Botany*, 60: 2217–2234.
- Poorter, H.; Evans, J.R. 1998. Photosynthetic nitrogen-use efficiency of species that differ inherently in specific leaf area. *Oecologia*, 116: 26-37.
- Poorter, H.; Remkes, C.; Lambers, H. 1990. Carbon and nitrogen economy of 24 wild species differing in relative growth rate. *Plant Physiology*, 94: 621-627.
- Rand, R.H. 1978. A theoretical analysis of CO₂ absorption in sun versus shade leaves. *Journal of Biomechanical Engineering*, 100: 20-24.
- Reich, P.B.; Ellsworth, D.S.; Walters, M.B.; Vose, J.M.; Gresham, C.; Volin, J.C.; Bowman, W. Generality of leaf trait relationships: A test across six biomes. *Ecology*, 80: 1955-1969, 1999.
- Reich, P.B.; Uhl, C.; Walters, M.B.; Ellsworth, D.S. 1991. Leaf lifespan as a determinant of leaf structure and function among 23 Amazonian tree species. *Oecologia*, 86: 16-24.
- Reich, P.B.; Walters, M.B.; Ellsworth, D.S.; Uhl, C. 1994. Photosynthesis-nitrogen relations in Amazonian tree species. I. Patterns among species and communities. *Oecologia*, 97: 62-72.
- Reich, P.B.; Kloeppel, B.D.; Ellsworth, D.S.; Walters, M.B. 1995a. Different photosynthesis-nitrogen relations in deciduous hardwood and evergreen coniferous tree species. *Oecologia*, 104: 24-30.

- Reich, P.B.; Ellsworth, D.S.; Uhl, C. 1995b. Leaf carbon and nutrient assimilation and conservation in species of different successional status in an oligotrophic Amazonian forest. *Functional Ecology*, 9: 65-76.
- Roderick, M.L.; Berry, S.L.; Noble, I.R. 2000. A framework for understanding the relationship between environment and vegetation based on the surface area to volume ratio of leaves. *Functional Ecology*, 14: 423-437.
- Rorison, I.H.; Spence, R.E.; Gupta, P.L. 1993. Mineral nutrients: chemical analysis. In: Hendry, G.A.F.; Grime, J.P. (Eds), *Methods in comparative plant ecology: a laboratory manual*. Chapman & Hall: London, p.156-163
- Rubio-Casal, A.E.; Leira-Doce, P.; Figueroa, M.E.; Castillo, J.M. 2010. Contrasted tolerance to low and high temperatures of three tree taxa co-occurring on coastal dune forests under Mediterranean climate. *Journal of Arid Environments*, 74: 429–439.
- Sage, R.F.; Kubien, D.S. 2007. The temperature response of C₃ and C₄ photosynthesis. *Plant Cell and Environment*, 30: 1086-1106.
- Salisbury, F.B.; Ross, C.W. 1992. *Plant Physiology*, 4^a ed. Wadsworth Publishing, Belmont, CA, 682pp.
- Sarda, X.; Tusch, D.; Ferrare, K.; Legrand, E.; Dupuis, J.M.; Casse-Delbart, F.; Lamaze, T. 1997. Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells. *Plant Journal*, 12: 1103-1111.
- Schaper, H.; Chacko, E.K. 1991. Relation between extractable chlorophyll and portable chlorophyll meter readings in leaves of eight tropical and subtropical fruittree species. *Journal Plant Physiology*, 138: 674-677.
- Sellers, P.J.; Dickinson, R.E.; Randall, D.A. 1997. Modeling the exchanges of energy, water, and carbon between continents and the atmosphere. *Science*, 275: 502–509.
- Sharkey, T.D.; Bernacchi, C.J.; Farquhar, G.D.; Singsaas, E.L., 2007. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C₃ leaves. *Plant, Cell and Environment*, 30, 1035–1040.
- Shrestha, S.; Brueck, H.; Asch, F. 2012. Chlorophyll index, photochemical reflectance index and chlorophyll fluorescence measurements of rice leaves supplied with different N levels. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 113: 7–13.
- Silva, R.P.; Santos, J.; Tribuzi, E.S.; Chambers, J.Q.; Nakamura, S.; Higuchi, N. 2002. Diameter increment and growth patterns for individual tree growing in Central Amazon, Brazil. *Forest Ecology and Management*, 166: 295–301.

- Sims, D.A.; Pearcy, R.W. 1989. Photosynthetic characteristics of a tropical forest understory herb, *Alocasia macrorrhiza*, and a related crop species, *Colocasia esculenta* grown in contrasting light environments. *Oecologia*, 79:53-59.
- Smeal, D.; Zhang, H. 1994. Chlorophyll meter evaluation for nitrogen management in corn. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 25: 1495-1503.
- Singsaas, E.L.; Ort, D.R.; DeLucia, E.H. 2004. Elevated CO₂ effects on mesophyll conductance and its consequences for interpreting photosynthetic physiology. *Plant, Cell and Environment*, 27: 41–50.
- Steppe, K.; Niinemets, Ü.; Teskey, R.O. 2011. Tree size- and age-related changes in leaf physiology and their influence on carbon gain, *In: Meinzer, F.C.; Dawson, T.; Lachenbruch, B. (Eds.), Size- and Age-related Changes in Tree Structure and Function*, Springer, Berlin, p. 235–253.
- Syvertsen, J.P.; Lloyd, J.; McConchie, C.; Kriedemann, P.E.; Farquhar, G.D. 1995. On the relationship between leaf anatomy and CO₂ diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant, Cell and Environment*, 18: 149–157.
- Tazoe, Y.; Von Caemmerer, S.; Badger, M.R.; Evans, J.R. 2009. Light and CO₂ do not affect the mesophyll conductance to CO₂ diffusion in wheat leaves. *Journal of Experimental Botany*, 60: 2291–2301.
- Teeri, J.A.; Tonsor, S.J.; Turner, M. 1981. Leaf thickness and carbon isotope composition in the Crassulaceae. *Oecologia*, 50: 367–369.
- Terashima, I.; Hikosaka, K. 1995. Comparative ecophysiology of leaf and canopy photosynthesis. *Plant Cell Environment*, 18: 1111–1128.
- Terashima, I.; Ono, K. 2002. Effects of HgCl₂ on CO₂ dependence of leaf photosynthesis: evidence indicating involvement of aquaporins in CO₂ diffusion across the plasma membrane. *Plant and Cell Physiology*, 43: 70-78.
- Theodoro, G.F.; Maringoni, A.C. 2006. Efeito de doses de potássio na severidade da murchar-de-curtobacterium em cultivares de feijoeiro comum. *Summa Phytopathologica*, 32: 139-146.
- Tholen, D.; Zhu, X.G. 2011. The mechanistic basis of internal conductance: A theoretical analysis of mesophyll cell photosynthesis and CO₂ diffusion. *Plant Physiology*, 156: 90–105.
- Valladares, F.; Niinemets, Ü. 2008. Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39: 237–257

- Valladares, F.; Pearcy, R.W. 1997. Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant Cell and Environment*, 20: 25-36.
- Veríssimo, A.; Amaral, P. 1996. A exploração madeireira na Amazônia: situação atual e perspectivas. *Cadernos de Propostas*, 3: 9-16.
- Vieira, S.; Trumbore, S.; Camargo, P.B.; Selhorst, D.; Chambers, J.Q.; Higuchi, N. 2005. Slow growth rates of Amazonian trees: consequences for carbon cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 18502–18507.
- Vieira, S.; Trumbore, S.; Camargo, P.B.; Selhorst, D.; Chambers, J.Q.; Higuchi, N. Slow growth rates of Amazonian trees: consequences for carbon cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, p. 18502–18507, 2005.
- Von Caemmerer, S. 2000. Biochemical models of leaf photosynthesis. CSIRO Publishing, Canberra, 165 pp.
- Vrabl, D.; Vaskov, M.; Hronkova, M.; Flexas, J.; SantrCek, J. 2009. Mesophyll conductance to CO₂ transport estimated by two independent methods: Effect of variable CO₂ concentration and abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*, 60: 2315–2323.
- Warren, C.R. 2008. Stand aside stomata, another actor deserves centre stage: the forgotten role of the internal conductance to CO₂ transfer. *Journal of Experimental Botany*, 59: 1475–1487.
- Warren, C.R. 2007. Stand aside stomata, another actor deserves centre stage: the forgotten role of the internal conductance to CO₂ transfer. *Journal of Experimental Botany*,
- Warren, C.R.; Adams, M.A. 2006. Internal conductance does not scale with photosynthetic capacity: implications for carbon isotope discrimination and the economics of water and N use in photosynthesis. *Plant, Cell and Environment*, 29: 192–201.
- Warren, C.R. 2004. The photosynthetic limitation posed by internal conductance to CO₂ movement is increased by nutrient supply. *Journal of Experimental Botany*, 55, 2313–2321.
- Warren, C.R.; Ethier, G.J.; Livingstone, N.J.; Grant, N.J. Turpin, D.H.; Harrison, D.L.; Black, T.A. 2003. Transfer conductance in second growth Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) canopies. *Plant, Cell and Environment*, 26: 1215–1227.
- Whitehead, D.; Barbour, M.M.; K.L. Griffin, M.H. Turnbull, D.T. 2011. Tissue, Effects of leaf age and tree size on stomatal and mesophyll limitations to photosynthesis in mountain beech *Nothofagus solandrii* var. *cliffortioides*. *Tree Physiology*, 31: 985–996.

- Woodruff, D.R.; Meinzer, F.C.; Lachenbruch, B. 2008. Height-related trends in leaf xylem anatomy and shoot hydraulic characteristics in a tall conifer: Safety versus efficiency in water transport. *New Phytologist*, 180: 90–99.
- Wullschleger, S.D. 1993. Biochemical limitations to carbon assimilation in C3 plants-a retrospective analysis of the A/C_i curves from 109 species. *Journal of Experimental Botany*, 44, 907-20.

ANEXO

AULA DE QUALIFICAÇÃO

PARECER

Aluno(a): **HELENA CRISTINA SANTOS NASCIMENTO**

Curso: BOTÂNICA

Nível: Doutorado

Orientador(a): Ricardo Antonio Marenco (INPA)

Título:

"CONDUTÂNCIA DO MESOFILO E CARACTERÍSTICA CINÉTICAS DA RUBISCO EM FUNÇÃO DO HORÁRIO DO DIA E DA ESPESSURA FOLIAR EM ESPÉCIES ARBÓREAS DA AMAZÔNIA CENTRAL"

BANCA JULGADORA:

TITULARES:

ROSALEE A. COELHO NETTO (INPA)
HIROSHI NODA (INPA)
NIRO HIGUCHI (INPA)
MARIA TERESA FERNANDEZ PIEDADE (INPA)
LUIZ ANTONIO CANDIDO (INPA)

SUPLENTES:

ASTRID DE OLICEIRA WITTMANN (INPA)
KAORU YUYAMA (INPA)

EXAMINADORES	PARECER		ASSINATURA
ROSALEE A. COELHO NETTO	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado	<input type="checkbox"/> Reprovado	<i>Rosalee A. Coelho Netto</i>
HIROSHI NODA	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado	<input type="checkbox"/> Reprovado	<i>Hiroschi Noda</i>
NIRO HIGUCHI	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado	<input type="checkbox"/> Reprovado	<i>Niro Higuchi</i>
MARIA TERESA F. PIEDADE	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado	<input type="checkbox"/> Reprovado	<i>Maria Teresa F. Piedade</i>
LUIZ ANTONIO CANDIDO	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado	<input type="checkbox"/> Reprovado	<i>Luiz Antonio Candido</i>

Manaus(AM), 10 de dezembro de 2009.

OBS: _____



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA DO INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

Aos vinte cinco dias do mês de fevereiro do ano de 2013, às 14h00min, no mini auditório da casa da ciência do INPA, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: **Dra. Maria Teresa Fernandez Piedade**, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, **Dr. Jair Max Furtunato Maia**, da Universidade Estadual do Amazonas, **Dra. Diolina Moura Silva**, da Universidade Federal do Espírito Santo, **Dr. Joaquim dos Santos**, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, e **Dra. Zilvanda Lourenço Oliveira Melo**, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, tendo como suplentes **Dra. Maria Gracimar Pacheco**, da Universidade Federal do Amazonas e a **Dra. Roseana Pereira da Silva**, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da **TESE DOUTORADO** da discente **Helena Cristina Santos Nascimento**, intitulada **“CONDUTÂNCIA DO MESOFILO, VELOCIDADE MÁXIMA DE CARBOXILAÇÃO DA RUBISCO E TRANSPORTE DE ELÉTRONS EM FUNÇÃO DO HORÁRIO DO DIA E DA ESPESSURA FOLIAR EM ESPÉCIES ARBÓREAS DA AMAZÔNIA CENTRAL”**, sob a orientação Dr. Ricardo Antonio Marengo Mendoza. Após a exposição, dentro do tempo regulamentar, o (a) discente foi arguido (a) oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final:

APROVADO

REPROVADO

Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos seguintes membros da Comissão Examinadora:

Dr(a). **Maria Teresa Fernandez Piedade (INPA)** *Maria Teresa Fernandez Piedade*
Dr(a). **Jair Max Furtunato Maia (UEA)** *Jair Max Furtunato Maia*
Dr(a). **Diolina Moura Silva (UFES)** *Diolina Moura Silva*
Dr(a). **Joaquim dos Santos (INPA)** *Joaquim dos Santos*
Dr(a). **Zilvanda Lourenço Oliveira Melo (INPA)** *Zilvanda Lourenço Oliveira Melo*

Alberto Vicentini
Alberto Vicentini
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Botânica
PO. 272/2012 DCBO/INPA