



POLLYANNA APARECIDA DE CARVALHO

**FONTES DE NITROGÊNIO NA FISIOLOGIA DE
CULTIVARES DE CAFÉ ARÁBICA SOB AUMENTO DA
CONCENTRAÇÃO DE CO₂**

**LAVRAS - MG
2020**

POLLYANNA APARECIDA DE CARVALHO

**FONTES DE NITROGÊNIO NA FISIOLOGIA DE CULTIVARES DE CAFÉ
ARÁBICA SOB AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE CO₂**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador
Prof. Dr. Rubens José Guimarães

**LAVRAS – MG
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Carvalho, Pollyanna Aparecida de.

Fontes de nitrogênio na fisiologia de cultivares de café arábica
sob aumento da concentração de CO₂ / Pollyanna Aparecida de
Carvalho. - 2020.

93 p. : il.

Orientador(a): Rubens José Guimarães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Coffea arábica. 2. Mudanças climáticas. 3. Nutrição mineral.
I. Guimarães, Rubens José. II. Título.

POLLYANNA APARECIDA DE CARVALHO

**FONTES DE NITROGÊNIO NA FISIOLOGIA DE CULTIVARES DE CAFÉ
ARÁBICA SOB AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE CO₂**

**NITROGEN SOURCES ON THE PHYSIOLOGY OF ARABICA COFFEE
CULTIVARS UNDER INCREASED CO₂ CONCENTRATION**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 06 de agosto de 2020.

Dra. Danielle Pereira Baliza	IF SUDESTE MG
Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho	EMBRAPA
Dra. Vânia Aparecida Silva	EPAMIG
Dra. Michele Valquíria dos Reis	UFLA

Prof. Dr. Rubens José Guimarães
Orientador

**LAVRAS – MG
2020**

*Aos meus pais, Sebastião e Marcia,
ao meu avô João, às minhas irmãs Mariana e Jullyanna, ao meu
sobrinho Gabriel e ao Pedro, com amor.*

Dedico

*A Deus,
Ofereço*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, à Nossa Senhora Aparecida e a todos os santos e anjos por me iluminar e oferecer força em todas as horas.

A minha mãe, Marcia, e ao meu pai, Sebastião, pelo exemplo de vida, esperança, fé e coragem, obrigada por sempre acreditarem e confiarem em mim.

Ao meu avô João, às minhas irmãs Mariana e Jullyanna, e ao Pedro e pelas orações, ensinamentos, pela constante torcida, pela paciência e pelo apoio em todos os momentos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Ao meu orientador, Dr. Rubens José Guimarães, pelos ensinamentos e amizade.

À Banca examinadora.

À minha amiga Débora que com certeza contribuiu para a concretização deste trabalho.

Aos funcionários do Setor de Cafeicultura.

Aos colegas da Fitotecnia.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha caminhada até aqui.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

RESUMO

Objetivou-se com esse estudo avaliar alterações fisiológicas em mudas de café cultivadas sob elevada concentração de dióxido de carbono ($[CO_2]$) e submetidas a aplicação de nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+). Os tratamentos consistiram da aplicação de solução nutritiva com 16 mM de NO_3^- ou 16 mM de NH_4^+ sob atmosfera com concentração atual de CO_2 ($380\mu L$ de $CO_2 L^{-1}$ de ar) ou sob atmosfera enriquecida com $760\mu L$ de $CO_2 L^{-1}$ de ar. Foram analisados o crescimento, o metabolismo de carboidratos, a assimilação do nitrogênio, os teores de minerais e a atividade do sistema antioxidante. Os resultados mostraram que os fatores $[CO_2]$ (380 ou $760 \mu L L^{-1}$) e fonte de nitrogênio (NO_3^- ou NH_4^+), influenciaram os processos fisiológicos das cultivares de *Coffea arabica* L. ('Mundo Novo', 'Rubi' e 'Catuaí') em diferentes níveis, dependendo da resposta analisada. A interação entre esses dois fatores, também foi significativa para diversas variáveis avaliadas. A elevação da $[CO_2]$, aumentou a taxa assimilatória líquida e a eficiência do uso da água, por outro lado, reduziu a condutância estomática e a taxa transpiratória. Os teores de clorofilas, a eficiência do PSII, a respiração e os parâmetros V_{cmax} e J_{max} também foram positivamente influenciados pela alta $[CO_2]$, ao passo que a fotorrespiração reduziu, independente da fonte de nitrogênio. Coerentemente, a taxa de crescimento relativo e a matéria seca das plantas elevaram-se significativamente sob maior $[CO_2]$. Verificou-se também que, nas folhas de café, o tratamento com alta $[CO_2]$, reduziu as quantidades de carboidratos solúveis enquanto elevou os teores de amido. Ainda nos tecidos foliares, a maior $[CO_2]$ implicou em reduções nas atividades da redutase do nitrato e da sintetase da glutamina com consequentes quedas nas concentrações de aminoácidos independente da fonte de nitrogênio. Sob alto CO_2 , os teores de proteínas foram reduzidos nas folhas das plantas com NO_3^- e aumentados nas tratadas com NH_4^+ . Os teores de macronutrientes e a atividade do sistema antioxidante, também apresentaram reduções nas folhas sob alto CO_2 em todos os tratamentos. Nas raízes, a elevação da $[CO_2]$, aumentou as quantidades de carboidratos solúveis bem como a atividade da invertase. Ainda nesse tecido, a maior $[CO_2]$ implicou em incrementos nos teores de NO_3^- e NH_4^+ , nas atividades da redutase do nitrato e da sintetase da glutamina com consequentes aumentos nas concentrações de aminoácidos e proteínas, sendo que os maiores resultados de atividade da sintetase da glutamina e produção de proteínas foram detectados no tratamento com NH_4^+ . A atividade do sistema antioxidante também se elevou nas raízes das plantas sob alta $[CO_2]$, independente da fonte de nitrogênio. Para a espécie, foram verificadas alterações fisiológicas favoráveis, a partir da elevação da $[CO_2]$. Sob elevada $[CO_2]$, as plantas tratadas com NH_4^+ superaram o desempenho das plantas com NO_3^- , pois, as plantas com NH_4^+ , apresentaram maiores taxas fotossintéticas e maior eficiência do uso da água resultando em maior acúmulo de matéria seca. Assim, verificou-se que a aplicação de NH_4^+ foi mais favorável que a aplicação NO_3^- , para o desempenho fisiológico do café sob alta $[CO_2]$.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Mudanças climáticas. Nutrição mineral. Metabolismo do nitrogênio. Metabolismo do carbono. Sistema antioxidante. Nitrato. Amônio.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate physiological changes in coffee plantlets ('Mundo Novo', 'Rubi' and 'Catuaí') grown under high CO₂ concentration and subjected to nitrate (NO₃⁻) or ammonium (NH₄⁺) application. The treatments consisted of nutrient solution application with 16 mM NO₃⁻ or 16 mM NH₄⁺ under atmosphere with current CO₂ concentration (380 μL CO₂ L⁻¹ air) or under atmosphere enriched with 760 μL CO₂ L⁻¹ air. Growth, carbohydrate metabolism, nitrogen assimilation, mineral content and antioxidant system activity, were analyzed. The results showed that the factors CO₂ concentration (380 or 760 μL L⁻¹) and nitrogen source (NO₃⁻ or NH₄⁺), influenced the physiological processes of *Coffea arabica* cultivars ('Mundo Novo', 'Rubi' and 'Catuaí') at different levels, according to the analyzed response. The interaction between these two factors also was significant for several variables evaluated. The increase in [CO₂] increased net assimilation rate and water use efficiency, on the other hand, reduced stomatal conductance and transpiratory rate. The chlorophylls levels, the *Fv/Fm* ratio, the respiratory rate and the *Vcmax* and *Jmax* parameters were also positively influenced by the high [CO₂], while photorespiration was reduced. Coherently, the relative growth rate and the dry matter of the plants increased significantly under higher [CO₂]. It was also found that, in the coffee leaves, the treatment with high [CO₂] reduced soluble carbohydrates amounts while increasing starch contents, still in the leaf tissues, the highest [CO₂] implied in reductions in the nitrate reductase (RN) and glutamine synthetase (GS) activities with consequent drops in amino acids regardless nitrogen source. Proteins concentrations decreased in the leaves of the plants with NO₃⁻ and increased in the plants treated with NH₄⁺. The macronutrients levels and antioxidant system activity also showed reductions in the leaves of the plants under high CO₂ in all treatments. In the roots, the increase in [CO₂] increased soluble carbohydrates amounts, as well as the invertase activity, even in this tissue, the highest [CO₂] implied increases in the NO₃⁻ and NH₄⁺ levels, and RN and GS activities with consequent increases in the amino acids and proteins concentrations. The greatest results of GS activity and protein production were detected in the treatment with NH₄⁺. Antioxidant system activity also increased in the roots of plants under high [CO₂] regardless nitrogen source. It was found that, under high [CO₂], the plants treated with NH₄⁺ outperformed the plants with NO₃⁻ because, the plants with NH₄⁺, showed photosynthetic rates and water efficiency use higher resulting in greater matter dry accumulation. Thus, in general, from the increase in [CO₂], for the specie, favorable changes were verified. In addition, the NH₄⁺ application was more favorable, for the physiological performance of the coffee plant under high [CO₂] than NO₃⁻ application.

Keywords: *Coffea arabica*. Climatic changes. Mineral nutrition. Nitrogen metabolism. Carbon Metabolism. Antioxidant system. Nitrate. Ammonium.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio no acúmulo de matéria seca total (A), na taxa de crescimento relativo (B), matéria seca da parte aérea (C) e na matéria seca da raiz (D) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*). 39
- Figura 1 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio no acúmulo de matéria seca total (A), na taxa de crescimento relativo (B), matéria seca da parte aérea (C) e na matéria seca da raiz (D) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*). 40
- Figura 2 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio no teor de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), e carotenoides (C) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*)... 41
- Figura 2 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio no teor de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), e carotenoides (C) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*)... 42
- Figura 3 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na taxa assimilatória líquida (A), na condutância estomática (B) e na concentração interna de CO₂ (C) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*). 43
- Figura 3 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na taxa assimilatória líquida (A), na condutância estomática (B) e na concentração interna de CO₂ (C) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*). 44
- Figura 4 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na taxa transpiratória (A), na eficiência instantânea do uso da água (B) e na eficiência intrínseca do uso da água (C) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*). 45
- Figura 4 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na taxa transpiratória (A), na eficiência instantânea do uso da água (B) e na eficiência intrínseca do uso da água (C) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*). 46
- Figura 5 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na taxa fotorrespiratória (A), e na eficiência do PS II (B), de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*). 47
- Figura 6 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na taxa respiratória (A), e na atividade da malato desidrogenase (B), de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*). 49
- Figura 7 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na concentração de açúcares solúveis totais (AST) em folhas (A), e raízes (B), de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*). 51

Figura 8 -	Efeito da concentração de CO ₂ e da fonte de nitrogênio na concentração de açúcares redutores (AR) em folhas (A), e raízes (B), de cultivares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>)	52
Figura 9 -	Efeito da concentração de CO ₂ e da fonte de nitrogênio na concentração de sacarose em folhas (A), e raízes (B), de cultivares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>)... ..	53
Figura 10 -	Efeito da concentração de CO ₂ e da fonte de nitrogênio na concentração de amido em folhas (A), e raízes (B), de cultivares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>).....	54
Figura 11 -	Efeito da concentração de CO ₂ e da fonte de nitrogênio na atividade da invertase ácida da parede celular em folhas (A), e raízes (B), de cultivares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>).	55
Figura 12 -	Efeito da concentração de CO ₂ e da fonte de nitrogênio na concentração de aminoácidos nas folhas (A) e raízes (B) de cultivares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>).	57
Figura 13 -	Efeito da concentração de CO ₂ e da fonte de nitrogênio na concentração de proteínas nas folhas (A) e raízes (B) de cultivares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>). ..	58
Figura 14 -	Efeito da concentração de CO ₂ e da fonte de nitrogênio nos teores de nitrato nas folhas (A) e raízes (B), de cultivares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>).	60
Figura 15 -	Efeito da concentração de CO ₂ e da fonte de nitrogênio nos teores de amônio nas folhas (A) e raízes (B), de cultivares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>).	61
Figura 16 -	Efeito da concentração de CO ₂ e da fonte de nitrogênio nos teores de nitrogênio (A) e fósforo (B), de cultivares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>).....	63
Figura 17 -	Efeito da concentração de CO ₂ e da fonte de nitrogênio nos teores de magnésio (A) e potássio (B), de cultivares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>).	64
Figura 18 -	Efeito da concentração de CO ₂ e da fonte de nitrogênio nos teores de cálcio (A) e enxofre (B) de cultivares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>).....	65
Figura 19 -	Efeito da concentração de CO ₂ e da fonte de nitrogênio na atividade da Redutase do nitrato nas folhas (A) e nas raízes (B) de cultivares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>).	68
Figura 20 -	Efeito da concentração de CO ₂ e da fonte de nitrogênio na atividade da sintetase da glutamina nas folhas (A) e nas raízes (B) de cultivares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>).	69

Figura 21 - Efeito da concentração de CO ₂ e da fonte de nitrogênio na atividade da Superóxido dismutase (SOD) nas folhas (A) e nas raízes (B) de cultivares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>).	71
Figura 22 - Efeito da concentração de CO ₂ e da fonte de nitrogênio na atividade da Ascorbato peroxidase (APX) nas folhas (A) e nas raízes (B) de cultivares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>).	72
Figura 23 - Efeito da concentração de CO ₂ e da fonte de nitrogênio na atividade da Catalase (CAT) nas folhas (A) e nas raízes (B) de cultivares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>).	73
Figura 24 - Efeito da concentração de CO ₂ e da fonte de nitrogênio no conteúdo de peróxido de hidrogênio nas folhas (A) e nas raízes (B) de cultivares de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>).	74

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (*V_{cmax}*); taxa de transporte de elétrons usados para regeneração da RuBP (*J*) e, a taxa de utilização de triose-fosfato (*TPU*) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*) (n = média de 5 repetições ± erro padrão da média).....48
- Tabela 2 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio nos teores de macronutrientes de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*) 66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Cultivo das plantas e condições experimentais	29
3.2	Avaliação da matéria seca e da taxa de crescimento relativo	31
3.3	Avaliação das trocas gasosas e da fotorrespiração	31
3.4	Quantificação de pigmentos fotossintéticos: clorofilas <i>a</i> , <i>b</i> e carotenoides	32
3.5	Avaliação da fluorescência da clorofila <i>a</i>	32
3.6	Avaliação da velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}), da taxa de transporte elétrons utilizados para regeneração da ribulose 1,5 bifosfato (J_{max}) e da taxa de utilização da triose-fosfato (TPU)	32
3.7	Quantificação de N total, NO_3^- , NH_4^+ , P, K, Ca, Mg e S	33
3.8	Determinação de amido, açúcares solúveis totais, açúcares redutores, sacarose, proteínas e aminoácidos livres totais.....	34
3.9	Avaliação das enzimas de assimilação do nitrogênio (RN, GS), enzima do metabolismo de açúcares (Invertase) e da enzima respiratória malato desidrogenase dependente de NADH (MDH).....	35
3.10	Atividade das enzimas do metabolismo antioxidante e conteúdo de H_2O_2	36
3.11	Análises estatísticas e delineamento experimental.....	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Produção de matéria seca e taxa de crescimento relativo.....	38
4.2	Teores de pigmentos fotossintéticos: clorofilas <i>a</i> , <i>b</i> e carotenoides.....	40
4.3	Trocas gasosas	42
4.4	Fotorrespiração e eficiência fotoquímica.....	46
4.5	Velocidade máxima de carboxilação, taxa de transporte de elétrons, taxa de utilização de triose-fosfato.....	47
4.6	Taxa respiratória e atividade da malato desidrogenase (MDH)	48
4.7	Concentrações de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, sacarose e amido... ..	50
4.8	Atividade enzimática da invertase ácida da parede celular.....	54
4.9	Concentrações de aminoácidos e proteínas	56
4.10	Teores de nitrato e amônio.....	58

4.11	Teores de macronutrientes.....	61
4.12	Atividades enzimáticas da redutase do nitrato (RN) e da sintetase da glutamina (GS)	66
4.13	Atividade enzimática do sistema antioxidante e conteúdo de peróxido de hidrogênio	69
5	DISCUSSÃO	75
6	CONCLUSÕES.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

Por seus inevitáveis impactos sobre a biosfera, as mudanças climáticas globais têm despertado grande interesse mundial, constituindo-se em um assunto atual e de grande relevância. Entre as variáveis que interferem nas mudanças climáticas, destaca-se o progressivo e acentuado aumento na concentração atmosférica de CO₂.

Atualmente a concentração de dióxido de carbono na atmosfera [CO₂] é superior a 400 µL de CO₂ L⁻¹ de ar (400 ppm), e segundo projeções de modelos climáticos, estima-se que a [CO₂] eleva-se cerca de 1% ao ano podendo atingir 1000 µL de CO₂ L⁻¹ de ar no final desse século (IPCC, 2019).

O aumento na concentração atmosférica de gases de efeito estufa, como o dióxido de carbono (CO₂), e o conseqüente aumento da temperatura ambiental, têm induzido diversas pesquisas para determinar quais seriam os seus efeitos sobre os seres vivos. No entanto, ainda não existem informações suficientes para prever quais serão os efeitos das variações dos fatores ambientais sobre a fisiologia, crescimento, desenvolvimento, produtividade e qualidade da produção das culturas, uma vez que, os impactos sobre as plantas variam de acordo com a espécie, cultivar e fase fenológica. Dessa forma, um grande desafio para as pesquisas atuais é compreender quais seriam as respostas das plantas ao elevado CO₂.

Para as plantas do tipo fotossintético C3, a concentração de CO₂ atmosférica atual está abaixo da concentração ideal para fotossíntese, portanto, as suas taxas assimilatórias líquidas são geralmente aumentadas em resposta à elevação da concentração do gás carbônico.

Diversas espécies vegetais como o cafeeiro, respondem ao aumento na [CO₂] por meio de elevações da taxa fotossintética e da eficiência do uso da água, a partir de reduções da fotorrespiração, e da condutância estomática, resultando em maior crescimento com conseqüente aumento da biomassa.

Em espécies perenes, como o cafeeiro, são relatados aumentos superiores a 50% na assimilação líquida de carbono quando essas plantas são expostas à elevadas concentrações de CO₂. A maior disponibilidade de substrato (CO₂) nos sítios carboxilativos da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) resulta em uma taxa de carboxilação mais alta, a qual está relacionada principalmente à inibição competitiva do CO₂ sobre o gás oxigênio (O₂) afetando significativamente a fotorrespiração, o que implica em reduções nas perdas energéticas associadas à via de fixação de carbono.

No entanto, as respostas dos vegetais às mudanças climáticas não dependem apenas da concentração de CO₂, mas sim da interação entre ela e outras variáveis ambientais como:

temperatura, luminosidade, disponibilidade hídrica e de nutrientes minerais. Dentre os elementos essenciais o nitrogênio (N) destaca-se como o mineral mais limitante ao crescimento e a produtividade dos vegetais em sistemas naturais e agrícolas, uma vez que esse elemento determina importantes características fisiológicas e agronômicas. Todavia, na literatura, existe uma escassez de informações a respeito da influência e/ou interferência, das variações climáticas previstas sobre o comportamento metabólico dos processos de absorção, assimilação, transporte e distribuição dos compostos nitrogenados.

Muitas pesquisas ressaltaram a resiliência dos genótipos de cafeeiros para se adaptarem às diferentes condições ambientais, e consideraram os efeitos positivos das futuras mudanças climáticas sobre a fisiologia do cafeeiro. Por outro lado, alguns estudos sugerem que o cafeeiro é uma planta sensível às mudanças climáticas, e previram efeitos negativos na cultura, incluindo reduções no zoneamento agroclimático, maior incidência de pragas e doenças e decréscimos na produtividade e na qualidade.

Além disso, vale ressaltar ainda que, apesar da importância agronômica da cafeicultura e da sua relevância econômica, pouco se sabe sobre os possíveis impactos dos cenários climáticos futuros sobre fisiologia dessa cultura que se sobressai por sua plasticidade e capacidade de ajustar-se metabolicamente às condições adversas. Portanto, mais estudos são necessários para elaboração de estratégias de produção do cafeeiro frente às mudanças climáticas.

Assim, objetivou-se com o presente estudo avaliar as respostas fisiológicas de mudas de cultivares de cafeeiros (*Coffea arabica*) submetidas à elevada concentração de CO₂ e a diferentes fontes nitrogenadas (NO₃⁻ ou NH₄⁺).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Por seus inevitáveis impactos sobre a biosfera, as mudanças climáticas globais têm despertado grande interesse mundial, constituindo-se em um assunto atual e de grande relevância. O aumento na concentração atmosférica de gases de efeito estufa, como o dióxido de carbono (CO_2), e o conseqüente aumento da temperatura ambiental, têm induzido diversas pesquisas para determinar quais seriam os seus efeitos sobre os seres vivos. No caso das plantas, ainda não existem informações suficientes para prever quais seriam os efeitos das mudanças climáticas sobre a fisiologia, bioquímica, crescimento, desenvolvimento, produtividade e qualidade da produção das principais espécies cultivadas.

O progressivo aumento na concentração atmosférica de dióxido de carbono ($[\text{CO}_2]$) ao longo dos últimos séculos se deve principalmente às emissões associadas à queima de combustíveis fósseis bem como à redução da cobertura vegetal. A agricultura e a indústria intensivas emitem quantidades significativas de gases que aumentam o efeito estufa, como CO_2 e metano (CH_4). Nesse cenário, verifica-se que a atividade humana adiciona 30 bilhões de toneladas de CO_2 à atmosfera todos os anos, o que aumenta a capacidade da Terra de reter o calor do sol (HILLEL; ROSENZWEIG, 2012).

Dentre os gases poluentes da atmosfera, o CO_2 assume papel chave no aumento do aquecimento global e conseqüentemente interfere diretamente nas mudanças climáticas. Atualmente a $[\text{CO}_2]$ é superior a $400 \mu\text{L L}^{-1}$ de ar (400 ppm), e segundo simulações de modelos climáticos, estima-se que a $[\text{CO}_2]$ eleva-se cerca de 1% ao ano (WMO, 2019). Nesse ritmo, a concentração desse gás poderá atingir $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ de ar no final do século. Paralelamente, dependendo da emissão de gases de efeito estufa, as projeções indicam um aumento da temperatura global entre $0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ e $4,8 \text{ }^\circ\text{C}$ (IPCC, 2019).

O Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas (PBMC), divulgou em 2013 o relatório sobre as tendências do clima futuro no país. As previsões apontam para um aumento na temperatura entre 3 e 6°C até 2100. Sugere-se também, que os índices pluviométricos apresentarão reduções em todos os biomas do país, com exceção da Mata Atlântica (RAN1, 2013). Essa variabilidade climática imprevisível, pode ameaçar a sustentabilidade da produção agrícola em escala global, com conseqüências no crescimento e desenvolvimento vegetal, bem como no rendimento e qualidade das culturas (DAMATTA *et al.*, 2010).

Dessa forma, um grande desafio da atualidade é compreender as respostas estruturais, funcionais, metabólicas e ecofisiológicas das plantas ao elevado CO_2 , pois a relação entre os parâmetros climáticos e produção vegetal é complexa, uma vez que o impacto de fatores

ambientais no crescimento e desenvolvimento das plantas varia de acordo com a espécie, cultivar e fases fenológicas. Logo, a capacidade de aclimação das culturas em um ambiente em mudança é determinante para sua produtividade, assim como a manutenção da qualidade é igualmente crucial para a sustentabilidade econômica (DAMATTA; RAMALHO, 2006).

O café é o segundo produto mais comercializado no mundo, atrás apenas, do petróleo. Entretanto, dentre as commodities agrícolas é a mais comercializada e destaca-se como a bebida mais popular do mundo. A produção mundial de grãos de café está aumentando constantemente, superando 167,4 milhões de sacas nos últimos anos (95,68 milhões de arábica e 71,72 milhões de robusta), conforme a International Coffee Organization (ICO, 2019).

O café é um dos principais produtos agrícolas brasileiros. O Brasil é o maior produtor e exportador e, também, segundo maior consumidor do grão. O país é responsável por quase 40% da produção mundial de café, aproximadamente 62 milhões de sacas de 60 kg são beneficiadas por ano (45,98 milhões de arábica e 16,04 milhões de robusta), gerando uma receita bruta total de 25,5 bilhões de reais (CONAB, 2020).

Dentre as 125 espécies pertencentes ao gênero *Coffea* (KRISHNAN *et al.*, 2013) apenas *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner, possuem importância econômica, sendo essas duas espécies responsáveis por 99% da produção mundial (DAVIS *et al.*, 2012). O *Coffea arabica* teve origem na Etiópia, mas, a partir de mecanismos adaptativos e de sua ampla plasticidade morfofisiológica seu cultivo expandiu-se para diversas regiões do mundo. No entanto, a espécie tem a produtividade e qualidade da produção fortemente influenciadas pelas condições ambientais.

Estudos demonstraram que o cafeeiro é uma planta sensível às mudanças climáticas. Diferentes autores previram efeitos negativos na cultura do café diante das alterações de temperatura e precipitação, incluindo extensas reduções no zoneamento agroclimático com perdas de áreas bioclimáticas favoráveis à sobrevivência da espécie de 38% a 90% (MOAT *et al.*, 2017), além de maior incidência de pragas e doenças (AVELINO *et al.*, 2015), decréscimo no rendimento (CRAPARO *et al.*, 2015) e reduções na qualidade (LÄDERACH *et al.*, 2017). Bunn *et al.* (2015) e Imbach *et al.* (2017), também previram que a área favorável ao plantio e a produção de *Coffea* spp reduzirá 50% e 88% respectivamente. Além disso, Paterson *et al.* (2014) ressaltaram que os efeitos diretos das mudanças climáticas precisam ser considerados urgentemente, pois, sugerem que os fungos serão um problema cada vez maior para os cafezais. Ressaltam ainda que à medida que as temperaturas se elevam o ambiente se torna mais eficiente para proliferação desses microrganismos sendo provável que as doenças sejam mais problemáticas.

Diante dessa perspectiva, vale enfatizar que boas práticas agrícolas que envolvem a conservação das florestas nas regiões cafeeiras, aumentando quantidades de sombra, preservação das características naturais e proteção de plantas nativas fornecem benefícios para a cultura frente às mudanças no clima, o que leva a maiores produtividades.

Por outro lado, pesquisas ressaltaram a resiliência dos genótipos de cafeeiros para se adaptarem às diferentes condições ambientais (CAVATTE *et al.*, 2012). Neste sentido, DaMatta *et al.* (2016), consideraram os efeitos positivos da elevada [CO₂] sobre a fisiologia do cafeeiro. Do mesmo modo, Rakočević e Matsunaga (2018b), mostraram o papel do CO₂ na retenção de folhas na espécie, enquanto Martins *et al.* (2016), destacaram o aumento da [CO₂] como fator chave para elevar a tolerância ao calor em plantas de café diante das mudanças climáticas.

Os resultados em níveis morfológicos e fisiológicos, apresentados por esses estudos, sugerem que o aumento da [CO₂] pode ser fundamental para que o cafeeiro suporte com sucesso as tensões ambientais futuras. Além disso, DaMatta *et al.* (2019), relataram que diferentes pesquisas produziram evidências inequívocas de que o CO₂ elevado estimula a fotossíntese e o rendimento das culturas. Argumentaram também, que o cafeeiro é uma planta altamente adequada sob CO₂ elevado, mais do que se poderia esperar, se destacando em relação a outras espécies C3.

No entanto, ainda são necessários muitos estudos sobre a influência de elevadas concentrações de CO₂ no metabolismo primário e secundário em *Coffea arabica*, os quais são relevantes para o avanço do conhecimento científico assim como para a elaboração de estratégias de produção do cafeeiro frente às mudanças climáticas. Sendo assim, espera-se que os efeitos da elevada [CO₂] no desenvolvimento dessa importante espécie cultivada sejam bem compreendidos.

As respostas das plantas à maior concentração atmosférica de CO₂ são classificadas em vários tipos. De acordo com o período de exposição, tem-se, as respostas de curto prazo, que são imediatas, observadas após uma exposição de segundos a minutos ao CO₂ elevado e as respostas de longo prazo as quais surgem após dias ou semanas em exposição ao alto CO₂ (WOLFE *et al.*, 1998). Os efeitos provocados pelo aumento da concentração atmosférica de CO₂ sobre as plantas, também podem ser classificados como diretos e indiretos (URBAN, 2004). Os efeitos diretos referem-se aos incrementos na disponibilidade de substrato para a fotossíntese e na produtividade primária das plantas pela ação do CO₂ como “fertilizante atmosférico” (KÖRNER, 2006). Os efeitos indiretos relacionam-se as alterações climáticas provocadas pelo efeito estufa, principalmente no incremento da temperatura, que pode afetar a

fisiologia e a produtividade das plantas (SALLAS *et al.*, 2003). Por fim, em um enfoque fisiológico, os efeitos do aumento de CO₂ sobre as plantas são incluídos em cinco categorias: 1. Efeitos sobre a fotossíntese líquida e respiração; 2. Efeitos sobre a condutância estomática e a eficiência do uso da água; 3. Efeitos sobre alocação de carbono e crescimento; 4. Efeitos sobre a estrutura da planta e fenologia; e 5. Efeitos sobre a concentração de nutrientes das plantas (aumento da eficiência no uso do nitrogênio) (WOODWARD, 2002).

Diferentes trabalhos científicos demonstraram que, inicialmente, as plantas respondem ao aumento atmosférico na [CO₂] por meio da elevação na taxa fotossintética (*A*), além de apresentar uma diminuição na condutância estomática (*g_s*), sendo essa a base do efeito da elevação da [CO₂] em plantas. Pesquisas com elevado CO₂ relataram aumentos em *A* de 31% em média e reduções em *g_s* de 22% e em diversas espécies C3 (AINSWORTH; ROGERS, 2007). Entretanto, maiores condutâncias estomáticas são relatadas por alguns autores diante do aumento da [CO₂] (PURCELL *et al.*, 2018). De qualquer forma, reduções em *g_s* geralmente levam a menor taxa de transpiração e maior eficiência no uso da água. Por outro lado, é importante salientar que a redução na perda de calor latente (redução da transpiração), pode levar a um aumento na temperatura das folhas, o que, por sua vez, pode prejudicar o desempenho do vegetal em um cenário de aquecimento global. Além disso, estudos apontam que os efeitos benéficos da eficiência fotossintética obtida sob elevadas [CO₂] podem ser contrabalanceados por fatores de estresse, tais como, excesso/escassez de chuvas e aumentos de temperatura.

Importantes resultados foram obtidos a partir de estudos que relacionam cafeeiros e mudanças climáticas, permitindo concluir que ocorrem significativos aumentos na fotossíntese de plantas de café cultivadas sob alto CO₂. Ghini *et al.* (2015) avaliaram os efeitos do cultivo de cafeeiros em Free-Air Carbon dioxide Enrichment (FACE) durante dois anos e observaram nos cafeeiros cultivados em CO₂ elevado, maiores taxas de fotossintéticas e maior rendimento produtivo nas cultivares estudadas ('Catuaí' e 'Obatã'). Ramalho *et al.* (2013) também relataram incrementos de 30 a 60% na *A* em cafeeiros em condições elevadas de CO₂ (700 μL L⁻¹ de ar) quando comparado às condições normais (380 μL L⁻¹ de ar).

A taxa assimilatória líquida do cafeeiro (4 a 11 μmol m⁻² s⁻¹) é relativamente baixa nas condições ambientais atuais de luz e CO₂ (DAMATTA, 2004). No entanto, sob condições ideais de luz, temperatura e CO₂ a fotossíntese atinge 30 μmol m⁻² s⁻¹ (MARTINS *et al.*, 2014a). Esses dados fornecem informações relevantes sobre a participação efetiva da barreira difusiva que limita significativamente o transporte do CO₂ da atmosfera até os cloroplastos (BATISTA *et al.*, 2012).

Experimentalmente, Martins *et al.* (2014a), demonstraram que é característico de plantas de café apresentarem condutância estomática e condutância do mesófilo baixas quando comparadas às outras espécies tropicais arbóreas. Entretanto, no cafeeiro, diferentemente da maioria das espécies C3 estudadas, não foi observada redução da condutância estomática sob elevado CO₂ e condições ideais de suprimento de água (DAMATTA *et al.*, 2016). Esse comportamento é considerado benéfico para os cenários climáticos previstos, uma vez que favorece a transpiração, e conseqüentemente a manutenção da temperatura foliar e a absorção de nutrientes por fluxo de massa.

A maior [CO₂] aumenta a *A* em plantas C3 porque está associada à estimulação da taxa de carboxilação da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase / oxigenase (Rubisco), etapa limitadora do processo fotossintético nos níveis atuais de CO₂, e concomitantemente, leva a uma redução da função de oxigenação dessa enzima implicando em menor taxa de fotorrespiração (AINSWORTH; ROGERS, 2007).

Sendo a Rubisco a proteína mais abundante do planeta, constituindo 50% das proteínas encontradas em uma folha, a qual catalisa a reação essencial à vida dos vegetais, ela sempre recebe destaque em diversos estudos com as plantas (ANDERSSON; BACKLUND, 2008). Essa enzima reage tanto com O₂ (função oxigenase) quanto com CO₂ (função carboxilase), tendo maior afinidade pelo CO₂. Porém, na atmosfera, o O₂ ocorre em concentração cerca de 550 vezes maior que o CO₂, fazendo com que a competição entre os dois substratos gasosos pela enzima seja um dos fatores determinantes da eficiência da fotossíntese nas atuais concentrações de CO₂ atmosférico (LAMBERS *et al.*, 2008).

Para que ocorra a carboxilação pela Rubisco e as demais etapas da fase bioquímica do processo fotossintético que culmina na formação de trioses-fosfato, é necessário também, o funcionamento da fase fotoquímica nos cloroplastos. Nessa etapa, a absorção de fótons é realizada por pigmentos, principalmente clorofila, distribuídos em complexos antena, que direcionam e transferem a energia de excitação para os centros de reação dos fotossistemas I e II. No fotossistema II ocorre a oxidação de moléculas de água, com produção de oxigênio e doação de elétrons para a cadeia de transporte de elétrons que o liga ao fotossistema I. Durante a transferência de elétrons entre os fotossistemas, prótons são bombeados para o lume gerando um gradiente eletroquímico através da membrana do tilacóide, a passagem dos prótons de volta para o estroma, pela enzima ATPase, produz força motriz para a fosforilação de ADP em ATP. Além disso, no final da cadeia de transporte de elétrons, ocorre a redução de NADP⁺ em NADPH. Ambos, ATP e NADPH são utilizados nas reações subsequentes da fotossíntese, na redução do carbono no Ciclo de Calvin.

As trioses produzidas nos cloroplastos durante o processo fotossintético são exportadas para o citosol formando sacarose, que pode ser utilizada nas folhas ou alocada para órgãos heterotróficos da planta como raízes, folhas jovens, frutos e tubérculos. Os fotoassimilados, podem ainda, serem direcionados para a síntese de amido funcionando como um sistema de escape para manter elevada a taxa de fotossíntese quando a taxa de síntese de sacarose superar sua taxa de exportação, via floema, para os drenos (TRETHERWEY; SMITH, 2000). A assimilação da planta é suficiente para a demanda do crescimento a partir da síntese, exportação e mobilização de carboidratos. Já o amido, carboidrato de reserva mais abundante, é produzido durante o dia e degradado no período noturno gerando carboidratos para atender a demanda de esqueletos de carbono e energia, tanto para os tecidos foliares fotossinteticamente ativos quanto para os tecidos dreno (SMITH; STITT, 2007).

O aumento da taxa fotossintética e da eficiência no uso da água a partir da elevação do CO₂ atmosférico, em geral, promove o aumento do crescimento das plantas e o incremento de biomassa vegetal (LONG *et al.*, 2004). Isso implica em grandes variações bioquímicas no metabolismo de carboidratos, alterando significativamente a síntese, mobilização, alocação, partição e exportação destes compostos. Sendo assim, ressalta-se que o aumento de CO₂ atmosférico afeta os processos biológicos em diferentes níveis, sendo os controles fisiológicos e ecológicos os mais estudados (AINSWORTH; ROGERS, 2007). Todavia, é importante destacar que a relação entre a taxa de fotossíntese e o crescimento não é direta, mas sim de retroalimentação, uma vez que não só a taxa fotossintética pode modificar o crescimento, mas também, a taxa de crescimento pode influenciar a taxa fotossintética.

É compreendido que as plantas devem atingir um equilíbrio entre assimilação de carbono, estoque de carbono e crescimento, mas ainda são necessários mais trabalhos para saber como isso ocorre (SMITH; STITT, 2007). Deste modo, entende-se que os vegetais possuem sistemas regulatórios afim de controlar a fisiologia metabólica, de crescimento e desenvolvimento e ser capaz de responder às condições ambientais de modo a otimizar a eficiência de uso dos recursos (WALTER *et al.*, 2009). Terashima *et al.* (2014), relataram sobre efeitos de elevadas concentrações atmosféricas de CO₂ no crescimento e desenvolvimento de diferentes espécies vegetais. Os resultados indicaram alterações nas razões fonte/dreno, no metabolismo e translocação de fotoassimilados, bem como na respiração.

Em um trabalho detalhado, Ramalho *et al.* (2013), estudaram efeitos de elevada concentração de CO₂ sobre teores de carboidratos não estruturais, densidade e morfologia de estômatos em trocas gasosas, metabolismo de carbono e fotossintético além de parâmetros de crescimento de três cultivares de *Coffea* sp. Os resultados indicaram tendências de elevação nas

taxas de fotossíntese dissociada de retroinibição resultando em aumento da eficiência do uso da água, e, de forma geral, alterações não significativas nos demais parâmetros analisados indicando uma boa adaptação dos cafeeiros às condições experimentais.

De acordo com Jablonski (2002), plantas cultivadas são mais responsivas ao aumento na [CO₂], contudo, as respostas diferem entre os diversos grupos taxonômicos e funcionais, com importantes implicações no funcionamento futuro de agrossistemas. O aumento nas taxas fotossintéticas e a melhora nas relações hídricas observados nas plantas cultivadas em elevado CO₂, normalmente geram incrementos de biomassa e altura das plantas, que são respectivamente 49% e 12% maiores (AINSWORTH; LONG, 2005).

Segundo Ghini *et al.* (2015), em um experimento de longo prazo realizado em FACE, as plantas de café aumentaram o crescimento, e apresentaram maior rendimento na colheita, sendo que a produtividade de grãos foi entre 17 e 28% maior, sob elevado CO₂.

Por outro lado, estudos mostraram que a estimulação de *A*, em plantas expostas à elevada [CO₂] não é sustentada por longos períodos (NORBY *et al.*, 2010), fato que frequentemente é associado ao acúmulo de produto final fotossintético (AINSWORTH; ROGERS, 2007). Esse efeito de redução do potencial fotossintético (em dias, meses ou anos dependendo da espécie) é conhecido como aclimação fotossintética a alta [CO₂], onde a estimulação inicial da fixação de carbono é seguida por uma reversão parcial ou estabilização desse processo (KANT *et al.*, 2012).

Contudo, ao contrário do que tem sido relatado para inúmeras outras espécies (XU *et al.*, 2016; BADER *et al.*, 2010; AINSWORTH; ROGERS, 2007), surpreendentemente, o cafeeiro sustenta o acréscimo na *A* diante da alta disponibilidade de CO₂ por anos (RAKOČEVIĆ *et al.*, 2018a). Neste sentido, informações evidenciam que não há nenhum sinal de regulação negativa da fotossíntese ou aclimação fotossintética ao CO₂ em plantas de café (DAMATTA *et al.*, 2019).

Autores têm relacionado a aclimação fotossintética a alta [CO₂] a diferentes fatores, como por exemplo: a diminuição no conteúdo de Rubisco em resposta a maior eficiência de uso do N (LONG *et al.*, 2004); a inibição da assimilação fotossintética de carbono em consequência da acumulação de carboidratos não estruturais ocasionado pelo desequilíbrio entre fonte e dreno (KITAOKA *et al.*, 2016); e ainda, uma redução no teor de proteína e nitrogênio total da planta (BAHRAMI *et al.*, 2017; BLOOM *et al.*, 2014; RUIZ-VERA *et al.*, 2017). Segundo Ellsworth *et al.* (2004), a disponibilidade de N nas plantas, mais do que qualquer outro fator ambiental, determina suas respostas ao elevado CO₂.

Dentre todos os elementos minerais essenciais requeridos pelas plantas, o nitrogênio (N) se destaca sendo exigido em maiores quantidades. Esse macronutriente atua na síntese de proteínas estruturais e enzimáticas, clorofilas, ácidos nucleicos, coenzimas, além de fitormônios, vitaminas e alcaloides, os quais desempenham importantes papéis no metabolismo vegetal. Sua deficiência frequentemente limita o crescimento vegetal, sendo os sintomas a clorose gradual das folhas mais velhas, seguida por abscisão e a redução do crescimento da planta (LI *et al.*, 2013).

O N está disponível no solo em diversas formas, tais como: NH_4^+ , NO_3^- , aminoácidos e peptídeos solúveis. No entanto, NO_3^- e NH_4^+ são as principais fontes minerais de N absorvidas pelas plantas, sendo que a forma de N inorgânico absorvida depende da espécie e das condições do solo (WILLIAMS; MILLER, 2001). Em condições ideais de pH e oxigênio, a forma nítrica é predominante em consequência do processo de nitrificação no qual bactérias promovem a oxidação do NH_4^+ livre (LI *et al.*, 2013).

A quantidade de N absorvida pelas plantas varia em função do seu ciclo de desenvolvimento, da quantidade de raízes, da taxa de absorção por unidade de peso de raiz (moles NO_3^- ou NH_4^+ $\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$ raiz), da atividade das enzimas envolvidas no ciclo e da disponibilidade de energia para o processo de assimilação (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

O NO_3^- absorvido pelas plantas pode ser assimilado nas raízes, na parte aérea, ou em ambos os locais (FORDE, 2002), porém inicialmente o NO_3^- precisa ser reduzido a NH_4^+ . Essa redução é catalisada por enzimas em duas etapas: a primeira ocorre no citosol através da enzima redutase do nitrato (RN) que transforma NO_3^- em nitrito (NO_2^-) e a segunda ocorre nos cloroplastos (parte aérea) e plastídios (raízes), através da redutase do nitrito (RNi) que converte NO_2^- a NH_4^+ (LI *et al.*, 2013). O NH_4^+ produzido é, então, assimilado pelas enzimas glutamina sintetase (GS), que requer ATP na reação que adiciona NH_4^+ ao glutamato (Glu) formando glutamina (Gln), na sequência, a glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase ou glutamato sintase (GOGAT) transfere um N amídico da Gln ao 2-oxoglutarato para formar duas moléculas de Glu (ciclo GS/GOGAT) (LEA; MIFLIN, 2011). Ou, ainda, em uma rota alternativa, a enzima glutamato desidrogenase (GDH) realiza a catálise reversível da aminação 2-oxoglutarato (TERCÉ-LAFORGUE *et al.*, 2013).

A assimilação do N pode ocorrer nas raízes ou na parte aérea, sendo a ocorrência de uma forma ou de outra dependente da espécie vegetal e das condições ambientais. Para assimilação na parte aérea, necessita-se primeiramente do transporte do N para as folhas, o qual ocorre via xilema, embora a redistribuição das folhas para outros órgãos ocorra

predominantemente na forma de aminoácidos, via floema. Essa redistribuição é fundamental para o suprimento dos tecidos que não participam na assimilação de N (PATE *et al.*, 1981).

O conhecimento das formas de absorção, assimilação e transporte do N é importante na avaliação do comportamento fisiológico das plantas nos diferentes estádios de desenvolvimento, e em distintas condições ambientais. Deste modo, melhorar a eficiência do uso desse mineral, que influencia diretamente o crescimento e o desenvolvimento das culturas, tem sido um dos desafios das pesquisas atuais, uma vez que o uso deste elemento está associado a questões ambientais, sociais e econômicas. Isso porque, a lixiviação de N constitui em uma importante fonte de poluição para os ecossistemas, além de os fertilizantes nitrogenados serem os que mais elevam o custo de produção. Dessa forma, a compreensão dos processos fisiológicos que envolve esse mineral implica diretamente em otimizar a integração entre produtividade, lucro e a proteção ambiental.

Apesar de ser um assunto extensivamente estudado, a complexidade da interação entre as plantas e o N ainda apresenta muitos desafios aos pesquisadores. O aumento da compreensão dessa relação será fundamental para melhorar a forma como as plantas absorvem, utilizam e distribuem o N disponível diante das mudanças climáticas previstas para as próximas décadas (CHEN *et al.*, 2013). Neste contexto, a relação entre o N e as plantas, merece atenção especial e compreender como a elevação da [CO₂] prevista para os próximos anos irá influenciar o metabolismo do N em plantas é uma questão que merece maiores investigações porque as alterações nos teores de N ocasionadas pela alta [CO₂] afetam tanto a produtividade quanto o valor nutricional das principais culturas (WEST *et al.*, 2014).

Diferentes trabalhos buscaram avaliar o comportamento das respostas fisiológicas da assimilação do N em diferentes espécies de plantas expostas a alta [CO₂], mas ainda não apresentaram resultados consistentes, porém, um grande número de hipóteses tem avançado na tentativa de explicar esse fenômeno (DOMICIANO *et al.*, 2020; GIFFORD; BARRETT; LUTZE, 2000; KANT *et al.*, 2012; KUEHNY *et al.*, 1991). Para o cafeeiro, não são encontradas pesquisas sobre o efeito da interação entre a aplicação de diferentes fontes nitrogenadas em plantas sob elevada [CO₂]. Estudos são fundamentais para a compreensão das respostas da espécie diante das modificações ambientais.

Neste contexto, pesquisas sugerem que a alta [CO₂] altera a eficiência de absorção e de assimilação de N e as respostas variam com a fonte nitrogenada aplicada (DOMICIANO *et al.*, 2020; BLOOM *et al.*, 2010; RACHMILEVITCH; COUSINS; BLOOM, 2004). Bloom *et al.* (2010), monitoraram a absorção de NO₃⁻ em *Triticum aestivum* e *Arabidopsis thaliana*, concluindo que tanto a absorção quanto a assimilação foram comprometidas em ambas as

espécies sob alta [CO₂]. Posteriormente, Bloom *et al.* (2014), verificaram uma redução no teor de proteína e, portanto, no valor nutricional do grão de *T. aestivum* quando NO₃⁻ era fornecido como principal fonte de N sob alta [CO₂].

Em plantas de café cultivadas com elevada [CO₂], a maior atividade metabólica reflete em diversas alterações fisiológicas como mudanças no particionamento de carbono e no uso nutrientes, especialmente do N e do fósforo (JIN *et al.*, 2016). Martins *et al.* (2014b) estudaram os teores de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn, Zn) em algumas cultivares de café e mostraram que, sob elevado CO₂, houve uma redução entre 7 e 25% na concentração dos elementos dependendo do mineral e do genótipo. Redução de 10% do teor de N também foi observada em cultivares de cafeeiro sob FACE, por Ghini *et al.* (2015). Essa ‘diluição mineral’, principalmente do N, e as alterações em seu metabolismo é um fator que deve ser considerado, entretanto, poucas informações são encontradas na literatura sobre esse assunto.

Adicionalmente, estudos sobre a interação entre o metabolismo de carbono e do nitrogênio também são fundamentais para avaliação das respostas fisiológicas das plantas à elevada [CO₂]. Os processos de assimilação de carbono e nitrogênio são interligados, visto que grande parte da energia utilizada na redução do N inorgânico a aminoácido é proveniente da fotossíntese. Além disso, esqueletos de carbono para síntese de compostos nitrogenados são originados a partir de fotoassimilados. Em contrapartida, grandes quantidades de N são investidas na maquinaria fotossintética, logo, a disponibilidade de N é claramente determinante da capacidade fotossintética e do rendimento das culturas.

Outro ponto relevante é que em espécies do tipo C3, como o cafeeiro, os ciclos do N e do carbono são significativamente influenciados pela via fotorrespiratória, que por sua vez, é afetada expressivamente pela [CO₂] (MISRA, 2014). A fotorrespiração, também chamada de ciclo C2, é o processo no qual a Rubisco atua como oxigenase, catalisando a reação do oxigênio à ribulose-1,5-bifosfato, gerando uma molécula de 3-fosfoglicerato e outra de 2-fosfoglicolato. Essa via metabólica ocorre em três organelas: cloroplastos, peroxissomos e nas mitocôndrias, onde a glicina é convertida em serina, ocorrendo a liberação de uma molécula de CO₂ e outra de NH₄⁺ (WINGLER *et al.*, 2000). Este processo é um importante ponto de ligação entre os ciclos do Carbono e do N. Conhecida por reduzir a eficiência fotossintética, visto que ocorre a liberação de carbono fixado, atualmente, pesquisadores ressaltam os benefícios da fotorrespiração, destacando seu papel principalmente na recuperação parcial do carbono desviado pela atividade oxigenase da Rubisco, na manutenção da homeostase redox celular, protegendo contra fotoinibição, funcionando como dreno de elétrons sob seca e alta

luminosidade, bem como na reassimilação do NH_4^+ liberado na mitocôndria e na interconversão de aminoácidos através das transaminações. Diante disso, é consenso que plantas de espécie C3 que não fotorrespiram são inviáveis em condições ambientais naturais.

Em duas cultivares de cafeeiro cultivados sob elevado CO_2 , significativos aumentos na eficiência de carboxilação da Rubisco, (50% em média), levaram a expressiva redução na fotorrespiração (30%) (DAMATTA *et al.*, 2016). Não obstante, outra relevante implicação do aumento da carboxilação é o conseqüente incremento no uso de energia luminosa, ou seja, uma maior quantidade de radiação é necessária para saturar os centros de reações fotoquímicas evitando a fotoinibição, além de contribuir para a redução da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs).

As modificações nas condições ambientais, podem provocar importantes alterações na produção e remoção de EROs, por meio das variações no metabolismo antioxidante. As EROs como o superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete são geradas durante processos metabólicos nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. Porém, sob condições adversas o acúmulo desses radicais é potencialmente prejudicial às células da planta, provocando danos em biomoléculas valiosas como o DNA, RNA, proteínas e membranas de organelas e celulares (JALEEL *et al.*, 2009).

O O_2^- e OH^- possuem baixa mobilidade pela membrana celular e curto tempo de meia-vida, o que implica em elevada capacidade de reação e especificidade de sinalização dessas EROs. Além disso, o radical OH^- , que pode ser formado a partir de O_2^- ou H_2O_2 , é o mais reativo, sendo também considerado o iniciador da peroxidação lipídica (SCANDALIOS, 1993). Já o peróxido de hidrogênio possui capacidade de cruzar as membranas celulares e maior tempo de meia-vida, o que possibilita agir como molécula sinalizadora do estresse oxidativo (BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2010).

Como uma estratégia de proteção aos danos oxidativos, as plantas têm desenvolvido um complexo sistema de defesa, que é dividido em não enzimático, composto por carotenoides, ascorbato, glutatona e α -tocoferóis e enzimático, com ação da superóxido dismutase (SOD; 1.15.1.1), que catalisa a transformação do radical superóxido a H_2O_2 ; catalase (CAT; EC 1.11.1.6) que produz H_2O e O_2 a partir do H_2O_2 ; e enzimas do ciclo ascorbato-glutatona, como a ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) que também elimina o H_2O_2 (BEN AHMED *et al.*, 2009).

A SOD catalisa a dismutação dos íons superóxido, formando H_2O_2 . É a primeira enzima do sistema antioxidante e pode ser vista como protetora contra os danos oxidativos causados pelos radicais O_2^- (POMPEU *et al.*, 2008), pois está presente em todos os compartimentos

celulares suscetíveis ao estresse oxidativo. Os estresses ambientais levam a uma maior atividade da SOD, a qual determina a concentração de O_2^- e H_2O_2 , sendo central nos mecanismos de defesa necessários para prevenir a formação de radicais OH^- (JALEEL *et al.*, 2007). A CAT está presente predominantemente nos peroxissomos agindo na eliminação do H_2O_2 proveniente do ciclo fotorrespiratório (FRUGOLI *et al.*, 1996), pode também ser encontrada em outros compartimentos celulares, tem uma baixa afinidade pelo H_2O_2 , sendo ativa somente quando este está em altas concentrações. A APX está presente em cloroplastos e mitocôndrias, ou ainda no citosol e nos peroxissomos, e ao contrário da CAT, têm alta afinidade pelo H_2O_2 , eliminando-o mesmo em baixas concentrações (GECHEV *et al.*, 2006). É a principal enzima do ciclo ascorbato-glutationa, degradando o H_2O_2 e formando H_2O . O ascorbato é utilizado como cofator enzimático, resultando na formação de dehidroascorbato o qual é reciclado a ascorbato, sendo a glutatona reduzida (GSH) a doadora de elétrons. Logo a ação combinada dessas enzimas permite a conversão de radicais O_2^- e de H_2O_2 , prejudiciais à célula, em H_2O e O_2 (ASADA; TAKAHASHI, 1987). Os antioxidantes lipofílicos (por exemplo: zeaxantina, b-caroteno e a-tocoferol), também são de grande importância nos processos de prevenção da superprodução de elétrons na célula (MUNNÉ-BOSCH, 2005).

Por fim é importante considerar a relação entre qualidade do grão de café, e conseqüentemente da bebida, diante da elevada $[CO_2]$. Esse também é um ponto altamente questionado e foi observado por Ramalho *et al.*, (2018), que relataram alterações nas características físicas e químicas dos frutos do cafeeiro. O elevado CO_2 aumentou a acidez, diminuiu o teor de cafeína, de sólidos solúveis e do ácido cafeico. Além disso, os mesmos autores mostraram que o concomitante aumento da temperatura levou a produção de frutos mal formados com conseqüente perda de qualidade da bebida. Por outro lado, Rahn *et al.* (2018) e Verhage *et al.* (2017) sugeriram, a partir de modelos matemáticos, que a maior $[CO_2]$ pode compensar os efeitos negativos do aumento da temperatura nas diferentes etapas do desenvolvimento da cultura do café.

Pela complexidade desse assunto, DaMatta *et al.* (2019), ressaltaram a necessidade de pesquisas futuras sobre as respostas do cafeeiro às mudanças climáticas. Enfatizaram, também, o papel do CO_2 como chave na mitigação de alguns dos efeitos nocivos das temperaturas elevadas e na resistência das plantas de café contra o estresse hídrico. Os mesmos autores destacaram a falta de respostas de como o aumento da temperatura e do CO_2 podem alterar o equilíbrio planta-pragas/doenças, e como esses fatores ambientais vão impactar a formação de flores e o desenvolvimento de frutos bem como a quantidade e qualidade do grão produzido. Já Rodrigues *et al.* (2016), destacaram sobretudo que estudos devem ser direcionados buscando

entender o comportamento das diferentes cultivares de *Coffea* para a obtenção e seleção de novos genótipos tolerantes as condições ambientais previstas.

Diante do exposto, verifica-se que, por mais que *Coffea arabica* seja uma das espécies de culturas mais importantes, cultivadas extensivamente em condições tropicais, as informações sobre os impactos da elevada [CO₂] na estrutura, crescimento, desenvolvimento e produtividade dessas plantas são muito escassas. Ainda existem muitas lacunas no conhecimento atual sobre a cultura no contexto das mudanças climáticas. Assim, destaca-se a prioridade de pesquisas para avançar no entendimento sobre como essa espécie responderá às variabilidades climáticas previstas para o futuro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo das plantas e condições experimentais

As mudas de cafeeiro (*Coffea arabica*) foram obtidas a partir da germinação de sementes em germinador de areia e posteriormente cultivadas em viveiro suspenso (21° 14' S, 45° 00' W, altitude 918 m). As sementes utilizadas estavam armazenadas em câmara fria e foram cedidas pelo setor de sementes do departamento de agricultura da Universidade Federal de Lavras no ano de 2018. As cultivares utilizadas foram 'Mundo Novo', 'Rubi' e 'Catuaí' (IAC, 144). A repicagem (transplântio) foi feita quando as plântulas atingiram o estágio de "palito de fósforo". As plântulas com características morfológicas semelhantes foram transplantadas para tubetes de polietileno rígido com capacidade volumétrica de 120 mL. Os recipientes foram colocados em um viveiro suspenso, a um metro acima do nível do solo, confeccionado com tela de arame ondulado. A cobertura do viveiro foi feita com tela plástica tipo sombrite de cor preta com passagem de 50% da luminosidade, colocada a dois metros de altura em relação ao solo. As irrigações foram feitas duas vezes ao dia, utilizando sistema de irrigação por microaspersão, procurando fornecer uma lâmina de 4,5 mm de água por dia, de acordo com Guimarães *et al.* (1998).

O substrato utilizado nesta fase do experimento foi substrato comercial Plantmax hortaliças HT[®], constituído à base de casca de pinus processada e enriquecida, vermiculita e turfa processada e enriquecida com adubo de eficiência aumentada conforme recomendado por Melo (1999). Para a adubação, utilizou-se o fertilizante de liberação lenta Osmocote, formulação 15-10-10 de NPK acrescido de 3,5% de Ca, 1,5% de Mg, 3,0% de S, 0,02% de B, 0,05% de Cu, 0,5% de Fe, 0,1% de Mn, 0,004% de Mo e 0,05% de Zn. Foi utilizada a dosagem de 8,3 kg m⁻³ de substrato (MELO, 1999).

As mudas foram mantidas nestas condições até emitirem o quarto par de folhas (aproximadamente 6 meses). Neste momento, as plantas foram selecionadas quanto à uniformidade e transplantadas para tubetes de 120 mL, contendo substrato inerte, vermiculita média (90 a 100% das partículas entre 1,19-0,50 mm), e transferidas para a câmara de crescimento controlado (CONVIRON[®], ATC60, Canada), com fotoperíodo de 12h, irradiância de 300 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura média de 24 °C (25 °C dia/23 °C noite), umidade de 71,44 \pm 7,7% e concentração de 380 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ de ar.

Nessas condições, as plantas foram mantidas por 14 dias para aclimação, recebendo solução nutritiva (SN) de Hoagland e Arnon (1950) completa.

Após esse período de aclimatação (14 dias), as plantas das três cultivares Mundo Novo, Rubi e Catuaí, foram submetidas aos tratamentos nitrogenados, sendo constituídos de:

- i) Aplicação de SN de Hoagland e Arnon (1950) completa e modificada para conter 16 mM de nitrogênio na forma de NO_3^- (Nitrato) e concentração de CO_2 atual ($380 \mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ ar = 380 ppm).
- ii) Aplicação de SN de Hoagland e Arnon (1950) completa e modificada para conter 16 mM de nitrogênio na forma de NH_4^+ (Amônio) e concentração de CO_2 atual ($380 \mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ ar = 380 ppm).

Durante esse período, cada planta recebeu semanalmente a aplicação de 100 mL de solução nutritiva (pH $6,0 \pm 0,5$) referente a cada um dos tratamentos nitrogenados (16 mmol/L de NO_3^- ou 16mmol/L de NH_4^+). Esse volume aplicado refere-se à capacidade de retenção de água do substrato utilizado.

Diariamente, as plantas foram irrigadas com 100ml de água deionizada. As condições de temperatura, fotoperíodo, irradiância e umidade permaneceram as mesmas descritas anteriormente.

Aos 14 dias após a indução dos tratamentos nitrogenados (28 dias após transferência para câmara de crescimento), foram avaliadas em metade das plantas (60 plantas), as trocas gasosas, eficiência do uso da água, fluorescência da clorofila *a*, fotorrespiração, respiração, *V_{cmax}*, *J_{max}* e *TPU*) e o material vegetal foi coletado para posteriores análises enzimáticas (invertase, RN, GS, MDH, SOD, CAT e APX), de pigmentos fotossintéticos, de nutrientes minerais, de macro e micromoléculas (açúcares, proteínas e aminoácidos) e para obtenção da matéria seca e da taxa de crescimento relativo.

A partir desse momento, a outra metade das plantas que permaneceram na câmara de crescimento controlado foram expostas à $760 \mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ ar. As demais variáveis permaneceram inalteradas (fotoperíodo de 12h, irradiância de $300 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura média de 24 °C (25 °C dia/23 °C noite), umidade de $71,44 \pm 7,7\%$, aplicação de SN de Hoagland e Arnon (1950) completa e modificada para conter 16 mM de nitrogênio na forma de NO_3^- (Nitrato) e concentração de CO_2 elevada ($760 \mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ ar = 760 ppm e aplicação de SN de Hoagland e Arnon (1950) completa e modificada para conter 16 mM de nitrogênio na forma de NH_4^+ (Amônio) e concentração de CO_2 elevada ($760 \mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ ar = 760 ppm).

Durante esse período, cada planta recebeu semanalmente a aplicação de 100 mL de solução nutritiva (pH $6,0 \pm 0,5$) referente a cada um dos tratamentos nitrogenados (16 mmol/L

de NO_3^- ou 16mmol/L de NH_4^+). Esse volume aplicado refere-se à capacidade de retenção de água do substrato utilizado.

Aos 14 dias após o ajustamento da concentração de CO_2 para $760 \mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ ar (42 dias após a transferência para o CONVIRON[®]) nas plantas restantes (60 plantas) foram avaliadas as trocas gasosas, eficiência do uso da água, fluorescência da clorofila *a*, fotorrespiração, respiração, *V_{cmax}*, *J_{max}* e *TPU*) e o material vegetal foi coletado para posteriores análises enzimáticas (invertase, RN, GS, MDH, SOD, CAT e APX), de pigmentos fotossintéticos, de nutrientes minerais, de macro e micromoléculas (açúcares, proteínas e aminoácidos) e para obtenção da matéria seca e da taxa de crescimento relativo.

3.2 Avaliação da matéria seca e da taxa de crescimento relativo

Para determinação da matéria seca (MS) as plantas foram coletadas no dia da indução dos tratamentos nitrogenados, aos 14 dias (380 ppm CO_2) e aos 28 dias (760 ppm CO_2) após a aplicação dos tratamentos. As plantas foram pesadas e posteriormente secas em estufa com circulação forçada de ar a 65°C durante 72 horas e em seguida, novamente pesadas para obtenção da matéria seca (MS). A taxa de crescimento relativo (TCR), foi calculada de acordo com Magalhães (1979).

3.3 Avaliação das trocas gasosas e da fotorrespiração

As medições das trocas gasosas foram realizadas aos 14 e aos 28 dias após a indução dos tratamentos nitrogenados, utilizando folhas totalmente expandidas. A taxa líquida de assimilação de CO_2 (*A*), condutância estomática (*g_s*), concentrações intracelular e ambiental de CO_2 (*C_i* e *C_a*), taxa transpiratória (*E*) foram obtidas entre 9 e 10 horas a partir do analisador portátil de trocas gasosas, IRGA modelo LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, NE, EUA. A eficiência instantânea do uso da água (EUA) e a eficiência intrínseca do uso da água foram calculadas a partir das razões *A/E* e *A/g_s* respectivamente. Nas mesmas folhas, com o mesmo equipamento, foram realizadas medidas de respiração no escuro (*R_n*), no período entre 4:00 e 5:00 horas da manhã.

A partir dos dados do IRGA, calculou-se também a taxa fotorrespiratória (FR) de acordo com Sharkey (1988), segundo as Equações:

$$FR = 0,5 \cdot v_0 \quad (1)$$

$$v_0 = (A + Rn)/(1 \phi - 0,5) \quad (2)$$

onde v_0 é a taxa de oxigenação da Rubisco, A é taxa assimilatória líquida de CO_2 , Rn é a respiração medida no escuro, e ϕ é a relação entre as taxas de carboxilação e oxigenação da Rubisco (FARQUHAR; VON CAEMMERER, 1980).

3.4 Quantificação de pigmentos fotossintéticos: clorofilas a , b e carotenoides

As concentrações dos pigmentos cloroplastídicos, clorofilas a , b e carotenóides (xantofilas + carotenos) foram determinadas de acordo com a metodologia de Lichtenthaler e Buschmann (2001). Foram macerados 100 mg de matéria fresca em 15 ml de acetona 80%. Na sequência, as amostras foram filtradas, o volume foi completado para 30 ml e as leituras realizadas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 645, 663 e 445 nm para clorofilas a , b , e carotenoides, respectivamente.

3.5 Avaliação da fluorescência da clorofila a

Nas mesmas folhas e nos mesmos dias em que foram feitas as análises de trocas gasosas, com o auxílio de um fluorômetro portátil MINI-PAM (*Walz Inc.*), foram medidos os valores de fluorescência inicial (F_0) e fluorescência máxima (F_m), a partir dos quais calculou-se a fluorescência variável (F_v) e a eficiência fotoquímica do PSII (F_v/F_m). Para obtenção de F_0 as folhas selecionadas foram adaptadas ao escuro para oxidação dos centros de reação de PSII, na sequência, um pulso de luz branca saturante ($8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foi aplicado para obtenção da fluorescência máxima adaptada à luz (F_m).

3.6 Avaliação da velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}), da taxa de transporte elétrons utilizados para regeneração da ribulose 1,5 bifosfato (J_{max}) e da taxa de utilização da triose-fosfato (TPU)

As curvas de resposta da assimilação líquida de CO_2 (A) ao aumento da concentração intercelular de CO_2 (C_i) foram realizadas em folhas completamente expandidas aos 14 dias (380 ppm CO_2) e aos 28 dias (760 ppm CO_2) após indução dos tratamentos nitrogenados. Para a curva A/C_c , a irradiância foi mantida constante em $900 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A concentração

de CO₂ foi modificada gradualmente na câmara de medida do IRGA e variaram de 50 a 1700 µmol de CO₂ mol⁻¹, na seguinte ordem: 380, 200, 100, 50, 380, 600, 800, 1300 e 1700 µmol mol⁻¹. Para a elaboração da curva, foi utilizado o modelo bioquímico desenvolvido por Sharkey (2016), para plantas C3, utilizando-se valores de C_c, ao invés de C_i, por meio de fórmulas desenvolvidas pelo mesmo autor em Excel. Segundo esse modelo, a taxa fotossintética líquida é dada pelo menor valor que se pode obter, em razão das limitações impostas pela atividade da Rubisco (A_c), pela taxa de transporte de elétrons (A_j) ou pela utilização das trioses fosfato (A_p), ou seja:

$$A = \min\{A_c, A_j, A_p\} \quad (3)$$

em que:

$$A_c = \frac{(C_c - \Gamma^*)V_{cmax}}{C_c + k_c + \frac{O}{K_o}} - R_c \quad (4)$$

$$A_j = J \frac{C_i - \Gamma^*}{4C_i - 8\Gamma^*} \quad (5)$$

$$A_p = 3TPU \quad (6)$$

onde C_c é a pressão parcial de CO₂ no cloroplasto, Γ* é o ponto de compensação fotorrespiratório, V_{cmax} a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco, K_c a constante cinética da reação de carboxilação da Rubisco, K_o a constante cinética da reação de oxigenação da Rubisco; O a pressão parcial de O₂ no cloroplasto, R_c a taxa de respiração mitocondrial na luz, J a taxa de transporte elétrons utilizados para regeneração da ribulose 1,5 bifosfato (RuBP) e TPU a taxa de utilização da triose-fosfato.

3.7 Quantificação de N total, NO₃⁻, NH₄⁺, P, K, Ca, Mg e S

O N total foi obtido de acordo com o método de Kjeldahl (AOAC, 1998), pesou-se 1 g de matéria seca foliar moída, no qual foram adicionados 1,5 g de sulfato de potássio (K₂SO₄), 0,3 g de sulfato de cobre (CuSO₄) e 3 ml de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi colocada em bloco digestor a 50 °C, aumentando a temperatura gradativamente até atingir 370 °C (até

atingir a coloração verde-clara), procedeu-se a determinação do N total no destilador, onde foram colocados 10 mL de NaOH 13N e 10 mL da solução ácido-bórico indicador (verde de bromocresol + vermelho de metila). Posteriormente, o destilado foi titulado com HCl 0,07143 N até que houvesse mudança da cor azul para rosa escuro. O volume gasto na titulação representou a porcentagem de N na amostra.

A determinação de nitrato foi executada conforme o método de Cataldo *et al.* (1975). Foram utilizados 100 mg de matéria seca foliar ou radicular e 400 µL do reagente salicílico (ácido salicílico 5% p/v em H₂SO₄ concentrado). Decorridos 20 minutos, à temperatura ambiente, foram adicionados lentamente 9,5 mL de NaOH (2N). Após resfriamento à temperatura ambiente, os tubos foram agitados e medidas as absorbâncias a 410 nm.

A determinação de amônio seguiu a metodologia estabelecida por McCullough (1967). Em 100 mg de matéria seca foliar ou radicular, adicionaram-se 500 µL do reagente I e 500 µL do reagente II, perfazendo ao todo 1,1 mL. Reagente I: Fenol 0,1 M + SNP (nitroprussiato de sódio) 170 µM. Reagente II: NaOH 0,125 M + Na₂HPO₄ · 12H₂O 0,15M + NaOCl (3% Cl₂). Após a adição do reagente I, agitou-se para depois acrescentar o reagente II, em seguida os tubos foram transferidos para banho-maria a 37 °C, por 35 minutos. As leituras foram realizadas a 625 nm.

Para determinação de fósforo, potássio, cálcio magnésio e enxofre a amostra foliar foi digerida em solução de ácido nítrico e perclórico. Para quantificar o fósforo utilizou-se o método colorimétrico, que se baseia na leitura da intensidade da cor do complexo amarelado formado da reação do fósforo com a mistura de molibdato de amônio e vanadato de amônio. O potássio foi quantificado por fotometria de chama. Ca e Mg foram determinados por absorção atômica e o S por turbidimetria (BATAGLIA *et al.* 1983).

3.8 Determinação de amido, açúcares solúveis totais, açúcares redutores, sacarose, proteínas e aminoácidos livres totais

Essas macro e micromoléculas foram extraídas pela homogeneização de 1 g de tecido foliar ou radicular, secos, em 5 mL de tampão fosfato de potássio, 100 mM e pH 7,0. O homogenato foi centrifugado a 5.000 g por 10 minutos coletando-se o sobrenadante. O processo foi repetido por duas vezes e os sobrenadantes, combinados. Para a quantificação de açúcares solúveis totais e amido, foi utilizado o método da Antrona (hidroxiantraceno) (DISCHE, 1962), e para os açúcares redutores, o protocolo descrito por Miller (1959), com uso do ácido

3,5-dinitrosalicílico (DNS). A concentração de sacarose foi estimada pela diferença entre açúcares solúveis totais e açúcares redutores.

No mesmo extrato obtido a proteína total foi estimada pelo método de Bradford (1976) e a concentração de aminoácidos livres foi determinada conforme método de Yemm e Cocking (1955) com o padrão glicina.

3.9 Avaliação das enzimas de assimilação do nitrogênio (RN, GS), enzima do metabolismo de açúcares (Invertase) e da enzima respiratória malato desidrogenase dependente de NADH (MDH)

Para a realização dos ensaios da RN e GS, os extratos enzimáticos foram obtidos a partir da maceração de 1 g de matéria fresca foliar ou radicular em nitrogênio líquido, adicionaram-se 5 mL de tampão de extração contendo tampão de fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), PMSF 1 mM, EDTA 100 mM, 10% PVPP e DTT 2 mM. O extrato foi centrifugado a 13.000 g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado como fonte enzimática.

A atividade da RN (E.C.1.6.6.1) foi quantificada utilizando protocolo descrito por Berger e Harrison (1995) com algumas modificações. Alíquotas de 20 μ L do extrato foram adicionadas ao meio de reação constituído por tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5, β -NADH 0,2 mM e KNO_3 10 mM, perfazendo um volume final de 200 μ L. A reação foi iniciada pela adição de NADH, após a incubação do meio, por 3 minutos, a 30 °C. A oxidação do NADH foi monitorada pelo decréscimo da absorbância em 340 nm, durante 10 minutos, em intervalos de 1 minuto e a quantificação foi feita a partir dos 5 minutos de decaimento.

A GS (EC 6. 3. 1. 2) foi avaliada como proposto por Ratajczak *et al.* (1981). O ensaio da GS foi realizado tomando-se uma alíquota de 300 μ L do extrato bruto, adicionaram-se 700 μ L de um meio reacional contendo 200 μ L de tampão tris-HCl 0,5 M, pH 7,5; 100 μ L de mercaptoetanol 0,1 M; 50 μ L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4 M; 150 μ L de NH_2OHCl 0,1 M; 100 μ L de glutamato monossódico 0,5 M e 100 μ L de ATP 0,1 M. Incubou-se a mistura a 30 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 1 mL de uma solução composta de FeCl_3 0,37 M, HCl 0,67 M e ácido tricloroacético (TCA) 0,2 M. Em seguida, centrifugou-se a 16.000 g por 5 minutos, o quelato Fe-L-glutamil- γ -hidroxamato (GHA) produzido foi determinado em espectrofotômetro a 540 nm e a atividade enzimática expressa em μmol de GHA g^{-1} MF h^{-1} .

A extração da invertase (EC 3.2.1.26) foi feita pela homogeneização de 0,4 g de tecido fresco de folhas e de raízes adicionados de 1,5 mL de meio constituído de tampão fosfato de potássio (100 mM pH 7,5), Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (1 mM), MgCl_2 (5 mM) e DTT (1 mM). Posteriormente, o conjunto foi centrifugado a 18.000 g a 4 °C, durante 20 minutos

(CAIRO *et al.*, 2009). O *pellet* foi utilizado para extração da invertase ácida da parede celular, a metodologia foi realizada de acordo com Fahrendorf e Beck (1990). A atividade enzimática foi avaliada pela quantificação de açúcares redutores produzidos, segundo protocolo descrito por Miller (1959), utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

A atividade da malato desidrogenase dependente de NADH (MDH: EC 1.1.1.37) foi mensurada seguindo o decréscimo da absorbância a 340nm devido à oxidação do NADH. A análise foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por López-Millán *et. al* (2000) com algumas alterações. 20 µL do extrato de folhas foram adicionados a solução contendo Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) e NADH 0,1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 20 µL de oxaloacetato (20 mM).

3.10 Atividade das enzimas do metabolismo antioxidante e conteúdo de H₂O₂

Os extratos enzimáticos foram obtidos a partir de 200 mg de tecidos foliares ou radiculares frescos macerados em N₂ líquido acrescido de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) insolúvel, adicionaram-se 1,5 mL do tampão de extração composto de: Fosfato de potássio 400 mM (pH 7,8), EDTA 10 mM e ácido ascórbico 200 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante coletado foi utilizado para quantificação das atividades da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX). A atividade da SOD foi estimada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). As leituras foram realizadas a 560 nm. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio. A atividade da APX foi determinada segundo Nakano e Asada (1981), por meio do monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm e o coeficiente de extinção molar utilizado foi 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹. A atividade da CAT foi determinada conforme Havir e McHale (1987). A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 36 mM⁻¹ cm⁻¹, conforme descrito por Azevedo *et al.* (1998).

O H₂O₂ foi determinado a partir de 200 mg de tecidos foliares ou radiculares frescos macerados em nitrogênio líquido, homogeneizados em 5 mL de TCA e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4 °C. Mediu-se a absorbância a 390 nm em um meio de reação, contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 e 1 mL de iodeto de potássio (VELIKOVA *et al.*, 2000).

3.11 Análises estatísticas e delineamento experimental

O experimento foi arranjado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (2 x 2 x 3). Sendo as fontes de variação: duas fontes de N (NO_3^- ou NH_4^+), duas concentrações de CO_2 (380 ou 760 $\mu\text{L.L}^{-1}$) e três cultivares ('Mundo Novo', 'Rubi' e 'Catuaí') com cinco repetições (60 parcelas) com duas plantas por parcela, totalizando 120 plantas. Os dados obtidos foram submetidos às pressuposições da ANOVA, verificou-se a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente, realizou-se a análise de variância com a significância das fontes de variação verificada pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade. Para o estudo das médias, quando verificada significância, realizou-se a comparação, por meio da sobreposição do erro padrão e pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0.05$).

4 RESULTADOS

4.1 Produção de matéria seca e taxa de crescimento relativo

A produção de matéria seca total (MST) das três cultivares de cafeeiro utilizadas ('Mundo Novo', 'Rubi' e 'Catuaí') foi positivamente influenciada pela elevação da $[\text{CO}_2]$ (FIGURA 1A). Além disso, a maior produção de biomassa foi verificada no tratamento com NH_4^+ .

Nas plantas tratadas com nitrato (NO_3^-), o acúmulo de biomassa nas cultivares Mundo Novo e Rubi apresentou acréscimo de 10,0%, enquanto que a MST da cultivar Catuaí, aumentou 13,0%. Nas plantas tratadas com amônio (NH_4^+), a maior $[\text{CO}_2]$ ($760 \mu\text{L de CO}_2 \text{ L}^{-1}$ de ar), propiciou maiores elevações na MST, sendo os acréscimos de 18,0; 14,0 e 25,0% para 'Mundo Novo', 'Rubi' e 'Catuaí' respectivamente.

Sob elevada $[\text{CO}_2]$, as três cultivares, apresentaram aumentos significativos na taxa de crescimento relativo (TCR) em ambos os tratamentos nitrogenados (FIGURA 1B). Para a cultivar Catuaí, a maior $[\text{CO}_2]$ aumentou a TCR, que passou de 0,2 para $0,35 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ nas plantas tratadas com NO_3^- e de 0,2 para $0,40 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ nas plantas tratadas com NH_4^+ . Em 'Mundo Novo' e 'Rubi' a TCR elevou-se de 0,2 para $0,3 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ em ambos os tratamentos nitrogenados.

A elevada $[\text{CO}_2]$ promoveu também, um maior acúmulo de matéria seca na parte aérea (MSPA) e de matéria seca radicular (MSR) em ambas os tratamentos nitrogenados, independente da cultivar analisada (FIGURAS 1C e 1D). A MSPA foi elevada em 10% no tratamento nítrico e em 18% no tratamento amoniacal. A MSR aumentou em 20% nas plantas de Mundo Novo' e 'Rubi, independente da fonte de nitrogênio aplicada. Nas plantas da cultivar Catuaí, os acréscimos na MSR foram de 20% e 40%, nos tratamentos com NO_3^- e com NH_4^+ respectivamente.

Quando as fontes de nitrogênio foram comparadas dentro da elevada $[\text{CO}_2]$, o tratamento com NH_4^+ resultou em maiores acréscimos na MST e na MSPA de todas as cultivares. Para a cultivar Catuaí, sob alta $[\text{CO}_2]$, além de maiores MST e MSPA, foram observados também, maiores valores de TCR e MSR no tratamento com NH_4^+ do que no tratamento com NO_3^- (FIGURAS 1A, 1B, 1C e 1D).

Figura 1 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio no acúmulo de matéria seca total (A), na taxa de crescimento relativo (B), matéria seca da parte aérea (C) e na matéria seca da raiz (D) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*). (continua)

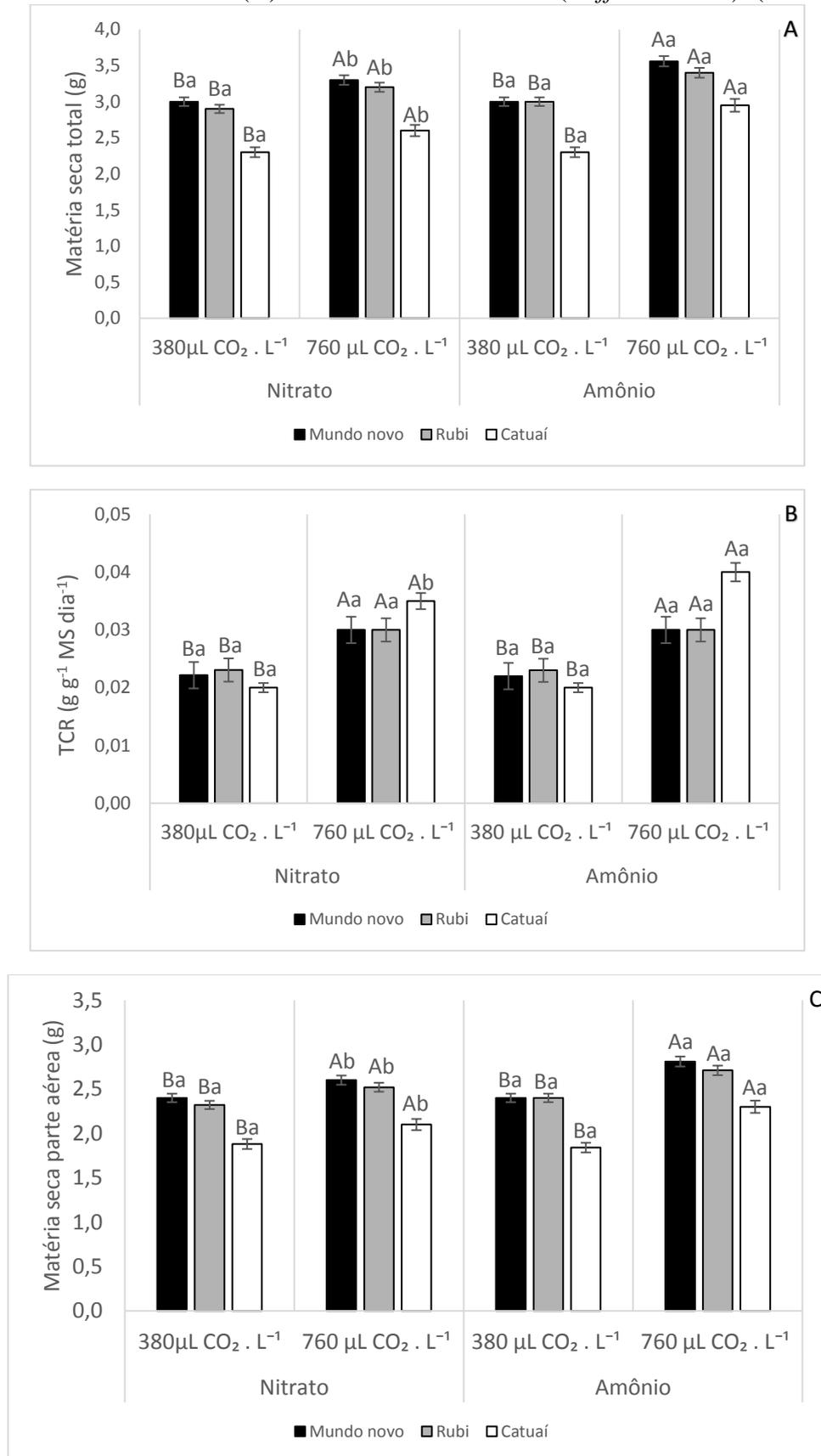
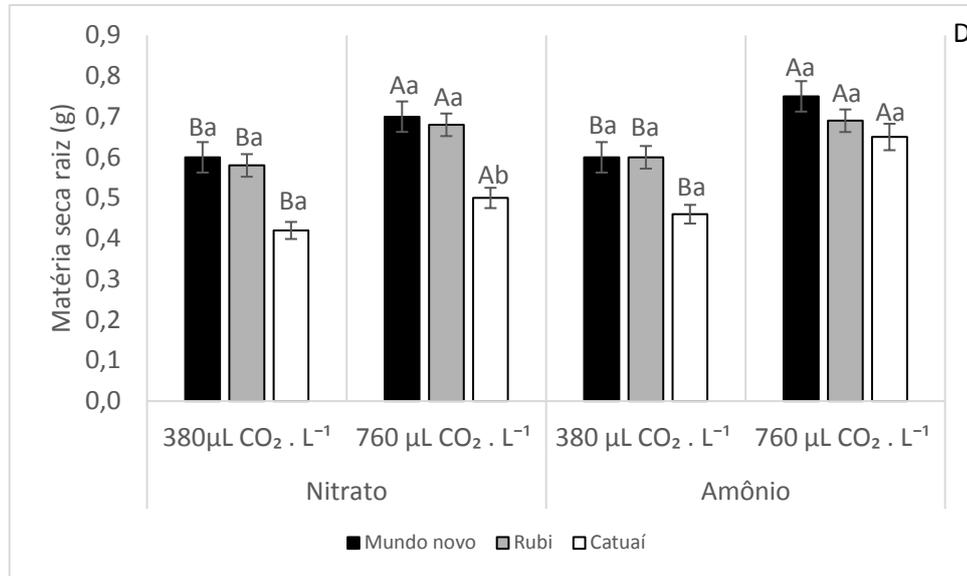


Figura 1 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio no acúmulo de matéria seca total (A), na taxa de crescimento relativo (B), matéria seca da parte aérea (C) e na matéria seca da raiz (D) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*). (conclusão)



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 µL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

4.2 Teores de pigmentos fotossintéticos: clorofilas *a*, *b* e carotenoides

Os teores de clorofilas *a* e *b* foram significativamente maiores nas plantas submetidas à elevada [CO₂], em ambas as fontes de nitrogênio, independente da cultivar. Para todas as cultivares, as maiores concentrações de clorofilas *a* e *b* foram observadas nas plantas tratadas com NH₄⁺ e alto CO₂. A interação entre 760 µL de CO₂ L⁻¹ e NO₃⁻ aumentou em 27 e 40% os teores de clorofilas *a* e *b*, enquanto que a interação entre alto CO₂ e NH₄⁺ elevou a concentração desses pigmentos em 50 e 75% respectivamente (FIGURAS 2A e 2B).

Dentro da concentração 380 µL de CO₂ L⁻¹, não foram verificadas diferenças para essas variáveis, a fonte de nitrogênio não interferiu nos teores das clorofilas (FIGURAS 2A e 2B).

Os teores de carotenoides não diferiram significativamente entre os tratamentos (FIGURA 1C).

Figura 2 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio no teor de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), e carotenoides (C) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*). (continua)

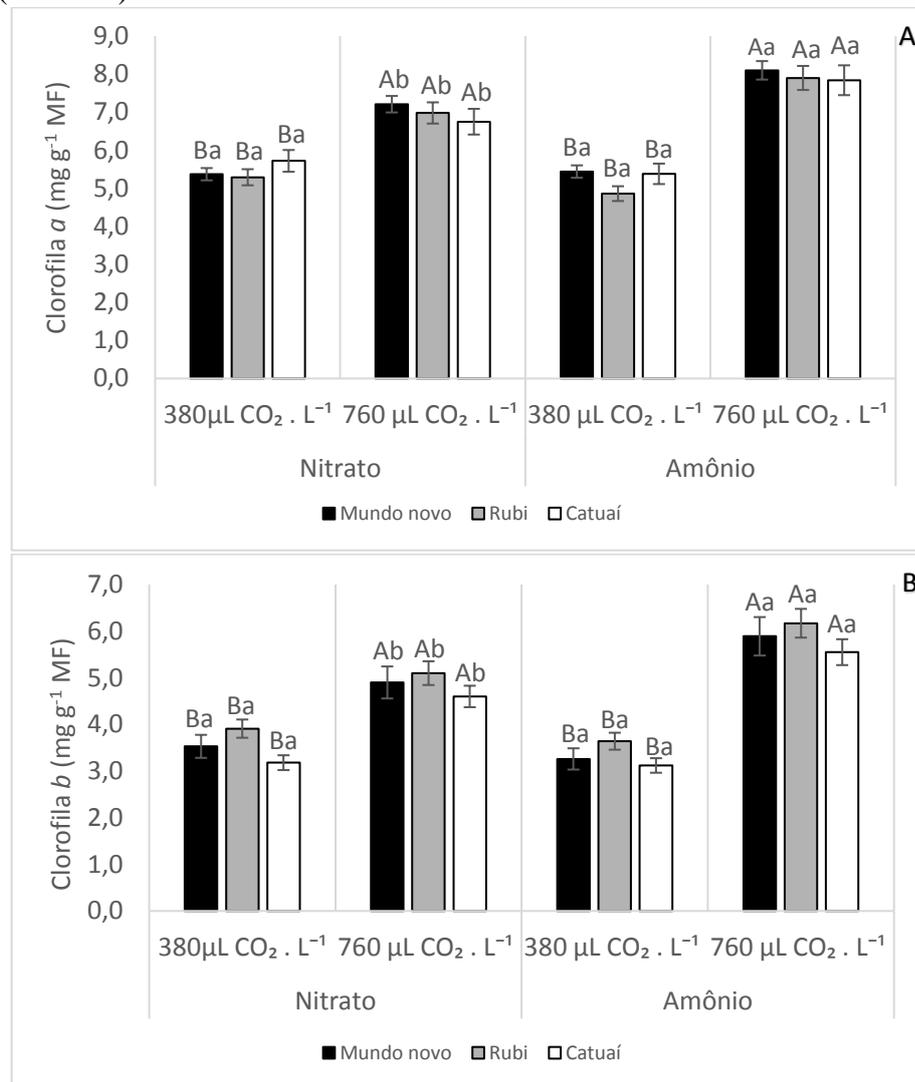
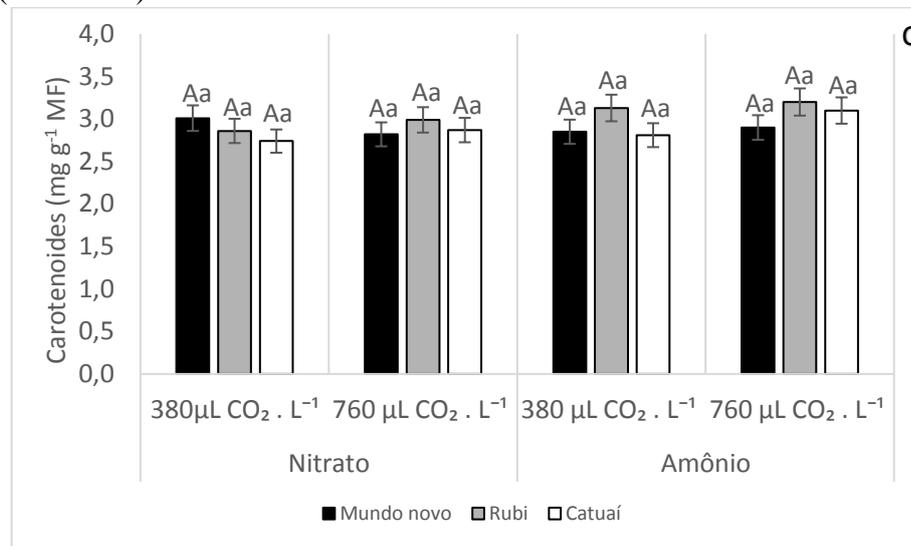


Figura 2 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio no teor de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), e carotenoides (C) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*). (conclusão)



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 μL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

4.3 Trocas gasosas

A análise de variância para taxa de fotossíntese líquida (*A*), concentração de carbono interno (*C_i*), e condutância estomática (*g_s*) indica significância para a interação fonte nitrogenada e elevada [CO₂] (FIGURAS 3A, e 3B e 3C). Para as três cultivares, as plantas mantidas sob elevada [CO₂], independente do tratamento nitrogenado, aumentaram de forma significativa *A* e *C_i*, por outro lado, reduziram *g_s*.

No entanto, as três variáveis, *A*, *C_i* e *g_s*, não foram influenciadas significativamente, quando comparadas as fontes de nitrogênio dentro da concentração de 380 μL de CO₂ L⁻¹.

A elevação da [CO₂], nas plantas tratadas com NO₃⁻, resultou em aumentos na *A* de 6,6 para 9,8 (48%); de 7,8 para 10,6 (35%) e de 7,7 para 12,3 (60%) μmol de CO₂ m² s⁻¹ para ‘Mundo Novo’, ‘Rubi’ e ‘Catuaí’ respectivamente. Já nas plantas tratadas com NH₄⁺, esses acréscimos foram significativamente superiores, os valores praticamente dobraram, visto que, *A* foi de 6,95 para 12,3 μmol de CO₂ m² s⁻¹ nas plantas da cultivar Mundo Novo, de 7,0 para 13,8 μmol de CO₂ m² s⁻¹ em ‘Rubi’ e de 7,3 para 15,4 μmol de CO₂ m² s⁻¹ em ‘Catuaí’ (FIGURA 3A).

Por outro lado, reduções de 30% na g_s foram verificadas diante da elevação da $[CO_2]$ para as duas fontes nitrogenadas e para as três cultivares (FIGURA 3B).

A maior $[CO_2]$ elevou em aproximadamente duas vezes a concentração de carbono na câmara subestomática (C_i), independente da forma de nitrogênio aplicada e da cultivar utilizada (FIGURA 3C).

Os valores de taxa transpiratória (E), (FIGURA 4A), reduziram 35% sob 760 μL de CO_2 nas plantas das três cultivares, em ambos os tratamentos nitrogenados.

Comparando as concentrações de CO_2 , independente do tratamento nitrogenado, as três cultivares apresentaram eficiência instantânea do uso da água (A/E) e eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s) significativamente maiores sob 760 μL de CO_2 . Sob elevada $[CO_2]$, a relação A/E triplicou no tratamento com NH_4^+ , e duplicou no tratamento com NO_3^- . A elevação da $[CO_2]$, também resultou na duplicação da A/g_s tanto nas plantas tratadas com NH_4^+ quanto nas plantas com NO_3^- (FIGURAS 4B e 4C).

Para as variáveis g_s , C_i , E e A/g_s não foram observadas alterações significativas quando comparadas as fontes de nitrogênio dentro de cada $[CO_2]$ (FIGURAS 3B, 3C, 4A e 4C).

Figura 3 - Efeito da concentração de CO_2 e da fonte de nitrogênio na taxa assimilatória líquida (A), na condutância estomática (B) e na concentração interna de CO_2 (C) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*). (continua)

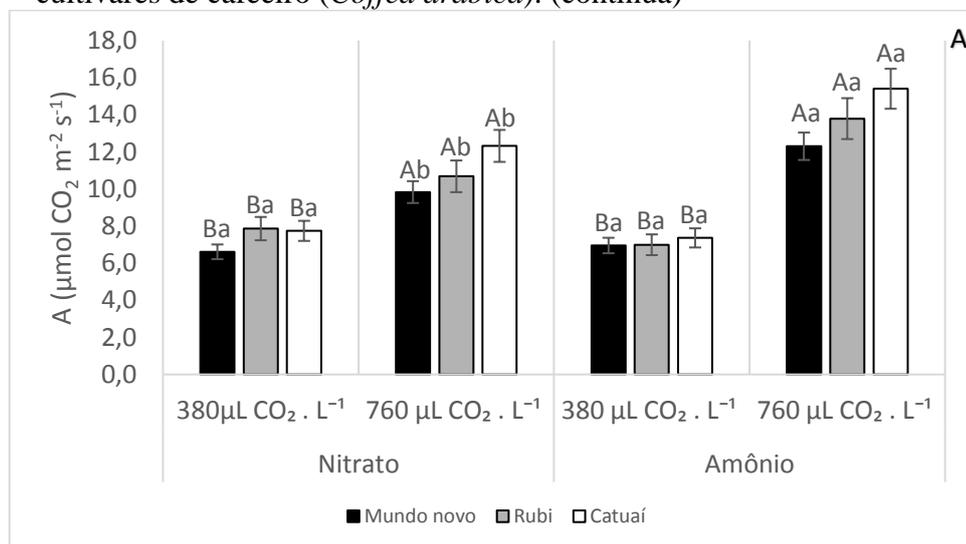
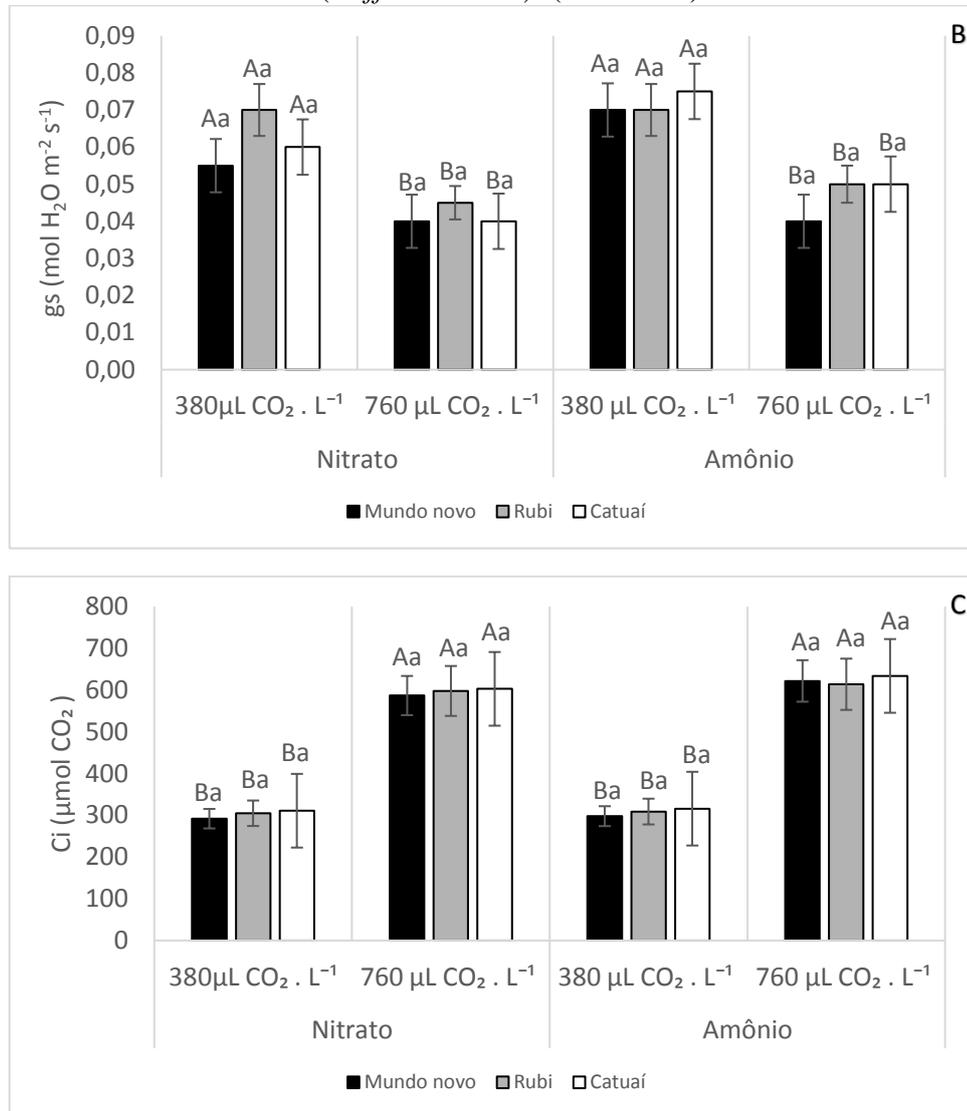


Figura 3 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na taxa assimilatória líquida (A), na condutância estomática (B) e na concentração interna de CO₂ (C) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*). (conclusão)



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 µL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

Figura 4 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na taxa transpiratória (A), na eficiência instantânea do uso da água (B) e na eficiência intrínseca do uso da água (C) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*). (continua)

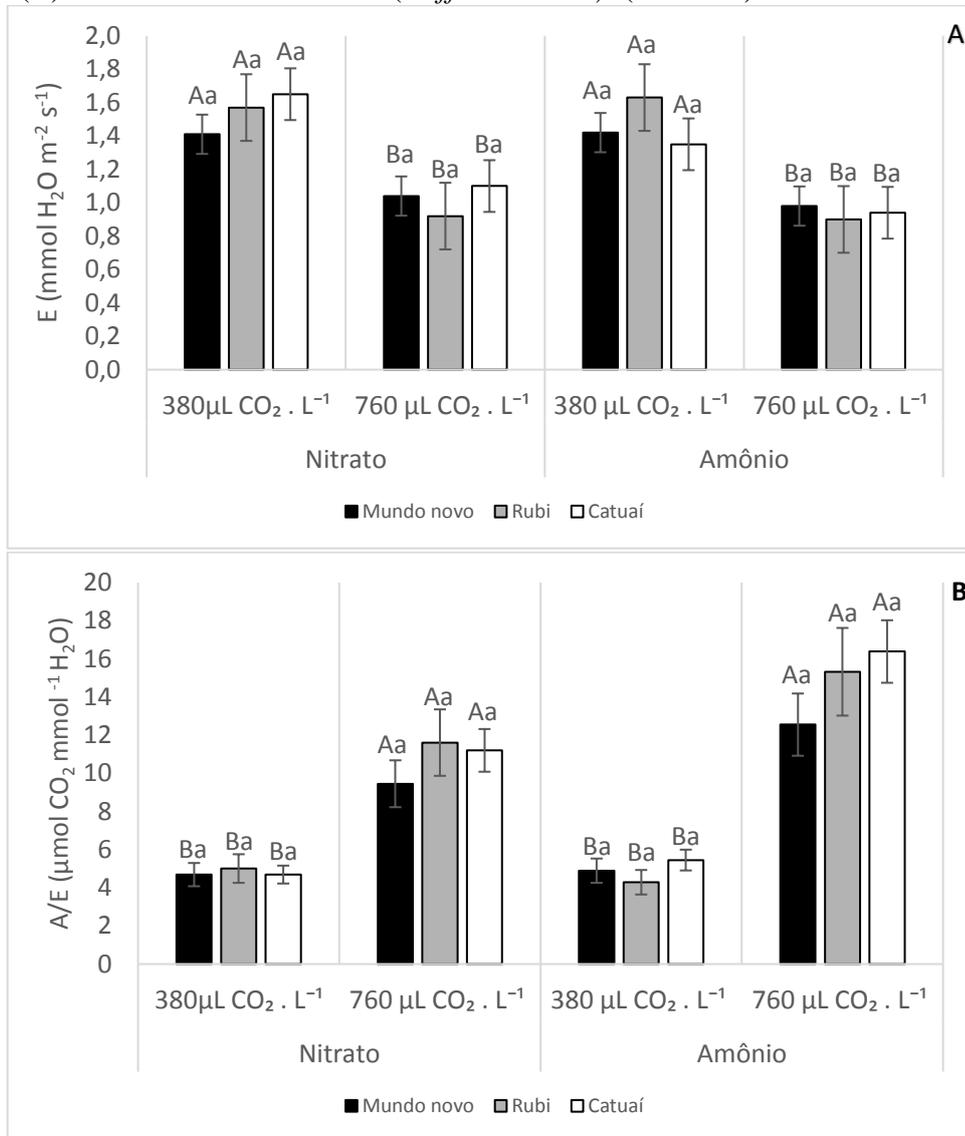
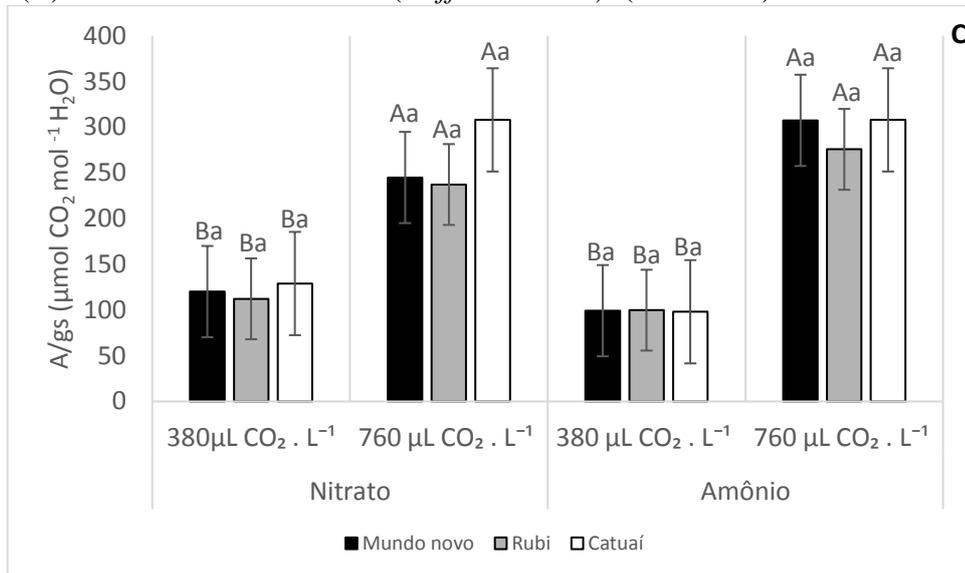


Figura 4 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na taxa transpiratória (A), na eficiência instantânea do uso da água (B) e na eficiência intrínseca do uso da água (C) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*). (conclusão)



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 µL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

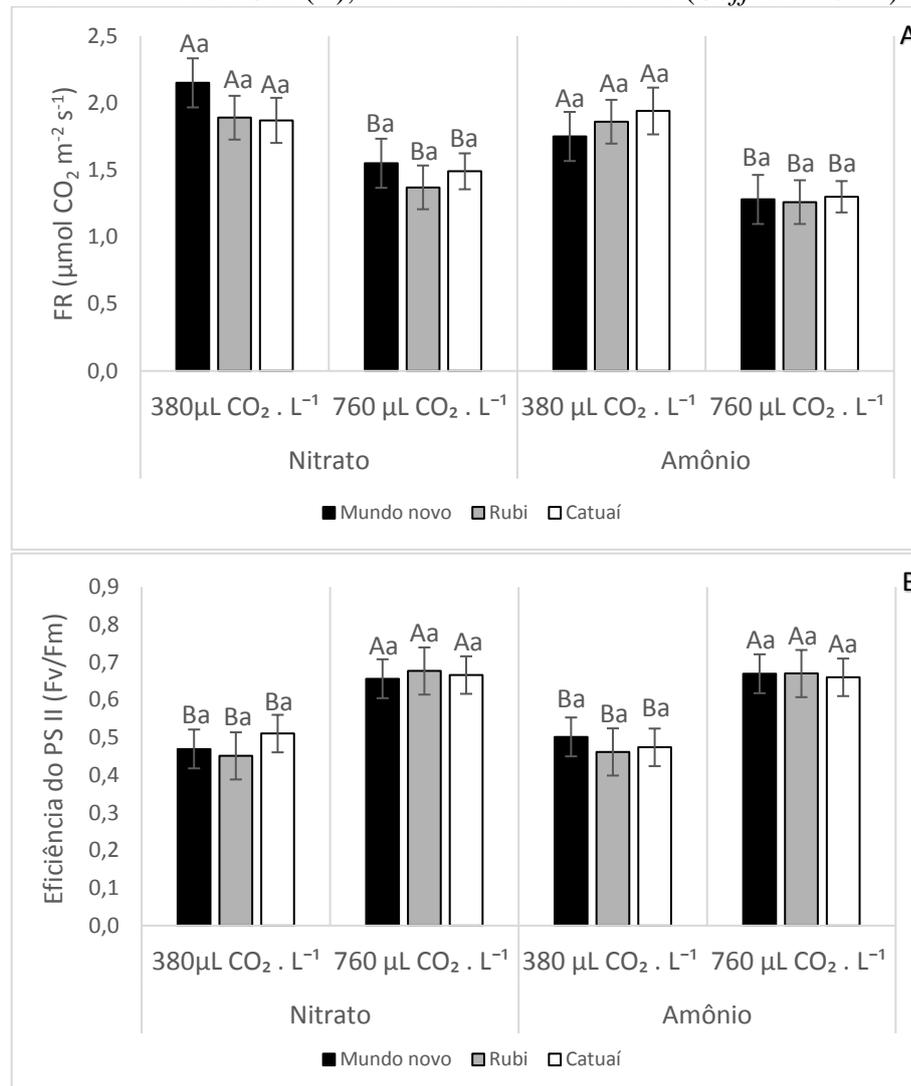
4.4 Fotorrespiração e eficiência fotoquímica

Quando foi analisado o efeito da elevação da [CO₂] sobre a taxa fotorrespiratória (FR), (FIGURA 5A), foram observadas significativas reduções. Essa queda foi de aproximadamente 28% independente do tratamento nitrogenado e da cultivar utilizada. Contudo, não houve diferenças significativas quando foram comparadas as fontes nitrogenadas dentro de cada [CO₂].

Ao analisar a eficiência do PSII constatou-se que a elevação da [CO₂] aumentou significativamente a relação F_v/F_m . O aumento nessa variável foi de 40% para ‘Mundo Novo’, ‘Rubi’ e ‘Catuaí’, em ambos os tratamentos nitrogenados (FIGURA 5B).

No entanto, não foram verificadas diferenças significativas para o efeito do fator fonte de nitrogênio dentro das concentrações de CO₂.

Figura 5 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na taxa fotorrespiratória (A), e na eficiência do PS II (B), de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 µL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

4.5 Velocidade máxima de carboxilação, taxa de transporte de elétrons, taxa de utilização de triose-fosfato

O aumento na [CO₂] para 760 µL de CO₂ L⁻¹ influenciou positivamente a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (*V_{cmax}*), a taxa de transporte de elétrons usados para regeneração da RuBP (*J_{max}*) e a taxa de utilização de triose-fosfato (*TPU*) em todos os tratamentos. Em adição, sob elevada [CO₂], independentemente da cultivar, as plantas tratadas com NH₄⁺ apresentaram valores de *V_{cmax}*, *J_{max}* e *TPU* significativamente maiores quando comparadas as plantas com NO₃⁻ (TABELA 1).

Tabela 1 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (*V_{cmax}*); taxa de transporte de elétrons usados para regeneração da RuBP (*J*) e, a taxa de utilização de triose-fosfato (*TPU*) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*) (n = média de 5 repetições ± erro padrão da média).

NITRATO			
	<i>V_{cmax}</i>	<i>J_{max}</i>	<i>TPU</i>
μmol de CO ₂ .m ⁻² .s ⁻¹			
Mundo Novo (380μL CO ₂ L ⁻¹)	28,55±1,42	36,48±1,86	2,79±0,13
Mundo Novo (760μL CO ₂ L ⁻¹)	59,64±2,98	71,87±3,51	4,36±0,21
Rubi (380μL CO ₂ L ⁻¹)	21,55±1,23	27,69±1,35	2,02±0,11
Rubi (760μL CO ₂ L ⁻¹)	49,63±2,88	68,11±3,47	3,96±0,20
Catuaí (380μL CO ₂ L ⁻¹)	18,44±1,01	33,98±2,04	3,06±0,15
Catuaí (760μL CO ₂ L ⁻¹)	51,88±2,54	74,18±3,59	4,99±0,23
AMÔNIO			
	<i>V_{cmax}</i>	<i>J_{max}</i>	<i>TPU</i>
μmol de CO ₂ .m ⁻² .s ⁻¹			
Mundo Novo (380μL CO ₂ L ⁻¹)	38,82±2,94	49,61±2,51	3,79±0,19
Mundo Novo (760μL CO ₂ L ⁻¹)	81,10±4,91	97,73±4,86	5,93±0,28
Rubi (380μL CO ₂ L ⁻¹)	29,31±1,46	37,65±1,88	2,75±0,14
Rubi (760μL CO ₂ L ⁻¹)	67,49± 3,49	92,22±4,82	5,39±0,27
Catuaí (380μL CO ₂ L ⁻¹)	25,07±1,95	46,21±2,43	4,16±0,25
Catuaí (760μL CO ₂ L ⁻¹)	70,55± 3,60	100,88±5,17	6,79±0,33

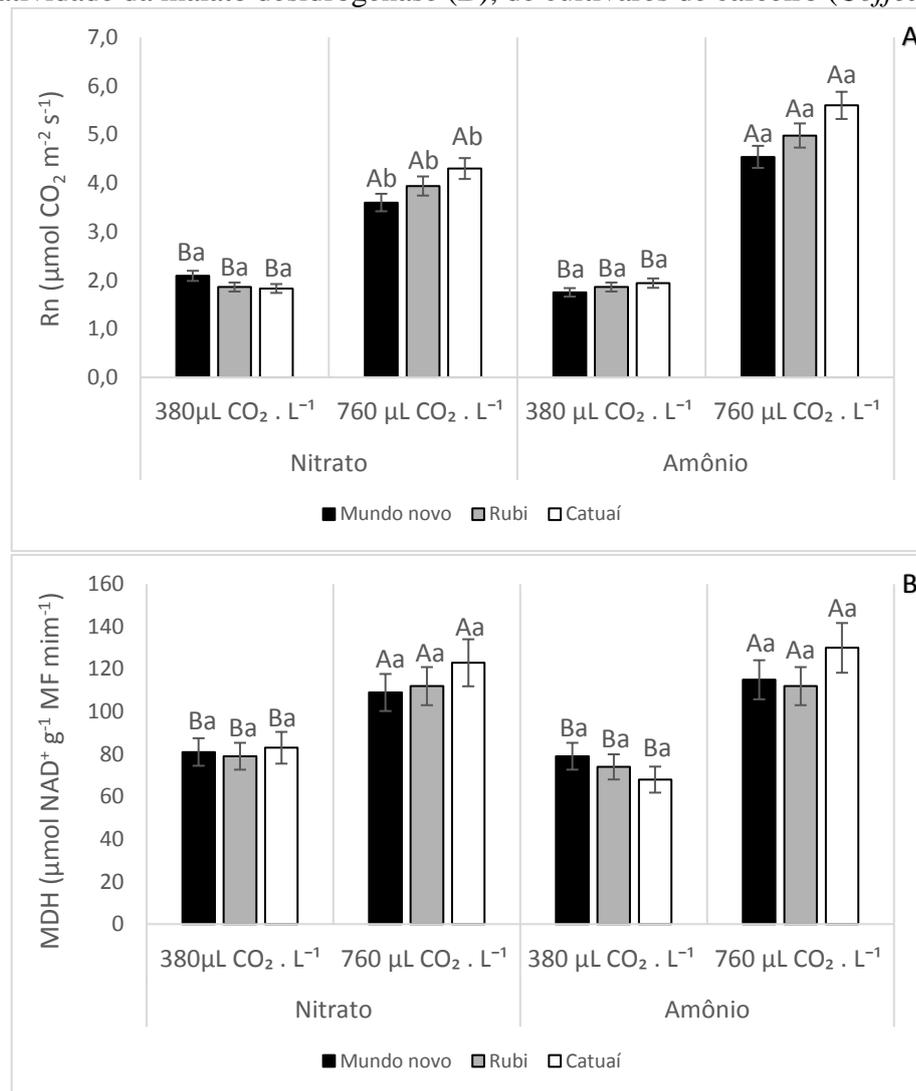
Fonte: Da autora (2020).

4.6 Taxa respiratória e atividade da malato desidrogenase (MDH)

A elevação da [CO₂] favoreceu significativamente a taxa respiratória (R_n), em ambos os tratamentos nitrogenados e independentemente da cultivar (FIGURA 6A). Além disso, quando foram comparadas as diferentes fontes nitrogenadas, na concentração de 760 μL de CO₂ L⁻¹, diferenças significativas foram observadas, sendo os maiores valores verificados no tratamento com NH₄⁺. Para as plantas tratadas com NO₃⁻, a elevação da [CO₂] aumentou a R_n em duas vezes. Enquanto que, para as cultivares tratadas com NH₄⁺ esse aumento foi de 2,7 vezes (FIGURA 6A). A respiração foliar (R_n) não sofreu interferência da fonte de nitrogênio sob 380 μL de CO₂ L⁻¹.

Sobre a avaliação da enzima malato desidrogenase (MDH), verificou-se que o aumento da $[CO_2]$ para $760 \mu L$ de $CO_2 L^{-1}$, afetou positivamente a atividade da proteína, a qual foi elevada em 50% independente da fonte de nitrogênio e da cultivar utilizada. Dentro das concentrações de CO_2 não foram observadas diferenças entre as fontes nítrica e amoniacal (FIGURA 6B).

Figura 6 - Efeito da concentração de CO_2 e da fonte de nitrogênio na taxa respiratória (A), e na atividade da malato desidrogenase (B), de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO_2 (380 ou $760 \mu L$ de $CO_2 L^{-1}$ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO_3^- ou NH_4^+), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO_2 . Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

4.7 Concentrações de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, sacarose e amido

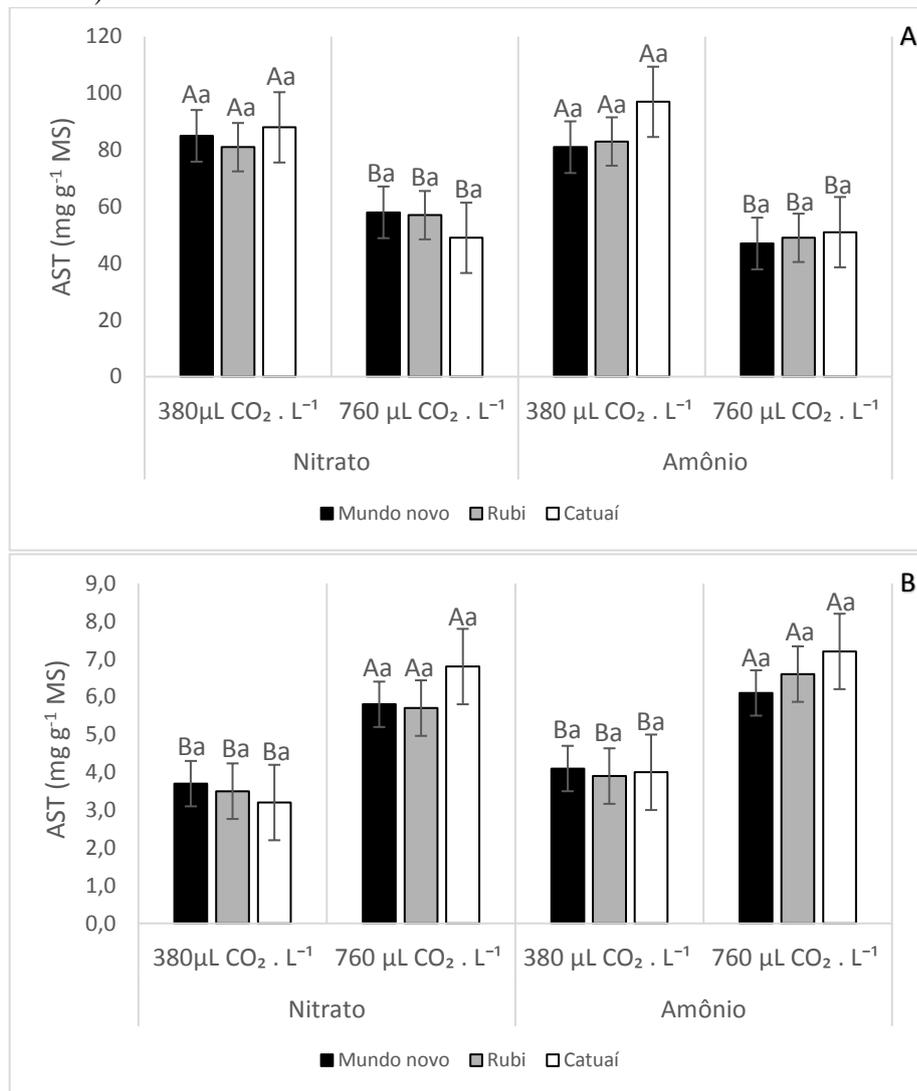
Quando se analisou o efeito da elevação da $[CO_2]$ dentro de cada tratamento nitrogenado, foram observadas significativas alterações nas concentrações de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR), sacarose e amido, nos tecidos foliares e radiculares das três cultivares, avaliadas (FIGURAS 7, 8, 9 e 10).

Nos tecidos foliares de ‘Mundo Novo’, ‘Rubi’ e ‘Catuaí’, a elevação da $[CO_2]$ reduziu a concentração de AST em 45%, AR em 40% e sacarose em 25% independente da fonte nitrogenada. Entretanto, nas folhas, a quantidade de amido foi significativamente aumentada sob elevado CO_2 , esse aumento foi superior nas plantas com NH_4^+ (68%) quando comparadas as plantas com NO_3^- (42%) (FIGURAS 7A, 8A, 9A e 10A).

Nas raízes, o efeito da $[CO_2]$, dentro dos tratamentos com NO_3^- ou NH_4^+ , foi significativo para AST, AR e sacarose, assim como para ‘Mundo Novo’, ‘Rubi’ e ‘Catuaí’. A elevação da $[CO_2]$ resultou em aumentos de 70% e 75% e 65% nas quantidades de AST, AR e sacarose respectivamente, tanto para tratamentos com NO_3^- quanto para os com NH_4^+ . Além disso, nos tecidos radiculares os tratamentos não alteraram significativamente a quantidade de amido (FIGURAS 7B, 8B, 9B e 10B).

As concentrações de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR), sacarose e amido, dos tecidos foliares e radiculares das três cultivares, não apresentaram diferenças significativas quando foram comparadas as fontes nitrogenadas dentro de cada condição de CO_2 (380 ou 760 μL de CO_2 L^{-1}), exceto para os teores de amido nas folhas, que apresentaram maiores valores no tratamento com NH_4^+ e elevada $[CO_2]$ (FIGURAS 7, 8, 9 e 10).

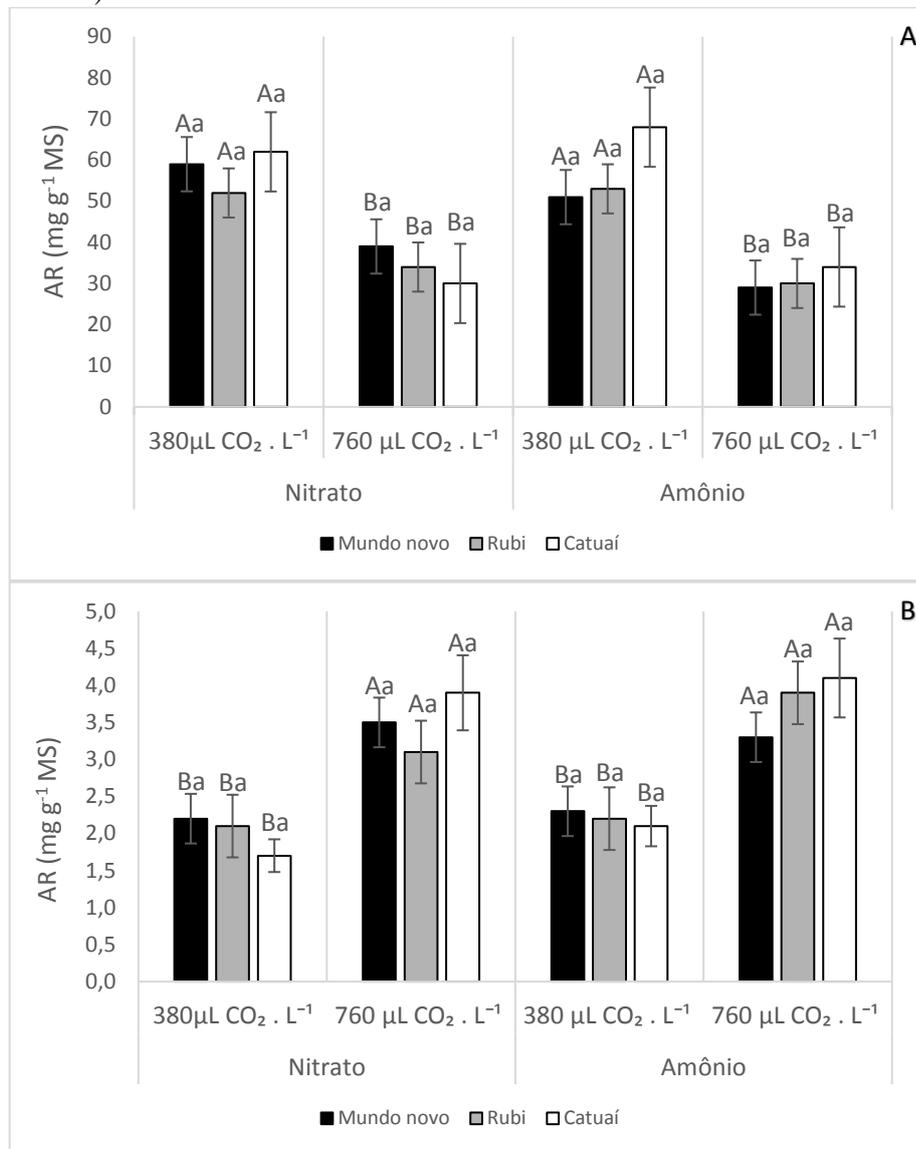
Figura 7 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na concentração de açúcares solúveis totais (AST) em folhas (A), e raízes (B), de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 µL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

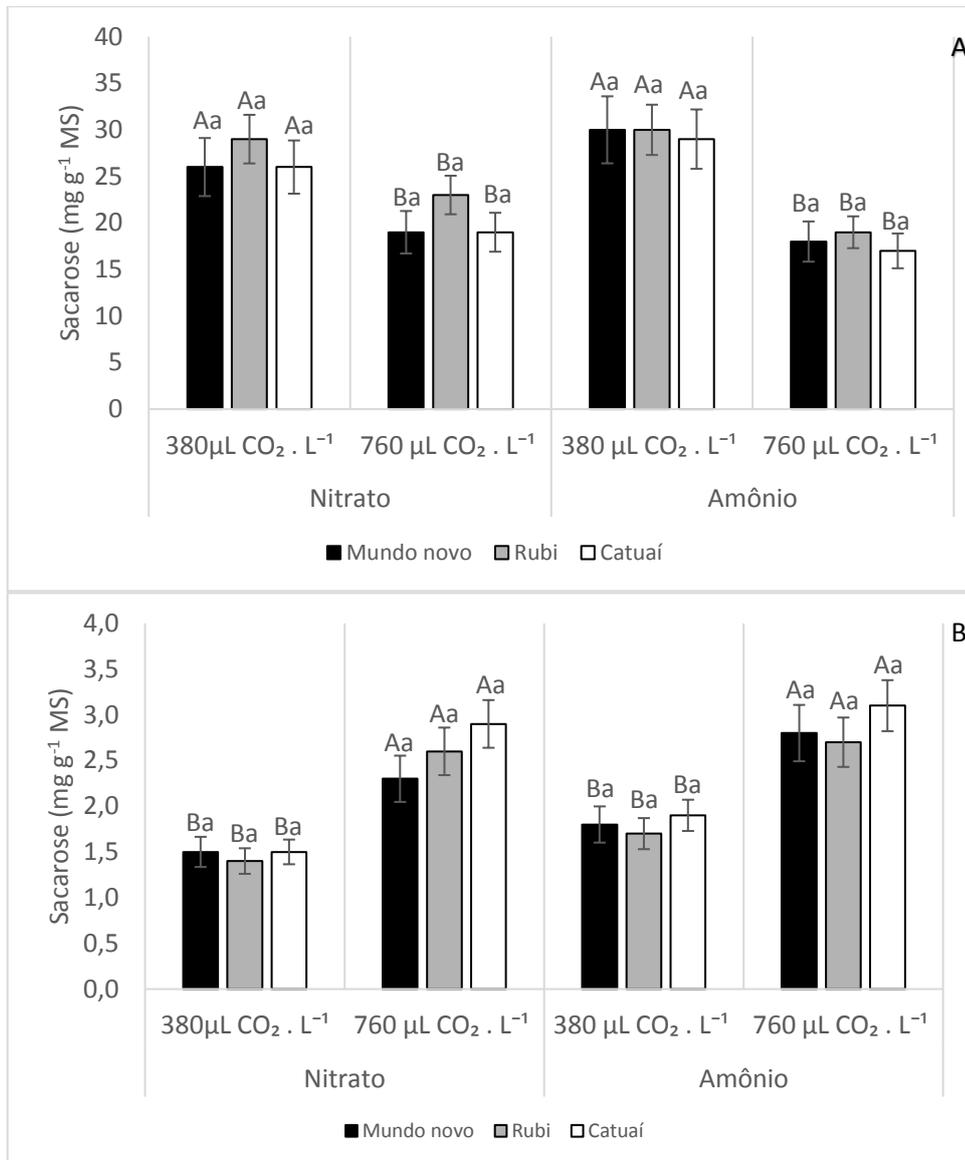
Figura 8 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na concentração de açúcares redutores (AR) em folhas (A), e raízes (B), de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 µL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

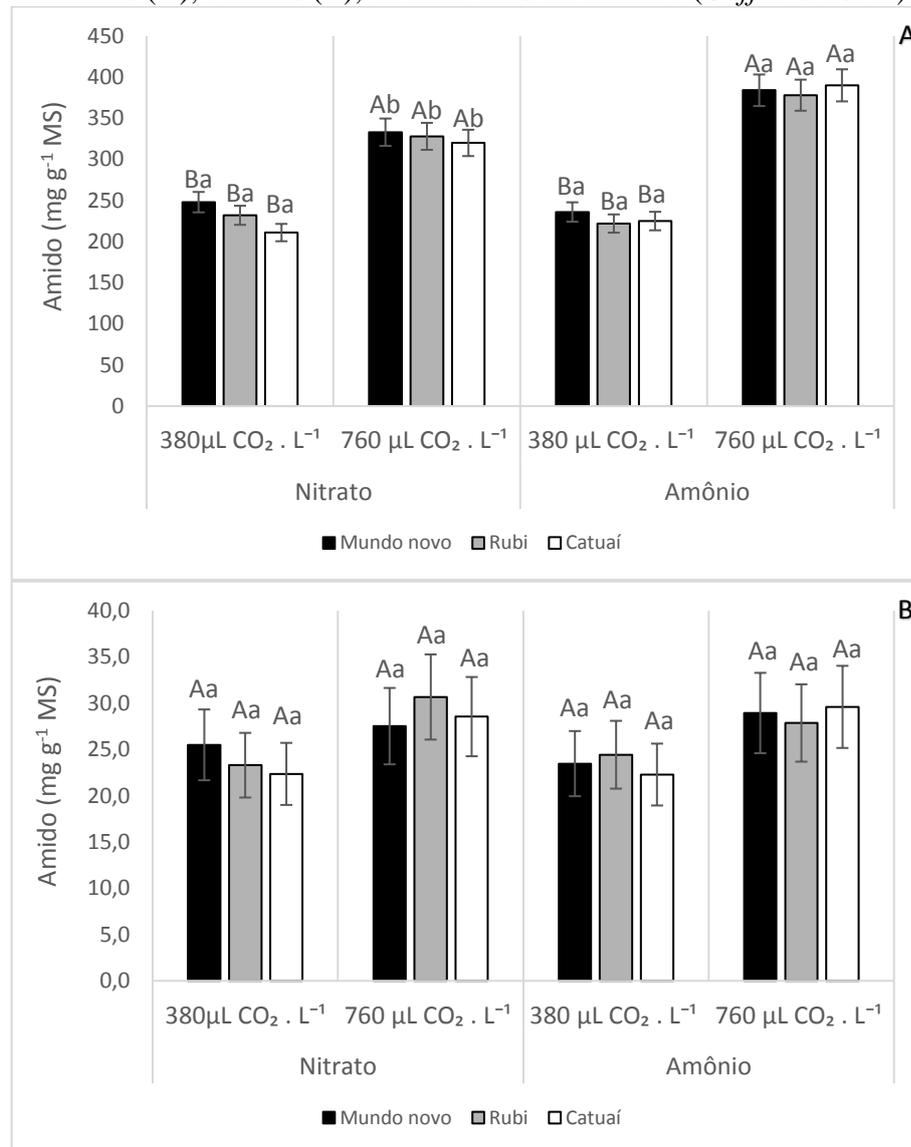
Figura 9 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na concentração de sacarose em folhas (A), e raízes (B), de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 μL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

Figura 10 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na concentração de amido em folhas (A), e raízes (B), de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 µL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

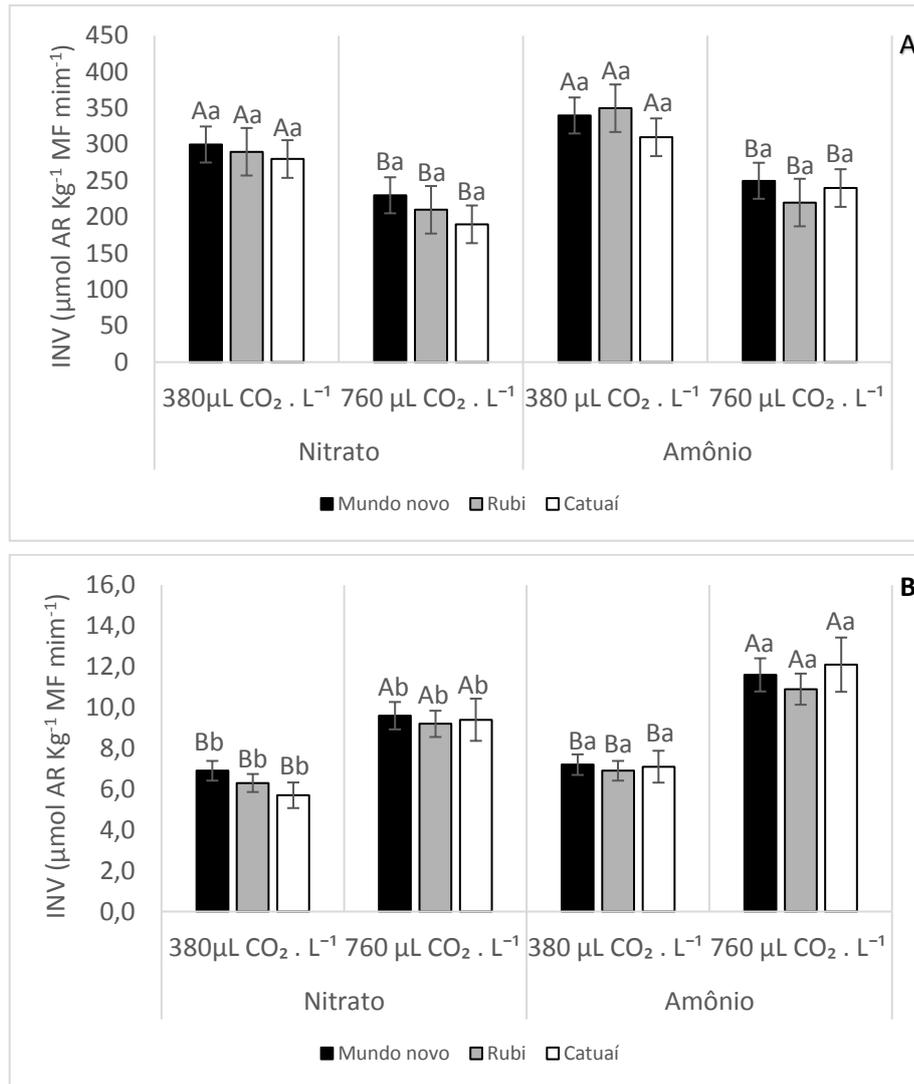
4.8 Atividade enzimática da invertase ácida da parede celular

A atividade da invertase ácida (INV) foi diferencialmente influenciada pela condição de disponibilidade de CO₂ nas folhas e raízes de ‘Mundo Novo’, ‘Rubi’ e ‘Catuaí’.

Nos tecidos foliares das três cultivares, elevação da [CO₂] levou a redução de 30% na atividade da enzima independente da fonte nitrogenada (FIGURA 11A).

Nas raízes foi observado efeito contrário, sob 760 μL de $\text{CO}_2 \text{ L}^{-1}$ foram verificados incrementos de 50% e 60% na atividade da INV para os tratamentos nítrico e amoniacal respectivamente (FIGURA 11B).

Figura 11 - Efeito da concentração de CO_2 e da fonte de nitrogênio na atividade da invertase ácida da parede celular em folhas (A), e raízes (B), de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO_2 (380 ou 760 μL de $\text{CO}_2 \text{ L}^{-1}$ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO_3^- ou NH_4^+), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO_2 . Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

4.9 Concentrações de aminoácidos e proteínas

Sobre o efeito da elevação da $[CO_2]$ dentro de cada tratamento nitrogenado foram observadas significativas alterações nas concentrações de aminoácidos (AA) e proteínas (PT) nos tecidos foliares e radiculares para todas as três cultivares avaliadas (FIGURAS 12 e 13).

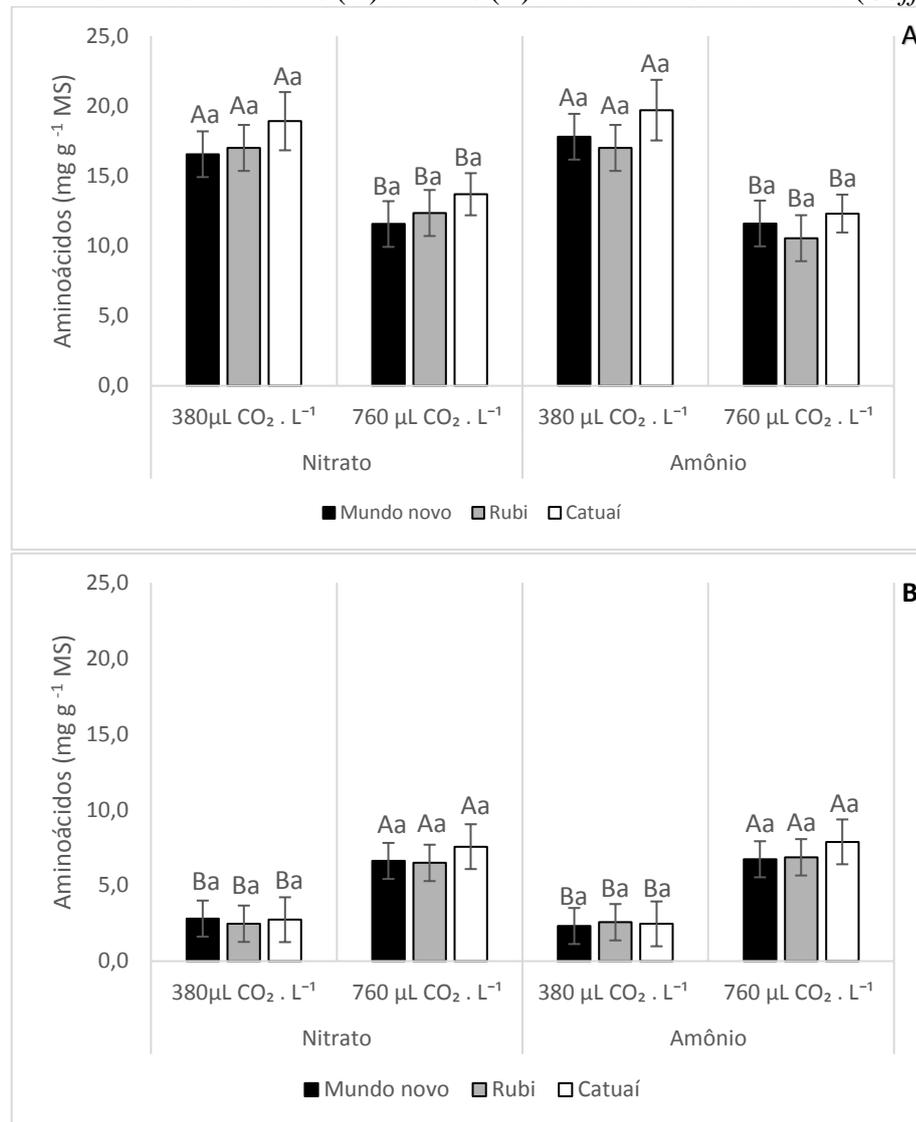
Nas folhas das três cultivares, a elevação da $[CO_2]$ reduziu a concentração de AA em 34% independente da fonte nitrogenada.

Nos tecidos foliares das plantas tratadas com NH_4^+ , os teores de PT aumentaram 10% em resposta alta $[CO_2]$. No entanto, com a aplicação de NO_3^- , os teores de PT reduziram em 20%.

Por outro lado, os teores de aminoácidos livres totais, nas raízes, aumentaram cerca de 2,5 vezes (FIGURA 12B), sob $760 \mu L$ de $CO_2 L^{-1}$, mediante da aplicação de NO_3^- ou de NH_4^+ .

Nas raízes, os teores de PT também foram significativamente superiores sob alta $[CO_2]$. Sob alta $[CO_2]$ nesse tecido, o teor de PT no tratamento amoniacal superou o tratamento nítrico. Os acréscimos foram de 45% e 20% para NH_4^+ e NO_3^- respectivamente (FIGURA 13B).

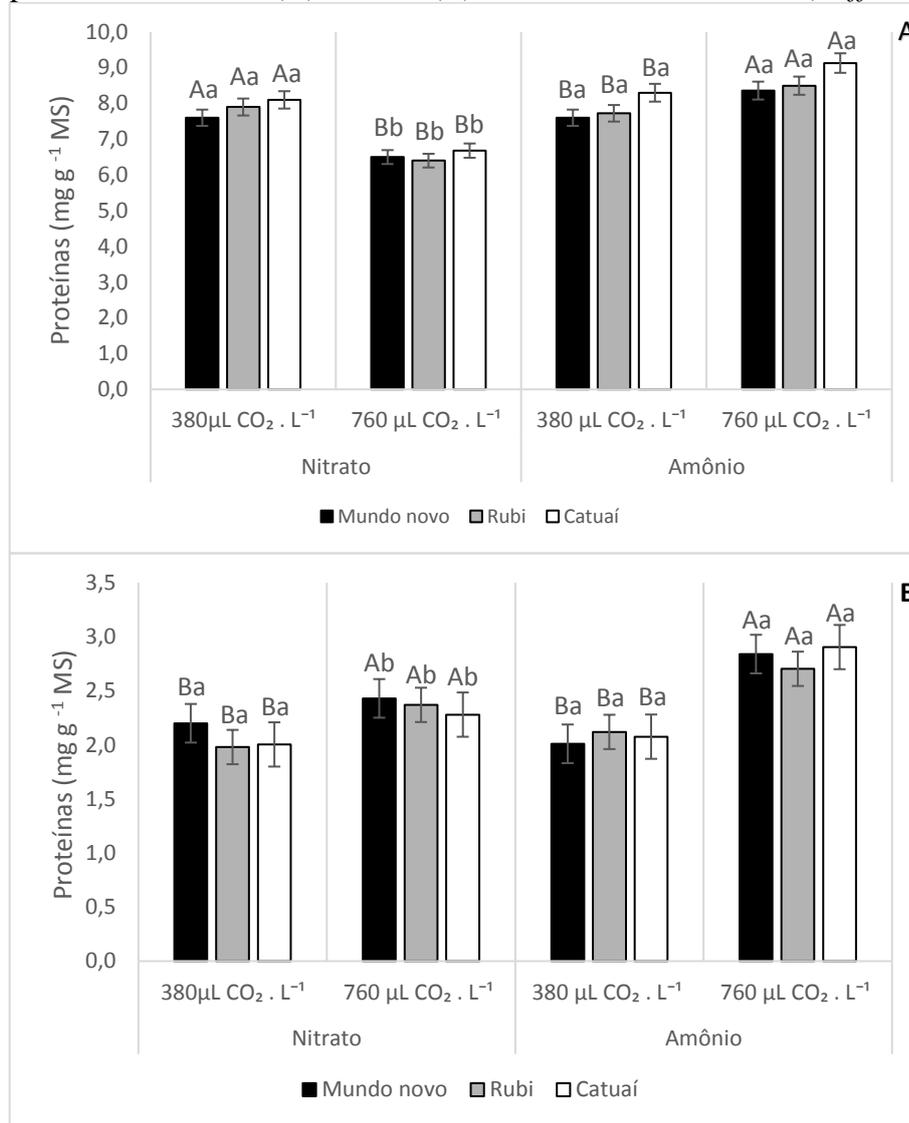
Figura 12 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na concentração de aminoácidos nas folhas (A) e raízes (B) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 μL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

Figura 13 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na concentração de proteínas nas folhas (A) e raízes (B) de cultivares de café (Coffea arabica).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 µL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

4.10 Teores de nitrato e amônio

Nas folhas e nas raízes os teores de NO₃⁻ foram superiores nas plantas tratadas com NO₃⁻ independente da concentração de CO₂ e da cultivar (FIGURAS 14A e 14B). Assim como os teores de NH₄⁺ foram superiores nas plantas tratadas com NH₄⁺ independente da concentração de CO₂, da cultivar utilizada do tecido vegetal avaliado.

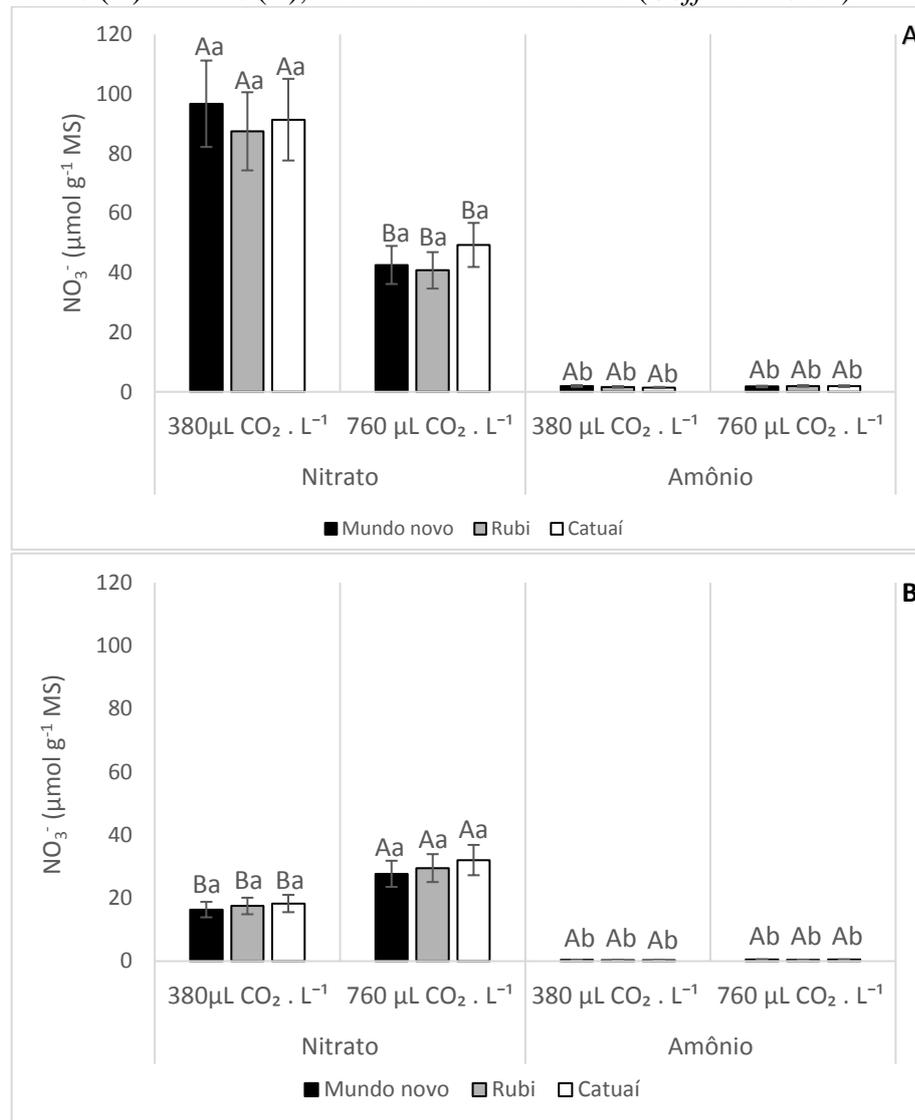
Nas folhas das plantas tratadas com NO_3^- , a elevação da $[\text{CO}_2]$ afetou negativamente o teor de NO_3^- essa variável diminuiu, de 90 para 45 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS (50%). Não foram observadas variações nos teores de NO_3^- nas folhas das plantas tratadas com NH_4^+ . O valor encontrado foi de 1,8 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS e manteve-se independente da concentração de CO_2 (FIGURA 14A).

Os teores de NH_4^+ , nas folhas, também reduziram significativamente quando se elevou a $[\text{CO}_2]$ os resultados passaram de 105 para 85 nmol.g^{-1} MS (19%) nas plantas submetidas ao NH_4^+ e de 45 para 30 nmol.g^{-1} MS (33%) nas tratadas com NO_3^- (FIGURA 15A). Os teores de NH_4^+ , nas plantas tratadas com NH_4^+ , foi de 2,3 vezes maior sob 380 $\mu\text{L de CO}_2 \text{ L}^{-1}$ e foi 2,8 vezes superior sob 760 $\mu\text{L de CO}_2 \text{ L}^{-1}$.

Os resultados dos teores de NO_3^- nas raízes estão apresentados na Figura 14B. Nas plantas tratadas com NH_4^+ , não houve variação no teor de NO_3^- independente da $[\text{CO}_2]$. No caso das plantas tratadas com NO_3^- , houve aumento de 56% nos teores NO_3^- sob maior $[\text{CO}_2]$.

De acordo com a Figura 15B, os teores de NH_4^+ no sistema radicular variaram significativamente entre os diferentes tratamentos. A quantidade de NH_4^+ foi significativamente aumentada após exposição ao alto CO_2 , sendo os maiores teores observados nos tratamentos com NH_4^+ . Nesse tratamento, a maior $[\text{CO}_2]$ elevou o teor de NH_4^+ em 17% (58 para 68 nmol.g^{-1} MS). No tratamento com NO_3^- sob 760 $\mu\text{L de CO}_2 \text{ L}^{-1}$, a oscilação foi de 45% (18 para 26 nmol.g^{-1} MS)

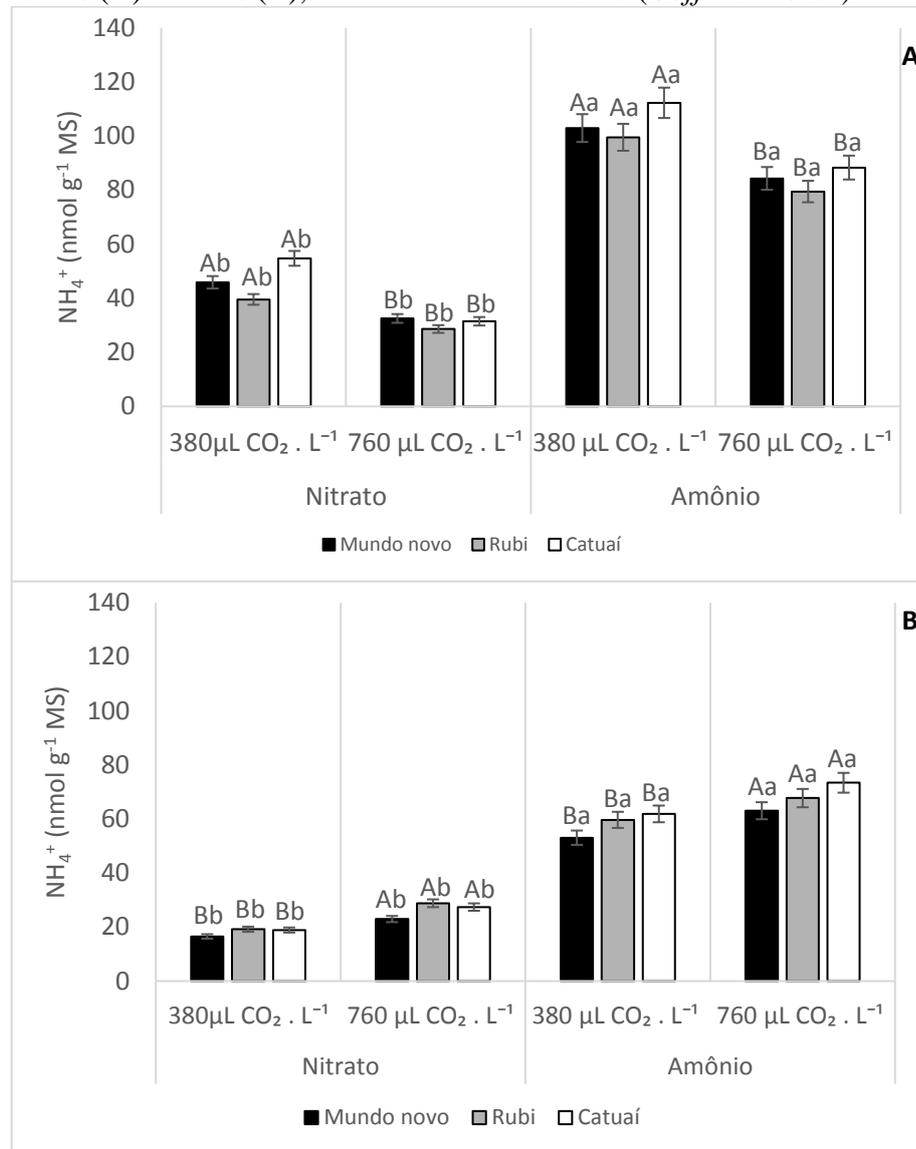
Figura 14 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio nos teores de nitrato nas folhas (A) e raízes (B), de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 µL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

Figura 15 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio nos teores de amônio nas folhas (A) e raízes (B), de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 μL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

4.11 Teores de macronutrientes

Para as três cultivares, nas plantas submetidas à elevada [CO₂] foram verificadas reduções significativas nos teores de todos os macronutrientes independente do tratamento nitrogenado (FIGURAS 16, 17 e 18).

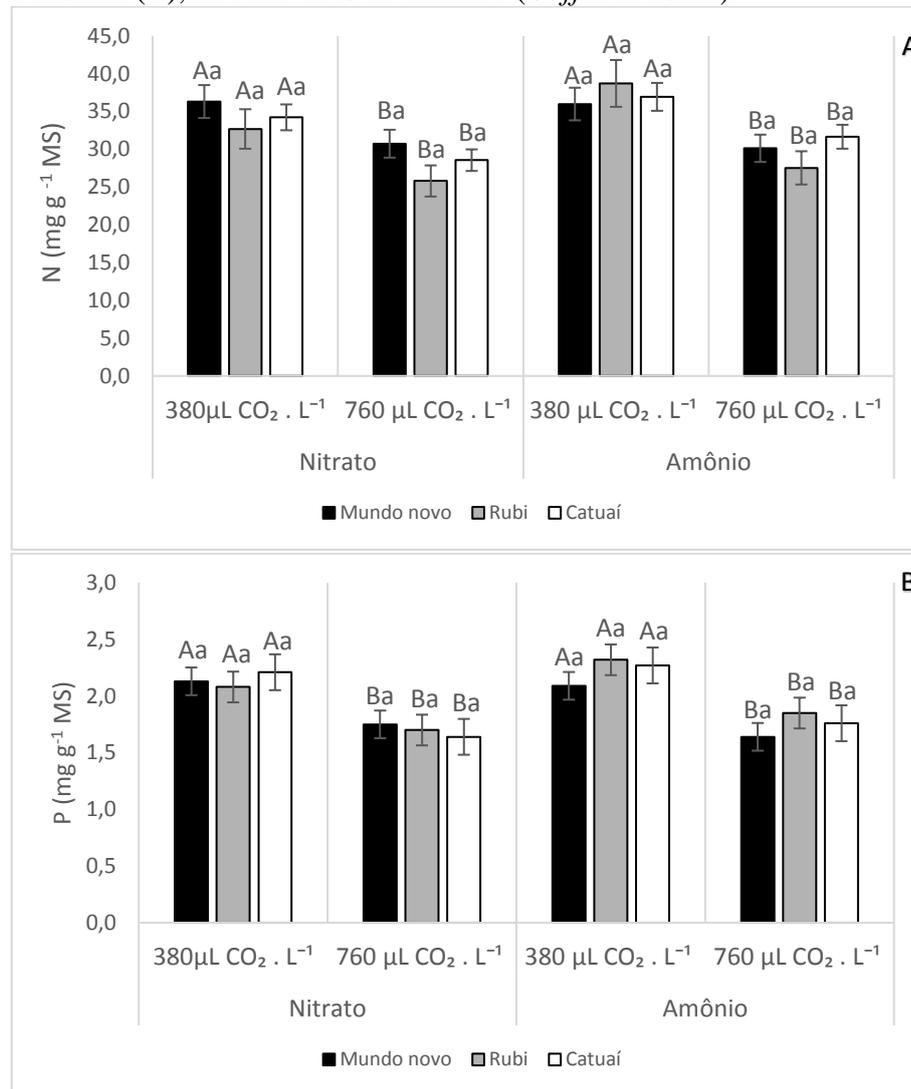
Comparando as concentrações de CO₂, independente do tratamento nitrogenado sob elevada [CO₂] (760 μL de CO₂ L⁻¹), as três cultivares apresentaram reduções de 20% nos teores

de N e P, (FIGURAS 16A e 16B), de 18% no teor de S (Figura 18B) e de 25% para Mg, K e Ca (FIGURAS 17A,17B e 18A).

Os teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), enxofre (S), magnésio (Mg) e cálcio (Ca) não diferiram significativamente, quando foram comparadas as fontes de nitrogênio dentro das concentrações de 380 μL de $\text{CO}_2 \text{ L}^{-1}$ e 760 μL de $\text{CO}_2 \text{ L}^{-1}$.

Em ambas as concentrações de CO_2 , a sequência decrescente de nutrientes encontrada foi N, K, Ca, Mg, P e S (TABELA 2). Sendo que, nas plantas com NO_3^- , para as duas concentrações de CO_2 , dentro de ‘Mundo Novo’, Ca e K não diferiram entre si, assim como P, Mg e S não diferiram significativamente, para ‘Rubi’, apenas P e S não diferiram, para ‘Catuaí’ os teores de P, Mg e S foram iguais. Nas plantas com NH_4^+ , para ‘Mundo Novo’ e ‘Catuaí’, P e S não diferiram entre si independente da $[\text{CO}_2]$. Dentro da cultivar Rubi, sob 380 μL de $\text{CO}_2 \text{ L}^{-1}$, K e Ca foram iguais. Os demais tratamentos apresentaram significância para todos os nutrientes avaliados.

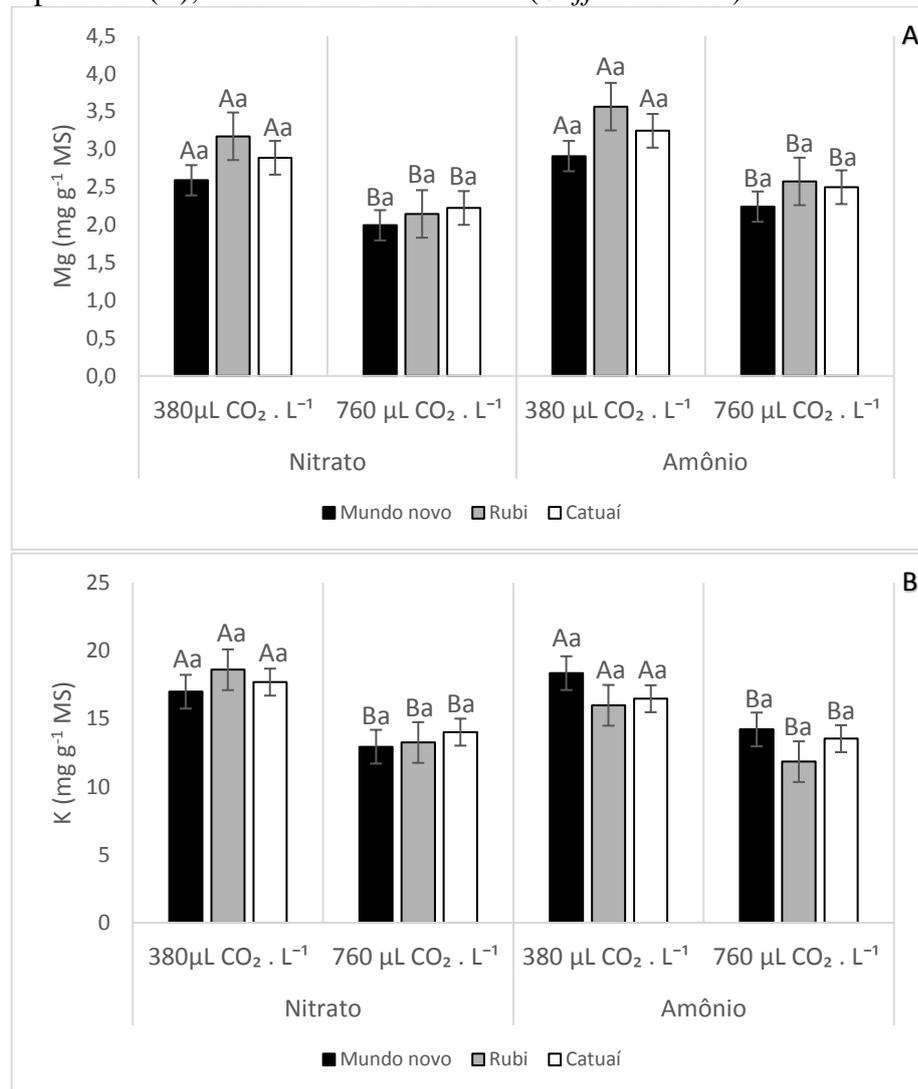
Figura 16 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio nos teores de nitrogênio (A) e fósforo (B), de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 µL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

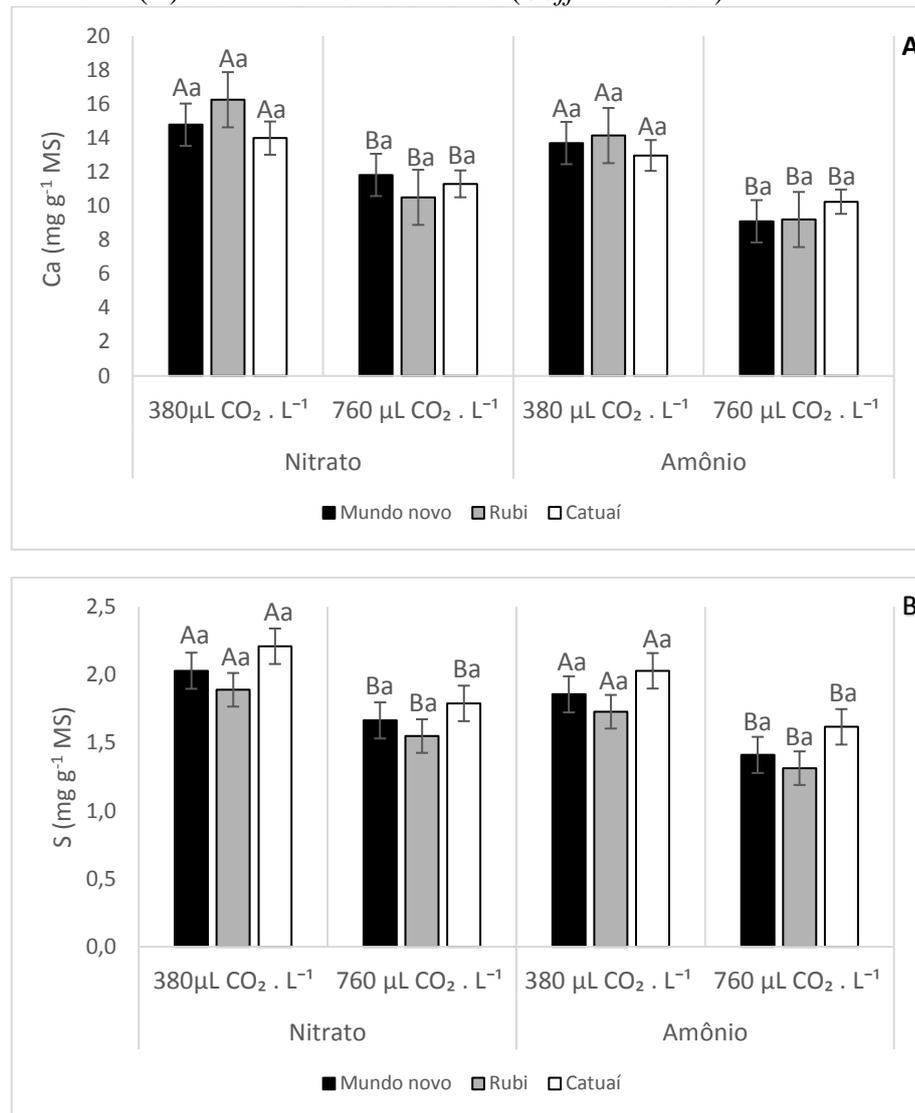
Figura 17 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio nos teores de magnésio (A) e potássio (B), de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 μL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

Figura 18 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio nos teores de cálcio (A) e enxofre (B) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 µL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

Tabela 2 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio nos teores de macronutrientes de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*)

NITRATO						
	N	P	K	Mg	S	Ca
mg/g						
Mundo Novo (380μL CO ₂ L ⁻¹)	36,32a	2,13c	16,98b	2,59c	2,03c	14,78b
Mundo Novo (760μL CO ₂ L ⁻¹)	30,74a	1,75c	12,94b	1,99c	1,66c	11,82b
Rubi 380 (μL CO ₂ L ⁻¹)	32,69a	2,08e	18,60b	3,17d	1,89e	16,25c
Rubi (760μL CO ₂ L ⁻¹)	25,81a	1,70e	13,25b	2,14d	1,55e	10,50c
Catuaí (380μL CO ₂ L ⁻¹)	34,23a	2,21d	17,69b	2,89d	2,22d	13,99c
Catuaí (760μL CO ₂ L ⁻¹)	28,56a	1,64d	14,01b	2,22d	1,79d	11,30c
AMÔNIO						
	N	P	K	Mg	S	Ca
mg/g						
Mundo Novo (380μL CO ₂ L ⁻¹)	35,99a	2,09e	18,35b	2,91d	1,86e	13,7c
Mundo Novo (760μL CO ₂ L ⁻¹)	30,13a	1,64e	14,21b	2,24d	1,41e	9,09c
Rubi 380 (μL CO ₂ L ⁻¹)	38,72a	2,32d	15,98b	3,56c	1,73e	14,14b
Rubi (760μL CO ₂ L ⁻¹)	27,54a	1,85e	11,84b	2,57d	1,31f	9,20c
Catuaí (380μL CO ₂ L ⁻¹)	36,94a	2,27e	16,47b	3,24d	2,03e	12,97c
Catuaí (760μL CO ₂ L ⁻¹)	31,66a	1,76e	13,53b	2,50d	1,62e	10,25c

Letras diferentes, nas linhas, indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Fonte: Da autora (2020).

4.12 Atividades enzimáticas da redutase do nitrato (RN) e da sintetase da glutamina (GS)

Nas folhas e nas raízes das três cultivares a atividade da redutase do nitrato (RN) foi influenciada pelas fontes de nitrogênio e pelas concentrações de CO₂.

Nos tecidos foliares, os maiores valores de RN foram observados no tratamento nítrico independente da [CO₂]. Além disso, dentro do tratamento com NO₃⁻ foi verificada uma redução de 23% sob alta [CO₂]. Dentro do tratamento com NH₄⁺ não houve diferenças significativas (FIGURA 19A).

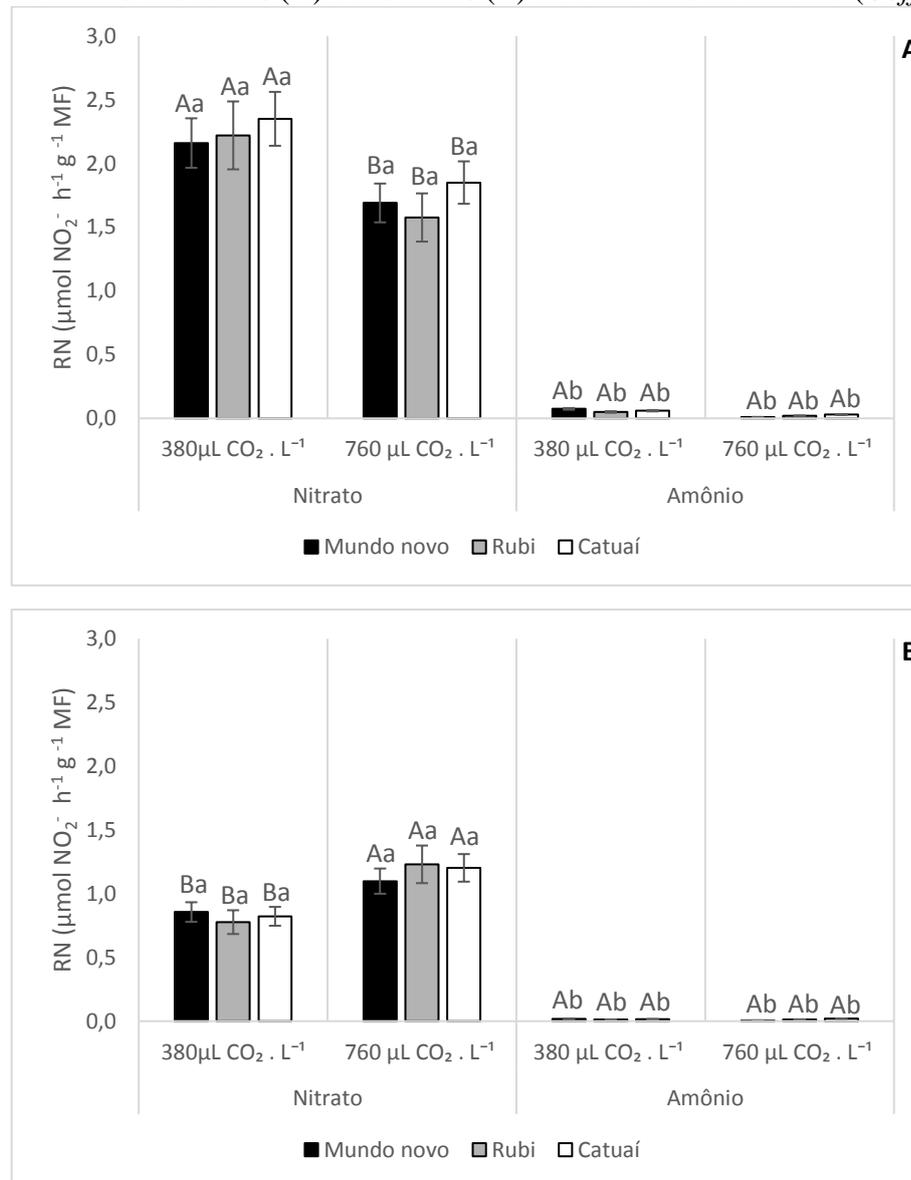
Nas raízes, a maior [CO₂] resultou em incremento de 35% na atividade da RN no tratamento com NO₃⁻. No tratamento com NH₄⁺ a atividade da RN não diferiu entre as

concentrações de CO_2 . Quando foi analisado o efeito da fonte nitrogenada em cada $[\text{CO}_2]$ as maiores atividades da RN foram detectadas no tratamento com NO_3^- (FIGURA 19B)

Nas folhas de 'Mundo Novo', 'Rubi' e 'Catuaí', a alta $[\text{CO}_2]$, levou a reduções significativas na atividade da GS, para todos os tratamentos (Figura 20A), a diminuição verificada foi de 30% para as duas fontes nitrogenadas. Por outro lado, nesse mesmo tecido vegetal, não houve diferenças significativas na GS quando foram comparados os tratamentos com NH_4^+ e NO_3^- dentro das concentrações de CO_2 .

Em contrapartida, nas raízes, foram observados aumentos significativos na atividade da enzima GS a partir da elevação da $[\text{CO}_2]$, os valores de GS foram 48% e 56% superiores no tratamento com NO_3^- e com NH_4^+ respectivamente (FIGURA 20B).

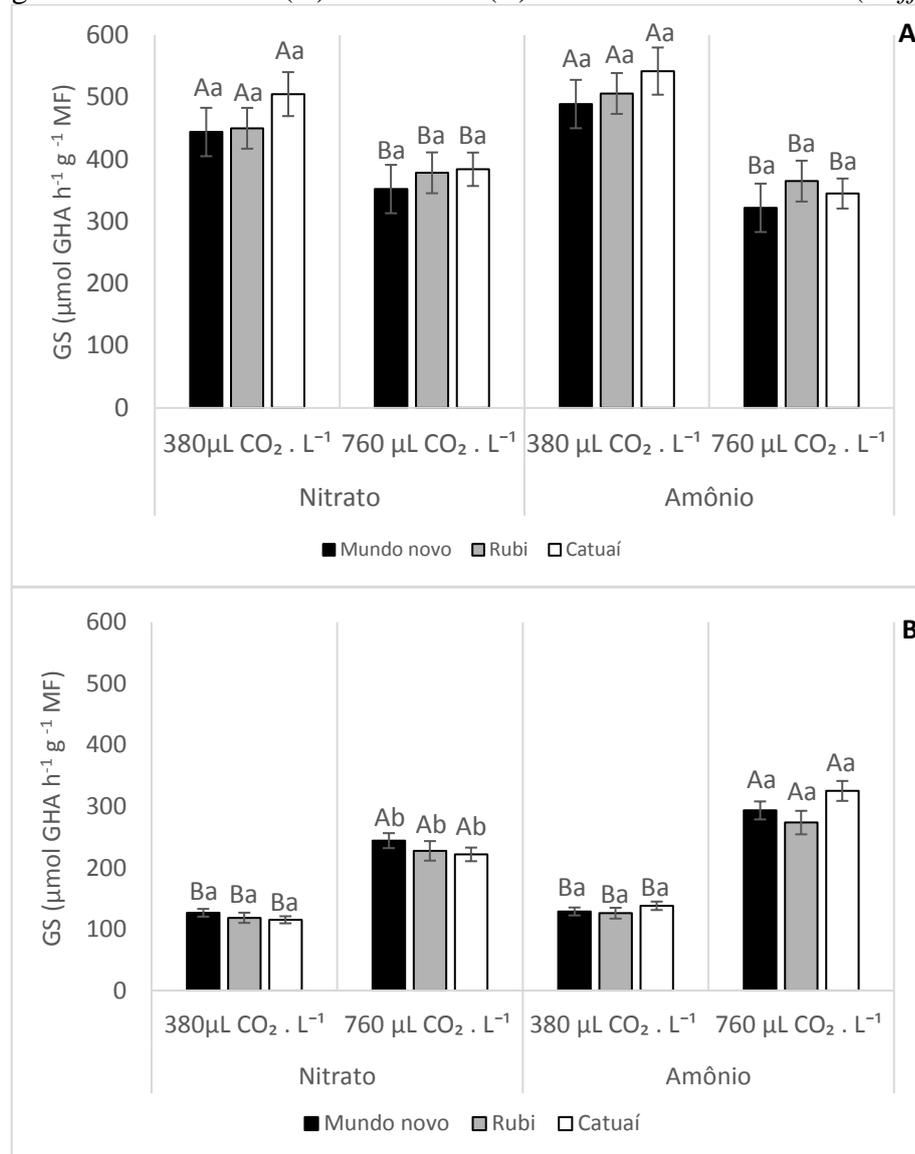
Figura 19 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na atividade da Redutase do nitrato nas folhas (A) e nas raízes (B) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 µL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

Figura 20 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na atividade da sintetase da glutamina nas folhas (A) e nas raízes (B) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 µL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

4.13 Atividade enzimática do sistema antioxidante e conteúdo de peróxido de hidrogênio

As atividades da dismutase do superóxido (SOD), da peroxidase do ascorbato (APX) e da catalase (CAT), bem como o conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nos tecidos foliares e radiculares das três cultivares, apresentaram diferenças significativas quando foram

comparadas as fontes nitrogenadas dentro de cada $[\text{CO}_2]$ (380 ou 760 μL de $\text{CO}_2 \text{ L}^{-1}$), e também quando foi analisado o efeito da $[\text{CO}_2]$ dentro dos tratamentos com NO_3^- ou com NH_4^+ .

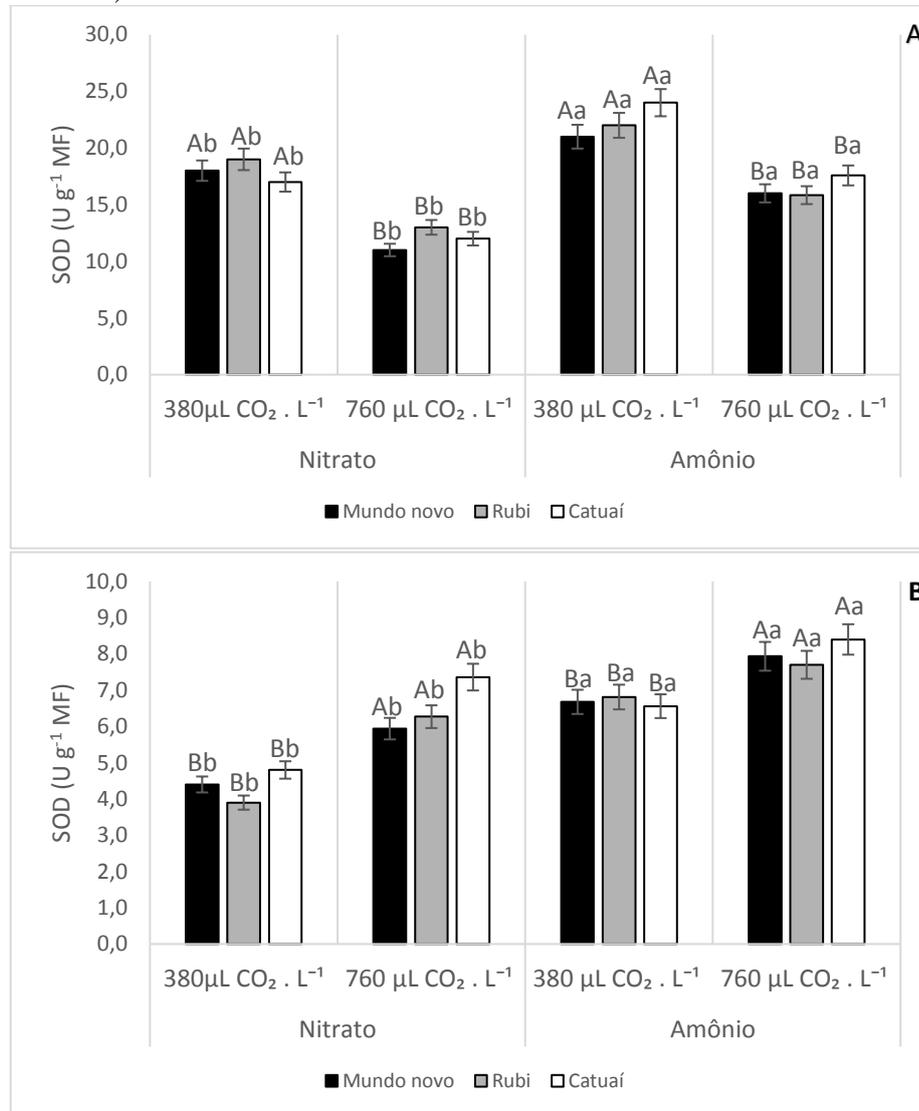
Nas folhas, os maiores valores para essas variáveis foram verificados nos tratamentos sob 380 μL de $\text{CO}_2 \text{ L}^{-1}$, para as duas fontes de nitrogênio. Em contrapartida, nas raízes a elevação da $[\text{CO}_2]$ resultou em incrementos significativos nas enzimas SOD, APX e CAT e na quantidade de H_2O_2 . Vale ressaltar ainda, que para as três enzimas do sistema antioxidante e para o conteúdo de H_2O_2 , os dados encontrados em tecidos radiculares superaram os resultados obtidos em tecidos de folhas em todas as avaliações (FIGURAS 21, 22, 23 e 24).

Nos tecidos foliares de ‘Mundo Novo’, ‘Rubi’ e ‘Catuaí’, a elevação da $[\text{CO}_2]$ reduziu a atividade da SOD em 34%, da APX em 20% e da CAT em 25% no tratamento com NO_3^- . Ainda nas folhas, a atividade do sistema antioxidante, também reduziu nas plantas com NH_4^+ , sob elevado CO_2 , essa diminuição foi de aproximadamente 26% para SOD, 20% para APX e 30% para CAT. O conteúdo de H_2O_2 reduziu 25% e 30% nos tratamentos com NO_3^- e NH_4^+ respectivamente (FIGURAS 21A, 22A, 23A e 24A). Além disso, para SOD e H_2O_2 , a comparação entre as fontes de nitrogênio, sob 760 μL de $\text{CO}_2 \text{ L}^{-1}$, foi significativa, sendo que os resultados superiores foram observados nas plantas tratadas com NH_4^+ .

Nas raízes, o efeito da $[\text{CO}_2]$, dentro dos tratamentos com NO_3^- ou NH_4^+ , foi significativo. A elevação da $[\text{CO}_2]$, no tratamento com NO_3^- , resultou em aumentos de 52%, 58%, 41% e 100% nas variáveis SOD, APX, CAT e H_2O_2 respectivamente. E no tratamento com NH_4^+ , o acréscimo foi de 21% para SOD, 87% para APX, 100% para CAT e H_2O_2 (Figuras 21B, 22B, 23B e 24B). Verificou-se também que, sob 760 μL de $\text{CO}_2 \text{ L}^{-1}$, a comparação entre as fontes de nitrogênio, mostrou resultados significativamente superiores nas plantas tratadas com NH_4^+ .

Nos tecidos radiculares, sob 380 μL de $\text{CO}_2 \text{ L}^{-1}$, a atividade da SOD e o conteúdo de H_2O_2 também diferiram entre as fontes de nitrogênio, os resultados das plantas com NO_3^- foram 52% e 41% inferiores aos das plantas com NH_4^+ (FIGURAS 21B e 24B).

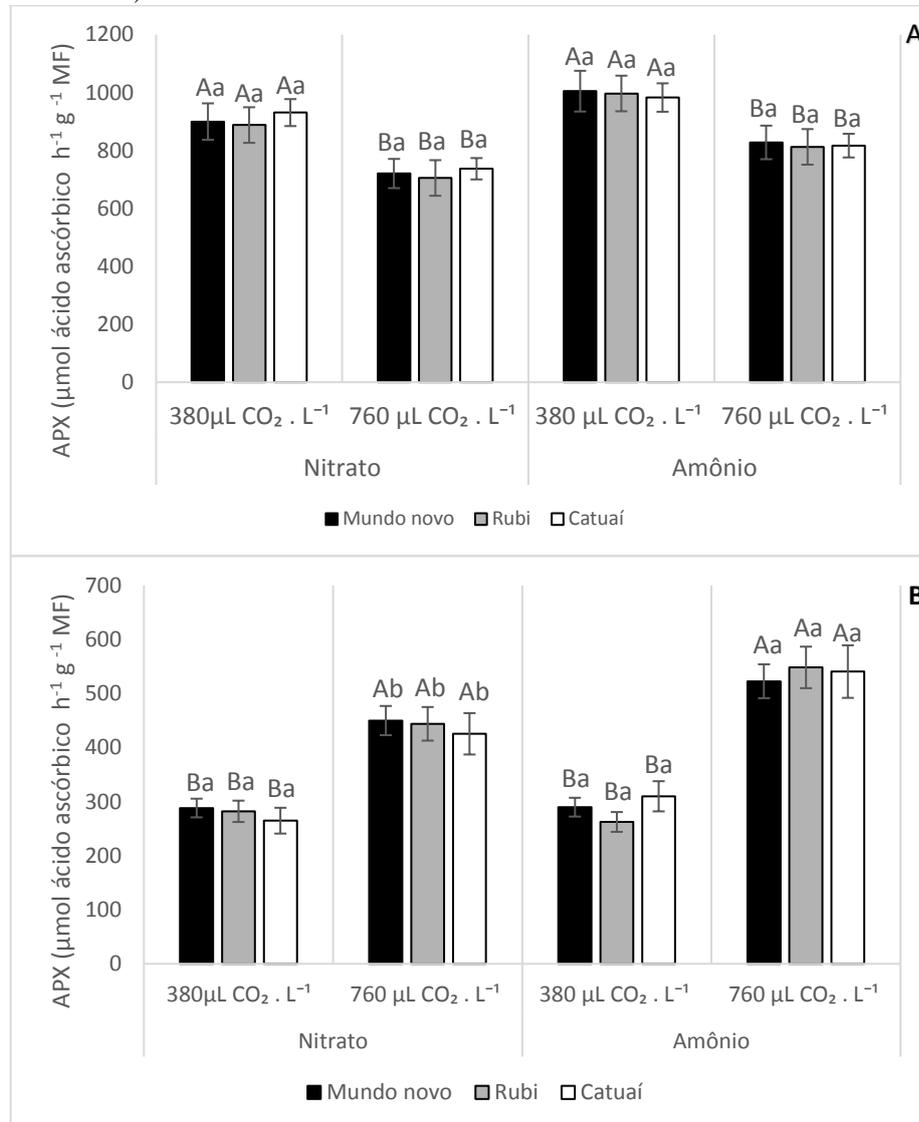
Figura 21 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na atividade da Superóxido dismutase (SOD) nas folhas (A) e nas raízes (B) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 μL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

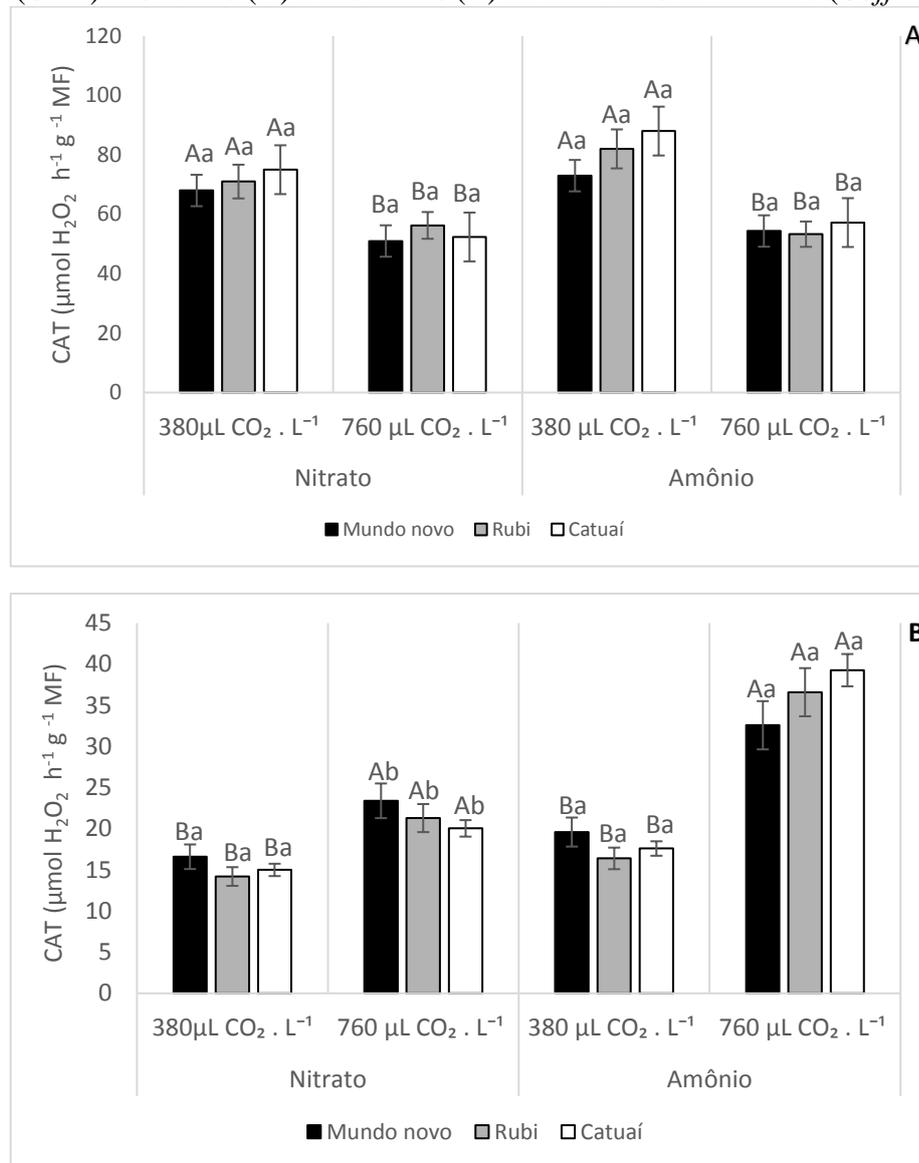
Figura 22 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na atividade da Ascorbato peroxidase (APX) nas folhas (A) e nas raízes (B) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 $\mu\text{L de CO}_2 \text{ L}^{-1}$ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

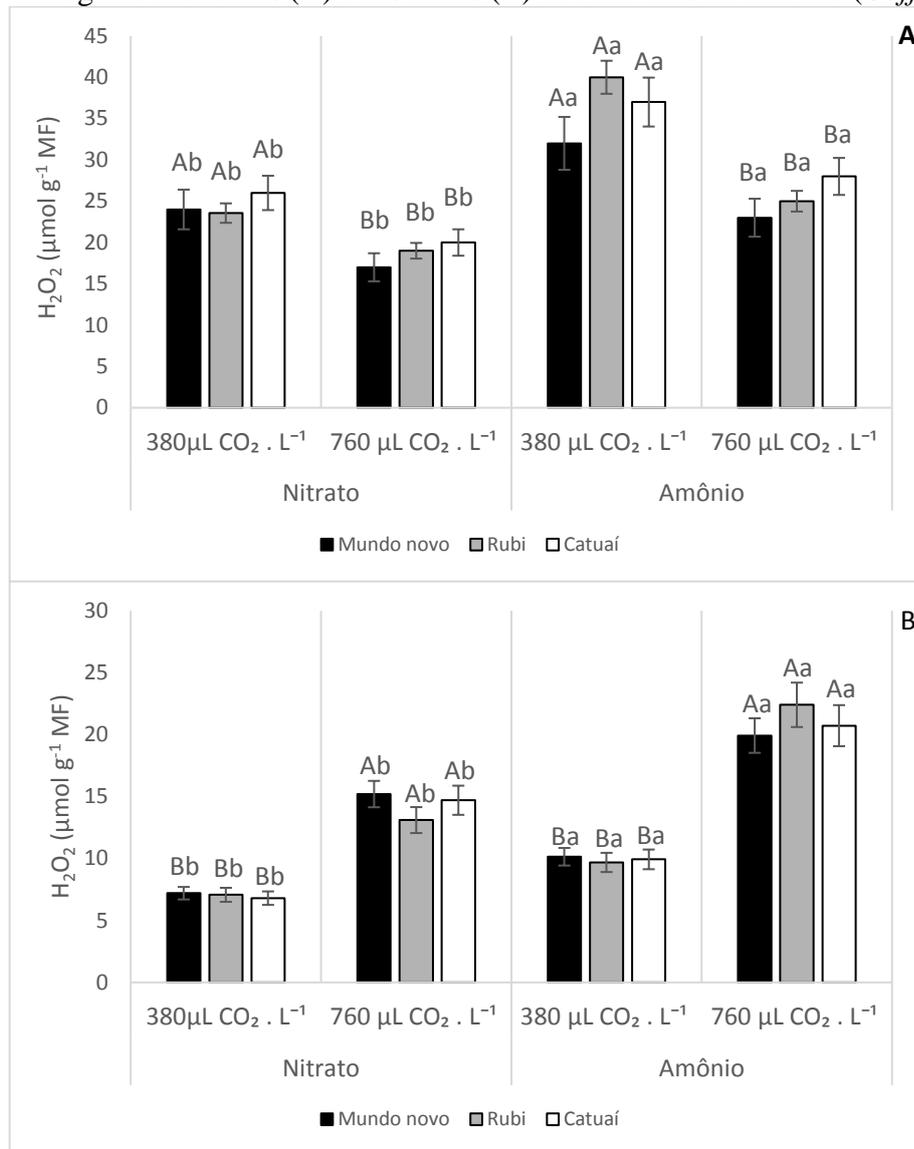
Figura 23 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio na atividade da Catalase (CAT) nas folhas (A) e nas raízes (B) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 $\mu\text{L de CO}_2 \text{ L}^{-1}$ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

Figura 24 - Efeito da concentração de CO₂ e da fonte de nitrogênio no conteúdo de peróxido de hidrogênio nas folhas (A) e nas raízes (B) de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica*).



As letras maiúsculas comparam o efeito da concentração de CO₂ (380 ou 760 µL de CO₂ L⁻¹ de ar) dentro de cada fonte de nitrogênio (NO₃⁻ ou NH₄⁺), letras minúsculas comparam o efeito das fontes de nitrogênio dentro de cada concentração de CO₂. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média das cinco repetições.

Fonte: Da autora (2020).

5 DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi verificado que os fatores concentração atmosférica de dióxido de carbono [CO_2] (380 ou 760 $\mu\text{mol. L}^{-1}$) e fonte de nitrogênio (NO_3^- ou NH_4^+), influenciaram os processos fisiológicos e o crescimento de cultivares de *Coffea arabica* ('Mundo Novo', 'Rubi' e 'Catuai') em diferentes níveis, dependendo da resposta analisada. A interação entre esses dois fatores, também foi significativa para diversas variáveis avaliadas. De modo geral, para a espécie e cultivares avaliadas foram verificadas alterações favoráveis, a partir da elevação da [CO_2]. Além disso, a aplicação de nitrogênio na forma de NH_4^+ , implicou em melhor desempenho dos cafeeiros sob alta [CO_2].

Os resultados mostraram que a MST, MSPA, MSR e TCR, das três cultivares de cafeeiro estudadas, foram positivamente influenciadas pela elevação da [CO_2], (FIGURA 1), independente da fonte nitrogenada aplicada (NO_3^- ou NH_4^+). De fato, a produção de biomassa e a taxa de crescimento foram significativamente maiores nas plantas expostas à alta [CO_2]. No entanto, é importante destacar que essas plantas permaneceram mais tempo na câmara de crescimento, sendo avaliadas 14 dias depois das plantas cultivadas sob 380 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ CO_2 . Assim, não pode ser descartada a hipótese da influência desse maior período tempo sobre o crescimento das plantas sob elevada [CO_2].

Sendo a fotossíntese o processo primário para produção de biomassa, o incremento da taxa fotossintética verificado nas plantas com alta [CO_2] (FIGURA 3A) implicou em aumento significativo no crescimento vegetal sob maior [CO_2]. Segundo Ainsworth e Long (2005), o aumento na assimilação de carbono e a melhora na eficiência do uso da água nas plantas cultivadas sob alta [CO_2], geralmente levam a acréscimos na biomassa dessas plantas, que são 50% maiores do que nas cultivadas em [CO_2] ambiente.

Coerentemente, nesse estudo, para as três cultivares, as plantas sob elevada [CO_2], independente do tratamento nitrogenado, aumentaram de forma significativa A , C_i , A/E e A/g_s por outro lado, reduziram g_s e E (FIGURAS 3A, 3B, 3C, 4A, 4B e 4C). Geralmente, as respostas iniciais ao elevado CO_2 atmosférico, são aumento da assimilação de carbono e diminuição da condutância estomática (LEAKEY *et al.*, 2009). A alta [CO_2] favorece a fotossíntese e leva a redução da condutância estomática e da transpiração, implicando em melhoria da eficiência do uso da água em muitas espécies de plantas (XU *et al.*, 2016).

DaMatta *et al.* (2016) e Ghini *et al.* (2015), demonstraram que em cafeeiros cultivados sob elevado CO_2 ocorreram aumentos significativos nas taxas fotossintéticas das plantas, com pequenas variações na g_s . Para Ainsworth e Rogers (2007), a alta disponibilidade de CO_2

atmosférico aumenta o gradiente de difusão desse gás, da atmosfera para os cloroplastos, e, assim, estimula a A ao passo que reduz g_s e E , promovendo aumentos na eficiência do uso da água.

Em adição, uma menor taxa de fotorrespiração nas plantas sob elevado CO_2 , também auxiliaria a explicar as maiores taxas de crescimento encontradas nestas plantas (FIGURA 5A). Em plantas C3 o aumento de CO_2 favorece o aumento da carboxilação em detrimento da oxigenação, visto que o CO_2 e O_2 competem pelo mesmo sítio ativo da Rubisco (AINSWORTH; ROGERS, 2007). Em duas cultivares de cafeeiro (Catuaí e Obatã) cultivados sob elevado CO_2 , significativos aumentos na eficiência de carboxilação da Rubisco, (50%), levaram a expressiva redução na fotorrespiração (30%) (DAMATTA *et al.*, 2016).

Nesse trabalho, a estimulação das reações bioquímicas devido ao aumento na $[\text{CO}_2]$ para $760 \mu\text{L de CO}_2 \text{ L}^{-1}$ foi verificada a partir de aumentos na velocidade máxima de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) e na taxa de transporte de elétrons usados para regeneração da RuBP (J_{max}) (Tabela 1). Concomitantemente, foram observadas alterações na atividade do aparato fotoquímico, visto que os teores de clorofilas a e b (FIGURAS 2A e 2B) bem como a relação F_v/F_m (FIGURA 5B), foram aprimorados sob elevada $[\text{CO}_2]$. Pode-se inferir que a dissipação de energia por fluorescência da clorofila a foi reduzida uma vez que maior quantidade de energia foi direcionada para o funcionamento da etapa fotoquímica. Os parâmetros determinados pela fluorescência da clorofila são bons indicadores dos processos envolvidos no transporte fotossintético de elétrons. O parâmetro F_v/F_m indica a máxima eficiência fotoquímica do PSII e se presta como um bom indicativo dos processos fotoquímicos a longo e curto prazo (SCHREIBER *et al.*, 2004).

Nesse sentido, o aumento da produção de NADPH e ATP nos tilacoides fez-se necessário para suprir a maior demanda pela etapa bioquímica nos estromas. Esses dados corroboram com os estudos de Ramalho *et al.* (2013) e Rodrigues *et al.* (2016) os quais mostraram aumentos significativos para V_{cmax} e J_{max} quando avaliaram plantas de café expostas a alta $[\text{CO}_2]$. Por outro lado, DaMatta *et al.* (2016), verificaram que a fluorescência da clorofila permaneceu inalterada em cultivares de cafeeiro sob elevado CO_2 .

Apesar da mais alta atividade metabólica verificada nas mudas de cafeeiros sob elevada $[\text{CO}_2]$, sugere-se um sincronismo entre as vias enérgicas, visto que, a quantidade de EROs (H_2O_2) assim como a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX reduziram nos tecidos foliares (FIGURAS 21A, 22A, 23A e 24A).

A menor atividade da SOD nas folhas, sob alta $[\text{CO}_2]$, está de acordo com o aumento da eficiência fotoquímica verificado pela relação F_v/F_m . Essa enzima é acionada quando a síntese

de produtos fotoquímicos excede a demanda bioquímica que resultaria em super redução celular com consequente formação de radicais livres (LOVELOCK; OSMOND; JEBB, 1994).

A redução da ação da CAT nas folhas das plantas desse experimento, também pode ser justificada pela menor taxa fotorrespiratória em plantas com atmosfera enriquecida com CO₂, pois o H₂O₂ formado no peroxissomo na via fotorrespiratória é convertido em água (H₂O) e oxigênio (O₂) pela atividade da CAT (DIETZ; MITTLER; NOCTOR, 2016). Martins *et al.* (2016), relataram que a atividade da SOD, CAT e APX reduziram na cultivar IPR de cafeeiros, sob alto CO₂, porém, aumentaram no ‘Conilon’. Esses autores sugerem ainda que, a menor taxa fotorrespiratória aliada a alta eficiência do PSII diminui a formação de EROs, impedindo, por fim, a necessidade de desenvolver um sistema antioxidante robusto. De fato, o CO₂ elevado pode levar a reduções nas atividades de SOD, APX, GR e CAT (ERICE *et al.*, 2007; VURRO *et al.*, 2009).

Dessa forma, a redução nas quantidades de carboidratos não estruturais (AST, AR e sacarose) nas folhas de cafeeiros, verificada nesse estudo, (Figuras 7A, 8A, 9A), também enfatiza o equilíbrio metabólico, pois, diversos estudos indicam o efeito negativo do acúmulo de carboidratos na homeostase foliar (PAUL; FOYER, 2001; PAUL; PELLNY, 2003; URBAN; ALPHONSOUT, 2007). Portanto, importantes restrições bioquímicas à fotossíntese têm sido atribuídas à retroinibição associada ao acúmulo de carboidratos (STITT, 1994).

Contudo, ao contrário do que tem sido relatado para inúmeras outras espécies (XU *et al.*, 2016; BADER *et al.*, 2010; AINSWORTH; ROGERS, 2007), o cafeeiro sustenta o acréscimo na A diante da alta disponibilidade de CO₂ por anos (RAKOČEVIĆ *et al.*, 2018a). Neste sentido, informações evidenciam que não há nenhum sinal de regulação negativa da fotossíntese ou aclimatação fotossintética ao CO₂ em plantas de café (DAMATTA *et al.*, 2019), visto que essa espécie não acumula carboidratos solúveis nos tecidos foliares quando cultivadas sob elevada [CO₂]. Em genótipos de café, vários açúcares solúveis apresentaram reduções significativas em condições de alta [CO₂], resultando em uma redução no conteúdo de carboidratos não estruturais. Portanto, a ausência de acúmulo de açúcar nas folhas teria contribuído para evitar a regulação negativa fotossintética.

O acúmulo de amido é mais um mecanismo que impede a regulação negativa da fotossíntese, fornecendo uma saída para os produtos finais fotossintéticos quando as exportações não são suficientes. Esses dados indicaram que as folhas de cafeeiro sustentaram o aumento da taxa de fotossíntese induzida por maior [CO₂] via síntese de amido (FIGURA 10A) e via exportação de sacarose para outras partes da planta (folhas novas e raízes). Da Matta *et*

al. (2016) sugeriram que níveis elevados de amido, especialmente sob [CO₂] elevada, permitiu aos cafeeiros (‘Catuaí’ e ‘Obatã’) evitar aclimatação fotossintética, impedindo o ciclismo e/ou acúmulo de açúcares solúveis. Por outro lado, existem estudos que apoiam correlações positivas entre acúmulo de amido e aclimatação fotossintética em resposta ao CO₂ elevado (DAWES *et al.*, 2013).

Assim como a elevação da concentração de amido, o aumento da taxa respiratória e da atividade da MDH nas folhas (FIGURAS 6A e 6B) também auxiliam a justificar a diminuição de carboidratos solúveis, a manutenção das altas atividades metabólicas, e o maior crescimento de cafeeiros sob alta [CO₂], verificados nesse trabalho. Algumas espécies como *Quercus ilex* e *Arabidopsis thaliana* (TENG *et al.*, 2006) apresentaram aumento significativo da concentração de carboidratos estruturais, como celulose, nas folhas dessas plantas quando cultivadas em elevado CO₂. Gibeaut *et al.* (2001) mostraram que esse aumento é decorrente de um maior direcionamento de carboidratos para a parede celular que foi observado em alta concentração atmosférica de CO₂. Entretanto, em outras espécies como *Betula pendula* o conteúdo de celulose e lignina apresentaram diminuição em alto CO₂, indicando que árvores tendem a investir mais carboidratos no crescimento (respiração e divisão celular) em detrimento dos componentes da parede celular quando cultivadas sob elevada [CO₂] (OKSANEN *et al.*, 2005, POORTER *et al.*, 1997).

No café, a ausência de um aumento de carboidratos não estruturais nas folhas pode estar relacionada também, a maior velocidade de produção de novas folhas e maior crescimento de raízes (RAMALHO *et al.* 2013). Dessa forma, os resultados desse trabalho mostraram que com o aumento da [CO₂] houve maior investimento no crescimento do sistema radicular (FIGURA 1D) comprovando a influência do dreno e da alocação e partição do carbono sobre a fotossíntese. Quando a água, a temperatura e nutrientes não são limitantes (como é o caso desse experimento), o crescimento das raízes auxilia na manutenção de altas taxas fotossintéticas sob elevada [CO₂], uma vez que, o transporte de carboidratos para órgãos dreno evita o acúmulo de açúcares nas folhas o que poderia levar a inibição fotossintética por retroalimentação. Para Paul e Pellny (2003), uma menor atividade do dreno é considerada como a principal causa para o decréscimo na assimilação de carbono.

Nas raízes, sob elevado CO₂, foram constatados acentuados aumentos nas concentrações de carboidratos solúveis (FIGURAS 7B, 8B, 9B) bem como na atividade da invertase (FIGURA 11B), evidenciando uma maior atividade desse órgão. Paralelamente, a atividade do sistema antioxidante (SOD, CAT e APX), nas raízes, também foi aprimorada, a fim de manter em níveis adequados compostos reativos gerados rotineiramente durante as

reações bioquímicas. Muitas EROs possuem função essencial como sinalizadoras de processos celulares, como por exemplo, a sinalização hormonal, portanto é fundamental a permanência dessas moléculas em baixas concentrações.

Atualmente, busca-se o entendimento sobre a assimilação do nitrogênio, interconversão e distribuição dos aminoácidos, bem como o papel do metabolismo desse nutriente em plantas sob condições ambientais particulares, como atmosfera com alta [CO₂]. Nessas condições as diferentes vias metabólicas, a exemplo da síntese/degradação de aminoácidos e proteínas, desaminação e fotorrespiração, podem ser reguladas e operar conjuntamente ou não, para atender à demanda fisiológica do vegetal.

Nas folhas das cultivares de cafeeiro estudadas, a alta [CO₂] levou a reduções nos teores de N e dos outros macronutrientes (P, K, Ca, Mg e S) (TABELA 2). Muitas espécies apresentam alterações de nutrientes minerais (por exemplo, em N, P, K, Mg, S, Ca) em resposta ao aumento da [CO₂] atmosférica (OVERDIECK, 1993; ROBERTZ; LINDER, 1999; BLANK *et al.* 2011). Uma diluição moderada de nutrientes pode refletir em mudanças fisiológicas qualitativas, sem implicar em deficiência de nutrientes (THIEC *et al.*, 1995). De fato, em plantas de café cultivadas sob elevada [CO₂], a maior atividade metabólica reflete em diversas alterações fisiológicas como mudanças no uso nutrientes, especialmente do N e do fósforo (JIN *et al.*, 2016). Nesse sentido, a maior taxa fotossintética associada ao teor de N mais baixo resultaria em maior eficiência do uso de nitrogênio (LEAKEY *et al.*, 2009). Martins *et al.* (2014b) estudaram os teores de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn, Zn) em algumas cultivares de café e mostraram que, sob elevado CO₂, houve reduções entre 7% e 25% nas concentrações dos elementos, dependendo do mineral e do genótipo estudado. Redução de 10% do teor de N também foi observada em cultivares de cafeeiro sob FACE, por Ghini *et al.* (2015). Essa ‘diluição mineral’, principalmente do N, é um fator que deve ser considerado, entretanto, poucas informações são encontradas na literatura sobre as alterações no metabolismo desse nutriente diante da elevação da [CO₂].

Assim como a maior taxa de crescimento influencia a diluição dos nutrientes, a redução da condutância estomática (gs), sob alta [CO₂], observada nas plantas desse estudo e o consequente decréscimo da taxa transpiratória podem ter levado a redução na absorção dos nutrientes por fluxo de massa. A manutenção da transpiração é fundamental tanto para a absorção nas raízes quanto para o transporte de N até as folhas, onde grande parte desse íon é assimilado (ANDREWS; RAVEN; LEA, 2013).

Pesquisas têm demonstrado que a nutrição com diferentes fontes de N (NO₃⁻ e NH₄⁺) podem induzir respostas metabólicas distintas dependendo do genótipo e da condição ambiental

(ESCOBAR *et al.*, 2006; PATTERSON *et al.*, 2010). Nesse trabalho, a partir da elevação da $[\text{CO}_2]$, no tratamento com NO_3^- , o comportamento dos compostos nitrogenados (aminoácidos, proteínas, NO_3^- e NH_4^+), bem como das enzimas de assimilação de nitrogênio (RN e GS) foi semelhante ao dos carboidratos, isto é, houve reduções dessas variáveis nas avaliações foliares, enquanto significativos aumentos foram detectados nas análises em tecidos radiculares.

Nas folhas das plantas tratadas com NO_3^- , a elevação da $[\text{CO}_2]$ afetou negativamente os teores de NO_3^- e de NH_4^+ . A diminuição dessas variáveis, implicou em significativas reduções nas atividades das enzimas RN e GS, que em última análise, resultaram em consequentes quedas nas concentrações de aminoácidos e proteínas (FIGURAS 12A,13A, 14A, 15A, 19A, 20A). Bloom *et al.* (2014), descreveram uma redução no teor de proteína e, portanto, no valor nutricional do grão de *T. aestivum* quando NO_3^- era fornecido como fonte de nitrogênio sob alta $[\text{CO}_2]$.

Existem evidências que a redução da fotorrespiração como consequência do aumento da $[\text{CO}_2]$, afeta negativamente a assimilação do NO_3^- em folhas de plantas C3 (BLOOM *et al.*, 2015). Uma diminuição da FR reduziria a quantidade de poder redutor disponível para conversão do NO_3^- a NH_4^+ (BLOOM *et al.*, 2010, 2014). Além disso, a redução do NO_3^- a NH_4^+ é um importante dreno elétrons que compete por produtos fotoquímicos com a fixação de carbono (BLOOM *et al.*, 2010). Além da menor quantidade de NH_4^+ , devido a menor atividade da RN, a menor fotorrespiração nas plantas, sob alto CO_2 , também ajuda a explicar a diminuição na atividade da GS em tecidos foliares. Isso porque a enzima GS é responsável pela assimilação do NH_4^+ da fotorrespiração (LEA *et al.*, 2011).

Por outro lado, nas raízes das plantas tratadas com NO_3^- sob alta $[\text{CO}_2]$, o aumento na atividade da RN indica que, com a diminuição da conversão do NO_3^- a NH_4^+ nas folhas, houve uma maior assimilação deste íon no sistema radicular. Além disso, o incremento da atividade da enzima GS nos tecidos radiculares está de acordo com o aumento na síntese de aminoácidos e proteínas, nesse órgão, nas plantas sob alta $[\text{CO}_2]$ (FIGURAS 12B,13B, 14B, 15B, 19B, 20B).

Quando expostos ao elevado CO_2 , os sistemas radiculares das plantas com NH_4^+ superaram os das plantas com NO_3^- , pois apresentaram maiores incrementos na atividade da GS que culminaram em maiores teores proteicos nesse tecido. Coerentemente uma elevação na atividade da invertase foi verificada, afim de fornecer esqueletos de carbono para síntese de aminoácidos.

Nas folhas das plantas tratadas com NH_4^+ , também houve alterações nas concentrações dos compostos nitrogenados. Nesse estudo, o aumento da $[\text{CO}_2]$, levou a redução da atividade da enzima GS, que implicou em queda na concentração de aminoácidos nos tecidos foliares.

Contudo, nesse tratamento, foi verificado aumento no teor de proteína. Nesse caso, a queda na atividade da GS foliar relaciona-se apenas com a baixa taxa fotorrespiratória, já que, a assimilação do NH_4^+ absorvido ocorre quase que exclusivamente nas raízes. De acordo com Moreno e Garcia-Martinez (1983), apenas traços de NH_4^+ são encontrados na seiva xilemática. Este íon pode ser tóxico quando acumulado em altas concentrações nos tecidos vegetais (KRONZUCKER *et al.*, 2001), portanto, ele é rapidamente incorporado a esqueletos de carbono, assim que absorvido, produzindo aminoácidos a partir de uma demanda energética muito inferior à assimilação do NO_3^- (LEA *et al.*, 2011). A assimilação de N é um dos processos metabólicos que mais demandam energia (BLOOM, 2015), no entanto, a absorção de NH_4^+ diferentemente do NO_3^- é passiva e sua assimilação requer um sexto da energia gasta para assimilar NO_3^- .

De fato, os maiores teores de proteínas, bem como os maiores teores de clorofilas foram observados nas folhas das plantas tratadas com NH_4^+ e expostas à alta $[\text{CO}_2]$. Plantas C3, normalmente investem até 50% da proteína foliar em Rubisco, o que representa cerca de 25% do nitrogênio da folha (WHITNEY *et al.*, 2015). Portanto, as respostas fotossintéticas das plantas tratadas com NH_4^+ , superam as respostas das plantas com NO_3^- , implicando em maior eficiência no uso da água. Consequentemente, no que se refere ao acúmulo de matéria seca, foi verificada nesse estudo, uma superioridade das plantas tratadas com NH_4^+ em relação as plantas com NO_3^- . Em adição, os aumentos da atividade da GS e dos teores de proteínas nas raízes podem ter favorecido a elevação de proteínas (Rubisco) nas folhas dessas plantas.

Estudando o efeito sinérgico da elevada $[\text{CO}_2]$ e das fontes nitrogenadas sobre a fisiologia de *Nicotiana tabacum L.*, Domiciano *et al.* (2020) também verificaram respostas mais positivas em plantas de tabaco cultivadas com NH_4^+ como fonte exclusiva de nitrogênio. Os autores sugeriram ainda que a interação entre os metabolismos do Carbono e Nitrogênio é diferencialmente afetada em plantas tratadas com NO_3^- ou NH_4^+ e submetidas ao aumento da $[\text{CO}_2]$, além de enfatizar que a forma inorgânica de nitrogênio absorvida, determina o desempenho fisiológico em plantas diante do aumento da $[\text{CO}_2]$ previsto para as próximas décadas.

Dessa forma, o entendimento de como os futuros cenários climáticos influenciarão as rotas metabólicas e os processos fisiológicos, torna-se fundamental para prever o comportamento das plantas.

6 CONCLUSÕES

A elevação da concentração de CO₂ influenciou positivamente o crescimento e desenvolvimento de mudas de *Coffea arabica* L. cultivares ('Mundo Novo', 'Rubi' e 'Catuaí').

A maior concentração de CO₂ favoreceu o metabolismo das mudas de café resultando em respostas fisiológicas superiores e maior acúmulo de matéria seca.

Sob elevado CO₂, a aplicação de amônio foi mais favorável que a aplicação nitrato, para o desempenho fisiológico das três cultivares ('Mundo Novo', 'Rubi' e 'Catuaí') de café estudadas, implicando em maiores taxas fotossintéticas com consequentes aumentos na produção de biomassa.

As interações entre as rotas metabólicas de assimilação do carbono e nitrogênio são fundamentais para o desenvolvimento da planta, uma vez que, essas vias são finamente ajustadas diante das variações das condições ambientais, resultando, em última análise, em modificações no comportamento e na plasticidade vegetal.

REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, E. A.; LONG, S. P. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. **New Phytologist**, Cambridge, v. 165, p. 351-372, 2005.
- AINSWORTH, E. A.; ROGERS, A. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. **Plant Cell Environmental**, [s.l.], v. 30, p. 258-270, 2007.
- ANDERSSON, I.; BACKLUND, A. Structure and function of Rubisco. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s.l.], v. 46, p. 275-291, 2008.
- ANDREWS, M.; RAVEN, J. A.; LEA, P. J. Do plants need nitrate? The mechanisms by which Nitrogen form affects plants. **Annals of Applied Biology**, [s.l.], v. 163, n. 2, p. 174-199, 2013.
- ASADA, K.; TAKAHASHI, M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: KYLE, D. J.; OSMOND, C. J.; ARTZEN, C. J. (Eds). **Photoinhibition: Topics in Photosynthesis**. Amsterdam, 1987. p. 227-287.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**, 16 ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists, MD, 1998.
- AVELINO, J.; CRISTANCHO, M.; GEORGIU, S.; IMBACH, P.; AGUILAR, L.; BORNEMANN, G.; LÄDERACH, P.; ANZUETO, F.; HRUSKA, A. J.; MORALES, C. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. **Food Security**, [s.l.], v. 7, p. 303–321, 2015.
- AZEVEDO, R. A. *et al.* Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild- type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, n. 2, p. 280-292, 1998.
- BADER, M. K. F.; SIEGWOLF, R.; KÖRNER, C. Sustained enhancement of photosynthesis in mature deciduous forest trees after 8 years of free air CO₂ enrichment. **Planta**, [s.l.], v. 232, p. 1115–1125, 2010.
- BAHRAMI, H. *et al.* The proportion of nitrate in leaf nitrogen, but not changes in root growth, are associated with decreased grain protein in wheat under elevated [CO₂]. **Journal of Plant Physiology**, [s.l.], v. 216, p. 44-51, set. 2017.
- BATAGLIA, O. C.; FURLANI, A. M. C.; TEIXEIRA, J. P. F.; FURLANI, P. R.; GALLO, J. R. **Métodos de análise química de plantas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1983. 48 p. (Boletim Técnico, 78).
- BATISTA, K. D.; ARAÚJO, W. L.; ANTUNES, W. C.; CAVATTE, P. C.; MORAES, G.; MARTINS, S. C. V.; DAMATTA, F. M. Photosynthetic limitations in coffee plants are chiefly governed by diffusive factors. **Trees**, [s.l.], p. 26, 459-468, 2012.

- BEN AHMED, C. *et al.* Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 67, n. 2, p. 345-352, 2009.
- BERGER, J. A.; HARRISON, P. J. Nitrate reductase activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: a revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v. 40, n. 1, p. 82-93, 1995.
- BLANK, R. R.; MORGAN, T.; ZISKA, L. H.; WHITE, R. H. Effect of atmospheric CO₂ levels on nutrients in cheatgrass tissue. **Natural Resource & Environment**, Issues, v. 16, p. 1-6, 2011.
- BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K. V. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 5, p. 359-373, 2010.
- BLOOM, A. J. *et al.* Carbon Dioxide Enrichment Inhibits Nitrate Assimilation in Wheat and Arabidopsis. **Science**, [s.l.], v. 328, n. 5980, p. 899-903, 14 maio 2010.
- BLOOM, A. J. The increasing importance of distinguishing among plant Nitrogen sources. **Current Opinion in Plant Biology**, [s.l.], v. 25, p. 10-16, 2015.
- BLOOM, J. A. *et al.* Nitrate assimilation is inhibited by elevated CO₂ in field-grown wheat. **Nature Climate Change**, v. 4, n. 6, p. 477-480, 6 jun. 2014.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** [s.l.], v. 72, p. 248-254, 1976.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 365-372, abr. 2000.
- BUNN, C. *et al.* "A Bitter Cup: Climate Change Profile of Global Production of Arabica and Robusta Coffee." **Climatic Change**, [s.l.], v. 129, no. 1, p. 89-101, 2015.
- CAIRO, P. A. R. *et al.* Activity of rubisco and enzymes of sucrose synthesis and hydrolysis associated to latex productivity, in rubber tree clones [*Hevea brasiliensis* (Willd ex. ADR. De Juss.) Muell. Arg] cultivated in Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 369-376, 2009.
- CATALDO, D. A. *et al.* Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid 1. Communications in Soil Science & Plant Analysis. **Philadelphia**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.
- CAVATTE, P. C. *et al.* Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee? A morphophysiological analysis. **Physiologia Plantarum**, [s.l.], v. 114, p. 111-122, 2012.
- CHEN, G. *et al.* Nitrogen use efficiency (NUE) in rice links to NH₄⁺ toxicity and futile NH₄⁺ cycling in roots. **Plant and Soil**, [s.l.], v. 369, n. 1-2, p. 351-363, 6 ago. 2013.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira – grãos**: Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 13 jul. 2020.

CRAPARO, A. C. W.; VAN ASTEN, P. J. A.; LÄDERACH, P.; JASSOGNE, L. T. P.; GRAB, S. W. *Coffea arabica* yields decline in Tanzania due to climate change: global implications. **Agricultural Forest Meteorology**, [s.l.], v. 207, p. 1-10, 2015.

DAMATTA, F. M. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. **Field Crops Research**, [s.l.], v. 86, p. 99-114, 2014.

DAMATTA, F. M. *et al.* Sustained enhancement of photosynthesis in coffee trees grown under free-air CO₂ enrichment conditions: disentangling the contributions of stomatal, mesophyll, and biochemical limitations. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 167, p. 341-352, 2016.

DAMATTA, F. M.; GRANDIS, A.; ARENQUE, B. C.; BUCKERIDGE, M. S. Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. **Food Research International**, [s.l.], v. 43, p. 1814-1823, 2010.

DAMATTA, F. M.; RAHN, E.; LÄDERACH, P.; GHINI, R.; RAMALHO, J. C. Why could the coffee crop endure climate change and global warming to a greater extent than previously estimated? **Climatic Change**, [s.l.], v. 152, n. 1, p. 167–178, 2019.

DAMATTA, F. M.; RAMALHO, J. D. C. Impact of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [s.l.], v. 18, p. 55-81, 2006.

DAVIS, A.P.; GOLE, T. W.; BAENA, S.; MOAT, J. The impact of climate change on indigenous Arabica coffee (*Coffea arabica*): predicting future trends and identifying priorities. **PloS One**, [s.l.], v. 7, 479-481, 2012.

DAWES, M. A.; HAGEDORN, F.; HANDA, I. T. *et al.* An alpine treeline in a carbon dioxide-rich world: synthesis of a nine-year free-air carbon dioxide enrichment study. **Oecologia**, [s.l.], n. 171, v. 3, p. 623-637, 2013.

DIETZ, K. J.; MITTLER, R.; NOCTOR, G. Recent progress in understanding the role of reactive oxygen species in plant cell signaling. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 171, n. 3, p. 1535-9, 2016.

DISCHE, Z. Color reactions of carbohydrates. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 1, p. 475-514, 1962.

DOMICIANO, D.; NERY, F.C.; CARVALHO, P. A. *et al.* Nitrogen sources and CO₂ concentration synergistically affect the growth and metabolism of tobacco plants. **Photosynthesis Research**, [s.l.], v. 144, 327-339, 2020.

ELLSWORTH, D. S. *et al.* Photosynthesis, carboxylation and leaf nitrogen responses of 16 species to elevated CO₂ across four free-air CO₂ enrichment experiments in forest, grassland and desert. **Global Change Biology**, v. 10, p. 2121–2138, 2004.

- ERICE, G.; ARANJUELO, I.; IRIGOYEN, J. J.; SÁNCHEZ-DÍAZ M. Effect of elevated CO₂, temperature and limited water supply on antioxidant status during regrowth of nodulated alfalfa. **Physiologia Plantarum**, [s.l.], v. 130, p. 33-45, 2007.
- ESCOBAR, M. A.; GEISLER, D. A.; RASMUSSEN, A. G. Reorganization of the alternative pathways of the Arabidopsis respiratory chain by nitrogen supply: opposing effects of ammonium and nitrate. **The Plant Journal**, Malden, v. 45, n. 5, p. 775-788, 2006.
- FAHRENDORF, T.; BECK, E. Cytosolic and cell-wall-bound acid invertases from leaves of *Urtica dioica* L.: a comparison. **Planta**, [s.l.], v. 180, n. 2, p. 237-44, 1990.
- FARQUHAR, G. D.; VON CAEMMERER, S.; BERRY, J. A. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C3 species. **Planta**, [s.l.], v. 149, p. 78-90, 1980.
- FORDE, B. G. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p. 203-224, 2002.
- FRUGOLI, J. A. *et al.* Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 112, n. 1, p. 327-336, 1996.
- GECHEV, T. S. *et al.* Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **Bioessays**, Hoboken, v. 28, n. 11, p. 1091-1101, 2006.
- GHINI, R. *et al.* Coffee growth, pest and yield responses to free-air CO₂ enrichment. **Climatic Change**, [s.l.], v. 132, p. 307-320, 2015.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rochville, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.
- GIBEAUT, D. M.; CRAMER, G.R. & SEEMANN, J.R. Growth, cell walls, and UDP-Glc dehydrogenase activity of *Arabidopsis thaliana* grown in elevated carbon dioxide. **Journal of Plant Physiology**, [s.l.], v. 158, n. 5, p. 569-576, 2001.
- GIFFORD, R. M.; BARRETT, D. J.; LUTZE, J. L. The effects of elevated [CO₂] on the C:N and C:P mass ratios of plant tissues. **Plant and Soil**, [s.l.], v. 224, n. 1, p. 1-14, 2000.
- GUIMARÃES, P. T. G.; ANDRADE NETO, A. BELLINI JUNIOR, O.; ADÃO, W. A.; SILVA, E. M. Produção de mudas de cafeeiros em tubetes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 193, p. 98-108, 1998.
- HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rochville, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.
- HILLEL, D.; ROSENZWEIG, C. Agriculture and environment in a crowding and warming world. In: HILLEL, D.; ROSENZWEIG, C; (Eds.). **Handbook of climate change and agroecosystems: global and regional aspects and implications**. ICP Series on Climate Change Impacts, Adaptation, and Mitigation 2. London: Imperial College Press, 2012. p. 3-10,

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 1950. 347 p.

ICO. International Coffee Organization. **Annual Review 2018/19**. IOC document. London: International Coffee Organization, 2019.

IMBACH, P. *et al.* "Coupling of Pollination Services and Coffee Suitability Under Climate Change." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 39, p. 10438-10442, 2017, PNAS.

IPCC. **Working Group I Contribution to the IPCC Fifth Assessment Report: The Physical Science Basis**. Climate Change, 2019.

JABLONSKI, L. M.; WANG, X.; CURTIS, P. S. Plant reproduction under elevated CO₂ conditions: a meta-analysis of reports on 79 crop and wild species. **New Phytologist**, [s.l.], v. 156, p. 9-26, 2002.

JALEEL, C. A. *et al.* Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiologiae Plantarum**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 427-436, 2009.

JALEEL, C. A. *et al.* Responses of antioxidant defense system of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. to paclobutrazol treatment under salinity. **Acta Physiologiae Plantarum**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 205-209, 2007.

KANT, S. *et al.* Improving yield potential in crops under elevated CO₂: Integrating the photosynthetic and nitrogen utilization efficiencies. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 3, p. 162, 2012.

KITAOKA, S. *et al.* The photosynthetic response of four seral deciduous broad-leaved tree seedlings grown under elevated CO₂ concentrations. **Journal of Agricultural Meteorology**, [s.l.], v. 72, n. 1, p. 43-49, 2016.

KÖRNER, C. Plant CO₂ responses: an issue of definition, time and resource supply. **New Phytologist**, [s.l.], v. 172, p. 393-411, 2006.

KRISHNAN, S.; RANKER, T. A.; DAVIS, A. P.; RAKOTOMALALA, J. J. Current status of coffee genetic resources: implications for conservation – case study in Madagascar. **Acta Horticulturae**, [s.l.], p. 15-20, 2015.

KRONZUCKER, H. J. *et al.* Ammonium toxicity and the real cost of transport. **Trends in Plant Science**, [s.l.], v. 6, n. 8, p. 335-337, 2001.

KUEHNY, J. S. *et al.* Nutrient Dilution by Starch in CO₂-enriched Chrysanthemum. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 42, n. 6, p. 711-716, 1991.

LÄDERACH, P. *et al.* Climate change adaptation of coffee production in space and time. **Climatic Change**, [s.l.], v. 141, p. 47-62, 2017.

LAMBERS, H.; CHAPIN III, F. S.; PONS, T. L. **Plant Physiology Ecology**. New York: Springer Verlag, 2008. 605 p.

LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement. **Annual Plant Reviews**, [s.l.], Washington, v.42, p. 1-40, 2011.

LEAKEY, A. D. B.; AINSWORTH, E. A.; BERNACCHI, C. J.; ROGERS, A.; LONG, S. P.; ORT, D. R. Elevated CO₂ Effects on Plant Carbon, Nitrogen, and Water Relations: Six Important Lessons from FACE. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 60, p. 2859-2876, 2009.

LEAKEY, A. D. B.; AINSWORTH, E. A.; BERNACCHI, C. J.; ALISTAIR, R., LONG, S. P. et al. Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 60, p. 2859-2876, 2009.

LI, S. X.; WANG, Z. H.; STEWAR, B. A. Responses of crop plants to ammonium and nitrate N. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 118, p. 205-397, 2013.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. p. F4.3.1-F4.3.8.

LONG, S. P.; AINSWORTH, E. A.; ROGERS, A.; ORT, D. R. Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the Future. **Annual Review of Plant Biology** 55: 591-628, 2004.

LÓPEZ-MILLÁN, A.F.; MORALES, F.; ABADÍA, A.; ABADÍA, J. Responses of sugar beet roots to iron deficiency. Changes in carbon assimilation and oxygen use. **Plant Physiology**, [s.l.], v.124, p. 885-897, 2000.

LOVELOCK, C. E.; OSMOND, C. B.; JEBB, M. Photoinhibition and recovery in tropical plant species: response to disturbance. **Oecologia**, [s.l.], v. 97, n. 3, p. 297-307, 1994.

MAGALHÃES, A. C. N. Análise quantitativa do crescimento. *In*: FERRI, M.G. **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: EPU/EDUSP, 1979. v. 1. p. 331-350.

MARTINS, L. D.; TOMAZ, M. A.; LIDON, F. C.; DAMATTA, F. M.; RAMALHO, J. C. Combined effects of elevated [CO₂] and high temperature on leaf mineral balance in *Coffea* spp. **Climatic Change**, [s.l.], v. 26:365-379, 2014b.

MARTINS, M. Q. *et al.* Protective response mechanisms to heat stress in interaction with high [CO₂] conditions in *Coffea* spp. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 7, p. 947, 2016.

MARTINS, S. V. C. *et al.* Understanding the low photosynthetic rates of sun and shade coffee leaves: bridging the gap on the relative roles of hydraulic, diffusive and biochemical constraints to photosynthesis. **PLoS One**, [s.l.], v. 9, 2014a.

MCCULLOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 297-304, 1967.

- MELO, B. **Estudos sobre produção de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em tubetes.** 1999. 65 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MISRA, J. B. Integrated operation of the photorespiratory cycle and cytosolic metabolism in the modulation of primary nitrogen assimilation and export of organic N-transport compounds from leaves: A hypothesis. **Journal of Plant Physiology**, [s.l.], v. 171, n. 3-4, p. 319-328, fev. 2014.
- MOAT, J. *et al.* Resilience potential of the Ethiopian coffee sector under climate change. **Nat Plants**, [s.l.], v. 3, p. 1708, 2017.
- MORENO, J.; GARCÍA- MARTINEZ, J. L. Seasonal variation of nitrogenous compounds in the xylem sap of Citrus. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 59, n. 4, p. 669-675, 1983.
- MUNNÉ-BOSCH S. The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. **Journal of Plant Physiology**, [s.l.], v. 162, p. 743-748, 2005.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
- NORBY, R. J.; WARREN, J. M.; IVERSEN, C. M.; MEDLYN, B. E.; MCMURTRIE, R. E. CO₂ enhancement of forest productivity constrained by limited nitrogen availability. **Proc Natl Acad Sci U S A**, [s.l.], v. 107, p. 19368-19373, 2010.
- OKSANEN, E.; RIIKONEN, J.; KAAKINEN, S.; HOLOPAINEN, T.; VAPAAVUORI, E. Structural characteristics and chemical composition of birch (*Betula pendula*) leaves are modified by increasing CO₂ and ozone. **Global Change Biology**, [s.l.], v. 11, p. 732-748, 2005.
- OVERDIECK, D. Elevated CO₂ and the mineral content of herbaceous and woody plants. **Vegetatio**, [s.l.], v. 104, 403-411, 1993.
- PATE, J. S.; LAYZELL, D. B. Carbon and nitrogen partitioning in the whole plant—a thesis based on empirical modeling. *In: Nitrogen and carbon metabolism*, Netherlands, n. 3, p. 94-134, 1981.
- PATERSON, R. R. M. *et al.* "Coffee, Mycotoxins and Climate Change." **Food Research International**, [s.l.], v. 61, p. 1-15, 2014.
- PATTERSON, K. *et al.* Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium- and nitrate- supplied plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 33, n. 9, p. 1486-1501, 2010.
- PAUL, M. J.; FOYER, C. H. Sink regulation of photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 52, p. 1383-1400, 2001.

- PAUL, M. J.; PELLNY, T. K. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 54, 539-547, 2003.
- POMPEU, G. B. *et al.* Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 5, p. 548-552, 2008.
- POORTER, H.; VAN BERKEL, Y.; BAXTER, R.; DEN HERTOOG, J.; DIJKSTRA, P.; GIFFORD, R.M.; GRIFFIN, K.L.; ROUMET, C.; ROY, J. & WONG, S.C. The effect of elevated CO₂ on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C₃ species. **Plant, Cell and Environment**, [s.l.], v. 20, p. 472-482, 1997.
- PURCELL, C.; BATKE, S. P.; YIOTIS, C.; CABALLERO, R.; SOH, W. K.; MURRAY, M.; MCELWAIN, J. C. Increasing stomatal conductance in response to rising atmospheric CO₂. **Annals of Bot.**, [s.l.], v. 121, p. 1137-1149, 2018.
- RACHMILEVITCH, S.; COUSINS, A. B.; BLOOM, A. J. Nitrate assimilation in plant shoots depends on photorespiration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 101, n. 31, p. 11506-11510, 3 ago. 2004.
- RAHN, E. *et al.* Exploring adaptation strategies of coffee production to climate change using a process based model. **Ecol Model.**, [s.l.], v. 371, p. 76-89, 2018.
- RAKOČEVIĆ, M.; MATSUNAGA, F. T. Variations in leaf growth parameters within the tree structure of adult *Coffea arabica* in relation to seasonal growth, water availability and air carbon dioxide concentration. **Annals of Botany**, [s.l.], v. 122, p. 117-131, 2018b.
- RAKOČEVIĆ, M; RIBEIRO, R. V.; MARCHIORI, P. E. R.; FILIZOLA, H. F; BATISTA, E. R. Structural and functional changes in coffee trees after 4 years under free air CO₂ enrichment. **Annals of Botany**, [s.l.], v. 21, p. 1065-1078, 2018a.
- RAMALHO, J. C. *et al.* Can elevated air [CO₂] conditions mitigate the predicted warming impact on the quality of coffee bean? **Front Plant Science**, [s.l.], v. 9, n. 287, 2018.
- RAMALHO, J. C. *et al.* Sustained photosynthetic performance of *Coffea* spp. under long-term enhanced [CO₂]. **PLoS One**, [s.l.], v. 8, p. 82712, 2013.
- RAN1. Primeiro Relatório de Avaliação Nacional sobre Mudanças Climáticas, 2013. Base científica das mudanças climáticas, 197 p.
- RATAJCZAK, L.; RATAJCZAK, W.; MAZUROWA, H. The effect of different carbon and nitrogen sources on the activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in lupine embryonic axes. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 51, n. 3, p. 277-280, 1981.
- REDDY, K. R.; ZHAO D. Interactive effects of elevated CO₂ and potassium deficiency on photosynthesis, growth, and biomass partitioning of cotton. **Field Crops Research**, [s.l.], v. 94, 201-213, 2005.
- ROBERTNTZ, P.; LINDER, S. Effects of long-term CO₂ enrichment and nutrient availability in Norway spruce. II. **Foliar chemistry. Trees**, [s.l.], v. 14, p. 17-27, 1999.

- RODRIGUES, W. P. *et al.* Long-term elevated air [CO₂] strengthens photosynthetic functioning and mitigates the impact of supra-optimal temperatures in tropical *Coffea arabica* and *C. canephora* species. **Global Change Biology**, [s.l.], v. 22, p. 415-431, 2016.
- RUIZ-VERA, U. M. *et al.* The Role of Sink Strength and Nitrogen Availability in the Down-Regulation of Photosynthetic Capacity in Field-Grown *Nicotiana tabacum* L. at Elevated CO₂ Concentration. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 8, 9 jun. 2017.
- SALLAS, L.; LUOMALA, E. M.; ULTRIAINEN, J.; KAINULAINEN, P.; HOLOPAINEN, J. K. Contrasting effects of elevated carbon dioxide concentration and temperature on Rubisco activity, chlorophyll fluorescence, needle ultrastructure and secondary metabolites in conifer seedlings. **Tree Physiology**, [s.l.], v. 23, p. 97-108, 2003.
- SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 101, n. 1, p. 7, 1993.
- SCHREIBER, U. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: An overview. *In: GC Papageorgiou Govindjee*. Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. The Netherlands: Springer, 2004. p. 279-319,
- SHARKEY, T. D. Estimating the rate of photorespiration in leaves. **Physiologia Plantarum**, [s.l.], v. 73, n. 1, p. 147-152, 1988.
- SHARKEY, T. D. What gas exchange data can tell us about photosynthesis. **Plant, Cell & Environment**, [s.l.], v. 39, n. 6, p. 1161-1163, 2016.
- SMITH, A. M.; STITT, M. Coordination of carbon supply and plant growth. **Plant, Cell and Environment**, [s.l.], v. 30, p. 1126-1149, 2007.
- STITT, M. Manipulation of carbohydrate partitioning. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 5, p. 137-143, 1994.
- TENG, N.; WANG, J.; CHEN, T.; WU, X. & LIN, J. Elevated CO₂ induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, [s.l.], v. 172, p. 92-103, 2006.
- TERASHIMA, I.; YANAGISAWA, S.; SAKAKIBARA, H. Plant Responses to CO₂: Background and Perspectives. **Plant and Cell Physiology**, [s.l.], v. 55, p. 237-240, 2014.
- TERCÉ-LAFORGUE, T. *et al.* Resolving the Role of Plant Glutamate Dehydrogenase: II. Physiological Characterization of Plants Overexpressing the Two Enzyme Subunits Individually or Simultaneously. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 54, n. 10, 2013.
- THIEC, D. L.; DIXON, M.; LOOSVELDT, P.; GARREC, J.P. Seasonal and annual variations of phosphorus, calcium, potassium and manganese contents in different cross-sections of *Picea abies* (L.) Karst. needles and *Quercus rubra* L. leaves exposed to elevated CO₂. **Trees**, [s.l.], v. 10, p. 55-62, 1995.

TRETHERWEY, R. N.; SMITH, A. M. Starch metabolism in leaves. *In*: LEEGOOD, R. C.; SHARKEY, T.; VON CAEMERER, S. (Eds.). *Photosynthesis: physiology and metabolism*. Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 205-231.

URBAN, L.; ALPHONSOUT, L. Girdling decreases photosynthetic electron fluxes and induces sustained photoprotection in mango leaves. **Tree Physiology**, [s.l.], v. 27, p. 345-352, 2007.

URBAN, L.; LÉCHAUDEL, M.; LU, P. Effect of fruit load and girdling on leaf photosynthesis in *Mangifera indica* L. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 55, p. 2075-2085, 2004.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, Kidlington, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000.

VERHAGE, F. Y. F.; ANTEN, N. P. R.; SENTELHAS, P. C. Carbon dioxide fertilization offsets negative impacts of climate change on Arabica coffee yield in Brazil. **Climatic Change**, [s.l.], v. 144, p. 671-685, 2017.

VURRO, E.; BRUNI, R.; BIANCHI, A.; TOPPI, L. S. Elevated atmospheric CO₂ decreases oxidative stress and increases essential oil yield in leaves of *Thymus vulgaris* grown in a mini-FACE system. **Environmental and Experimental Botany**, [s.l.], v. 65, p. 99-106, 2009.

WALTER, A.; SILK, W. K.; SCHURR, U. Environmental effects on spatial and temporal patterns of leaf and root growth. **Annual Reviews on Plant Biology**, [s.l.], v. 60, p. 279-304, 2009.

WEST, P. C. *et al.* Leverage points for improving global food security and the environment. **Science**, [s.l.], v. 345, n. 6194, 2014.

WHITNEY, S. M. *et al.* Improving recombinant Rubisco biogenesis, plant photosynthesis and growth by coexpressing its ancillary RAF1 chaperone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 112, n. 11, p. 3564–3569, 2015.

WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 52, n. 1, p. 659-688, 2001.

WINGLER, A. *et al.* Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. **Philosophical Transaction of the Royal Society**, Elmsford, v. 355, n. 1402, p. 1517-1529, 2000.

WMO. World Meteorological Organization. Greenhouse Gas Bulletin: the state greenhouse gases in the atmosphere based on global observation through 2018. **Weather Climate Water, Bulletin**, n. 15, 2019.

WOLFE, D. W.; GIFFORD, R. M.; HILBERT, D.; LUO, Y. Integration of photosynthetic acclimation to CO₂ at the whole-plant level. **Global Change Biology**, [s.l.], v. 4, p. 879-893, 1998.

WOODWARD, F. I. Potential impacts of global elevated CO₂ concentrations on plants. **Current Opinion in Plant Biology**, [s.l.], v. 5, p. 207-211, 2002.

XU, Z.; JIANG, Y.; JIA, B.; ZHOU, G. Elevated-CO₂ response of stomata and its dependence on environmental factors. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 7, p. 657, 2016.

YEMM, E. W.; COCCKING, E. C. The determination of amino acid with ninhydrin. **Analyst**, London, v. 80, p. 209-213, 1955.