

EUNICE REIS BATISTA

**Respostas fisiológicas e metabólicas de  
duas cultivares de *Coffea arabica* L.  
submetidas a atmosferas enriquecidas  
em CO<sub>2</sub> em Câmaras de Topo Aberto e  
sistema FACE**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2015

EUNICE REIS BATISTA

**Respostas fisiológicas e metabólicas de  
duas cultivares de *Coffea arabica* L.  
submetidas a atmosferas enriquecidas  
em CO<sub>2</sub> em Câmaras de Topo Aberto e  
sistema FACE**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. MÁRCIA REGINA BRAGA

CO-ORIENTADOR: DR. EMERSON ALVES DA SILVA

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA e MEMÓRIA**

Batista, Eunice Reis

B333m Respostas fisiológicas e metabólicas de duas cultivares de *Coffea arabica* L. submetidas a atmosferas enriquecidas em CO<sub>2</sub> em Câmaras de topo aberto e sistema FACE / Eunice Reis Batista -- São Paulo, 2015.

142 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2015

Bibliografia.

1. Rubiaceae. 2. Mudanças climáticas. 3. CO<sub>2</sub> elevado. I. Título

CDU: 582.972

## ***Agradecimentos***

*À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pela grande oportunidade de aprimoramento profissional, recursos financeiros ao projeto e suporte financeiro pessoal*

*À Fapesp por recursos financeiros ao projeto*

*Ao Alfredo meu marido e à minha filha querida, Tereza, que foram compreensíveis e colaborativos sempre*

*À minha querida mãe Leonilda e irmã Elisangela que se dispuseram a cuidar da Tereza na ausência de seus pais, assim como também minha amiga Leni*

*A toda a equipe que esteve envolvida no projeto ClimapestFACE pelo apoio*

*À Rosa Frighetto minha colega de Embrapa que eu admiro e respeito por sua seriedade e competência e por ter estado sempre disposta a ajudar do início ao final deste trabalho*

*À Adriana Pires também colega de Embrapa por sua generosidade de inestimável valor no momento final*

*À minhas colegas Dag e Melissa profissionais competentes e sempre colaborativas*

*À minha colega de sala Nilza por compartilhar minhas aflições e desabafos do dia a dia*

*A Isabel Grillo, responsável, pelo setor de gestão de pessoas da Embrapa Meio Ambiente pelo apoio indispensável, assim como os demais colegas de todos os setores*

*Aos pesquisadores envolvidos no CTI, nas chefias de P&D (Marcelo Morandi e Marília Folegatti) e Celso Manzatto, Chefe Geral da Embrapa Meio Ambiente, por todo o apoio recebido*

*Aos pesquisadores e funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo pela infraestrutura laboratorial, à secretária Ana Alice, aos técnicos Mary Monteiro e Pedro pelo apoio, amizade e simpatia*

*Agradeço especialmente ao Tiné pelas observações e auxílio nos cromatógrafos*

*Aos colegas de pós-graduação Fernanda, Daiane, Evandro, Leila, Juliana pela amizade e a de todos os alunos que conheci no laboratório*

*À equipe de alunos de Viçosa-MG, Alice, Leandro, Paulo e Samuel por demonstrarem o que é realmente trabalho em equipe e pela oportunidade de aprender com vocês no FACE*

*Ao Carlos Simamura pela colaboração nas análises de carboidratos*

*À secretaria de pós-graduação do Instituto de Botânica pelos serviços prestados*

*Aos membros do Conselho de Pós-Graduação do Instituto de Botânica pelo apoio prestado*

*Aos meus orientadores Márcia e Emerson por me demonstrarem a importância de me dedicar profundamente àquilo que eu me propuser a fazer*

*Muito obrigada a todos vocês!*

*“A experiência nunca falha,  
apenas as nossas opiniões falham,  
ao esperar da experiência aquilo  
que ela não é capaz de oferecer”*

*Leonardo da Vinci*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 EFEITOS DO CO <sub>2</sub> ELEVADO SOBRE A FOTOSÍNTESE, O CRESCIMENTO E O METABOLISMO DE PLANTAS .....	2
1.2 EFEITOS DO CO <sub>2</sub> ELEVADO NO METABOLISMO DE DEFESA CONTRA FITOPATÓGENOS.....	9
1.3 O CULTIVO CAFEIEIRO E OS DESAFIOS FRENTE ÀS MUDANÇAS CLIMÁTICAS .....	15
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3. ABORDAGEM EXPERIMENTAL.....</b>	<b>22</b>
3.1 EXPERIMENTO I: ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE CAFEIROS CULTIVADOS EM ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM CO <sub>2</sub> EM CÂMARAS DE TOPO ABERTO (OTCS) .....	22
3.1.1 <i>Material e Métodos</i> .....	22
3.1.1.1 Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental ....	22
3.1.1.2 Curvas de resposta da fotossíntese à luz.....	24
3.1.1.3 Medidas de crescimento .....	24
3.1.1.4 Determinações de carboidratos.....	24
3.1.1.5 Teores de fenólicos solúveis totais .....	26
3.1.1.6 Teores de carbono (C) e nitrogênio (N), razão C/N, discriminação isotópica do carbono ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) e razão <i>pi/pa</i> .....	27
3.1.1.7 Análise estatística.....	27
3.1.2 <i>Resultados</i> .....	27
3.1.3 <i>Discussão</i> .....	41
3.2 EXPERIMENTO II: ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE CAFEIROS EXPOSTOS AO FUNGO CAUSADOR DA FERRUGEM ALARANJADA (HEMILEIA VASTATRIX) E CULTIVADOS EM ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM CO <sub>2</sub> . .....	54
3.2.1 <i>Material e Métodos</i> .....	54
3.2.1.1 Material vegetal, condições de cultivo, inoculação do patógeno e delineamento experimental.....	54

3.2.1.2	Curvas de resposta da fotossíntese à luz.....	55
3.2.1.3	Determinações bioquímicas.....	55
3.2.1.4	Teores de fenólicos solúveis totais .....	55
3.2.1.5	Teores de lignina .....	56
3.2.1.6	Análise estatística .....	56
3.2.2	<i>Resultados</i> .....	57
3.2.3	<i>Discussão</i> .....	71
3.3	EXPERIMENTO III: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE CAFEEIROS CULTIVADOS SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CO <sub>2</sub> EM ESTRUTURAS DO TIPO “FREE AIR CARBON ENRICHMENT” (FACE) .....	77
3.3.1	<i>Material e Métodos</i> .....	77
3.3.1.1	Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental .....	77
3.3.1.2	Taxas de assimilação líquida de carbono e eficiência intrínseca do uso da água (EIUA). .....	79
3.3.1.3	Análise quantitativa de carboidratos.....	79
3.3.1.4	Teores de fenólicos solúveis totais .....	80
3.3.1.5	Teores de lignina .....	80
3.3.1.6	Teores de Carbono (C) e Nitrogênio (N), Razão C/N, discriminação isotópica do carbono ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) e razão <i>pi/pa</i> .....	81
3.3.1.7	Análise estatística .....	81
3.3.2	<i>Resultados</i> .....	81
3.3.3	<i>Discussão</i> .....	97
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>104</b>
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>105</b>

## RESUMO

O café é um dos principais produtos de exportação do agronegócio brasileiro, no entanto, as principais variedades de *Coffea arabica* cultivadas são suscetíveis ao fungo biotrófico *Hemileia vastatrix*, causador da ferrugem alaranjada, doença que provoca significativas perdas na produção. A atual preocupação com o cenário de mudanças climáticas tem motivado a realização de estudos sobre impactos das alterações ambientais previstas no cultivo cafeeiro e na interação planta-patógeno. Este trabalho teve por objetivos avaliar o efeito de atmosferas enriquecidas de CO<sub>2</sub> em *Coffea arabica* comparando-se as cultivares Catuaí vermelho IAC-144 e Obatã vermelho IAC-1669, respectivamente suscetível e resistente à ferrugem. Foram conduzidos três experimentos, sendo dois deles em Câmaras de Topo Aberto (Open Top Chambers, OTCs) nas concentrações atmosféricas ambiente (380ppm) e o de elevado CO<sub>2</sub> (760 ppm), com duração de 100 e 45 dias, respectivamente, e com inoculação dos cafeeiros pelo fungo *Hemileia vastatrix* apenas no segundo experimento. O 3º experimento foi realizado sob condições de campo no primeiro sistema de enriquecimento atmosférico de CO<sub>2</sub> ao ar livre (FACE) da América Latina instalado no campus experimental da Embrapa Meio Ambiente de Jaguariúna, SP, no qual os cafeeiros das duas cultivares foram submetidos a concentrações atual (~380ppm) e de 550 ppm de CO<sub>2</sub> ao longo de 27 meses de cultivo. No primeiro experimento, realizado em OTCs, foi observado aumento nas taxas de assimilação de carbono sob condições de elevado CO<sub>2</sub>, principalmente na cultivar Catuaí, porém sem efeitos significativos sobre o crescimento. Os teores de carboidratos aumentaram até os 46 dias, sendo que a cv. Catuaí acumulou maiores teores de glicose e frutose enquanto a cv. Obatã acumulou maiores teores de amido. A aclimação fotossintética ocorreu simultaneamente ao acúmulo de amido, sendo observada redução dos teores de nitrogênio nas duas cultivares. Os teores de <sup>15</sup>N e C variaram de acordo com a disponibilidade de CO<sub>2</sub> atmosférico, com reflexos significativos na composição isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e de discriminação isotópica do carbono ( $\Delta^{13}\text{C}$ ). No segundo experimento, as medidas de taxas de fotossíntese realizadas após o ciclo da infecção pelo fungo *H. vastatrix* foram maiores em todos os cafeeiros cultivados na concentração elevada de CO<sub>2</sub>. Também foram verificados aumentos dos teores de açúcares solúveis totais (AST), amido, fenólicos solúveis totais (FST) e lignina e diminuição dos teores de glicose, frutose, sacarose, rafinose, estaquiose e de açúcares

redutores (AR) em cafeeiros suscetíveis (Catuaí) não inoculados com o patógeno. Quando foram inoculados com o patógeno, esses cafeeiros, apresentaram redução dos teores de AST, glucose, frutose e lignina e elevação dos teores de AR e amido e não apresentaram variações nos teores de sacarose, rafinose e estaquiose. Não foi observada alteração na severidade dos sintomas causados por *Hemileia vastatrix* nos cafeeiros suscetíveis crescidos em alto de CO<sub>2</sub> em comparação com aqueles mantidos na concentração atmosférica ambiente. O 3º experimento indicou que o aumento da concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> nos cafeeiros cultivados no sistema FACE não influenciou significativamente as concentrações foliares de carboidratos, de fenólicos solúveis totais e de lignina, nas duas cultivares ao longo do período de 27 meses. Por outro lado, propiciou o aumento das taxas de fotossíntese do cafeeiro, principalmente no período quente e úmido, contribuindo ainda para a elevação da eficiência intrínseca do uso da água. Adicionalmente, o aumento da discriminação isotópica de carbono indicou influência positiva da maior concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> na assimilação de carbono em todos os cafeeiros. Em resumo, as cultivares de cafeeiro estudadas responderam ao incremento da concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> com aumento na fotossíntese, porém este incremento não resultou em melhora de resistência ao fungo causador da ferrugem do café quando cultivado em OTCs.

## ABSTRACT

Coffee is one of the main commodities of the Brazilian agribusiness but most cultivars of *Coffea arabica* are susceptible to the fungus *Hemileia vastatrix*, the causal agent of the coffee rust disease, with negative impacts on coffee production. The current concerns with the scenario of climate changes have stimulated studies on impacts of environmental changes on coffee cultivation and its interaction with the pathogen. This work aimed to evaluate the effect of CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres on two cultivars of *Coffea arabica*, comparing the susceptible cultivar red Catuaí 144 IAC with the resistant one IAC 1669 red Obatã. Three different experiments were carried out, two of them in Open Top Chambers (OTCs) under ambient (380ppm) and high CO<sub>2</sub> atmosphere (760 ppm), for 100 and 45 days, respectively, and the second one with *H. vastatrix* inoculation. The third experiment was performed under field conditions in the first free air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE) system in Latin America, installed in the Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, Brazil, in which coffee cultivars were subjected to current concentration (~ 380ppm) and CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere (550 ppm) for 27 months. We evaluated the net carbon assimilation rates and the contents of primary and secondary metabolites. In the first experiment conducted in OTCs, an increase in carbon assimilation was observed under high CO<sub>2</sub> conditions, mainly in the cultivar Catuaí, but without significant effects on growth. Carbohydrate levels increased until the 46<sup>th</sup> day, with accumulation of glucose and fructose in the Catuaí cultivar when compared with the Obatã, which stored predominantly starch. The photosynthetic acclimation occurred simultaneously to the accumulation of starch, following the reduction in the levels of nitrogen in both cultivars. The levels of <sup>15</sup>N and C varied according to the availability of atmospheric CO<sub>2</sub>, with significant effects on isotopic composition ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) and carbon isotope discrimination ( $\Delta^{13}\text{C}$ ). In the second experiment, the net photosynthetic assimilation was measured after infection by the fungus *H. vastatrix*, being higher in both cultivars under elevated CO<sub>2</sub>. Increased levels of total soluble sugars (AST), starch, soluble total phenolic (FST) and lignin and reduction of glucose, fructose, sucrose, raffinose, stachyose and reducing sugars (AR) were observed in susceptible coffee (Catuaí) not inoculated with the pathogen. Plant inoculation with the pathogen led to a reduction in the levels of AST, glucose, fructose and lignina and increasing in AST and starch with no changes in sucrose, raffinose and stachyose. No changes were observed in the severity of symptoms

caused by *H. vastatrix* on the susceptible cultivar under high CO<sub>2</sub> when compared to ambient atmospheric concentration. The third experiment indicated that the atmospheric CO<sub>2</sub> concentration in the FACE system did not influence significantly the foliar concentrations of carbohydrates, total soluble phenolic and lignin, in both cultivars over the period of 27 months. On the other hand, the increase in the atmospheric CO<sub>2</sub> led to increased photosynthesis rates of the coffee trees, mainly during warm and rainy seasons, contributing to the elevation of the intrinsic water use efficiency. Additionally, the increased carbon isotope discrimination indicated positive influence of increased atmospheric CO<sub>2</sub> concentration in carbon assimilation in both cultivars. In conclusion, the coffee cultivars responded to the elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration increasing photosynthesis, but this increase did not result in resistance improvement to the coffee rust fungus when coffee was grown on OTCs.

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente é fato amplamente aceito que a concentração de dióxido de carbono no ar atmosférico [CO<sub>2</sub>] tem aumentado nos últimos dois séculos, devido principalmente às emissões associadas à queima de combustíveis fósseis e da cobertura florestal. As medições indicaram que entre 2005 e 2014, a média anual de aumento do CO<sub>2</sub> atmosférico foi de 2,11 ppm, o que corresponde a mais que o dobro das taxas verificadas no período de 1965 a 1974 (<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/> e <http://www.co2now.org>). Estima-se que a [CO<sub>2</sub>] aumenta cerca de 1% ao ano e nesse ritmo, segundo a simulação de modelos climáticos, as concentrações poderão atingir entre 600 e 750ppm em 90 anos (IPCC, 2013).

A temperatura média global aumentou 0,4% entre 1992 e 2010 (Guia Rio+20) e os modelos sugerem que a temperatura média da atmosfera terrestre aumentará de 1,5 a 4°C neste século, ocasionando derretimento de parte do gelo das calotas polares, elevando o nível oceânico trazendo inúmeros prejuízos para a humanidade e para os ecossistemas principalmente das zonas litorâneas. Também serão observadas alterações na umidade atmosférica, nos regimes de precipitação e na circulação atmosférica e oceânica (Buckeridge *et al.*, 2007; IPCC, 2013).

Em setembro de 2013, o Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas (PBMC), criado em 2009 pelos ministérios do Meio Ambiente (MMA) e da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), divulgou o primeiro relatório de avaliação nacional (RAN1). Este é o mais completo diagnóstico já produzido sobre as tendências do clima futuro no país. As previsões apontam para um aumento em todas as regiões do Brasil, de 3 a 6°C até 2100. Sugere, ainda, que os índices pluviométricos apresentarão reduções em quase todos os biomas, tanto no inverno quanto no verão, com exceção dos Pampas e da Mata Atlântica (apenas a porção da região sudeste) em que a precipitação será maior (RAN1, 2013).

Uma das alternativas de mitigação das mudanças climáticas é o sequestro do carbono atmosférico, cujo mecanismo mais eficiente é a fotossíntese (Buckeridge & Aidar, 2002), processo no qual a energia luminosa solar é utilizada e armazenada na síntese de compostos carbonados que servirão como fonte de energia para a própria planta e todas as formas de vida (Taiz & Zeiger, 2010). Estima-se que 40% da massa seca de uma planta consiste em carbono fixado na fotossíntese (Lambers *et al.*, 2008). Sendo assim, o estudo da fotossíntese e do metabolismo de compostos de carbono de plantas

expostas à elevadas concentrações de CO<sub>2</sub> estão relacionados à potencialidade de um aumento na produção agrícola (Cure & Acock, 1986) e de alterações no funcionamento de plantas e ecossistemas (Mooney *et al.*, 1991), contribuindo na elaboração de estratégias adaptativas às novas condições climáticas.

### 1.1 Efeitos do CO<sub>2</sub> elevado sobre a fotossíntese, o crescimento e o metabolismo de plantas

As plantas inicialmente percebem e respondem ao aumento na concentração de CO<sub>2</sub> através do aumento na assimilação fotossintética e da redução na condutância estomática, e todos os outros efeitos do CO<sub>2</sub> elevado em plantas derivam dessas duas respostas fundamentais (Ainsworth & Rogers, 2007). A alteração na concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> só pode ser percebida nas plantas por tecidos que estejam expostos ao ar. A presença da cutícula protetora em folhas e outros órgãos fotossintéticos de plantas superiores indica que apenas a superfície interna das células-guarda dos estômatos e células do mesofilo podem perceber diretamente mudanças na concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico (Long *et al.*, 2004).

Nos cloroplastos, 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 um elétron para a cadeia de transporte de elétrons que o liga ao fotossistema I. Os prótons produzidos pela oxidação da água, que ocorre no lúmen das tilacóides, geram um gradiente eletroquímico através da membrana da tilacóide, o que se torna uma força motora para a fosforilação de ADP em ATP. No fotossistema I, ocorre a redução de NADP<sup>+</sup> em NADPH. Ambos, ATP e NADPH são utilizados nas reações subsequentes da fotossíntese, o ciclo de redução de carbono ou Ciclo de Calvin. O processo de fixação de carbono se dá pela carboxilação da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP, um açúcar de cinco carbonos) pela enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), formando duas moléculas de 3-fosfoglicerato. Este é reduzido a triose-fosfato, processo que consome ATP e NADPH (Lambers *et al.*, 2008; Taiz & Zeiger, 2010).

A Rubisco é considerada a proteína mais abundante do planeta, constituindo até 50% das proteínas encontradas em uma folha (Andersson & Backlund, 2008). Além da

importante função que exerce, essa grande quantidade é também necessária por ser a Rubisco um catalisador ineficiente (Parry *et al.*, 2008). Competitivamente, a Rubisco catalisa também a oxigenação da RuBP, no processo denominado fotorrespiração. A Rubisco tem maior afinidade pelo CO<sub>2</sub>, porém, o O<sub>2</sub> ocorre em concentração cerca de 550 vezes maior que o primeiro, 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 CO<sub>2</sub> atmosférico (Lambers *et al.*, 2008). Uma vez que esta reação com o oxigênio é inibida competitivamente pelo CO<sub>2</sub>, espera-se que, se a fotossíntese estiver limitada pela Rubisco, um aumento da concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> de 350 ppm para 700 ppm aumente a taxa de assimilação em torno de 78% a 25°C. Se a fotossíntese estiver limitada pela regeneração de seu substrato, a RuBP, esta deve se beneficiar apenas do deslocamento da reação de oxigenação e, portanto, com o mesmo aumento na concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> deve aumentar apenas em torno de 27% a 25°C. Se a fotossíntese estiver limitada pela troca de trioses fosfato/ Pi com o citoplasma, esta não deve aumentar com o incremento na concentração de CO<sub>2</sub> atmosférica (Stitt, 1991).

As respostas de plantas à maior concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> são classificadas em dois tipos, de acordo com o período de exposição. As respostas de curto prazo são imediatas, observadas após uma exposição de segundos a minutos ao CO<sub>2</sub> elevado. As respostas de longo prazo surgem após dias ou semanas em exposição ao elevado CO<sub>2</sub> (Sasek *et al.*, 1985; Sage *et al.*, 1989; Wolfe *et al.*, 1998).

A aquisição de CO<sub>2</sub> pelas plantas envolve a difusão deste gás da atmosfera para os espaços intercelulares do mesófilo foliar, através dos estômatos, e subsequentemente para os cloroplastos, onde a fixação do CO<sub>2</sub> em compostos orgânicos cria o gradiente de concentração que gera a difusão (Evans & Loreto, 2000).

Os isótopos estáveis de carbono <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C não estão distribuídos igualmente na matéria, devido ao fracionamento durante processos físicos, químicos e biológicos envolvendo o ciclo desse elemento. As plantas são normalmente reduzidas em <sup>13</sup>C devido ao fracionamento isotópico durante a fixação fotossintética do CO<sub>2</sub>. Assim a abundância de isótopos de C se tornou ferramenta clássica para distinguir vias fotossintéticas diferentes sendo que plantas C3 exibem maior variação isotópica de δ<sup>13</sup>C (Brugnoli & Farquhar, 2000)

A discriminação contra o isótopo pesado (Δ<sup>13</sup>C) ocorre durante a fixação

fotossintética do C (Farquhar *et al.*, 1989) e está refletida nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  dos tecidos vegetais. Em plantas C3, o valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  é altamente dependente da razão entre as pressões intercelular e atmosférica do  $\text{CO}_2$  ( $pi/pa$ ) prevalecente no momento em que o carbono foliar foi assimilado. Essa razão representa o balanço entre a taxa de difusão de  $\text{CO}_2$  controlada pela condutância estomática ( $g_s$ ) e a assimilação de  $\text{CO}_2$  determinada pela fotossíntese (Farquhar, 1982; 1989; Evans *et al.*, 1986). Há uma relação linear entre  $pi/pa$  e  $\Delta^{13}\text{C}$ , ou seja, quando  $pi/pa$  é baixa,  $\Delta^{13}\text{C}$  é governada por fracionamento difusional enquanto que se  $pi/pa$  é elevada então  $\Delta^{13}\text{C}$  é governada por fracionamento devido à carboxilação (Farquhar & Sharkey, 1982). Assim a discriminação isotópica do carbono ( $\Delta$ ), é considerada uma medida integrada dos eventos bioquímicos da planta e das condições ambientes preponderantes, correlacionando-se com as variações das taxas fotossintéticas (Condon *et al.*, 1987; Farquhar *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1990). Dos dois isótopos estáveis do carbono,  $^{13}\text{C}$  e  $^{12}\text{C}$ , o pesado, em virtude dos efeitos de massa, difunde-se e reage (carboxilação pela Rubisco) em velocidades menores em relação ao isótopo  $^{12}\text{C}$ . Portanto, as plantas podem discriminar o  $^{13}\text{C}$  durante a fixação fotossintética do  $\text{CO}_2$ , em relação ao reservatório de carbono na atmosfera (Farquhar *et al.*, 1989). Independentemente do  $\text{CO}_2$  atmosférico utilizado na fotossíntese,  $\Delta^{13}\text{C}$  difere de  $\delta^{13}\text{C}$  por descrever somente mudanças na composição isotópica induzidas pela planta (Farquhar & Richards, 1984).

A avaliação da abundância natural de isótopos estáveis tais como  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  possibilita a compreensão da ciclagem desses nutrientes entre os diferentes compartimentos da natureza, nos mais diferentes ecossistemas e em diferentes escalas espaço-temporais apresentando, portanto, um caráter de variáveis integradoras de processos ecofisiológicos (Bassirirad, 2003; Esmeyer-Liu *et al.*, 2012; Sah & Brumme, 2003; Zak *et al.*, 2011).

Enquanto a diminuição da razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  apresenta um lento mas contínuo decréscimo em escala global, os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  apresentam ampla variação espacial, tanto em escala global quanto local, e estão relacionadas a diferenças entre fontes e estratégias de aquisição de nitrogênio, tipos de vegetação, deslocamento de espécies sendo portanto considerados bons bioindicadores em estudos de ciclagem desse nutriente (Esmeyer-Liu *et al.*, 2012; Fertig *et al.*, 2010). Em plantas, o processo de fracionamento contra o isótopo mais pesado  $^{15}\text{N}$  pode ocorrer durante a assimilação de N na forma de  $\text{NH}_x$  ou  $\text{NO}_x$  e pode diminuir quando N não é abundante (Hobbie & Ouimette, 2009;

Esmeyer-Liu *et al.*, 2012).

No contexto das mudanças climáticas, alguns estudos foram conduzidos no sentido de se avaliar possíveis alterações na ciclagem de C e N. Esmeyer *et al.* (2012) encontraram correlações significativas entre a diluição atmosférica de  $\delta^{13}\text{CO}_2$  e os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  em diferentes órgãos e espécies vegetais, bem como, entre o aumento da deposição atmosférica de N e os valores de  $\delta^{15}\text{N}$ . Sah & Brumme (2003) avaliaram a abundância natural de  $^{15}\text{N}$  e de  $^{13}\text{C}$  em solos e folhas de *Pinnus* ao longo de gradientes altitudinais, verificando que a composição isotópica estaria estreitamente relacionada a disponibilidade local de N. Cernusak *et al.* (2009) avaliaram o efeito de elevadas concentrações atmosféricas de  $\text{CO}_2$  na assimilação de N em espécies arbóreas leguminosas e não leguminosas. Os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  diminuíram em resposta ao  $\text{CO}_2$  elevado; o teor foi ainda menor em espécies leguminosas e variou entre as espécies estudadas dependendo do “status” nutricional e hídrico.

Foram descritos na literatura trabalhos utilizando análises isotópicas de  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$  para interpretar respostas fisiológicas de cafeeiros submetidos a estresses ambientais. Carelli *et al.* (1999), por exemplo, analisaram os valores de  $\Delta^{13}\text{C}$  em folhas de *Coffea* sp. cultivados em diferentes níveis de irradiância. Os resultados indicaram que o decréscimo de  $\Delta^{13}\text{C}$  esteve mais fortemente associado ao aumento das taxas fotossintéticas ( $A$ ) do que ao aumento da condutância estomática ( $g_s$ ). Os valores de  $\Delta^{13}\text{C}$  foram negativamente correlacionados aos valores de  $A$  e  $g_s$  bem como ao aumento dos teores foliares de N. Silva *et al.* (2004) verificaram em cafeeiros cv. Catuaí vermelho que os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  indicaram alta correlação negativa entre  $A$  e  $\Delta^{13}\text{C}$  em folhas, concluindo que  $\Delta^{13}\text{C}$  seria um bom parâmetro indicador de respostas de cafeeiros a limitações ambientais. Aumentos em  $\Delta^{13}\text{C}$  e na razão  $pi/pa$  na época fria sugeriram menor capacidade de assimilação de  $\text{CO}_2$ .

De acordo com Farquhar (1989), valores mais negativos de  $\delta^{13}\text{C}$  podem ser decorrentes de altos valores de  $g_s$  ou de menores valores de  $A$ , os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  estão correlacionados negativamente à razão  $c_i/c_a$  ( $\text{CO}_2$  intercelular/ $\text{CO}_2$  atmosférico). Em plantas C3, os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  da biomassa vegetal são bons indicadores de  $c_i$  em intervalos de tempo maiores que aqueles obtidos pela medida instantânea de trocas gasosas. O valor de  $c_i$  reflete a relação entre  $g_s$  e  $A$  e, conseqüentemente, fornece informação sobre a eficiência instantânea do uso da água (EIUA). Se  $c_i$  é alta então  $g_s$  é menor em relação à  $A$  e há maior discriminação do isótopo  $^{13}\text{C}$  pela Rubisco logo  $\Delta^{13}\text{C}$  é

direta e positivamente correlacionado a  $c_i$ . Se  $c_i$  é menor então mais isótopos  $^{13}\text{C}$  são fixados pela Rubisco e os valores de  $\Delta^{13}\text{C}$  então são menores (Lambers *et al.*, 2008).

Recentemente Farquhar e Cernusak (2012) incluíram no modelo de  $\Delta^{13}\text{C}$  uma correção decorrente da influência da transpiração na difusão do  $\text{CO}_2$  entre a atmosfera e os espaços intercelulares, nesse caso o efeito denominado “ternário” se refere à interação tripla dos gases  $\text{CO}_2$ , vapor d’água e ar. No caso das plantas  $\text{C}_3$ , os efeitos ternários incorporados ao modelo de  $\Delta^{13}\text{C}$  têm implicações na determinação da condutância do mesófilo a partir de medidas acopladas de  $\Delta^{13}\text{C}$  e de trocas gasosas foliares (Cernusak *et al.*, 2013).

Quando as plantas são cultivadas em alto  $\text{CO}_2$  existe um estímulo inicial da fotossíntese, mas este pode ser perdido ou diminuído. Esta redução da capacidade fotossintética da folha é denominada de regulação negativa e pode limitar o potencial das plantas de mitigar os efeitos danosos do excesso de  $\text{CO}_2$  na atmosfera (Stitt, 1991; Sage, 1994; Drake *et al.* 1997; Norby *et al.*, 1999).

O armazenamento do carbono assimilado na fotossíntese ocorre através da síntese de carboidratos, compostos produzidos em grande quantidade pelas plantas e que possuem altas proporções de carbono. Enquanto a maior parte da triose-fosfato produzida no Ciclo de Calvin é utilizada para regenerar a RuBP, processo que consome ATP, 1/6 da triose-fosfato é de fato direcionada para a produção de sacarose e amido (Leegood *et al.*, 2000; Lambers *et al.*, 2008).

Os processos de síntese de sacarose e amido estão fortemente ligados às taxas de assimilação de  $\text{CO}_2$  pela troca de trioses fosfato e fosfato inorgânico através da membrana do cloroplasto (Foyer *et al.*, 2000). As trioses-fosfato são exportadas ao citosol para a síntese de sacarose, que é utilizada nas folhas e alocada para órgãos heterotróficos da planta como raízes, frutos e tubérculos. As trioses-fosfato também podem ser retidas nos cloroplastos e serem direcionadas para a síntese de amido transitório, funcionando como um sistema de escape para manter a taxa de fotossíntese quando as taxas de síntese e exportação de sacarose foram atingidas (Flugge, 2000; Trethewey & Smith, 2000). A assimilação da planta geralmente é suficiente para a demanda imediata do crescimento (a partir da síntese e mobilização da sacarose), mas também para acumular compostos na folha (síntese de amido transitório). O amido é o carboidrato de reserva mais abundante nas plantas em termos de quantidade, universalidade e distribuição entre espécies. Durante à noite subsequente ao período de assimilação, o amido transitório é degradado

gerando substratos que serão utilizados na síntese de sacarose. Este açúcar proverá esqueletos de carbono e energia tanto para as células foliares quanto para os tecidos não fotossintetizantes. Portanto, a partir da degradação noturna do amido dá-se continuidade à provisão do carbono necessária ao crescimento da planta (Smith & Stitt, 2007)

A elevação do CO<sub>2</sub> atmosférico, em geral, promove o crescimento das plantas e o incremento de biomassa vegetal pelo aumento da taxa de fotossíntese e da eficiência no uso da água (Long *et al.*, 2004). O crescimento pode ser definido como aumento de massa seca, volume, área ou comprimento e, portanto, dependente da produção primária (Lambers *et al.*, 2008). O aumento de CO<sub>2</sub> atmosférico pode afetar os processos biológicos em diferentes níveis de organização, sendo que os controles fisiológicos e ecológicos são os estudados há mais tempo (Ainsworth & Rogers, 2007). A relação entre a taxa de fotossíntese e o crescimento não é direta, ou seja, quanto maior a fotossíntese maior o crescimento, mas sim de retroalimentação (feedback), onde não só a taxa fotossintética pode modificar o crescimento, mas também, a taxa de crescimento pode influenciar a taxa fotossintética. A base deste mecanismo é que a alta concentração de fotoassimilados aumenta a capacidade dos drenos já existentes e estimula a formação de novos drenos. A incapacidade do organismo de criar novos drenos (ou aumentar os existentes) leva ao acúmulo de carboidratos nas folhas o que resulta na inibição da taxa fotossintética (Stitt 1991, Paul & Foyer 2001, Paul & Pellny 2003; Smith & Stitt, 2007). O que tem sido visto é que o efeito do CO<sub>2</sub> sobre a taxa de crescimento ou é pequeno, quando medido no final do experimento, ou começa maior e termina igual ou menor do que a concentração ambiente, quando realizado ao longo de experimento (den Hertog *et al.* 1996, Makino *et al.* 1999, Centritto *et al.* 1999; Poorter & Nagel, 2000; Ziska, 2003).

Embora seja óbvio que as plantas devem atingir um equilíbrio entre assimilação de carbono, estoque de carbono e crescimento, pouco ainda se sabe sobre como isso é alcançado (Smith & Stitt, 2007). Ao mesmo tempo em que o crescimento é rigorosamente regulado, de modo que é possível identificar o hábito de uma espécie, mesmo em indivíduos submetidos a diferentes condições, o crescimento também deve ser capaz de responder às condições ambientais de modo a otimizar a eficiência de uso dos recursos (Walter *et al.*, 2009). O crescimento, conforme definido por Lambers *et al.* (2008), é o incremento de massa seca, volume, comprimento ou área, e envolve a divisão, expansão e diferenciação celular. É resultado da interação de diversos processos, como as taxas de fotossíntese e respiração, o transporte de assimilados, a disponibilidade de nutrientes do

solo, as relações hídricas da planta e sua fase de desenvolvimento (Walter *et al.*, 2009).

De acordo com Jablonski (2002), plantas cultivadas são mais responsivas ao aumento de [CO<sub>2</sub>] do que plantas em ambiente natural, no entanto, 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 CO<sub>2</sub> normalmente geram incrementos de biomassa e altura nestas plantas, que são respectivamente 49% e 12% maiores do que nas plantas cultivadas em atmosfera ambiente de CO<sub>2</sub> (Poorter & Pérez-Soba, 2002; Ainsworth & Long, 2005).

Os métodos de experimentação para avaliar o efeito do aumento da concentração do CO<sub>2</sub> e também de outros gases podem ser realizados em ambientes controlados. As estufas de topo aberto (Open-Top Chambers – OTC) são uma alternativa para criar um ambiente mais realista. Porém, o microclima em seu interior é alterado pela estrutura de plástico que envolve as estufas, quanto à temperatura, umidade e radiação solar (Ghini, 2005; Long *et al.*, 2006).

Uma vez que diversos autores têm questionado a influência de artefatos em ambientes controlados de avaliação de respostas de plantas ao clima, os resultados mais realistas sobre essas respostas são aqueles relatados em experimentos com estruturas do tipo FACE (do inglês, Free Air Carbon Enrichment). Em tais experimentos, diferentes concentrações de CO<sub>2</sub> são aplicadas sobre áreas extensas de espécies cultivadas sob condições de manejo mais próximas das condições reais (Ainsworth *et al.*, 2008). Nos últimos anos, esse tipo de experimento tem permitido acompanhar o impacto de elevadas concentrações de CO<sub>2</sub> atmosférico durante todo o ciclo de vida sob condições mais representativas das variações climáticas e ecológicas, especialmente no caso de cultivos agrícolas (Leakey *et al.*, 2009).

Em uma revisão, compilando 124 trabalhos realizados em FACE, Ainsworth & Long (2005) verificaram que as taxas fotossintéticas de plantas cultivadas em elevada [CO<sub>2</sub>] aumentaram 28%. Valores similares a este (aumento de 33%) foram encontrados em espécies de gramíneas do tipo C3 em diferentes condições de crescimento. O estudo de Ainsworth & Long (2005) também mostra que ocorre redução na taxa de condutância estomática de aproximadamente 20% e aumento na eficiência do uso da água em até 50%.

Leakey *et al.* (2009) resumem seis principais constatações feitas a partir da análise de diversos experimentos realizados em FACE ao longo de 20 anos: i) aumentos

substanciais na taxa de fotossíntese e produção primária líquida a despeito da regulação da atividade da enzima rubisco; ii) aumento da eficiência do uso de nitrogênio; iii) aumento da eficiência hídrica; iv) estímulo das taxas de respiração noturna; v) não há estímulo direto sobre a fotossíntese de plantas C4 mas, indiretamente, aumenta o rendimento líquido em carbono nas situações de deficiência hídrica; vi) o aumento do rendimento em cultivos agrícolas foi menor do que o esperado. Os autores observaram que, embora essas constatações tenham se baseado em sistemas cultivados, as implicações para os sistemas naturais são igualmente importantes.

Wang *et al.* (2012) resumiram e interpretaram um total de 466 observações em 84 publicações sobre efeitos de CO<sub>2</sub> sobre a fisiologia e crescimento de espécies vegetais sob diferentes faixas de temperatura. Foram reportados efeitos positivos e negativos no acúmulo de biomassa, na maquinaria fotossintética, na concentração de nitrogênio no metabolismo e fotossíntese de espécies do tipo C3, C4, leguminosas e não leguminosas, herbáceas, lenhosas, cultivadas e não cultivadas. Os estudos apontam que os efeitos benéficos da eficiência fotossintética obtida sob elevadas [CO<sub>2</sub>] podem ser contrabalanceados por fatores de estresse, tais como, excesso de chuvas e aumentos de temperatura.

Terashima *et al.* (2014) relataram diversos estudos recentes sobre efeitos de elevadas concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> no desenvolvimento de diferentes espécies vegetais. Os resultados indicaram alterações morfológicas e no desenvolvimento vegetal; mudanças nas relações C/N e nas razões fonte/dreno, alterações no metabolismo e translocação de fotoassimilados e na respiração.

## 1.2 EFEITOS DO CO<sub>2</sub> ELEVADO NO METABOLISMO DE DEFESA CONTRA FITOPATÓGENOS

As modificações morfofisiológicas vegetais associadas ao aumento de temperatura e aumento dos níveis de precipitação resultantes da elevação atmosférica de CO<sub>2</sub> podem alterar os níveis de incidência e severidade de doenças de plantas cultivadas, em decorrência de novas formas de interação patógeno – hospedeiro (Ghini *et al.*, 2008), o que representa um grande desafio à produção de alimentos.

As alterações no metabolismo, crescimento e processos fisiológicos das plantas promovidas pelo incremento de CO<sub>2</sub> influenciam os componentes epidemiológicos das

doenças, devido a alteração no microclima resultando, em longo prazo, por exemplo, em aumento de esporulação e agressividade do patógeno e alteração de resistência levando, em última instância, à seleção de novos patógenos adaptados ao novo ambiente e por consequência novas doenças gerando maiores custos de produção agrícola (Chakraborty, 2008; Ghini, 2005; 2008).

A literatura descreve inúmeros trabalhos que investigaram o efeito de elevada [CO<sub>2</sub>] na ocorrência de doenças em plantas, relatando efeitos positivos, negativos ou nenhuma alteração de acordo com o patossistema analisado. Por exemplo, McElrone *et al.* (2010) constataram aumento da incidência de mancha foliar causada por espécies do gênero *Cercospora* em espécies arbóreas ao longo de cinco anos de exposição a elevadas [CO<sub>2</sub>] em sistema FACE. Esse efeito, segundo os autores, resultou possivelmente de modificações na planta hospedeira, as quais favoreceram o crescimento e reprodução do fungo. Por sua vez, Guo *et al.* (2012) verificaram que os níveis de resistência de tomateiros a *Helicoverpa armigera*, um inseto herbívoro que causa sérios danos às folhas da planta, foram reduzidos, por interferência negativa na síntese de ácido jasmônico e, portanto, na via sinalizadora do jasmonato, interferindo na síntese de diversas substâncias de defesa do vegetal. Melloy *et al.* (2010) avaliaram a produção e desempenho de fungos patógenos em trigo ao longo de dois anos em FACE e observaram que a variedade suscetível ao fungo não foi alterada, enquanto a variedade resistente apresentou aumento de 68% na incidência de doenças. Melloy *et al.* (2014) estudaram a influência de CO<sub>2</sub> atmosférico e temperatura elevados na suscetibilidade de dezesseis genótipos de trigo ao fungo patogênico *Fusarium pseudograminearum* verificando que, sob elevada concentração de CO<sub>2</sub> e temperatura ambiente, houve aumento nos parâmetros de incidência e severidade da doença bem como na biomassa do fungo.

As diferentes respostas observadas indicam quão específica é a natureza da interação patógeno-hospedeiro, daí a necessidade de estudos específicos para diferentes patossistemas em diferentes regiões geográficas a fim de desenvolver cultivares resistentes, novos métodos de controle de doenças e adaptar técnicas de manejo com o objetivo de evitar maiores prejuízos à produção agrícola (Ghini *et al.*, 2008; McElrone, 2010).

A regulação de respostas de defesa vegetal tem sido estudada há décadas, no entanto, poucos estudos abordaram os efeitos da infecção pelo patógeno no metabolismo primário de plantas (Berger *et al.*, 2007). Recentemente o interesse nessa área de

investigação vem aumentando e aspectos como fotossíntese, partição de carbono e regulação das relações fonte-dreno em diferentes interações planta-patógeno têm sido investigados (Berger *et al.*, 2007; Cabello *et al.*, 2014).

Estudos fitopatológicos têm levado em conta o status fisiológico dos tecidos infectados para elucidar os mecanismos da infecção. A ativação de respostas de defesa exige uma alta demanda metabólica na região da infecção devido ao requerimento de esqueletos carbônicos e de energia para a síntese de novas moléculas. As taxas respiratórias do hospedeiro aumentam durante a resposta de defesa, sugerindo elevação do metabolismo para fornecer energia (Bolton, 2009).

As alterações no metabolismo primário durante a resposta imune vegetal foram também evidenciadas por alterações na fotossíntese de folhas infectadas. Scharte *et al.* (2005), por exemplo, verificaram redução das taxas fotossintéticas tanto no sítio de penetração do patógeno quanto nas áreas circunvizinhas durante a resposta de resistência. Em outras interações compatíveis, no entanto, a região do sítio de infecção apresentou elevação da fotossíntese como no caso da infecção de tomate por *Botrytis cinerea* e *Pseudomonas syringae* (Berger *et al.*, 2004).

Uma vez que os patógenos também possuem enzimas glucolíticas extracelulares, e utilizam preferencialmente hexoses ao invés de sacarose (Voegelé *et al.*, 2001), não está claro se interações compatíveis envolvem invertases do fungo ou da própria planta (Berger *et al.*, 2007).

A redução localizada da fotossíntese, em conjunção com aumento da demanda metabólica celular durante o processo de infecção, inicia a transição do status de fonte para dreno dos tecidos infectados (Berger, 2007). Após a inoculação, o teor de sacarose apoplástica aumenta durante horas ao longo da interação compatível (Scharte *et al.*, 2005). O aumento dos teores de sacarose se deve a atividade das enzimas sacarose-sintase e invertases (Ehness *et al.*, 1997). Ambas utilizam a sacarose como substrato para gerar glucose e frutose, que estarão disponíveis para serem utilizadas na produção de energia, macromoléculas e biossíntese de aminoácidos (Roitsch *et al.*, 2003; Koch, 2004; Berger *et al.*, 2007; Vargas and Salerno, 2010). Cabello *et al.* (2014) demonstraram que indivíduos de *Arabidopsis thaliana* mutantes para enzimas invertases e sacarose sintases apresentaram alterações no processamento local e sistêmico de sacarose que comprometeram o desenvolvimento das plantas.

As respostas vegetais ao ataque por fungos patogênicos geralmente estão

conectadas intimamente às vias reguladoras dos níveis de açúcar na célula vegetal, garantindo a homeostase energética (Hey *et al.*, 2010). Os açúcares apresentam papel regulatório afetando todas as fases do ciclo de vida vegetal interagindo com fitormônios e controlando os processos de crescimento e desenvolvimento (Wind *et al.*, 2010; Stokes *et al.*, 2013).

Muitos trabalhos descrevem a importância dos níveis de açúcares na resistência de plantas ao ataque de patógenos fúngicos, porém, seu papel como moléculas sinalizadoras na resposta de defesa vegetal foi descrito mais recentemente, a partir do estudo de mutantes, transgênicos e análise de expressão gênica (Doehlemann *et al.* 2008; Morkunas *et al.* 2011; Bolouri Moghaddam and Van den Eden 2012; Cho *et al.*, 2012; Schenk *et al.*, 2012).

Estudos ecológicos e agronômicos indicaram forte correlação entre concentração de açúcares solúveis e tolerância a estresses (Morkunas, 2014; Rosa *et al.*, 2009). Alguns autores acreditam que o acúmulo de carboidratos possa servir como um sinal metabólico indutor de expressão de genes de defesa e repressores da fotossíntese (Berger *et al.* 2004; Chou *et al.* 2000; Ehness *et al.* 1997; Kocal *et al.* 2008; Roitsch *et al.* 2003; Scholes *et al.* 1994; Sinha *et al.* 2002; Morkunas, 2014).

A hexoquinase (HXK1) é o sensor de glucose mais investigado (Granot *et al.*, 2013; Morkunas, 2014). De acordo com Kim *et al.* (2006), as hexoquinases podem “perceber” as hexoses solúveis e regular a morte celular programada sugerindo uma ligação direta entre metabolismo de carboidratos e respostas de defesa.

Assim como são recentes os trabalhos que analisaram o envolvimento do metabolismo primário nas respostas de defesa vegetal ao ataque de patógeno, também são recentes estudos sobre a influência de CO<sub>2</sub> elevado nessas interações. Por exemplo, Vaughan *et al.* (2014) investigaram o efeito de CO<sub>2</sub> elevado na interação milho e micotoxinas do fungo *Fusarium verticillioides*. Os resultados obtidos indicaram que a redução nos teores de carboidratos observados nas plantas cultivadas em alto CO<sub>2</sub> comprometeu a síntese de compostos de defesa, aumentando a suscetibilidade do hospedeiro ao patógeno.

Diversos estudos já foram desenvolvidos quanto à identificação de genes e de compostos do metabolismo secundário envolvidos na defesa do cafeeiro contra ferrugem. Contudo ainda não foram relatados na literatura estudos sobre alterações do metabolismo primário na interação entre cafeeiros e *H. vastatrix*, seja em atmosfera ambiente, seja em

atmosfera com elevado CO<sub>2</sub>.

O sucesso da defesa da planta no combate à invasão do agente patogênico depende em muito da rapidez e intensidade de resposta. Quando as respostas de defesa são tardias e/ou pouco intensas, a planta hospedeira apresenta suscetibilidade ao agente patogênico e a interação denomina-se compatível. Pelo contrário, quando as respostas de defesa são rápidas e/ou intensas permitem bloquear eficazmente o avanço do agente patogênico, a planta apresenta resistência e a interação denomina-se incompatível (Duhoux & Nicole, 2004; van Loon *et al.*, 2006; Bari & Jones, 2009).

A reação de hipersensibilidade (RH) é uma forma de morte celular programada que consiste na morte rápida das células da planta no local de penetração do agente patogênico (Lecouls *et al.*, 2006; Mur *et al.*, 2008). Embora esta reação de defesa possa constituir, por si só, um mecanismo eficaz de resistência contra os agentes patogênicos biotróficos, como as ferrugens, que dependem de células vivas do hospedeiro para se desenvolverem e reproduzirem, ela é apenas uma parte de toda a estratégia defensiva da planta (Heath *et al.*, 1997).

A RH parece estar associada a uma série de alterações metabólicas integradas e coordenadas entre si, entre as quais se destaca a ativação de determinadas vias metabólicas, como a síntese de compostos fenólicos e algumas fitoalexinas, o aumento de atividade de enzimas oxidativas, o acúmulo de formas reativas de oxigênio e ainda a ativação de genes PR (Heath, 2000; Lecouls *et al.*, 2006; Mur *et al.*, 2008; Ramiro *et al.*, 2009). As modificações estruturais ao nível da parede celular envolvendo a deposição de fenóis e mais tarde a formação de lignina (resultante da polimerização dos fenóis), assim como a incorporação de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e de polissacarídeos, parecem desempenhar um papel importante como barreira à penetração do agente patogênico, sendo muitas vezes associadas à resistência das plantas hospedeiras e não hospedeiras (Nicholson & Hammerschmidt, 1992; Shimada *et al.*, 2006). A importância dos compostos fenólicos na resistência das plantas às doenças, nomeadamente através do reforço da parede celular, da associação à RH, da sua atividade antimicrobiana e também pelo seu envolvimento nos processos de sinalização tem sido reportada na literatura (Nicholson & Hammerschmidt, 1992; Vlot *et al.*, 2009).

Nas plantas, os compostos fenólicos estão envolvidos em respostas ao estresse biótico e abiótico (Santiago *et al.*, 2000; Read *et al.*, 2009) principalmente devido às suas propriedades antioxidantes (Moglia *et al.*, 2008; Shahidi *et al.*, 2010; Gallego-giraldo *et*

*al.*, 2011) exercendo papel fundamental na adaptação a mudanças ambientais (Boudet, 2007) e na coevolução com doenças e pragas (Orians, 2000; Eyles, 2010). Muitos desses compostos têm recebido considerável atenção como potencialmente protetores contra doenças humanas crônico-degenerativas, câncer e distúrbios cardiovasculares (Scalbert *et al.*, 2005; Somporn *et al.*, 2012).

Inúmeros trabalhos discutiram a relação entre o aumento dos níveis de CO<sub>2</sub> na síntese de substâncias oriundas do metabolismo secundário (Lincoln *et al.*, 1993; Hartley *et al.*, 2000; Coviella *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005; Peltonen *et al.*, 2005; Braga *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011; Goufo *et al.*, 2014; Saldanha *et al.*, 2014; Rezende *et al.*, 2015), indicando, por exemplo, que o acúmulo de carbono nessa condição atmosférica ocorre não só na forma de carboidratos mas também na forma de compostos carbonados sintetizados por vias do metabolismo secundário. Os metabólitos secundários compreendem uma imensa categoria de moléculas as quais são sintetizadas pela combinação de um número limitado de blocos construtores que, por sua vez, são derivados do metabolismo primário (Dewick, 2009; Ghasemzadeh *et al.*, 2010). O mecanismo pelo qual elevadas concentrações de CO<sub>2</sub> alteram a síntese e o acúmulo de compostos fenólicos em tecidos vegetais ainda não foi totalmente elucidado, mas provavelmente resulta de alterações do metabolismo primário. Goufo *et al.* (2014), por exemplo, estudaram o efeito de elevado CO<sub>2</sub> nos teores de diversas classes de compostos fenólicos em arroz verificando reduções, com maior ou menor intensidade, de acordo com as cultivares utilizadas. Adicionalmente, Rezende *et al.* (2014) verificaram maior acúmulo de taninos em folhas de goiabeiras cultivadas em elevado CO<sub>2</sub>.

Estudos sobre o efeito de alto CO<sub>2</sub> nos teores de compostos fenólicos e a influência na resposta de defesa vegetal contra o ataque de patógenos indicaram efeitos diversos, de acordo com o patossistema analisado. Por exemplo, o estudo de McElrone *et al.* (2005) mostrou que os parâmetros de incidência e severidade de doença causada pelo fungo *Phyllosticta minima* foram reduzidos em uma espécie arbórea cultivada em CO<sub>2</sub> elevado. Nesse caso, foram observados maiores teores foliares de compostos fenólicos e de taninos em resposta ao CO<sub>2</sub> elevado. Matros *et al.* (2006) verificaram maior nível de resistência ao vírus Y da batata em folhas de tabaco cultivados em alto CO<sub>2</sub>, as quais apresentaram também maiores teores de ácido clorogênico (um composto fenólico rico em carbono) e teores de lignina sem alterações. McElrone *et al.* (2010) verificaram que os níveis de incidência e de severidade de doenças causada por fungos do gênero *Cercospora*

aumentaram em duas espécies arbóreas cultivadas em CO<sub>2</sub> elevado, no entanto, não foram detectadas alterações significativas nos teores foliares de compostos fenólicos.

Conforme indicado na literatura, o envolvimento de compostos fenólicos e lignina na resposta de defesa de cafeeiros contra o fungo causador da ferrugem foi investigado em diversos estudos com plantas cultivadas em CO<sub>2</sub> ambiente (Guzzo, 2004; Gonçalves *et al.*, 2012). No entanto, o efeito do cultivo em elevado CO<sub>2</sub> nos teores desses compostos em folhas de cafeeiros ainda não foi relatado.

### 1.3 O CULTIVO CAFFEEIRO E OS DESAFIOS FRENTE ÀS MUDANÇAS CLIMÁTICAS

O café é a commodity tropical mais comercializada no mundo. Sua cadeia produtiva sustenta 120 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo a vasta maioria pequenos cafeicultores em países em desenvolvimento, representando um valor agregado bruto anual de mais de 458 bilhões de dólares (IOC, 2013). Sua produção perfaz a base econômica de mais de 50 países em desenvolvimento, com influxo de capital estrangeiro que alcança 80% em alguns países africanos. Dentre outras culturas, como chá, cacau e especiarias, o café foi responsável por um terço das expansões observadas nas exportações globais, que triplicaram entre 2000 e 2010, de 29 bilhões para 79 bilhões de dólares (FAO, 2013). O café é um dos principais produtos agrícolas brasileiros representando 30% da produção mundial e o 5º item na pauta de exportação do agronegócio. Em 2013 foram beneficiadas 49 milhões de sacas de 60 kg. Além de maior produtor e exportador o Brasil ocupa a 2ª posição dentre os maiores consumidores mundiais do grão, perdendo apenas para os Estados Unidos (MAPA, 2014).

Dentre as 124 espécies pertencentes ao gênero *Coffea* apenas duas delas, *Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre ex A.Froehner, possuem importância econômica, respondendo por 99% da produção mundial de café (Davis *et al.*, 2011; 2012) sendo que o café arábica responde por cerca de 70% da produção mundial (IOC, 2013). O café arábica teve sua origem nas florestas tropicais da Etiópia, podendo ser encontrado como vegetação de sub-bosque e tendo, dessa forma, desenvolvido mecanismos morfológicos e fisiológicos de adaptação, visando primariamente à sobrevivência e à perpetuação da espécie em tais condições.

A produtividade em grãos verdes do café arábica é fortemente influenciada por oscilações climáticas. Temperaturas acima de 23°C em média resultam no

amadurecimento acelerado levando à perda de qualidade da bebida assim como temperaturas abaixo de 17–18°C reduzem o crescimento, inviabilizando economicamente seu cultivo (Camargo, 2010). A temperatura anual média considerada ótima para a cultura é de 18 a 21°C embora, em algumas regiões como no nordeste brasileiro, temperaturas entre 24 e 25°C resultem em uma produtividade satisfatória (DaMatta & Ramalho, 2006). A elevação da temperatura global média de 1.8°C a 4°C, prevista para o final deste século (IPCC, 2013), impõe uma série de desafios para a produção cafeeira nas próximas décadas (Zullo *et al.*, 2006; Camargo, 2010).

A vulnerabilidade de uma região às mudanças climáticas pode ser avaliada por meio de modelos climáticos globais que se baseiam nas propriedades físicas, químicas e biológicas de seus componentes. Davis *et al* (2012) elaboraram modelos bioclimáticos a partir de três cenários de emissões de CO<sub>2</sub> do IPCC (A1B, A2A, B2A) considerando três intervalos de tempo (2020, 2050, 2080). Os modelos indicaram uma profunda influência negativa na sobrevivência de espécies indígenas de *C. arabica*, localizadas principalmente na Etiópia. As áreas já ocupadas pela espécie seriam reduzidas em 65% no cenário otimista e em 100% no cenário pessimista. As áreas com características bioclimáticas favoráveis à sobrevivência da espécie seriam reduzidas em 38% no cenário otimista e em 90% no cenário pessimista. Sendo o cafeeiro uma espécie altamente sensível ao aumento da temperatura, a redução nas populações indígenas de *C. arabica* previstas nos modelos bioclimáticos significariam a redução da fonte de diversidade genética comprometendo o desenvolvimento de novas linhagens adaptadas a um novo cenário climático.

No Brasil, as estimativas dos modelos climáticos globais observados são de aumento não uniforme na temperatura e diminuição da precipitação que varia em regiões e meses do ano (Hamada *et al.*, 2008). Assad *et al.* (2007) avaliaram os cenários climáticos futuros para nove culturas agrícolas (algodão, arroz, café, cana-de-açúcar, feijão, girassol, mandioca, milho e soja) e as projeções apontam que, com exceção da cana e da mandioca, todas as demais culturas sofrerão uma diminuição da área favorável ao plantio. Para o café, as reduções de produção atingiriam 92% nas regiões atuais de cultivo brasileiras (Assad *et al.*, 2007).

Os efeitos decorrentes do aumento da concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> tais como, excesso de chuvas e aumentos de temperatura, contribuem na alteração dos níveis de incidência e severidade de doenças de plantas cultivadas em decorrência de novas formas

de interação planta - patógeno (Ghini *et al.*, 2008).

Pozza *et al.* (2008) estudaram os impactos das mudanças climáticas em relação à intensidade de doenças fúngicas do cafeeiro. O comportamento das doenças será modificado devido ao aumento de temperatura e a concentração de chuvas em alguns meses do ano. Com o deslocamento do cultivo de café para áreas mais adequadas, podem surgir novas doenças e a seleção de patógenos mais adaptados, que gerariam maiores custos de produção da cultura.

As principais variedades de *C. arabica* cultivadas no Brasil são suscetíveis ao fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome causador da ferrugem que, se não controlada adequadamente, pode causar perdas de 30% a 50% (Zambolim *et al.*, 2002). A luta contra esse parasita tem sido empreendida há muito tempo com o uso de fungicidas protetores cúpricos e/ou fungicidas sistêmicos do grupo dos triazóis com vários inconvenientes ambientais, ecológicos além do custo que chega a representar entre 10% e 20% dos custos de produção (Zambolim *et al.*, 2002; Matiello, 2002).

A ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., ocupa uma posição de destaque na história da fitopatologia. A doença levou à falência a indústria do café no Ceilão, tornando necessária a substituição da produção do café pelo chá (Carvalho *et al.*, 1989). Após a sua constatação em janeiro de 1970 na Bahia, a doença disseminou-se por toda a região cafeeira do Brasil e, em seguida, por todos os países produtores de café das Américas do Sul, Central e do Norte (Zambolim *et al.*, 1997). A primeira raça de *H. vastatrix* constatada no Brasil foi a raça II, em 1970, na Bahia. No mesmo ano, essa raça foi detectada nos Estados do Espírito Santo e Minas Gerais. O fungo *H. vastatrix* teve disseminação muito rápida, a partir da data de sua constatação no país. Parecia que iria tornar as lavouras inviáveis economicamente e as medidas tomadas pelo Governo Brasileiro evidenciaram essa preocupação. Seguindo a sua rápida marcha, em 1971 o fungo *H. vastatrix* raça II alcançou os Estado de São Paulo e Paraná e, posteriormente, outros estados brasileiros com culturas cafeeiras. A sua disseminação foi tão rápida, que num período de cinco a seis anos já tinha se alastrado por todas as regiões cafeeiras do Brasil. Novas raças fisiológicas de ferrugem foram sendo detectadas. Até o presente, foram detectadas, no Brasil, 13 raças fisiológicas de *H. vastatrix* e pelo menos três isolados que poderão, no futuro, ser identificados como novas raças fisiológicas (Fazuoli *et al.*, 2007).

Os sintomas da ferrugem podem ser observados na face inferior das folhas, onde

aparecem manchas de coloração amarelo-pálida, pequenas, de 1 a 3 mm de diâmetro, que evoluem, atingindo até 2 cm de diâmetro, quando então apresentam aspecto pulverulento com produção de uredíniosporos de coloração amarelo-alaranjada. Na face superior das folhas, a doença causa manchas cloróticas amareladas correspondendo aos limites da pústula na face inferior. As folhas atacadas em geral caem prematuramente, prejudicando o desenvolvimento das plantas jovens e comprometendo a produção das adultas. A ocorrência de desfolhas repetidas irá exaurir a planta e o cafezal tornar-se-á antieconômico. Nos anos de alta produção dos cafeeiros, tem-se verificado maior índice de ataque.

Estudos relacionando ocorrência de ferrugem em cafeeiros cultivados em CO<sub>2</sub> elevado foram publicados recentemente. Tozzi (2013) por exemplo, avaliou em duas cultivares de *C. arabica* cultivados em OTCs, o efeito do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> sobre a ferrugem do cafeeiro nas cultivares Catuaí vermelho (suscetível) e Obatã vermelho (resistente), nas quais foram avaliados os parâmetros de severidade e incidência da doença. A severidade foi menor no tratamento com maior concentração de CO<sub>2</sub> para a cultivar Catuaí vermelho, indicando diminuição da doença em função do aumento do CO<sub>2</sub>. Para a cultivar Obatã vermelho, o aumento do gás não teve efeito na doença. Por outro lado, ambas as cultivares apresentaram incremento no diâmetro do caule e altura de plantas no tratamento com adição de CO<sub>2</sub>. Iost (2013) por sua vez, constatou nas mesmas cultivares de *C. arabica* cultivadas em FACE, que o aumento da concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> não teve efeito na incidência de ferrugem na cv. Catuaí e na incidência de bicho-mineiro nas duas cultivares.

Estudos sobre fotossíntese e crescimento de cafeeiros cultivados em elevadas atmosferas de CO<sub>2</sub> também são recentes. Ramalho *et al.* (2013) estudaram efeitos de elevada concentração de CO<sub>2</sub> (700 ppm) na fotossíntese, 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 genótipos de *Coffea* sp cultivados em OTCs. 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. Martins *et al.* (2014) estudaram efeito de CO<sub>2</sub> elevado (700 ppm) e diferentes faixas de temperatura de cafeeiros cultivados em OTCs sobre os teores foliares de macro e micronutrientes de três

genótipos de cafeeiros sendo que os resultados indicaram maior influência de altas temperaturas associados a aumento de teores de nutrientes nas folhas, porém nenhuma alteração significativa foi devida às diferentes concentrações de CO<sub>2</sub>. Ghini *et al.* (2015) avaliaram os efeitos do cultivo de cafeeiros em FACE durante dois anos e observaram nos cafeeiros cultivados em CO<sub>2</sub> elevado: maiores taxas de fotossíntese e maior rendimento em grãos nas cultivares Catuaí e Obatã, além de redução dos teores de nitrogênio na cv. Obatã. Quanto à ocorrência de pragas e doenças houve redução da incidência de bicho mineiro assim como não houve efeito na incidência de ferrugem.

Enquanto muitos aspectos da pesquisa em alto CO<sub>2</sub> se desenvolveram rapidamente, alguns processos fundamentais em plantas apresentam respostas extremamente variáveis, algumas das quais ainda não são totalmente explicadas (Luo *et al.*, 1999). A variabilidade das respostas e a busca por modelos que possam ser aplicados em larga escala e extrapolados em nível de ecossistema, bem como a oportunidade de se conhecer melhor os processos biológicos envolvidos, estimulam a continuidade dos estudos nessa área (Rogers *et al.*, 1994; Griffin & Seeman, 1996; Luo *et al.*, 1999; Calfapietra *et al.*, 2009).

Estudos sobre a influência de elevadas concentrações de CO<sub>2</sub> no metabolismo primário e secundário em *Coffea arabica* são relevantes para o avanço do conhecimento científico assim como para a elaboração de estratégias de produção do cafeeiro frente às mudanças climáticas. Em 2011, a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) inaugurou em sua unidade localizada em Jaguariúna (SP), o primeiro FACE da América Latina e também o primeiro, em nível mundial, exclusivamente voltado ao estudo de cafeeiros cultivados em alto CO<sub>2</sub> (Ghini *et al.*, 2015). Espera-se que os efeitos de elevada [CO<sub>2</sub>] no desenvolvimento dessa importante espécie cultivada sejam profundamente compreendidos.

Este trabalho objetivou investigar o efeito de elevadas concentrações de CO<sub>2</sub> nas taxas de trocas gasosas e no acúmulo de compostos do metabolismo primário e secundário em cafeeiros cultivados em diferentes concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub>. Foram estudadas duas cultivares de *C.arabica*: Catuaí vermelho IAC-144 e Obatã vermelho IAC-1669-20. A cultivar Catuaí tem ampla capacidade de adaptação, apresentando produtividade elevada na maioria das nossas regiões cafeeiras ou mesmo em outros países. De baixa estatura, permitem maior densidade de plantio, tornam mais fácil a colheita e mais eficientes os tratamentos fitossanitários. Esses cultivares já produzem

abundantemente logo nos dois primeiros anos de colheita, necessitando por isso de cuidadoso programa de adubação. No entanto é suscetível à ferrugem laranjada. A cultivar Obatã, por sua vez, apresenta também porte baixo permitindo maior densidade de plantio. Suas sementes são maiores que as dos cultivares Catuaí Vermelho e tem apresentado excelentes produções e grande rusticidade, razão pela qual seu plantio tem se expandido rapidamente especialmente em regiões com maior restrição hídrica. Os cafeeiros Obatã são resistentes à ferrugem (Fazuoli *et al.*, 2007).

Neste trabalho, foram conduzidos três experimentos independentes comparando efeitos de duas concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> e duas estruturas experimentais, OTCs e FACE. Em todos os experimentos foram comparadas as respostas de duas cultivares diferentes, sendo uma suscetível à ferrugem alaranjada (Catuaí vermelho) e uma resistente (Obatã vermelho).

## **2. OBJETIVOS**

Este estudo teve por objetivo investigar respostas fisiológicas de duas cultivares de *Coffea arabica* ao incremento do CO<sub>2</sub> atmosférico sob condições controladas e de campo.

### **Objetivos específicos**

**2.1.** Analisar o efeito isolado da elevação da concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> nas taxas de assimilação líquida de carbono e nos teores foliares de compostos do metabolismo primário e secundário, quantificados ao longo de um período de 100 dias de cultivo em câmaras de topo aberto (OTCs).

**2.2.** Analisar o efeito da elevação da concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> nas taxas de assimilação líquida de carbono e nos teores de compostos do metabolismo primário e secundário em folhas de cafeeiros inoculadas com o fungo causador da ferrugem alaranjada e cultivados durante 45 dias em OTCs.

**2.4.** Analisar o efeito da elevação da concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> nas taxas de trocas gasosas e nos teores de compostos do metabolismo primário e secundário em folhas de cafeeiros cultivados em estrutura do tipo FACE.

### 3. ABORDAGEM EXPERIMENTAL

#### 3.1 EXPERIMENTO I: ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE CAFEEIROS CULTIVADOS EM ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM CO<sub>2</sub> EM CÂMARAS DE TOPO ABERTO (OTCS)

##### 3.1.1 MATERIAL E MÉTODOS

###### 3.1.1.1 MATERIAL VEGETAL, CONDIÇÕES DE CULTIVO E DELINEAMENTO

###### EXPERIMENTAL

Sementes de cafeeiros das cultivares Catuaí Vermelho IAC 144 e Obatã Vermelho IAC 1669-20, suscetível e resistente, respectivamente, à ferrugem do cafeeiro, foram gentilmente fornecidas pela pesquisadora Dra. Masako Toma Braghini, do Centro de Café “Alcides Carvalho” do Instituto Agrônomo de Campinas - SP. As sementes foram germinadas em sacos de polietileno (15 x 5 cm) contendo terra e esterco bovino (3:1), além de fertilizante NPK (4:14:8) e micronutrientes. O cultivo de plântulas de café iniciou-se em setembro de 2011 na casa de vegetação da Embrapa Meio Ambiente, situada no município de Jaguariúna (SP) sob coordenadas geográficas 22° 42' 21" Sul, 46° 59' 10" Oeste. Ao atingirem entre três e cinco pares de folhas, as plântulas mais homogêneas foram selecionadas, transferidas para vasos plásticos (40 cm altura e volume 7 litros) contendo substrato *Plantmax Café*® (DDL – Paulínia-SP) e encaminhadas para a Casa de Vegetação do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica, situado no município de São Paulo-SP sob coordenadas geográficas 23° 32' 36" Sul, 46° 37' 59" Oeste. As plantas foram regadas diariamente e receberam semanalmente 100 mL/vaso de solução nutritiva Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) e nitrogênio adicional na forma de solução 0,5% de sulfato de amônio. Os cafeeiros foram distribuídos em quatro OTCs, sendo duas com atmosfera ambiente de CO<sub>2</sub> (380 ± 42 ppm) e duas com atmosfera enriquecida em CO<sub>2</sub> (760 ± 100 ppm). A concentração de CO<sub>2</sub> no interior de cada OTC foi monitorada diariamente com auxílio de um analisador portátil de gases por infravermelho (*Vaisala* mod. GM70). Ao longo do experimento, a temperatura média diária no interior das câmaras foi de 23°C, com máxima de 28°C e mínima de 10°C. A umidade relativa do ar foi de 86%, com máxima de 97% e mínima de 42%. A figura 1 ilustra o cultivo dos cafeeiros nas OTCs. Maiores detalhes sobre a estrutura e funcionamento das OTCs podem ser obtidos em Aidar *et al.* (2002). Um lote de trinta vasos foi colocado em cada câmara sendo, quinze vasos contendo um cafeeiro cultivar

Catuaí e quinze vasos contendo um cafeeiro cultivar Obatã. Ao longo do ensaio, os vasos foram periodicamente realocados no interior das câmaras para evitar efeitos negativos de sombreamento e otimizar a distribuição de CO<sub>2</sub>. Inicialmente, as plantas foram mantidas por 15 dias nas OTCs, nos respectivos ambientes de CO<sub>2</sub> para adaptação às condições atmosféricas impostas. A partir de dezesseis dias de cultivo nas OTCs, foram iniciadas as avaliações de taxas de assimilação líquida de carbono em resposta à luz e aos dezoito dias iniciaram-se as coletas de folhas para as análises bioquímicas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em fatorial 2x2 sendo duas concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> (380 e 760 ppm) e duas cultivares de cafeeiros (Catuaí x Obatã), totalizando 4 tratamentos.



**Figura 1:** Câmaras de topo aberto (OTCs) instaladas na casa de vegetação do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica contendo plantas de *Coffea arabica* cultivares Catuaí e Obatã, cultivados em elevada concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> e também em atmosfera ambiente.

### 3.1.1.2 CURVAS DE RESPOSTA DA FOTOSSÍNTESE À LUZ

Medidas instantâneas das taxas de assimilação líquida de carbono ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) em resposta ao fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFF), curvas  $A \times$  DFFF foram construídas utilizando-se um analisador de gás por infravermelho (LI-6400 XT, Li-Cor Inc., Nebraska, USA) equipado com uma fonte de luz azul/vermelho modelo LI-6400-02B (LI-COR). As curvas  $A \times$  DFFF foram realizadas em folhas totalmente expandidas do 3º par, a partir do ápice de ramos plagiotrópicos, variando-se a densidade de fluxo de fótons nos valores 1200, 1000, 800, 500, 300, 100, 50 e 0  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Foram elaboradas curvas  $A \times$  DFFF no 16º, 22º, 25º, 32º, 64º, 68º, 82º e 93º dia de cultivo dos cafeeiros nas OTCs. As curvas foram ajustadas conforme modelo da hipérbole não retangular proposta por Long & Hallgren (1993), determinando-se então os valores das taxas de assimilação líquida máxima na saturação ( $A_{max}$ ), pontos de compensação (PCL) e de saturação (PSL) luminosos e de respiração no escuro ( $R_E$ ) para os cafeeiros cultivados sob duas concentrações atmosféricas de  $\text{CO}_2$ . Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de duas plantas em cada câmara.

### 3.1.1.3 MEDIDAS DE CRESCIMENTO

Em cada uma das OTCs foram reservados seis cafeeiros (sendo três de cada genótipo) para avaliações de parâmetros de crescimento. Foram mensurados: (i) massa seca de folhas (ii) massa seca de caule e ramos (iii) massa seca de raízes (iv) área foliar total e (v) massa foliar específica. Todas as avaliações foram efetuadas após 101 dias que correspondem ao final do experimento. O sistema radicular foi cuidadosamente separado e lavado com auxílio de peneira fina. As medidas de massa seca foram efetuadas após secagem do material em estufa com circulação forçada de ar a 70°C até peso constante. Todos os parâmetros foram determinados em seis plantas por tratamento ( $n=6$ ).

### 3.1.1.4 DETERMINAÇÕES DE CARBOIDRATOS

#### *Teores de carboidratos solúveis*

Folhas totalmente expandidas do 3º/4º pares, a partir do ápice de ramos plagiotrópicos, foram coletadas para análise dos teores de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e amido. Foram coletadas seis amostras compostas por tratamento (três amostras por OTC) aos 18, 25, 46, 82 e 96 dias de exposição ao  $\text{CO}_2$ . As coletas de folhas foram realizadas sempre no período da manhã. O material foi imediatamente mergulhado

em N<sub>2</sub> líquido, macerado e liofilizado. Para determinação dos teores de carboidratos solúveis 100 mg de material foram extraídos em 10 mL de solução etanólica 80% (v/v) em banho-maria a 80°C por 15 min, centrifugados por 10 min a 12000 rpm em temperatura ambiente. Os precipitados foram reextraídos mais duas vezes consecutivas. Os sobrenadantes das extrações etanólicas foram reunidos e uma alíquota de 10 mL foi retirada, concentrada em evaporador rotatório a 40°C e ressuspensa em 1 mL de água destilada para quantificação de carboidratos solúveis totais pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) e análise dos teores de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1945), ambos tendo D-glucose (Sigma Aldrich ®) como padrão. Os resultados foram expressos em mg em equivalentes de glucose g MS<sup>-1</sup>. O resíduo da extração etanólica foi liofilizado e submetido à quantificação de amido de acordo com o método descrito por Amaral *et al.* (2007). As amostras (10 mg) foram incubadas em banho-maria a 75°C por 30 min com a enzima  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1) na concentração 120 U/mL, diluída em tampão MOPS 10 mM pH 6,5 por duas vezes consecutivas. Em seguida foram incubadas duas vezes consecutivas durante 30 min a 50°C na presença da enzima amiloglucosidase (EC 3.2.1.3 de *Aspergillus niger* (cód. E-AMGPU, MEGAZYME, Irlanda), diluída em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5. A reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu$ L ácido perclórico 0,8 N. O extrato obtido foi centrifugado a 10.000 g por 5 min e uma alíquota de 10  $\mu$ L do sobrenadante foi misturada a 270  $\mu$ L do Reagente Glicose PAP Liquiform (CENTERLAB, Brasil), incubada a 37°C durante 15 min e a absorbância lida a 490 nm em equipamento do tipo Elisa. As análises foram conduzidas em triplicata técnica. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de glucose g MS<sup>-1</sup>.

*Teores de carboidratos solúveis por cromatografia líquida de troca aniônica de alta resolução (HPAEC/PAD)*

Uma alíquota de 1 mL da amostra de carboidratos solúveis, obtidos a partir da extração etanólica descrita no item 3.1.1.4, foi purificada em coluna de troca iônica de 5 mL, utilizando resinas Dowex de troca catiônica 50 x 8 (100-200 mesh) e aniônica 1 x 8 (52-100 mesh). A eluição foi realizada com 20 vezes o volume da alíquota de água deionizada e o volume final teve o pH ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio 0,4 M. Em seguida as amostras foram liofilizadas e ressuspensas em 1 mL de água deionizada e novamente submetidas à quantificação de carboidratos totais para ajuste da concentração

em  $400\mu\text{g mL}^{-1}$  (Carvalho *et al.*, 1997). A análise da composição em carboidratos solúveis foi realizada através de cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em cromatógrafo líquido DIONEX modelo ICS3000 (Dionex, Thermo Scientific, USA) com coluna CarboPac PA-1. Os carboidratos solúveis foram eluídos isocraticamente com 100 mM de NaOH, com fluxo de  $0,25\text{ mL min}^{-1}$ , por 35 min. A identificação dos carboidratos solúveis, glucose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose, foi realizada por comparação dos tempos de retenção com padrões comerciais (Sigma Aldrich<sup>®</sup>). O tempo de corrida foi de 35 minutos para cada amostra. Foram analisadas seis amostras compostas por tratamento ( $n=6$ ). As análises foram conduzidas em triplicata técnica. Os resultados foram expressos em  $\text{mg g MS}^{-1}$ .

### 3.1.1.5 TEORES DE FENÓLICOS SOLÚVEIS TOTAIS

Foram determinados os teores de fenólicos solúveis totais nas amostras coletadas conforme descrito no item 3.1.1.4. Uma amostra de 30 mg de tecido foliar liofilizado foi adicionada a um microtubo e submetida à extração de compostos fenólicos com 1,5 mL de solução metanólica 80% (v/v), sob agitação contínua com ultrassom durante 30 minutos. O extrato metanólico foi centrifugado a 12.000 rpm durante cinco minutos. Transferiu-se 1 mL do sobrenadante para um microtubo de 2 mL e diluiu-se com 1 mL da mesma solução metanólica obtendo se assim o extrato diluído 1:2, que foi homogeneizado em vórtex para a determinação de fenólicos solúveis totais. Adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  do extrato metanólico de folhas (1:2) em microtubos contendo 490  $\mu\text{L}$  de água destilada, 250  $\mu\text{L}$  do reagente Folin Ciocalteu (1N) diluído (1:1) e 1,25 mL de carbonato de sódio (20%). Os microtubos foram agitados e, após 40 minutos, procedeu-se às leituras em espectrofotômetro, medindo-se a absorvância a 725 nm (Spanos & Wrolstad, 1990). Os teores de compostos fenólicos foram calculados com base em uma curva padrão de ácido tânico e os resultados foram expressos em mg de ácido tânico  $\text{g MS}^{-1}$ . Foram analisadas três amostras compostas por tratamento ( $n=3$ ). As análises foram conduzidas em triplicata técnica.

### 3.1.1.6 TEORES DE CARBONO (C) E NITROGÊNIO (N), RAZÃO C/N, DISCRIMINAÇÃO ISOTÓPICA DO CARBONO ( $\Delta^{13}C$ ) E RAZÃO PI/PA

Amostras de folhas totalmente expandidas do 3º/4º pares a partir do ápice de ramos plagiotrópicos de cafeeiros cultivados nas OTCs sob concentrações ambiente e elevada de CO<sub>2</sub> foram liofilizadas, moídas finamente em moinho de bolas e enviadas ao Laboratório de Ecologia Isotópica do CENA/ESALQ/USP onde foram analisadas. A composição de isótopos de nitrogênio e carbono foi determinada, respectivamente, em analisador elementar (Carlo Erba, EA 1110, CHNS, CE Instruments) e espectrometria de massas (Delta Plus, ThermoQuest-Finnigan), conforme descrito por Nadelhoffer & Fry (1994). As análises foram conduzidas em duplicata técnica. Foram analisadas três amostras compostas por tratamento (n=3).

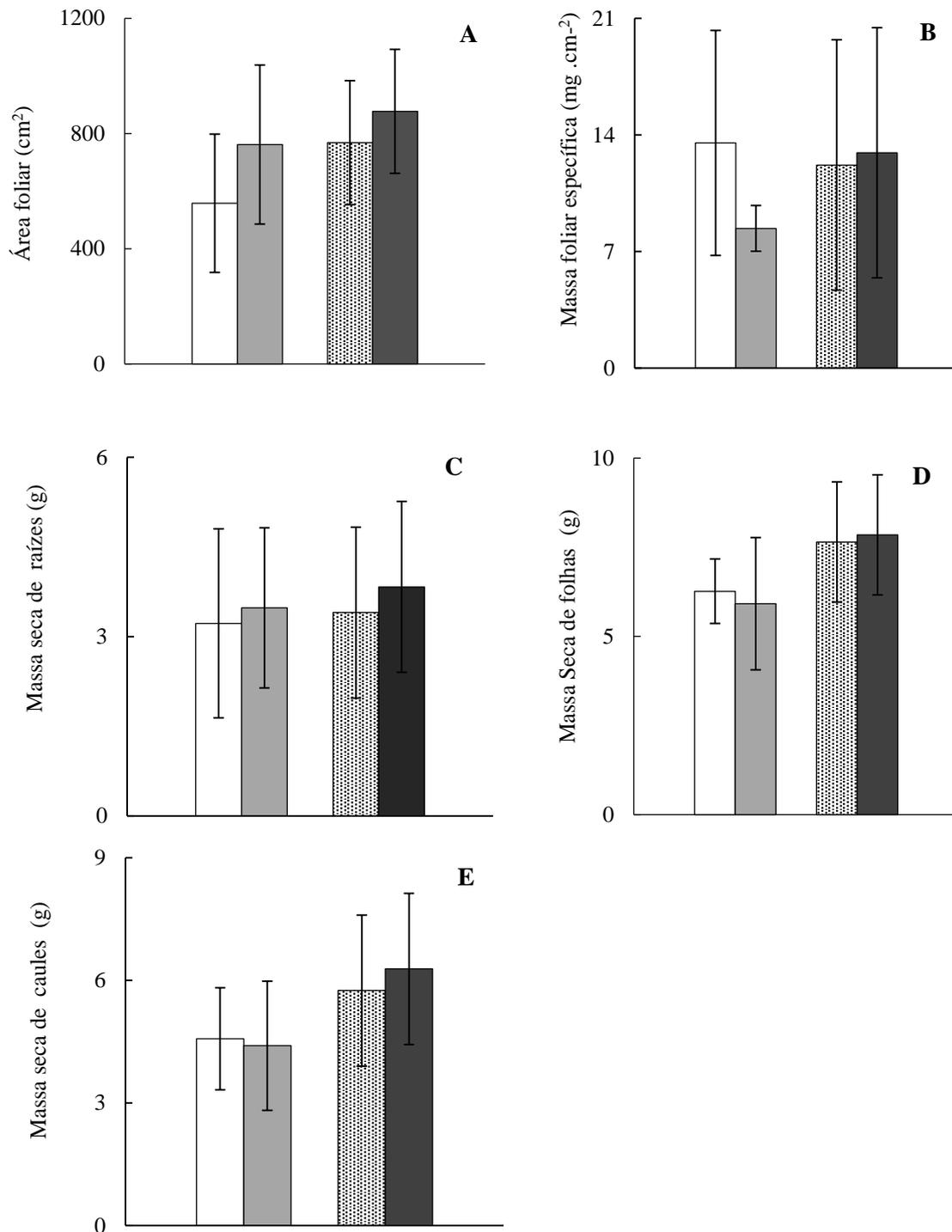
### 3.1.1.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA dois Fatores) e todo e qualquer contraste entre médias analisado pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o software R.

## 3.1.2 RESULTADOS

### *Análise do crescimento*

Sob condições de CO<sub>2</sub> elevado, observou-se maior área foliar em ambas a cultivares Catuaí (36%) e Obatã (14%) (Figura 2A). Foi observada redução da massa foliar específica (38%) nos cafeeiros Catuaí e pequeno aumento (6%) nos cafeeiros Obatã (Figura 2B). Observou-se um pequeno aumento médio na massa seca de raízes em ambos os cafeeiros: 8% na cv. Catuaí e 13% na cv. Obatã (Figura 2C). Houve ligeira redução na massa seca de folhas nos cafeeiros Catuaí (5%) enquanto nos cafeeiros Obatã foi observado um pequeno ganho de biomassa foliar (2,5%) conforme ilustrado na Figura 2D. Em relação ao acúmulo médio de biomassa nos caules foi observada diminuição de 3,7% nos cafeeiros Catuaí e aumento de 9% na cultivar Obatã (Figura 2 E). Apesar dessas variações, a análise estatística não indicou diferenças significativas nos parâmetros analisados entre os tratamentos de CO<sub>2</sub> e as cultivares.



**Figura 2:** Área foliar (A), massa foliar específica (B), massa seca de raízes (C), massa seca de folhas (D) e massa seca de caules (E) de *C. arabica* cultivados durante 100 dias sob diferentes atmosferas de CO<sub>2</sub> em OTCs.. Cultivar Catuaí vermelho CO<sub>2</sub> ambiente (○) e CO<sub>2</sub> elevado (●); cultivar Obatã vermelho CO<sub>2</sub> ambiente (▨) e CO<sub>2</sub> elevado (■). As barras representam a média ± desvio padrão (n=6).

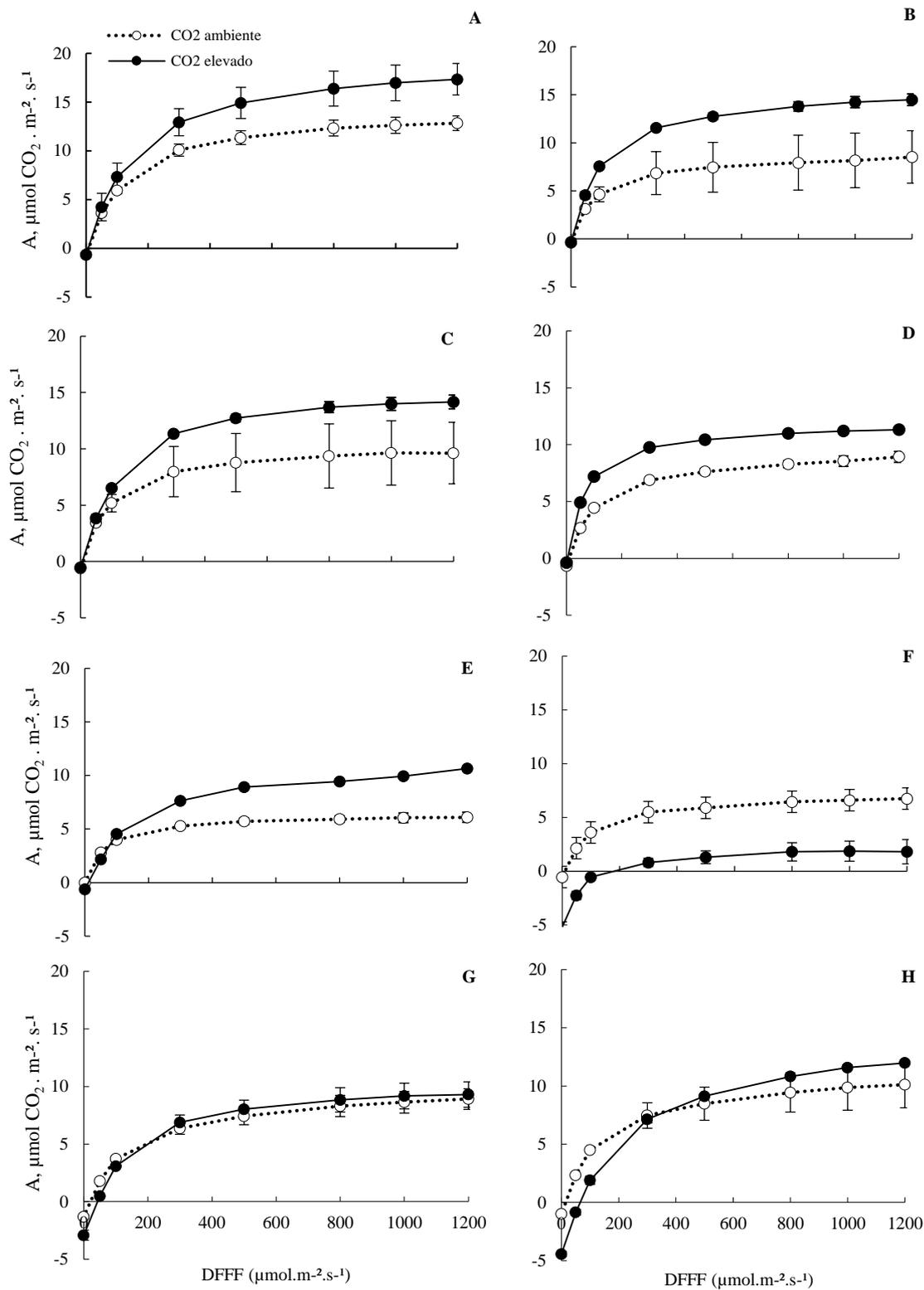
## CURVAS DE RESPOSTA DA FOTOSSÍNTESE À LUZ

As medidas instantâneas das taxas de assimilação líquida de carbono ( $A$ ) em resposta à densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) indicaram diferenças entre os tratamentos com  $\text{CO}_2$  em ambas as cultivares. Aos 16 dias de cultivo foram observados aumentos das taxas assimilatórias em resposta ao  $\text{CO}_2$  elevado em ambas as cultivares (Figuras 3A e 4A). Nos cafeeiros Catuaí, a partir de 32 dias houve redução das diferenças entre as taxas fotossintéticas nas duas atmosferas de  $\text{CO}_2$ , intensificada a partir de 82 dias, sugerindo possível aclimatação da fotossíntese (Figura 3D). Nos cafeeiros Obatã, esse efeito foi observado aos 25 dias (Figura 4B), quando as taxas fotossintéticas entre tratamentos ambiente e elevado  $\text{CO}_2$  foram praticamente idênticas.

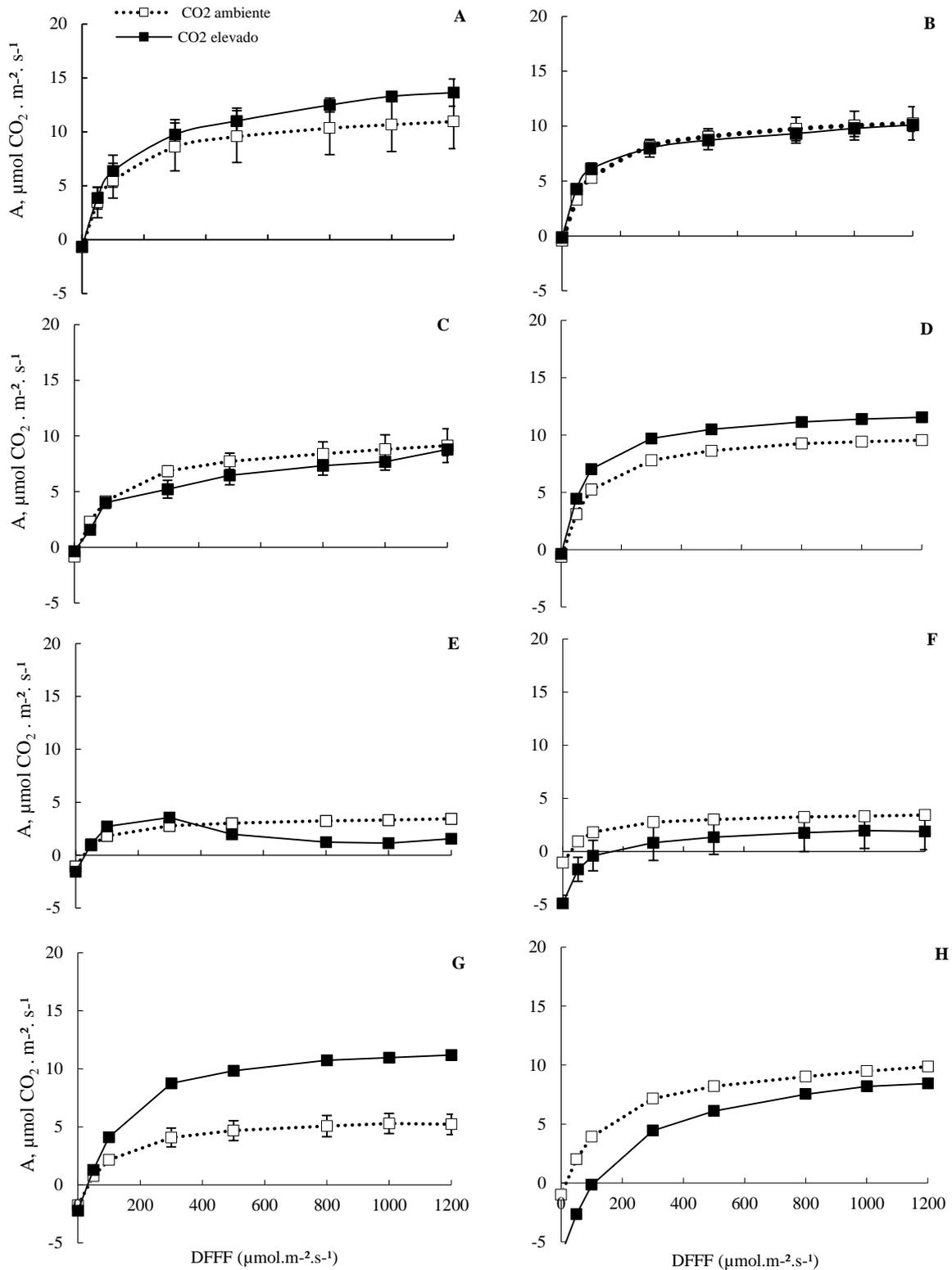
Os parâmetros obtidos pela modelagem das curvas  $A \times \text{DFFF}$  conforme o modelo da hipérbole não retangular, taxas de assimilação líquida máxima na saturação ( $A_{max}$ ), pontos de compensação (PCL) e de saturação luminosos (PSL) e de respiração no escuro ( $R_E$ ) são apresentados na Figura 5.

Nos cafeeiros Catuaí os valores de  $A_{max}$  foram maiores no tratamento de  $\text{CO}_2$  elevado em praticamente todos os dias analisados, correspondendo a um aumento médio de 27% em relação ao tratamento com  $\text{CO}_2$  ambiente ao longo do experimento (Figura 5A). Os valores de PCL aumentaram em média 112% (Figura 5C) enquanto que os valores de PSL aumentaram em média 27% (Figura 5E). A respiração no escuro diminuiu no tratamento com  $\text{CO}_2$  elevado, em média 112%, sendo os valores mais negativos registrados a partir de 82 dias de experimento (Figura 5G).

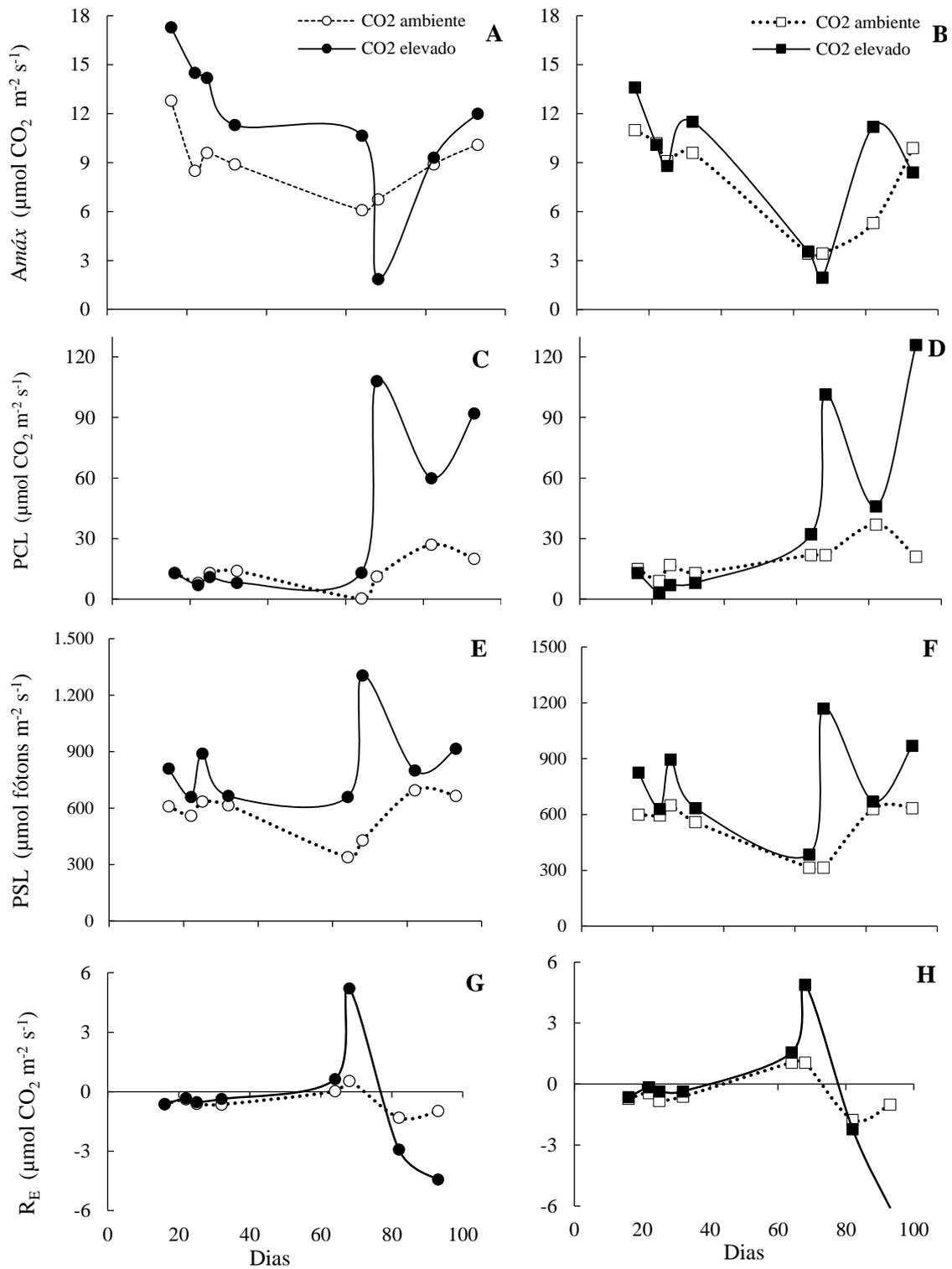
Nos cafeeiros Obatã os valores de  $A_{max}$  foram em média 19% superiores no tratamento  $\text{CO}_2$  elevado embora valores menores, em comparação com o tratamento  $\text{CO}_2$  ambiente, tenham sido observados nos dias 25, 68 e 96 (Figura 5B). Os valores de PCL foram menores no tratamento  $\text{CO}_2$  elevado até 32 dias aumentando a partir de 64 dias de experimento resultando no aumento médio de 94% nesse tratamento (Figura 5D). O ponto de saturação por luz foi 30% mais elevado no tratamento  $\text{CO}_2$  elevado (Figura 5F). Semelhante ao observado nos cafeeiros Catuaí, na cultivar Obatã a respiração no escuro diminuiu a partir de 82 dias e foi, em média, 96% menor no tratamento  $\text{CO}_2$  elevado (Figura 5H).



**Figura 3:** Curvas de resposta da fotossíntese à luz de *Coffea arabica* cultivar Catuaí vermelho IAC 144 determinadas nos dias 16 (A), 22 (B), 25 (C), 32 (D), 64 (E), 68 (F), 82 (G), 93 (H) de cultivo de plantas mantidas em CO<sub>2</sub> ambiente (380 ppm) e elevado (~760 ppm) em OTCs. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de duas plantas (n=2).



**Figura 4:** Curvas de resposta da fotossíntese à luz de *Coffea arabica* cultivar Obatã vermelho IAC 1662-20 determinadas nos dias 16 (a), 22 (b), 25 (c), 32 (d), 64 (e), 68 (f), 82 (g), 93 (h) de cultivo em  $\text{CO}_2$  ambiente (380ppm) e  $\text{CO}_2$  elevado (~760ppm) em OTCs. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de duas plantas (n=2).



**Figura 5:** Taxas de máxima assimilação de carbono ( $A_{máx}$ ), ponto de compensação de luz (PCL), ponto de saturação de luz (PSL) e taxas de respiração no escuro ( $R_E$ ) de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho (A,C,E,G) e cv. Obatã vermelho (B,D,F,H) determinadas aos 16, 22, 25, 32, 64, 68, 82 e 93 dias de cultivo em CO2 ambiente (380ppm) e CO2 elevado (~760ppm) em otc. Cada ponto representa a média de duas plantas (n=2).

### *Alterações nos teores foliares de carboidratos não estruturais*

Os teores de AST nos cafeeiros Catuaí foram maiores no tratamento CO<sub>2</sub> elevado com diferenças significativas nos dias 25, 46, 82 e 96 resultando num aumento médio de 12% ao longo do experimento (Figura 6A). Os teores de AR também aumentaram nesse tratamento em média 20%, com diferenças significativas nos dias 18, 25, 82 e 96 (Figura 6C). Os teores de amido aumentaram 71% em média no tratamento CO<sub>2</sub> elevado com diferenças significativas nos dias 18 e 25; cabe ressaltar o aumento de 220% de amido foliar observado aos 25 dias (Figura 6E). De forma geral, os teores de AST e AR aumentaram até os 46 dias e diminuíram aos 82 dias enquanto os teores de amido aumentaram até 25 dias e reduziram a partir de 46 dias.

Os cafeeiros Obatã, quando cultivados em CO<sub>2</sub> elevado, não apresentaram alterações significativas nos teores de AST com uma única exceção aos 96 dias, quando os teores diminuíram em 30% em relação ao tratamento CO<sub>2</sub> ambiente; em média houve redução de 3% nos teores foliares de AST (Figura 6B). Os teores de AR apresentaram tendência de aumento no tratamento CO<sub>2</sub> elevado, significativamente no dia 25, porém houve redução aos 96 dias; o aumento médio no experimento foi de 9% (Figura 6D). Os teores de amido aumentaram no tratamento CO<sub>2</sub> elevado com alterações significativas nos dias 18, 25 e 46; o aumento médio nesses teores foi de 103%, porém um aumento de 255% foi observado aos 25 dias (Figura 6F).

A análise dos perfis cromatográficos de monossacarídeos e oligossacarídeos glucose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose podem ser visualizados na Figura 7.

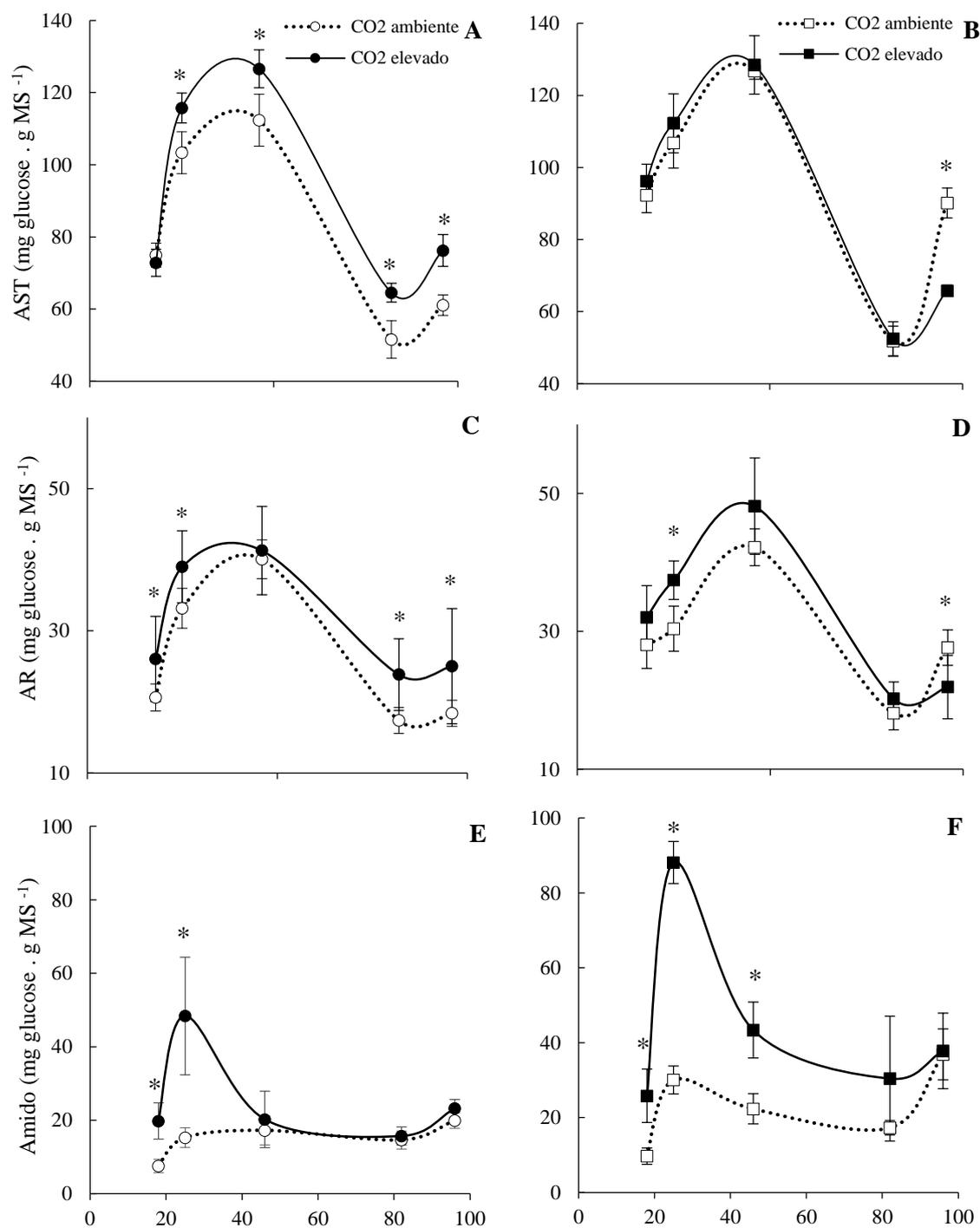
Ao considerarmos os teores de glucose para cada cultivar, foram detectadas diferenças estatisticamente significativas para os cafeeiros Catuaí aos 25 e 46 dias de cultivo (Figura 7A), enquanto nos cafeeiros Obatã essas diferenças foram observadas nos dias 18 e 96 (Figura 7B). Os teores aumentaram em média 128% na cultivar Catuaí e 117% na cultivar Obatã no tratamento CO<sub>2</sub> elevado.

Os teores de frutose aumentaram em média 194% nos cafeeiros Catuaí (Figura 7C) e 117% nos cafeeiros Obatã (Figura 7D) no tratamento CO<sub>2</sub> elevado; as alterações foram significativas no dia 25 na cultivar Catuaí e aos 18 e 96 dias na cultivar Obatã.

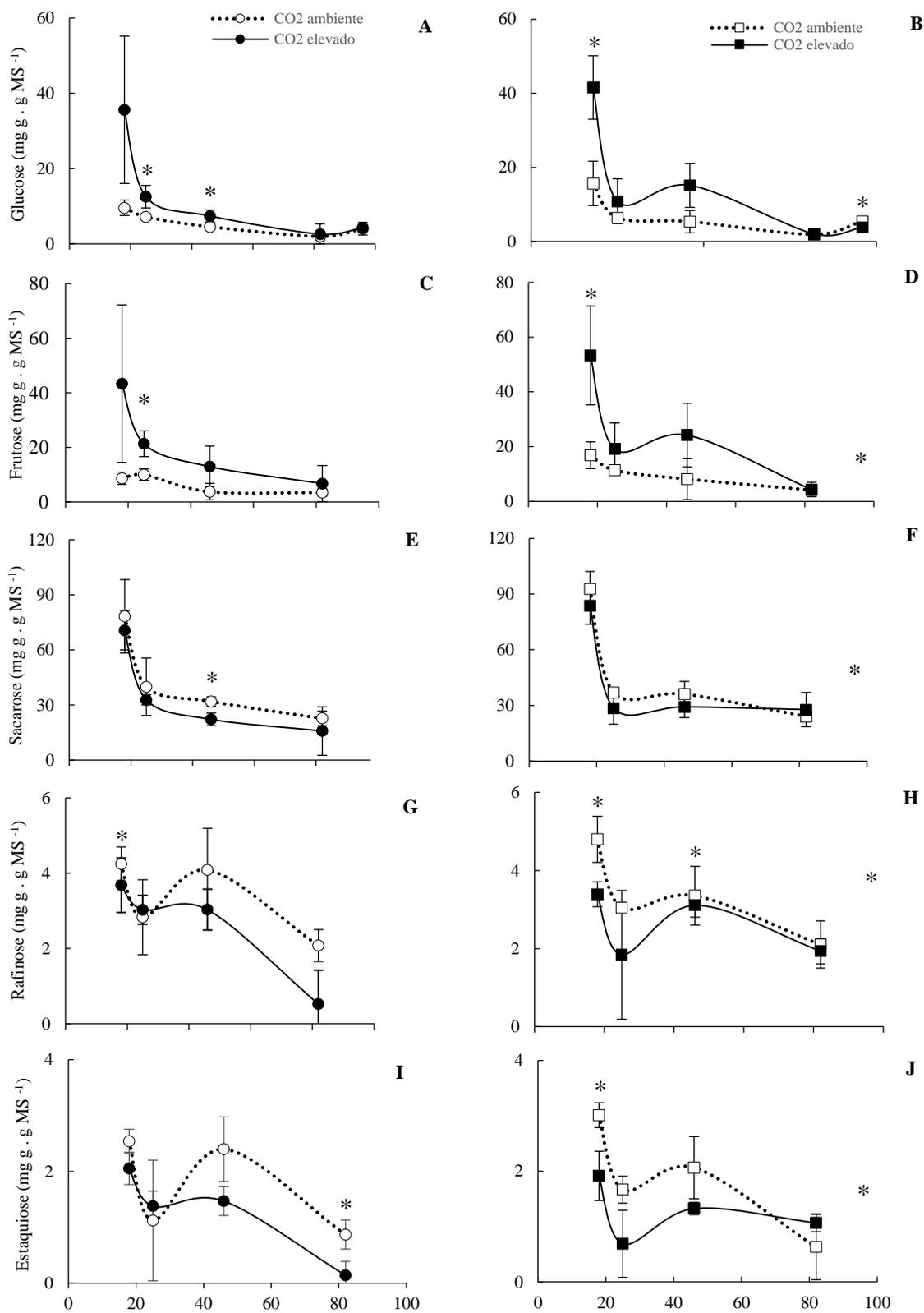
O cultivo em CO<sub>2</sub> elevado também alterou os teores de sacarose que apresentaram tendência de redução na cultivar Catuaí (11% em média) com alteração significativa no dia 46 (Figura 7E); essa tendência se manteve nos cafeeiros Obatã com redução de 5% na média geral do experimento, ainda que tenha ocorrido elevação desses teores aos 96 dias (Figura 7F).

Em relação aos teores de rafinose, os cafeeiros cultivados em CO<sub>2</sub> elevado apresentaram, em média, uma redução de 22% na cv. Catuaí (Figura 7G) e de 3% na cv. Obatã (Figura 7H). Alterações significativas ocorreram somente na cv. Obatã (18, 46 e 96 dias).

Quando cultivados em CO<sub>2</sub> elevado, os cafeeiros apresentaram, de forma geral, teores de estaquiose menores que os valores observados em CO<sub>2</sub> ambiente. Os valores diminuíram em média 25% na cv. Catuaí (Figura 7I) e 15% na cv. Obatã (Figura 7J). Os cafeeiros Catuaí apresentaram diferenças significativas aos 82 dias enquanto nos cafeeiros Obatã essas diferenças foram observadas aos 18 e 96 dias.



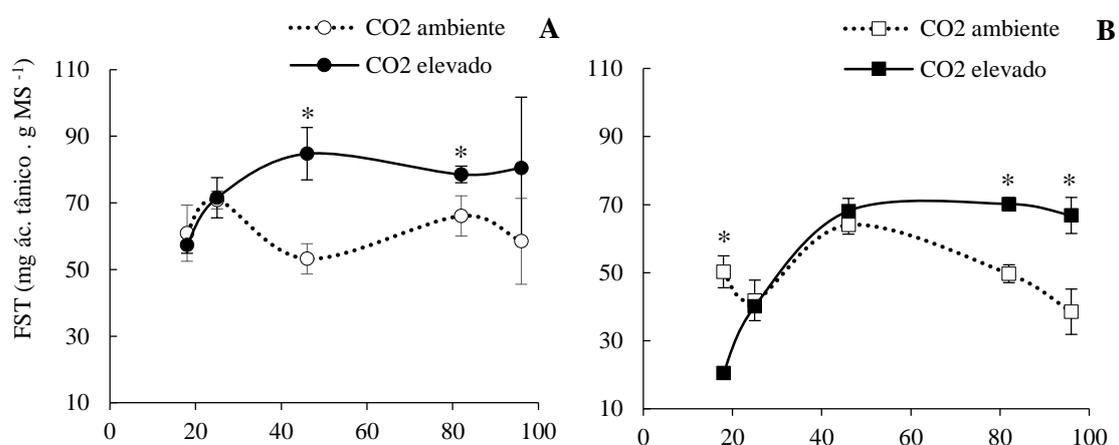
**Figura 6:** Teores de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e amido de folhas de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho (A,C,E) e cv. Obatã vermelho (B,D,F) determinados nos dias 18, 25, 46, 82 e 96 de cultivo em CO<sub>2</sub> ambiente (380ppm) e CO<sub>2</sub> elevado (~760ppm) em OTCs. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de seis amostras (n=6). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos (Teste de Tukey, P < 0,05).



**Figura 7:** Teores de glicose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose determinados em folhas de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho (A,C,E,G,I) e cv. Obatã vermelho (B,D,F,H,J) determinados nos dias 18, 25, 46, 82 e 96 de cultivo em CO<sub>2</sub> ambiente (380ppm) e CO<sub>2</sub> elevado (~760ppm) em OTCs. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de seis amostras (n=6). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos (Teste de Tukey, P < 0,05).

### *Alterações nos teores de fenólicos solúveis totais*

As variações dos teores foliares de FST ao longo do experimento estão ilustradas na Figura 8. O tratamento com CO<sub>2</sub> elevado promoveu aumento dos teores de FST em ambas as cultivares com destaque para os cafeeiros Catuaí, que apresentaram elevação média de 20% enquanto nos cafeeiros Obatã o aumento médio foi de 9%. As diferenças significativas ocorreram aos 46 e 82 dias nos cafeeiros Catuaí e aos 18, 82 e 96 dias nos cafeeiros Obatã.



**Figura 8:** Teores de fenólicos solúveis totais (FST) de folhas de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho (A) e cv. Obatã vermelho (B) determinados nos dias 18, 25, 46, 82 e 96 de cultivo em CO<sub>2</sub> ambiente (380ppm) e CO<sub>2</sub> elevado (~760ppm) em OTCs. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de três amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos (Teste de Tukey, P < 0,05).

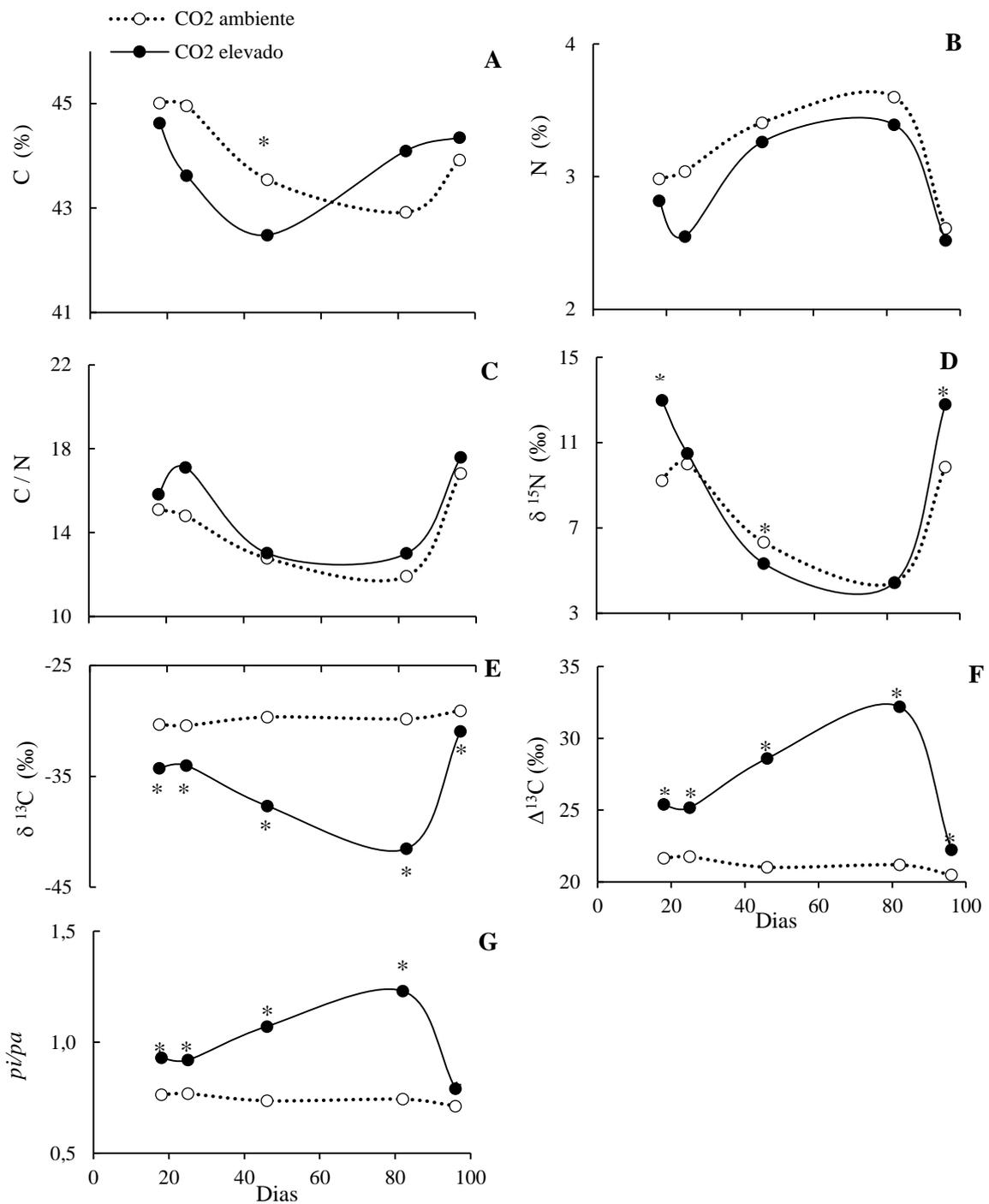
### *Alterações nos teores de Carbono (C) e Nitrogênio (N), Razão C/N, discriminação isotópica do carbono ( $\Delta^{13}C$ ) e razão pi/pa.*

A composição isotópica e os teores foliares de carbono (C), nitrogênio (N) e razão C/N dos cafeeiros Catuaí e Obatã estão descritos nas figuras 9 e 10, respectivamente.

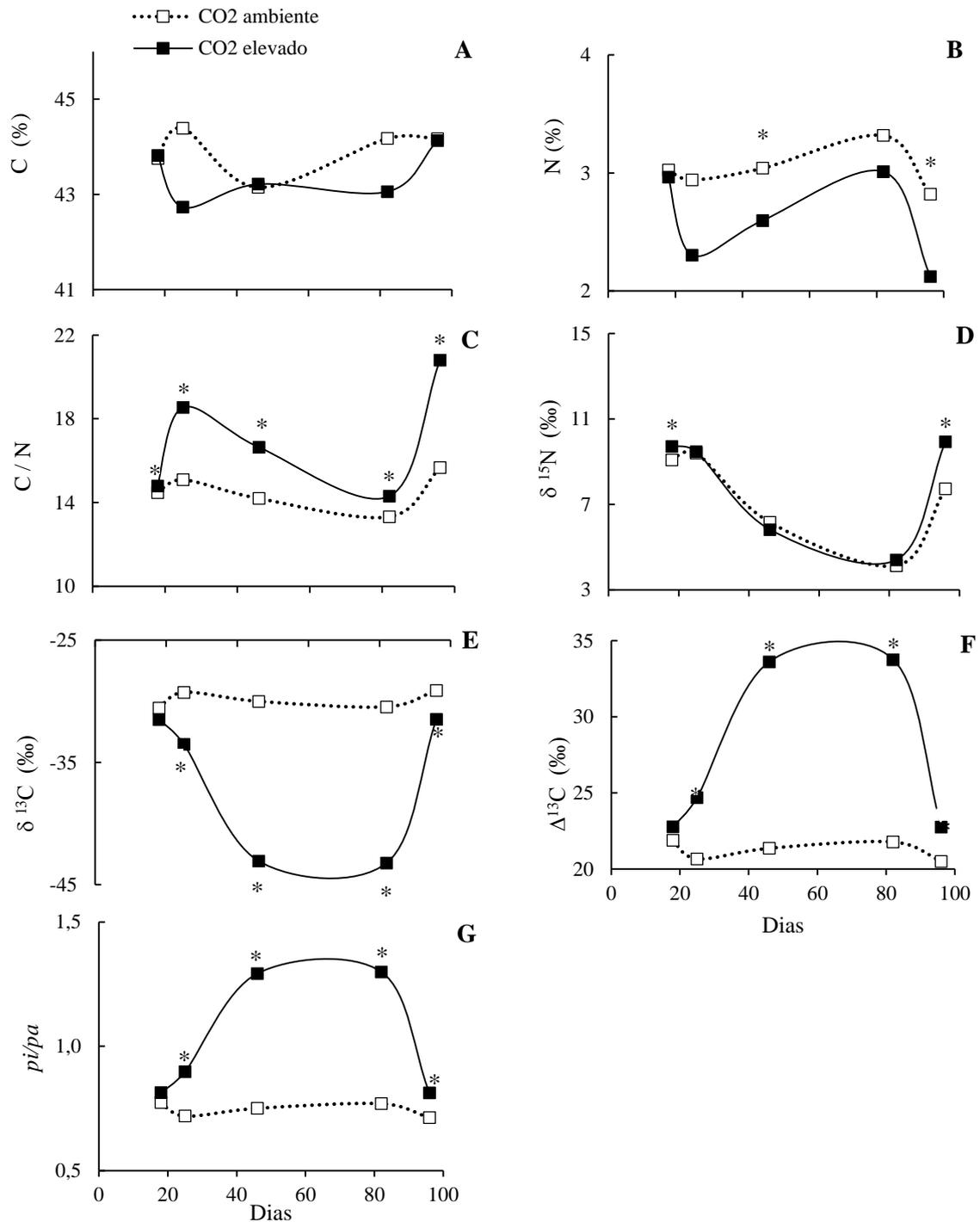
Nos cafeeiros Catuaí o cultivo em atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> diminuiu os valores absolutos de  $\delta^{13}C$  (valores mais negativos) em 20% na média, sendo que as diferenças entre tratamentos foram significativas em todos os dias analisados (Figura 9A). Os teores foliares de carbono não foram significativamente alterados nas folhas das plantas mantidas em CO<sub>2</sub> elevado embora tenha ocorrido em média uma redução de 1% desses teores em relação ao tratamento CO<sub>2</sub> ambiente (Figura 9B). Os valores de  $\delta^{15}N$

apresentaram aumento médio de 16% no tratamento CO<sub>2</sub> elevado com alterações significativas aos 18, 46 e 96 dias (Figura 9C). Observou-se uma tendência de redução nos valores de N (7% em média) no tratamento CO<sub>2</sub> elevado, no entanto não se observou diferença significativa em nenhum dos dias analisados (Figura 9D). A razão C/N não foi significativamente alterada embora tenha havido uma tendência de aumento de 7% na média (Figura 9E). Os valores de  $\Delta^{13}\text{C}$  aumentaram em 26% no tratamento CO<sub>2</sub> elevado sendo que as alterações foram significativas todos os dias (Figura 9F). Os valores de *pi/pa* também aumentaram nesse tratamento, em média 33%, e as diferenças também foram significativas em todos os dias analisados (Figura 9G).

Os cafeeiros Obatã apresentaram alterações no tratamento CO<sub>2</sub> elevado semelhantes às observadas na cv. Catuaí, porém com intensidades diferentes conforme indicado na Figura 10. Foram observados decréscimos médios de 22% na  $\delta^{13}\text{C}$  (valores mais negativos), sendo que as diferenças entre tratamentos foram significativas em quase todos os dias analisados (Figura 10A). Os teores foliares de C apresentaram tendência de redução (1% em média) em relação ao tratamento CO<sub>2</sub> ambiente tendo ocorrido apenas uma alteração significativa aos 25 dias. (Figura 10B). Os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  apresentaram aumento médio de 8% no tratamento CO<sub>2</sub> elevado com alterações significativas aos 18 e 96 dias (Figura 10C). Os teores de N alteraram significativamente em quatro dos cinco dias analisados (exceto dia 18) no tratamento CO<sub>2</sub> elevado e resultaram na redução média de 14 ao longo do experimento (Figura 10D). Em consequência, a razão C/N aumentou em média 17% sendo que as alterações foram significativas em todos os dias analisados (Figura 10E). Os valores de  $\Delta^{13}\text{C}$  aumentaram em 30% no tratamento CO<sub>2</sub> elevado sendo que as alterações foram significativas em todos os dias exceto no dia 18 (Figura 10F). Os valores de *pi/pa* aumentaram em média 33% nesse tratamento e as diferenças foram significativas em todos os dias analisados exceto no dia 18 (Figura 10G).



**Figura 9:** Teor de carbono (A), teor de nitrogênio (B), razão carbono/nitrogênio (C), composição isotópica de nitrogênio (D), composição isotópica de carbono (E), discriminação isotópica do carbono (F), razão entre a pressão interna e a pressão atmosférica de CO<sub>2</sub> (G) em folhas de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho cultivados em CO<sub>2</sub> ambiente (380 ppm) e CO<sub>2</sub> elevado (~760ppm) CO<sub>2</sub> durante 100 dias em OTCs. Os pontos representam a média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos (Teste de Tukey, P < 0,05).



**Figura 10:** Teor de carbono (A), teor de nitrogênio (B), razão carbono/nitrogênio (C), composição isotópica de nitrogênio (D), composição isotópica de carbono (E), discriminação isotópica do carbono (F), razão entre a pressão interna e a pressão atmosférica de CO<sub>2</sub> (G) de folhas de *Coffea arabica* cv. Obatã vermelho cultivados em CO<sub>2</sub> ambiente (380 ppm) e CO<sub>2</sub> elevado (~760 ppm) durante 100 dias em OTCs. Os pontos representam a média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos (Teste de Tukey, P < 0,05).

### 3.1.3 DISCUSSÃO

#### *Crescimento*

Nos cafeeiros cultivados em alto CO<sub>2</sub> tendências diferentes foram observadas nas cultivares: aumento de área foliar e de massa seca de raízes nas duas cultivares e diminuição de massa foliar específica, massa seca foliar e massa seca de caules na cv. Catuaí e de aumento desses parâmetros na cv. Obatã. Diversos estudos têm observado aumento na área foliar em CO<sub>2</sub> elevado (Ziska *et al.*, 1991; Ackerly *et al.*, 1992; Thomas & Bazzaz, 1996). De acordo com Wolfe *et al.* (1998), o padrão de resposta comumente observado em experimentos com plantas em CO<sub>2</sub> elevado é um incremento na biomassa maior que o aumento na área foliar, resultando em menor área foliar específica.

Algumas hipóteses têm sido levantadas para explicar o efeito do aumento de CO<sub>2</sub> no tamanho das folhas. É comum que a redução da condutância estomática em plantas sob alto CO<sub>2</sub> leve ao aumento na pressão de turgor (Sasek & Strain, 1989) e a expansão de células foliares é dependente do turgor, o que pode explicar um alongamento do pecíolo e aumento da expansão foliar (Thomas & Bazzaz, 1996). Sabe-se, porém, que os açúcares exercem efeito no alongamento do pecíolo e na expansão da lâmina foliar (Stitt & Smith, 2007) e são fortes candidatos a compor a complexidade dessas respostas (Lake *et al.*, 2002).

De acordo com Poorter & Pères-Soba (2002), a diminuição da massa foliar específica, relatada em diversos trabalhos de crescimento de plantas em condições de elevado CO<sub>2</sub>, neutraliza o aumento da taxa fotossintética por unidade de área foliar e resulta em um crescimento substancialmente menor do que era esperado com base apenas na taxa fotossintética. Rezende *et al.* (2014) não verificaram alterações significativas na biomassa seca total, caules, raízes e número de folhas de *Psidium guajava*, uma frutífera de fotossíntese tipo C3, cultivada em atmosfera de CO<sub>2</sub> elevado (780 ppm) durante 90 dias, reforçando assim a tendência verificada nos cafeeiros.

#### *Curvas de resposta da fotossíntese à luz*

Sob condições atmosféricas atuais de CO<sub>2</sub> e luz saturante, o cafeeiro apresenta baixas taxas fotossintéticas (A), quando comparadas com as de outras espécies tropicais, variando normalmente de 4-11  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Silva *et al.*, 2004; Franck *et al.*, 2006;

DaMatta *et al.*, 2010). As curvas de assimilação de carbono em resposta à DFFF indicaram valores ao redor de  $17,3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  considerado elevado para cafeeiros. Os valores de  $A$  em resposta à DFFF indicaram diferenças de comportamento entre as cultivares quanto à resposta ao tratamento com  $\text{CO}_2$  elevado. Enquanto os cafeeiros Catuaí apresentaram taxas assimilatórias claramente superiores em resposta ao tratamento com  $\text{CO}_2$  elevado, a cultivar Obatã mostrou nesse tratamento taxas muito próximas às observadas no tratamento de  $\text{CO}_2$  ambiente e por vezes até menores. Somente uma exceção ocorreu aos 82 dias, quando os valores de  $A$  foram claramente superiores em alto  $\text{CO}_2$ .

Os parâmetros obtidos pela modelagem das curvas  $A \times \text{DFFF}$  indicaram aumento nos valores de  $A_{\text{máx}}$  nas duas cultivares estudadas com efeitos mais positivos na cv. Catuaí indicando que houve aumento na taxa assimilação de carbono em resposta ao maior fluxo de fótons fotossintetizantes, conforme verificado em diversos outros trabalhos sobre efeitos de  $\text{CO}_2$  elevado em plantas. Realizando experimentos com feijão, Jifon & Wolfe (2002) verificaram um aumento de  $A_{\text{máx}}$  na faixa entre 350 e 700 ppm de  $\text{CO}_2$ . Ainsworth *et al.* (2002), em uma meta-análise sobre as repostas da soja ao alto  $\text{CO}_2$ , verificaram que  $A_{\text{máx}}$  aumenta em média 39%. No entanto, Bernacchi *et al.* (2005), também trabalhando com soja, encontraram um aumento médio de 21% na primeira estação de crescimento e 16% na segunda estação de crescimento. Os autores sugerem que a diferença encontrada em seu experimento, em relação à meta-análise, seja o fato destas estarem no período reprodutivo na meta-análise e, portanto, em diferente estado fisiológico (uma vez que o enchimento dos grãos representa um dreno forte para os fotoassimilados). Em outra meta-análise sobre plantas crescidas no sistema FACE, Ainsworth & Long (2005) também relataram aumento de 30% no  $A_{\text{máx}}$ . Marabesi (2007), no entanto, verificou que a espécie do tipo C3, *Senna alata*, cultivada em  $\text{CO}_2$  elevado (720 ppm), não apresentou alterações nos valores de  $A_{\text{máx}}$ . Ramalho *et al.* (2013), estudando o efeito de duas concentrações atmosféricas de  $\text{CO}_2$  (380 ppm e 700 ppm) em três diferentes genótipos de *Coffea* sp., cultivados durante um ano em condições controladas, não encontraram alterações significativas nos valores de  $A_{\text{máx}}$  ainda que tenham observado tendências de elevação (18% e 25%) em duas das cultivares analisadas.

As taxas de respiração no escuro ( $R_E$ ) variaram consideravelmente nas duas cultivares e apresentaram aumento ao final do ensaio. Os efeitos do incremento de  $\text{CO}_2$

na respiração variam entre espécies, podendo causar aumentos ou reduções. Por exemplo, Mortari (2012) e Grandis (2010) verificaram redução nos valores de  $R_E$  e tendência de redução desses valores respectivamente, em *Euterpe oleracea* e *Senna reticulata*, expostas a  $CO_2$  elevado (760 ppm) durante 90 dias. Os supostos mecanismos através dos quais o incremento do  $CO_2$  modifica as taxas de respiração ainda estão sendo elucidados, e as principais hipóteses incluem alterações na disponibilidade de carboidratos, nas taxas de crescimento e na alocação de biomassa, mudanças na composição química de tecidos e interações entre a concentração de  $CO_2$  e as enzimas respiratórias (Amthor, 1991; Curtis, 1996; González-Meler *et al.*, 1996; Drake *et al.*, 1997).

Foi observado um aumento do valor médio dos pontos de compensação (PCL) e de saturação luminoso (PSL) nos cafeeiros cultivados em  $CO_2$  elevado, o que está de acordo com os efeitos previstos para plantas C3 as quais, sob altas concentrações atmosféricas de  $CO_2$ , apresentariam um balanço positivo entre fotossíntese e respiração, Isso ocorre devido às maiores taxas de carboxilação da enzima rubisco, além de aumento do fluxo de elétrons no PSII visando a regeneração da molécula aceptora ribulose-1,5-bisfosfato pelo Ciclo de Calvin (Taiz & Zeiger, 2010).

O efeito positivo na assimilação de carbono dos cafeeiros cultivados sob atmosfera enriquecida em  $CO_2$  está de acordo com inúmeros estudos em diferentes espécies que possuem metabolismo fotossintético do tipo C3 (Kimball *et al.*, 2002; Leakey *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012, 2015; Talhelm *et al.*, 2014).

#### ***Alterações nos teores de carboidratos***

O acúmulo de carboidratos não estruturais em folhas de plantas C3 em função do elevado  $CO_2$  é um efeito bastante documentado e ocorre basicamente pelo aumento da função carboxilase da enzima RUBISCO durante a fotossíntese (Stitt, 1991; Cheng *et al.*, 1998; Rogers *et al.*, 2004). O padrão básico observado em muitas plantas é a partição dos fotossintatos entre sacarose, que durante o dia é translocada da folha através do floema para órgãos não fotossintetizantes, e amido transitório, que se acumula nas folhas ao longo do dia e é quase totalmente hidrolisado à noite, gerando substratos que serão utilizados para a síntese de sacarose, garantindo assim um fluxo contínuo de carboidratos quando a fotossíntese não é possível (Geiger *et al.*, 2000; Lambers *et al.*, 2008; Smith & Stitt, 2007).

No tratamento CO<sub>2</sub> elevado, os cafeeiros apresentaram diferenças nos padrões de acúmulo foliar de carboidratos. A cultivar Catuaí apresentou maiores teores de açúcares solúveis totais (AST) e açúcares redutores (AR) em relação à cultivar Obatã (Figura 6). Esta cultivar, por sua vez, apresentou maiores teores de amido em relação à cultivar Catuaí. Em condições atmosféricas normais (ambiente) foram relatados diversos trabalhos demonstrando a influência negativa do acúmulo de carboidratos nas folhas sobre as taxas fotossintéticas de cafeeiros (Da Matta *et al.*, 1997). Frank *et al.* (2006), por exemplo, observaram correlação negativa entre fotossíntese e acúmulo de sacarose no floema de folhas fonte, enquanto que Silva *et al.* (2004) verificaram que os teores de amido apresentaram correlações significativas com a temperatura do ar e com as taxas de fotossíntese. .

O amido é o principal responsável pelo aumento do teor de carboidratos não estruturais em plantas cultivadas sob atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> (Saxe *et al.*, 1998). Diversos estudos mostram que o acúmulo de amido nas folhas de plantas cultivadas em alta concentração de CO<sub>2</sub> pode estar associado ao acúmulo de sacarose e/ou seus intermediários no citossol (Stitt, 1990; Stitt, 1991; Huber & Huber, 1996). O acúmulo de amido na folha reduz a taxa de exportação de triose-fosfatos do cloroplasto, promovendo um aumento da razão 3-fosfoglicerato (3-PGA): fosfato inorgânico (Pi) no cloroplasto. O aumento nessa razão é responsável pela regulação alostérica positiva da atividade da ADP-glucose pirofosforilase (AGPase), principal enzima envolvida na síntese de amido (Smith *et al.*, 1997). No caso deste experimento, as maiores taxas de assimilação de carbono detectadas nos cafeeiros cultivados em alto CO<sub>2</sub> poderiam ter resultado em maior disponibilidade de 3-PGA promovendo a regulação positiva da AGP-ase, resultando então em maiores teores de amido transitório.

De acordo com Williams & Farrar (1990), os níveis de ATP, juntamente com a disponibilidade de carboidratos, controlam diretamente as taxas respiratórias, o que parece ter ocorrido no caso dos cafeeiros cultivados em alto CO<sub>2</sub>, uma vez que a manutenção de baixas taxas de respiração esteve associada à elevação dos teores de amido até 46 dias de experimento. A partir de então, houve aumento das taxas respiratórias associadas ao declínio dos teores foliares de amido. Adicionalmente, a elevação do ponto de saturação de luz medido nos cafeeiros em alto CO<sub>2</sub> indica que houve aumento no fluxo de elétrons pelos fotossistemas, resultando assim em maior disponibilidade de ATP.

Diversos estudos apontaram aumento da respiração em folhas maduras expostas a elevadas concentrações de CO<sub>2</sub> já que elevadas taxas fotossintéticas exigiriam aumento da exportação dos elevados teores de carboidratos acumulados requerendo, portanto, altos níveis de energia que seriam supridos pela respiração (Bunce, 2005; Ainsworth & Rogers, 2007; Leakey *et al.*, 2009). Apesar de resultados muito controversos descritos na literatura, o fato é que neste estudo os cafeeiros apresentaram elevação na taxa de respiração no escuro (Catuaí 35% e Obatã 24%), possivelmente associada ao acúmulo de carboidratos.

A sacarose é o principal produto da fotossíntese na maioria das folhas, sendo também a principal forma pela qual o carbono é exportado para outras partes da planta (Stitt *et al.*, 1984). Este experimento indicou que, folhas de cafeeiros cultivados em elevado CO<sub>2</sub>, coletadas no período da manhã, apresentaram tendência de redução dos teores de sacarose associada à elevação dos teores de glicose, de frutose e de amido. Ainda que os parâmetros de crescimento dos cafeeiros não tenham sido conclusivos, há indícios de que tenha ocorrido maior translocação de sacarose para as raízes (nas duas cultivares), caules e folhas (cultivar Obatã) resultando em uma tendência de maior acúmulo de carbono nesse órgão em função do cultivo em CO<sub>2</sub> elevado.

Enquanto grande parte das espécies de plantas produz predominantemente amido e sacarose, sendo esta a principal forma de carboidrato translocado pelo floema (Taiz & Zeiger, 2010), muitas podem produzir derivados da sacarose (ex. rafinose), polímeros derivados da frutose (frutanos) ou açúcares álcool (manitol) (Foyer *et al.*, 2000). A rafinose é o oligossacarídeo mais abundante em plantas depois da sacarose (Bourne *et al.*, 1965). As principais funções da rafinose estão relacionadas ao transporte de carbono em folhas e tolerância à seca em sementes (Kuo *et al.*, 1988; Bachmann *et al.* 1994), além da reserva de carbono, tolerância à seca, ao frio e à alta salinidade em tecidos vegetativos (Lehle & Tanner, 1973; Bachmann *et al.*, 1994; Taji *et al.*, 2002).

Efeitos de elevado CO<sub>2</sub> atmosférico nos teores foliares de oligossacarídeos da série da rafinose não foram descritos para cafeeiros até o presente. Em nosso experimento, os cafeeiros cultivados em elevado CO<sub>2</sub> apresentaram tendência de redução nos teores de rafinose e estaquiose nas duas cultivares analisadas sendo que na cultivar Obatã as alterações foram significativas. Observou-se que as oscilações nos teores desses

oligossacarídeos acompanharam a redução de sacarose observada até 46 dias bem como a elevação desses teores a partir de 82 dias, confirmando assim a relação de dependência entre disponibilidade de sacarose e a síntese dos oligossacarídeos rafinose e estaquiase que, neste experimento, foi mais evidente na cultivar Obatã.

Dos Santos *et al.* (2011) descreveram alterações nos teores foliares de rafinose e estaquiase em folhas de *C. arabica* submetidas a diferentes estresses abióticos. As modificações observadas indicaram que o acúmulo desses oligossacarídeos foi importante para a proteção contra estresse osmótico, como já apontado para outras espécies, porém o tempo de duração, o tipo e o nível de estresse determinaram quais e, em que quantidade, esses oligossacarídeos se acumularam nas folhas da planta.

A aclimatação fotossintética, verificada em plantas expostas à altas concentrações de CO<sub>2</sub>, não ocorre pela maior concentração de CO<sub>2</sub> *per se* e sim por sinalização pelo aumento da concentração de açúcares, mais especificamente as hexoses solúveis, mediada por hexoquinases, através do mecanismo denominado ‘*sugar sensing*’, no qual vias de transdução de sinais envolvendo fitormônios regulam a transcrição de genes relacionados à maquinaria fotossintética, sendo que, a subunidade menor da Rubisco e a Rubisco ativase são as primeiras a serem afetadas. O resultado desse mecanismo é o particionamento do carbono e a regulação das relações fonte-dreno em resposta ao crescimento de plantas cultivadas em alto CO<sub>2</sub> atmosférico (Stitt, 1991; Paul & Foyer, 2001; Rolland *et al.*, 2006; Lambers *et al.*, 2008). De acordo com os resultados apontados neste experimento (Figuras 3, 4 e 5) as oscilações observadas nos teores de carboidratos das folhas de cafeeiros cultivados em CO<sub>2</sub> elevado estiveram relacionadas às alterações nas taxas assimilatórias de carbono, provavelmente envolvendo o mecanismo de sinalização por açúcares proposto na literatura.

### *Alterações nos teores de fenólicos solúveis totais*

Os compostos fenólicos são derivados de ácido benzóico e cinâmico com substituições por grupos hidroxila e metóxi em vários pontos do anel aromático. No café, os ácidos fenólicos consistem nos ácidos ferúlico, *p*-cumárico, cafeico, siríngico e clorogênico (Daglia *et al.*, 2000). Muitas das informações sobre compostos fenólicos em cafeeiros são relativas aos grãos. Sabe-se, por exemplo que, baixa intensidade de luz aumenta a concentração de ácidos clorogênicos, trigonelina, açúcares e lipídios durante diferentes estágios do desenvolvimento dos grãos de café (Avelino *et al.*, 2005). No entanto, poucos estudos foram publicados à respeito desses compostos em folhas de cafeeiros, as quais teriam também grande potencial benéfico à saúde humana se consumidas por exemplo na forma de chá (Campa *et al.*, 2012).

Os cafeeiros cultivados em CO<sub>2</sub> elevado apresentaram maiores teores foliares de compostos fenólicos (FST) de forma acentuada na cultivar Catuaí cujos teores ultrapassaram aqueles observados no tratamento CO<sub>2</sub> ambiente aos 46 dias de tratamento. Na cultivar Obatã, esse comportamento só foi observado aos 82 dias, o que indica que o tempo de exposição ao tratamento influenciou o investimento na produção de metabólitos secundários de acordo com cada uma das cultivares avaliadas. Segundo Way & Oren (2010), não há dúvidas de que elevadas concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> afetam a produção de compostos primários e secundários de plantas, no entanto, as respostas variam de acordo com o tipo, a localização e o período de exposição.

A elevação dos teores foliares de FST nos cafeeiros cultivados em CO<sub>2</sub> elevado não ocorreu simultaneamente à elevação dos teores de carboidratos (Figuras 6 e 7) mas parece ter ocorrido de forma subsequente, indicando assim um possível ajuste do metabolismo primário e seu direcionamento para a produção de compostos do metabolismo secundário, o que ajudaria a explicar a diminuição dos teores de carboidratos observada nos cafeeiros a partir de 82 dias de experimento, associada à manutenção de elevados níveis de FST até o final do experimento (Figura 8).

De acordo com Matyssek *et al.* (2012), o aumento da disponibilidade de metabólitos secundários carbonados ocorre frequentemente pelo acúmulo de carboidratos não estruturais. De acordo com esses autores, o que ocorre é um balanceamento constante entre a taxa de produção primária bruta direcionada ao crescimento vegetal e o

metabolismo relacionado à defesa vegetal, de tal forma que, esses processos metabólicos se relacionam e se complementam.

Elevadas doses de CO<sub>2</sub> podem alterar a composição química das plantas influenciando: a assimilação de nutrientes e carbono; a abundância dos precursores na biossíntese de metabólitos secundários; as vias de transdução de sinal e eventualmente, os genes que controlam a expressão desses metabólitos (Lindroth, 2010). Assim sendo, os estudos disponíveis sobre efeitos de CO<sub>2</sub> elevado na produção de metabólitos secundários não são conclusivos, indicando que tipos específicos de metabólitos secundários são diferencialmente influenciados por altas concentrações de CO<sub>2</sub> (Zvereva & Kozlov, 2006; Stutte *et al.*, 2008; Lindroth, 2010; Goufo *et al.*, 2014; Rezende *et al.*, 2015).

Este experimento realizado com *C. arabica* indicou que as cultivares Catuaí e Obatã acumularam maiores teores foliares de FST quando cultivadas em CO<sub>2</sub> elevado (~760 ppm) durante 100 dias. De acordo com Poorter *et al.* (1997), nas plantas, os componentes com maior conteúdo energético são mais caros para serem produzidos: 2,1 - 3,0 g glucose.g<sup>-1</sup> para lipídeos, compostos fenólicos solúveis, proteínas e ligninas enquanto outros como, carboidratos não estruturais e ácidos orgânicos, são formados com relativamente pouca quantidade de glucose (0,9 - 1,2 g glucose.g<sup>-1</sup>). Sendo assim, a maior disponibilidade de moléculas de glucose (Figura 7) possivelmente favoreceu o alto investimento na produção de FST observado nos cafeeiros cultivados em alto CO<sub>2</sub>.

***Alterações nos teores de Carbono (C) e Nitrogênio (N), Razão C/N, discriminação isotópica do carbono ( $\Delta^{13}C$ ) e razão pi/pa.***

As cultivares de cafeeiros Catuaí e Obatã cultivadas em CO<sub>2</sub> elevado apresentaram respostas semelhantes, porém, com intensidades de variações distintas nos teores foliares de nitrogênio (N). A cultivar Catuaí apresentou tendência de redução (7% em média) enquanto a Obatã apresentou redução média de 14% com reduções estatisticamente significativas praticamente durante todo o experimento (Figuras 9 e 10).

Sabe-se que os cafeeiros, em condições atmosféricas de CO<sub>2</sub>, são exigentes quanto aos teores de N que normalmente estão entre 3 e 4% (Malavolta 2002). De acordo com Moraes (1981) valores abaixo de 2,3 e 2,7 são considerados deficientes o que indica que

a cultivar Obatã apresentou deficiência de N no tratamento CO<sub>2</sub> elevado pois apresentou teor médio de 2,1% ao final do período experimental nas OTCs .

Alguns autores sugerem que a retroinibição da fotossíntese está relacionada a diminuição da força dreno causada por deficiência de N. Sanz-Saèz *et.al* (2010) demonstraram em Alfafa (leguminosa) que a suplementação com N resultou em altas taxas de A associadas a maiores teores foliares de N e redução do acúmulo de AST e de amido quando cultivadas em CO<sub>2</sub> elevado. Corroborando esses resultados, observamos que os cafeeiros cultivados em CO<sub>2</sub> elevado apresentaram queda nos teores foliares de N associadas à diminuição das taxas fotossintéticas (Figuras 3 e 4) e maior acúmulo de AST e amido (Figura 6).

Jifon & Wolfe (2002) observaram que o efeito de N na aclimação ao CO<sub>2</sub> elevado depende do balanço entre disponibilidade e demanda por N com efeitos na alocação de biomassa em função de alterações na relação fonte-dreno. Deficiência de N pode afetar o crescimento do vegetal reduzindo a capacidade de produção de novos drenos (Chaves *et al.*, 2012). É possível que no caso dos cafeeiros, a diminuição dos teores foliares de N tenha contribuído para que os parâmetros de crescimento observados não tenham sido significativamente maiores no tratamento CO<sub>2</sub> elevado.

Markelz *et al.* (2014) avaliaram o efeito de diferentes suplementações com N em *Arabidopsis thaliana* cultivada em duas diferentes concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> e observaram que o menor fornecimento de N implicou o aumento da taxa de respiração no escuro bem como o aumento da transcrição gênica de componentes da via respiratória. Em nosso estudo com cafeeiros observamos que o aumento das taxas de respiração (Figura 5) coincidiu com os mais baixos teores foliares de N, quantificados nas duas cultivares aos 96 dias de tratamento com CO<sub>2</sub> elevado (Figuras 9B e 10B).

Corroborando nossos resultados, Martins *et al.* (2014) reportaram significativas reduções de N em folhas de três genótipos de *Coffea* sp cultivados sob diferentes atmosferas de CO<sub>2</sub> e diferentes faixas de temperatura. Nesse estudo, a maior concentração de CO<sub>2</sub> (700 ppm) diminuiu significativamente os teores foliares de N independentemente da temperatura e do genótipo.

Houve uma tendência de redução dos teores foliares de carbono (C) em todos os dias (significativa aos 25 dias) na cv. Obatã (Figura 10A) e até 46 dias na cv. Catuaí (Figura 9A) resultando numa queda tendencial de 1% em média nesses teores. De acordo com Poorter *et al.* (1992) geralmente o conteúdo de carbono aumenta em folhas e caules e diminui nas raízes de plantas cultivadas em alto CO<sub>2</sub>. O que não está de acordo com este estudo, que indicou tendência de aumento de carbono nas raízes e diferentes tendências nas folhas e caules das duas cultivares estudadas. O mesmo autor enfatiza, no entanto, que o conteúdo de carbono na folha depende de sua composição química, uma vez que, diferentes compostos apresentam quantidades diferentes de carbono na estrutura molecular. Açúcares solúveis, por exemplo, apresentam menos carbono molecular (0,412 g.g<sup>-1</sup>) que lipídios (0,776 g.g<sup>-1</sup>) segundo Poorter (1989).

As alterações nos teores foliares de C e N dos cafeeiros cultivados em elevado CO<sub>2</sub> resultaram em uma tendência de elevação (7% em média) da razão C/N na cultivar Catuaí enquanto na cultivar Obatã a elevação dessa razão ocorreu em todos os dias de experimento resultando no aumento médio de 17%. No caso, a elevação de C/N ocorreu pela diminuição dos teores foliares de nitrogênio e não pelo aumento dos teores de carbono.

Essa mesma relação foi vista para seis espécies anuais de gramíneas que apresentaram aumento nas razões C/N sob elevado CO<sub>2</sub> devido à diminuição de N, ao invés do aumento de carbono por unidade de massa seca, ou seja, o aumento de C/N foi decorrente da redução na assimilação de N e não da diluição de N pelo acúmulo de carboidratos (Hungate *et al.*, 1996). Esse efeito também foi observado em *Senna reticulata* exposta à elevado CO<sub>2</sub> (~760ppm) durante 135 dias (Arenque *et al.*, 2014).

Em um trabalho com *Arabidopsis* e trigo (duas espécies C3) foi verificado que o elevado CO<sub>2</sub> (720 ppm) inibiu a assimilação de nitrato em compostos orgânicos nitrogenados e que sua inibição poderia estar relacionada aos processos de aclimação, como o decréscimo da fotossíntese e do crescimento em plantas C3 em períodos de longa exposição ao enriquecimento atmosférico de CO<sub>2</sub> (Bloom *et al.*, 2010).

Alguns autores relacionam a aclimação fotossintética observada em plantas cultivadas em elevado CO<sub>2</sub> à redução do teor foliar de nitrogênio e, portanto, dos níveis de Rubisco uma vez que esta enzima corresponde a 20% a 30 % do total de proteínas da

folha. A relação entre aclimatação da fotossíntese e redução do teor foliar de N foi investigada por *Rogers et al.* (1998). Nesse trabalho, a gramínea *Lolium perenne* foi cultivada em diferentes concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> e diferentes níveis de adubação com nitrogênio. Os resultados indicaram que a aclimatação fotossintética sob baixo teor de N esteve relacionada à limitações ao desenvolvimento de novos drenos e não ao efeito direto da redução do teor de nitrogênio disponível para a fotossíntese.

Embora neste estudo não tenham sido avaliados parâmetros relativos à atividade e aos teores foliares de Rubisco, a redução dos teores foliares de N associada ao acúmulo de açúcares observado nas folhas dos cafeeiros cultivados em alto CO<sub>2</sub> foram indicadores de aclimatação conforme indicado na literatura para diversas espécies de fotossíntese tipo C3 assim como *C.arabica*.

O cultivo em atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> promoveu acréscimos nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$ . Em média, esses valores aumentaram em 16% nos cafeeiros Catuaí e em 8% na cultivar Obatã. Conforme apontado por alguns autores, o processo de fracionamento contra o isótopo mais pesado  $^{15}\text{N}$  em plantas pode ocorrer durante a assimilação de N na forma de NH<sub>x</sub> ou NO<sub>x</sub> e pode diminuir quando N não é abundante (Hobbie & Ouimette, 2009; Esmeyer-Liu *et al.*, 2012). Esse comportamento foi observado nos cafeeiros expostos ao tratamento CO<sub>2</sub> elevado uma vez que, de forma geral, os teores de  $^{15}\text{N}$  aumentaram no momento em que os teores de nitrogênio reduziram, o que significa que houve menor discriminação contra o isótopo pesado  $^{15}\text{N}$  quando o nitrogênio não estava tão disponível nas folhas (Figuras 8 C/D e 9 C/D).

Os cafeeiros cultivados em atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> apresentaram diminuição dos valores absolutos de  $\delta^{13}\text{C}$  (valores mais negativos) em ambas as cultivares e com mais intensidade nos cafeeiros Obatã que tiveram redução média de 22% enquanto que na cv. Catuaí os teores reduziram em média 20% (Figuras 8E e 9E). De acordo com o modelo proposto por Farquhar *et al.* (1989), a discriminação contra o isótopo pesado ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) ocorre durante a fixação fotossintética do C e isto está refletido nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  dos tecidos vegetais. Os valores de  $\Delta^{13}\text{C}$  aumentaram em média 26% nos cafeeiros Catuaí e 30% nos cafeeiros Obatã (Figuras 8F e 9F) indicando, de acordo com esse modelo, maior discriminação do isótopo  $^{13}\text{C}$  durante a assimilação fotossintética dos cafeeiros cultivados em alto CO<sub>2</sub>.

Nos cafeeiros cultivados sob alta concentração atmosférica de CO<sub>2</sub>, as razões  $pi/pa$  aumentaram em relação ao tratamento CO<sub>2</sub> ambiente em todos os dias analisados com diferenças entre os cafeeiros Catuaí e Obatã, sendo os valores ligeiramente superiores na cultivar Obatã. De acordo com Farquhar & Sharkey (1982), em plantas C3, há uma relação linear entre  $pi/pa$  e  $\Delta^{13}C$ , ou seja, quando  $pi/pa$  é baixa,  $\Delta^{13}C$  é governada por fracionamento difusional do carbono, enquanto que, se  $pi/pa$  é elevada então  $\Delta^{13}C$  é governada por fracionamento devido à carboxilação. Sendo assim, nossos resultados indicam que a discriminação contra o isótopo <sup>13</sup>C observada nos cafeeiros possa ter ocorrido por fracionamento devido à carboxilação e não esteve relacionada à limitações difusivas ao CO<sub>2</sub>, ou seja, a maior disponibilidade de CO<sub>2</sub> na atmosfera enriquecida colabora para diminuir as limitações difusivas resultando em maior discriminação contra o isótopo pesado por parte de Rubisco.

A avaliação da composição isotópica de carbono em cafeeiros cv. Catuaí vermelho realizada por Silva *et al.* (2004) indicou uma alta correlação negativa entre  $A$  e  $\Delta^{13}C$  nas folhas, concluindo que  $\Delta^{13}C$  teria sido um bom parâmetro indicador de respostas de cafeeiros a limitações ambientais.

Este experimento indica que cafeeiros submetidos ao dobro da concentração atmosférica atual de CO<sub>2</sub>, durante 100 dias, não apresentam alterações significativas de crescimento ainda que tendências de acúmulo de carbono sejam observadas em diferentes órgãos das plantas. Há efeito positivo nas taxas de assimilação de carbono em resposta à luz, principalmente na cultivar Catuaí, associado à elevação dos pontos de saturação por luz e do ponto de compensação de CO<sub>2</sub>, além de redução da respiração no escuro ao final do período. Os teores de carboidratos aumentam até os 46 dias sendo que a cv. Catuaí tende a acumular maiores teores de glicose e frutose enquanto a cv. Obatã acumula maiores teores de amido. A aclimatação fotossintética ocorre simultaneamente ao acúmulo de amido envolvendo, possivelmente, mecanismos de sinalização por açúcares e estando também associada à redução dos teores de nitrogênio observada nas duas cultivares. As duas cultivares estudadas acumulam maiores teores de compostos fenólicos em função da maior disponibilidade de carboidratos. A variação dos teores de <sup>15</sup>N está opostamente relacionada à disponibilidade de nitrogênio enquanto que a diminuição dos teores de <sup>13</sup>C indica a diluição isotópica do carbono resultando em maiores valores de

$\Delta^{13}\text{C}$  os quais, por sua vez, estão diretamente relacionados à queda das taxas fotossintéticas das plantas, visando o controle do fluxo de carbono.

### 3.2 EXPERIMENTO II: ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE CAFEEIROS EXPOSTOS AO FUNGO CAUSADOR DA FERRUGEM ALARANJADA (*HEMILEIA VASTATRIX*) E CULTIVADOS EM ATMOSFERA ENRIQUECIDA COM CO<sub>2</sub>.

#### 3.2.1 MATERIAL E MÉTODOS

##### 3.2.1.1 MATERIAL VEGETAL, CONDIÇÕES DE CULTIVO, INOCULAÇÃO DO PATÓGENO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Ao final do experimento 1, os cafeeiros utilizados foram retirados das OTCs e permaneceram na casa de vegetação sendo cultivados sob atmosfera ambiente de CO<sub>2</sub> até a execução deste novo experimento, realizado entre março e abril de 2013, quando então os cafeeiros apresentavam um ano e meio de idade. Nesse período, a temperatura mínima variou entre 11,3°C e 20,7°C e a máxima entre 18°C e 32,8°C. Os cafeeiros foram inoculados com uredíniosporos da raça II do fungo *Hemileia vastatrix*, gentilmente fornecidos pela Pesquisadora Dra. Masako Toma Braghini, do Centro de Café “Alcides Carvalho” do Instituto Agrônomo de Campinas-SP. A suspensão de uredíniosporos foi preparada em água destilada acrescida de Tween 20 (1 gota em 500 mL de água destilada) sob agitação constante, sendo calibrada em câmara de Neubauer na concentração aproximada de  $1 \times 10^5$  uredíniosporos/mL. Após 10 dias de aclimação dos cafeeiros às condições atmosféricas das OTCs, a suspensão de esporos foi aspergida nas faces abaxiais do 2º e 3º par de folhas de todas as plantas mantidas em uma câmara com CO<sub>2</sub> ambiente (380 ppm) e outra em CO<sub>2</sub> elevado (~760 ppm). Imediatamente após a aspersão do inóculo, os cafeeiros foram transferidos para câmara escura e mantidas durante 48 horas sob atmosfera saturada de água utilizando-se umidificador de ar eletrônico. Para fins de controle, duas OTCs sob as mesmas condições ambientais, não receberam inóculo. Ao final desse período, as plantas foram transportadas para as OTCs iniciando-se então os procedimentos de coleta de folhas. Em cada uma das OTCs foram coletados três pares de folhas de indivíduos diferentes nos tempos 0 (após a aspersão do inóculo, manutenção em câmara escura e transporte para as OTCs) 1, 2, 4, 7, 14 e 28 dias a partir da inoculação do patógeno. As folhas foram lavadas em água destilada e imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido, maceradas, liofilizadas e armazenadas em freezer (-20°C) para análises posteriores. Constatado o surgimento dos sintomas característicos da ferrugem do cafeeiro, o ensaio foi finalizado totalizando 45 dias de cultivo dos cafeeiros nas OTCs. A quantificação de área lesionada de dez folhas de seis plantas foi executada com auxílio do software ASSES (Image Analysis Software for Plant Disease Quantification versão

2.0).” O experimento foi inteiramente casualizado e os fatores foram: genótipos (Catuaí x Obatã); CO<sub>2</sub> (ambiente x elevado) e patógeno (com patógeno x sem patógeno).

#### *3.2.1.2 CURVAS DE RESPOSTA DA FOTOSÍNTESE À LUZ*

Os procedimentos de obtenção e ajuste das curvas de taxas de assimilação líquida de carbono ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) em resposta ao fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFF), foram descritos no item 3.1.1.2. As medidas foram efetuadas no 19º, 40º, 41º, 42º e 45º dia de cultivo dos cafeeiros nas OTCs. Foram medidas duas plantas de cada cultivar por tratamento com CO<sub>2</sub>, sendo uma planta inoculada e uma não inoculada.

#### *3.2.1.3 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS*

##### *Análise quantitativa de carboidratos*

Foram quantificados os teores de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e amido em folhas totalmente expandidas do 3º/4º pares, a partir do ápice, de ramos plagiotrópicos de cafeeiros cultivados em OTCs coletadas aos 0, 7, 14 e 28 dias de exposição ao CO<sub>2</sub>. Os procedimentos analíticos foram descritos no item 3.1.1.4. Foram analisadas três amostras compostas por tratamento (n=3). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de glucose g MS<sup>-1</sup>.

##### *Análise qualitativa dos carboidratos solúveis por cromatografia líquida de troca aniônica de alta resolução (HPAEC/PAD)*

Os perfis cromatográficos de glucose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiiose foram determinados nas amostras coletadas nos dias 0, 14 e 28 contados a partir da inoculação do patógeno. Os procedimentos analíticos estão descritos no item 3.1.1.4. Foram analisadas três amostras compostas por tratamento (n=3). As análises foram conduzidas em triplicata técnica. Os resultados foram expressos em mg g MS<sup>-1</sup>.

#### *3.2.1.4 TEORES DE FENÓLICOS SOLÚVEIS TOTAIS*

Foram determinados os teores de fenólicos solúveis totais em folhas coletadas nos dias 0, 1, 2, 4, 7, 14 e 28 dias a partir da inoculação do patógeno. Os procedimentos analíticos estão descritos no item 3.1.1.5. Foram analisadas três amostras compostas por tratamento (n=3). As análises foram conduzidas em triplicata técnica. Os teores foram calculados com base em uma curva padrão de ácido tânico e os resultados foram

expressos em mg de ácido tânico g MS<sup>-1</sup>.

#### *3.2.1.5 TEORES DE LIGNINA*

As análises de lignina seguiram o método de Doster & Bostock (1988). Cada amostra analisada foi composta por 30 mg de tecidos foliares submetidos a duas extrações sucessivas com 1,5 mL de solução metanólica 80% (v/v), durante 30 minutos em agitação contínua por ultrassom. Após a extração as amostras foram centrifugadas em microcentrífuga a 12.000 rpm durante 5 min e os sobrenadantes foram separados. Os resíduos sólidos foram secos durante 6 h em estufa com circulação forçada de ar à 70°C e resfriados à temperatura ambiente. Após a secagem, o resíduo foi misturado com 1,5 mL de uma solução de 98% de ácido tioglicólico e HCl 2 N (1:10, v/v) e mantidos em um banho-maria a aproximadamente 100° C por 4 h. Em seguida, os microtubos foram rapidamente resfriados em banho com gelo e centrifugados a 12.000 rpm por 10 min, descartando-se os sobrenadantes. Os resíduos sólidos foram lavados com 1,5 mL de água destilada, centrifugados novamente a 10.000 rpm por 10 min e, após o descarte do sobrenadante, foram solubilizados em 1,5 mL de NaOH 0,5N. As suspensões foram mantidas “overnight” em agitador rotativo em temperatura ambiente, sendo em seguida centrifugadas (10.000 rpm por 10 min). Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos aos quais foram adicionados 200 µL de HCl concentrado e transferidos para uma câmara fria, onde permaneceram por 4 h. Foi realizada uma última centrifugação (10.000 rpm por 10 min), descartando-se os sobrenadantes e solubilizando-se os precipitados em 2 mL de NaOH 0,5N. Foram analisadas três amostras compostas por tratamento (n=3). As análises foram conduzidas em triplicata técnica. Os resultados foram calculados com base em uma curva padrão de Lignin,alkali, 2-hydroxypropyl ether (Sigma-Aldrich ®). Os teores de lignina foram expressos em mg.g MS<sup>-1</sup>.

#### *3.2.1.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA*

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de três fatores sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade (P<0,05). As análises foram efetuadas com auxílio do software R.

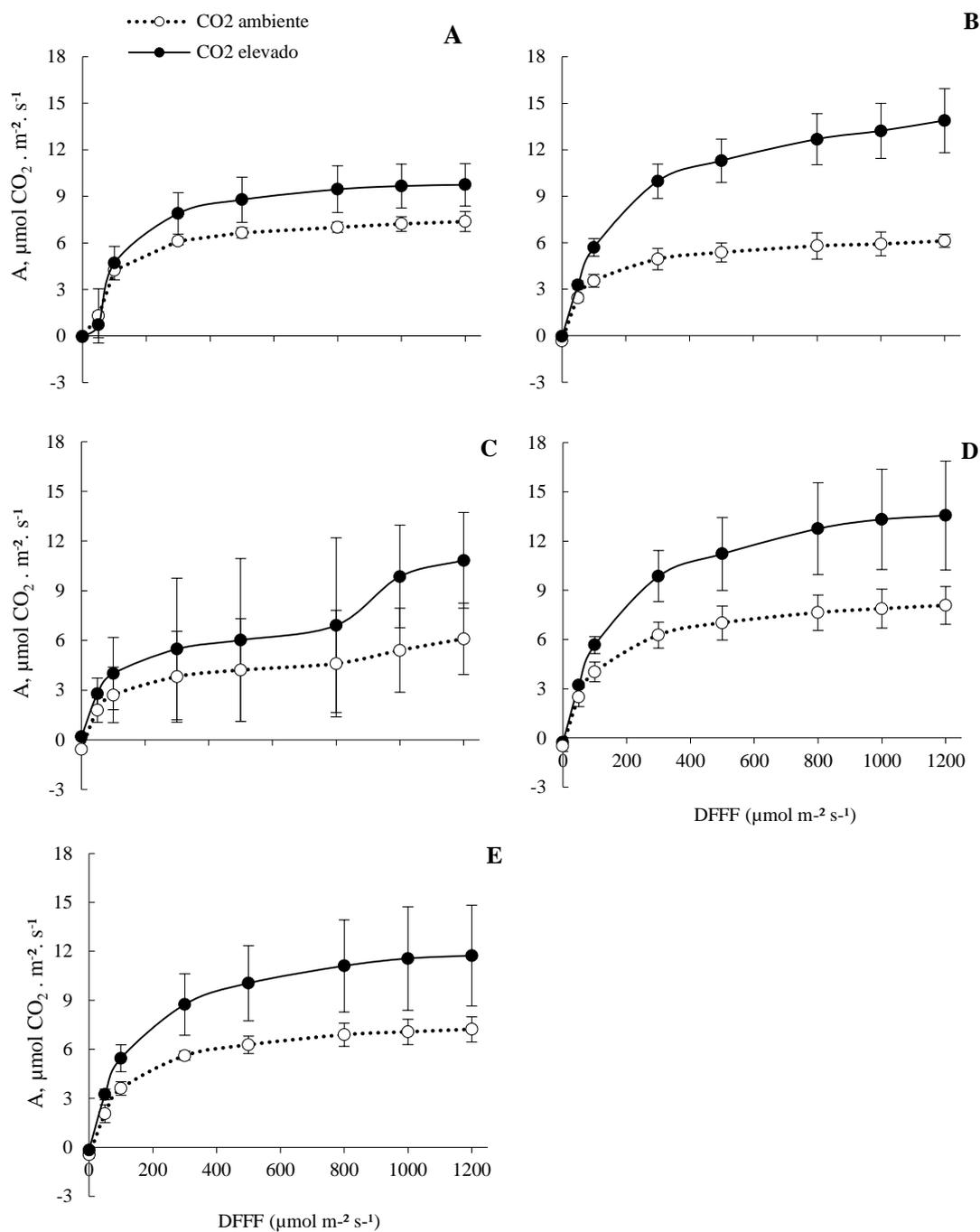
### 3.2.2 RESULTADOS

#### *Efeito de diferentes concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> na ocorrência de ferrugem alaranjada*

Ao final de 35 dias após a inoculação do patógeno, foi feita a avaliação da ocorrência de ferrugem alaranjada nos cafeeiros. Foram observadas pústulas esporuladas somente em folhas de cafeeiros da cultivar Catuaí cultivadas em ambas as concentrações de CO<sub>2</sub>. A proporção de área lesionada nas folhas de cafeeiros Catuaí cultivados sob CO<sub>2</sub> atmosférico foi  $7,0 \pm 3,4$  (média  $\pm$  desvio padrão) e  $10,6 \pm 4,0$  nos cafeeiros cultivados em CO<sub>2</sub> elevado. Não houve ocorrência de ferrugem alaranjada nos cafeeiros da cultivar Obatã sob nenhuma das concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> nas OTCs.

#### *Curvas de resposta da fotossíntese à luz*

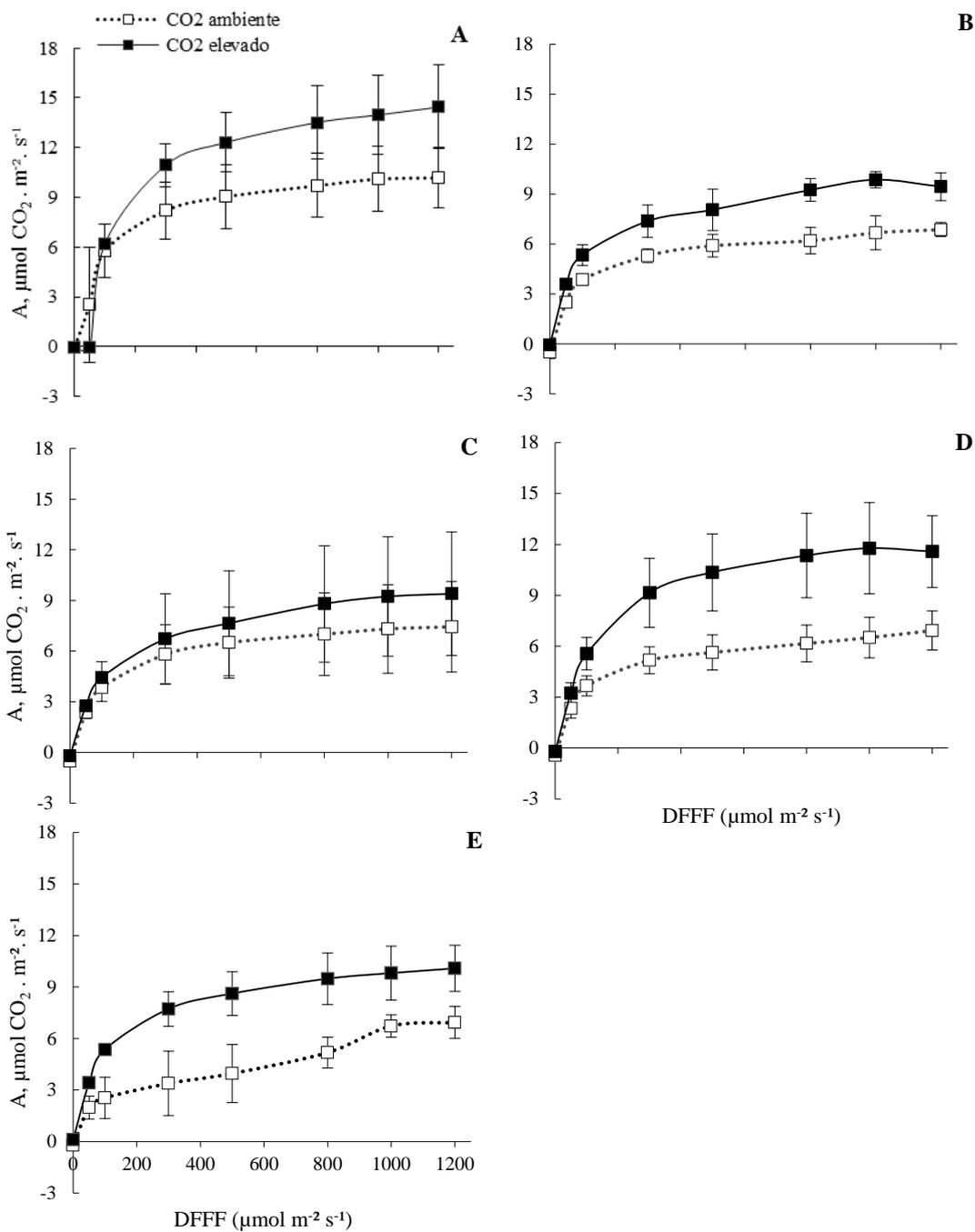
As medidas instantâneas das taxas de assimilação líquida de carbono (*A*) em resposta à densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) indicaram que o tratamento com CO<sub>2</sub> elevou as taxas de assimilação de carbono nos cafeeiros Catuaí (Figura 11) e Obatã (Figura 12) em todos os dias analisados. Nos cafeeiros cultivados em CO<sub>2</sub> ambiente, as máximas taxas de assimilação de carbono foram em média  $7,0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nos cafeeiros Catuaí e  $7,6 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nos cafeeiros Obatã. Nos cafeeiros cultivados em CO<sub>2</sub> elevado, os valores foram de  $11,4 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  na cv. Catuaí e  $11,0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  na cv. Obatã.



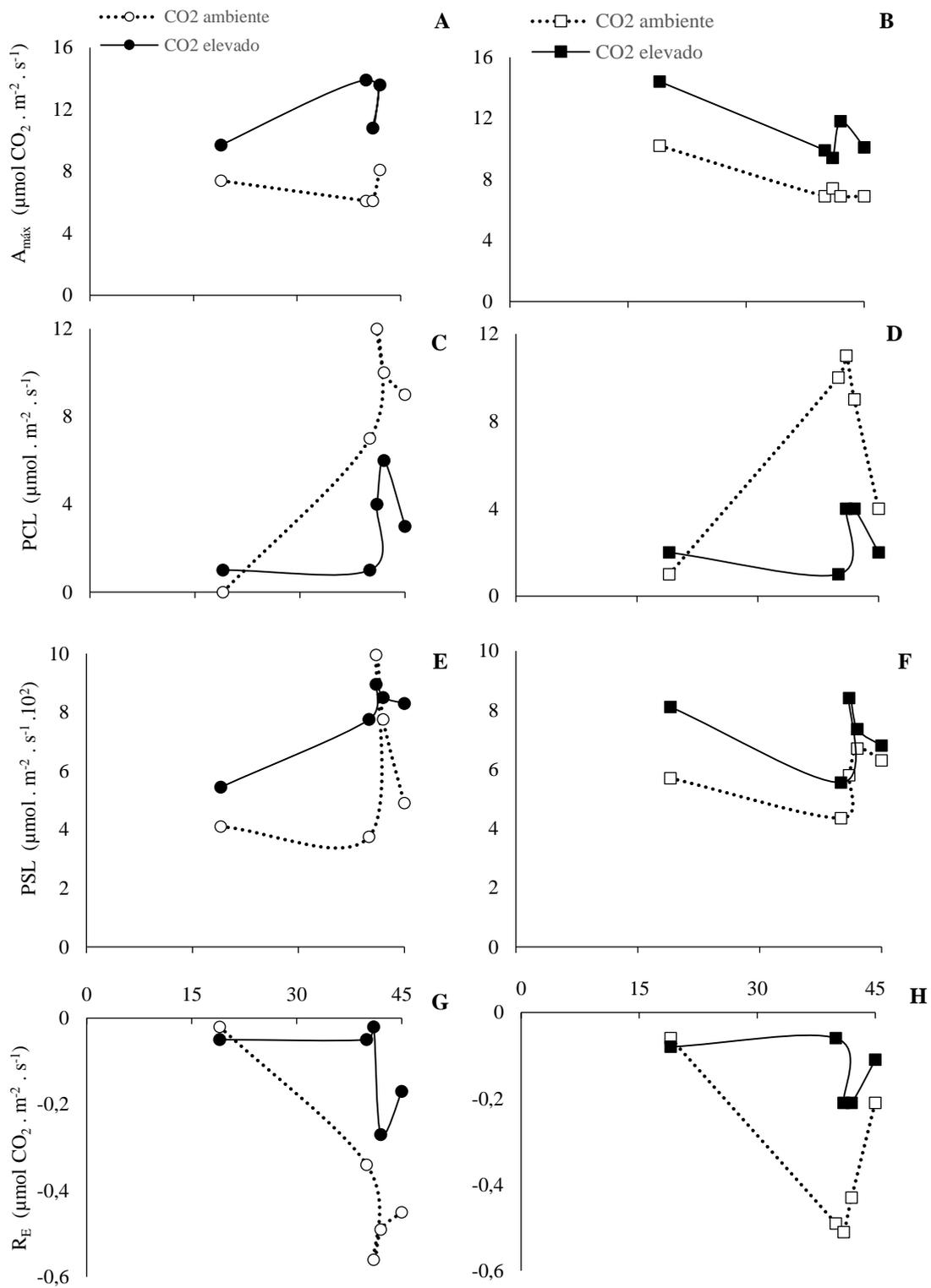
**Figura 13:** Curvas de resposta da fotossíntese à luz de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho determinadas nos dias 19 (A), 40 (B), 41 (C), 42 (D), 45 (E) de cultivo em atmosfera ambiente de  $\text{CO}_2$  (380 ppm) e atmosfera com  $\text{CO}_2$  elevado (760 ppm) durante 45 dias em OTCs. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de duas plantas (n=2).

Nos cafeeiros Catuaí os valores de  $A_{max}$  foram maiores no tratamento CO<sub>2</sub> elevado em praticamente todos os dias analisados, correspondendo a um aumento médio de 71% em relação ao tratamento CO<sub>2</sub> ambiente ao longo do experimento (Figura 13A). Os valores de PCL diminuíram em média 61% (Figura 13C) enquanto que os valores de PSL aumentaram em média 28% (Figura 13E). A respiração no escuro diminuiu no tratamento CO<sub>2</sub> elevado em média 70%, sendo os valores mais negativos registrados a partir de 82 dias de experimento (Figura 13G).

Nos cafeeiros Obatã, os valores de  $A_{max}$  foram em média 45% superiores no tratamento CO<sub>2</sub> elevado. Valores menores, em comparação com o tratamento CO<sub>2</sub> ambiente, foram observados nos dias 25, 68 e 96 (Figura 13B). Os valores de PCL diminuíram no tratamento com CO<sub>2</sub> elevado em média de 63% (Figura 13D). O ponto de saturação por luz foi 25% maior no tratamento CO<sub>2</sub> elevado (Figura 13F). À semelhança do observado nos cafeeiros Catuaí, na cultivar Obatã a respiração no escuro diminuiu a partir de 82 dias e foi, em média, 61% menor no tratamento CO<sub>2</sub> elevado (Figura 13H).



**Figura 12:** Curvas de resposta da fotossíntese à luz de *Coffea arabica* cultivar Obatã vermelho determinadas nos dias 19 (A), 40 (B), 41 (C), 42 (D), 45 (E) de cultivo em atmosfera ambiente de CO<sub>2</sub> (380 ppm) e atmosfera com CO<sub>2</sub> elevado (760 ppm) durante 45 dias em OTCs. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de duas plantas (n=2).



**Figura 13:** Taxas de máxima assimilação líquida de carbono ( $A_{\text{máx}}$ ), ponto de compensação de luz (PCL), ponto de saturação de luz (PSL) e taxas de respiração no escuro ( $R_E$ ) de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho (A,C,E,G) e cv. Obatã vermelho (B,D,F,H) determinadas aos 19, 40, 41, 42 e 45 dias de cultivo em  $\text{CO}_2$  ambiente (380ppm) e  $\text{CO}_2$  elevado (~760ppm) em OTCs. Cada ponto representa a média de duas plantas ( $n=2$ ).

### *Teores foliares de carboidratos não estruturais*

Os cafeeiros suscetíveis à ferrugem (Catuaí) que não foram inoculados e cultivados em CO<sub>2</sub> elevado apresentaram elevação média dos teores de AST (15%) com alterações significativas nos dias 0 e 7 (Figura 14A); redução média dos teores de AR (14%) com alteração significativa no dia zero (Figura 14C) e aumento médio nos teores de amido (35%) sendo o maior teor observado no dia 7 e menor teor no dia 28 (Figura 14E).

Os cafeeiros suscetíveis inoculados com *H. vastatrix* e cultivados em CO<sub>2</sub> elevado apresentaram redução do valor médio de teores de AST (17%) que foram menores nos dias 14 e 28 (Figura 14B). Houve aumento médio dos teores de AR (31%) de forma significativa nos dias 0 e 7 (Figura 14D). Foi observada elevação média dos teores de amido (27%) significativamente nos dias 0, 7 e 14 (Figura 14E).

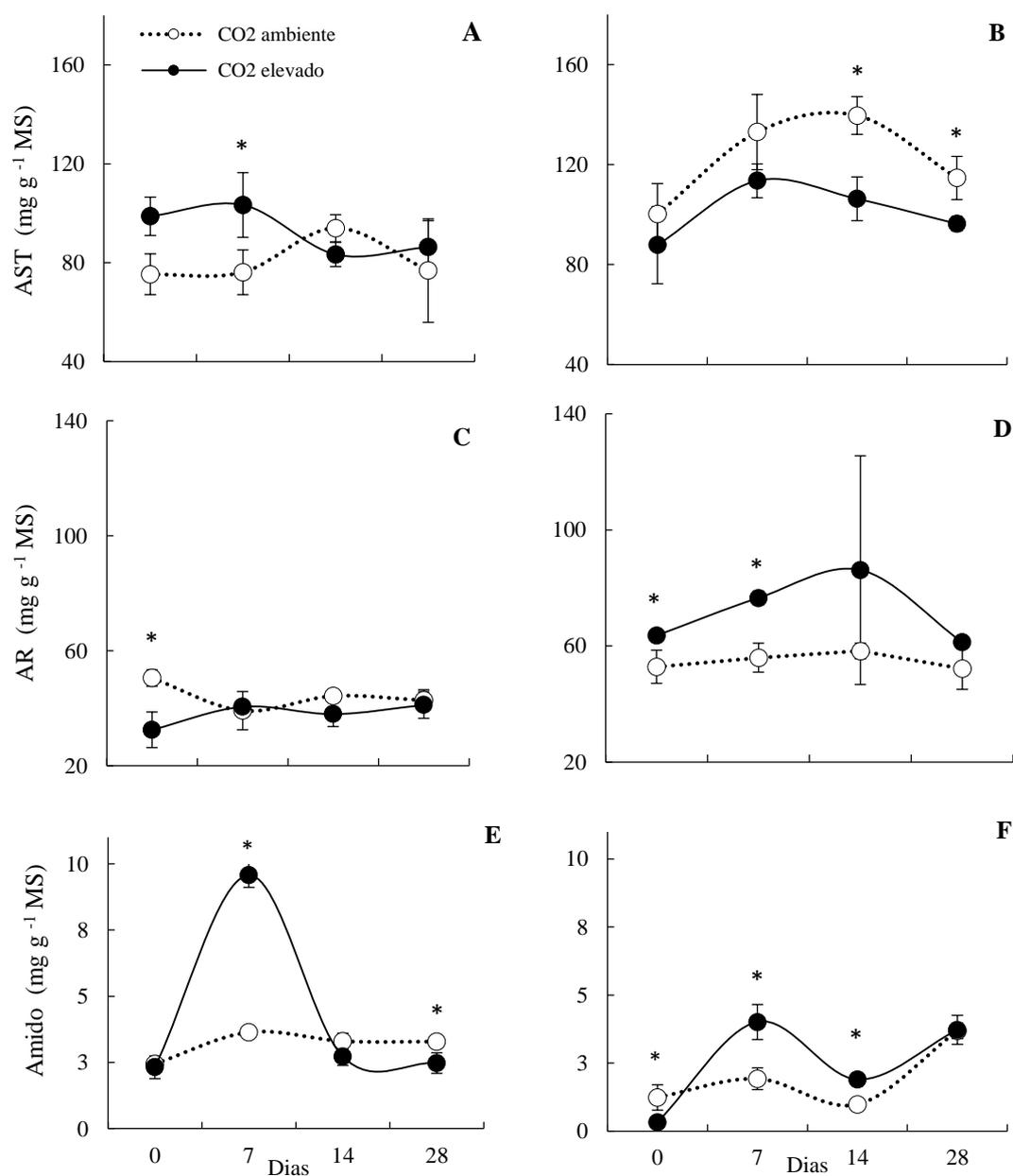
Os cafeeiros resistentes à ferrugem (Obatã) que não foram inoculados com *H. vastatrix* e foram cultivados em CO<sub>2</sub> elevado apresentaram maiores teores de AST (74%) em todos os dias analisados, sendo significativos nos dias 0 e 14 (Figura 15A); os teores de AR tiveram aumento médio de 35% , significativo aos 14 dias (Figura 15C), enquanto os teores de amido tiveram elevação média de 58% com valores significativamente maiores nos dias 7 e 28 (Figura 15E).

Quando inoculados com o patógeno, os cafeeiros resistentes (Obatã) cultivados em elevado CO<sub>2</sub> tiveram aumento médio de 5% nos teores de AST (Figura 15B); redução média de 6% dos teores de AR (Figura 15D) e aumento significativo de cerca de 25% dos teores de amido nos dias 7 e 14 (Figura 15F).

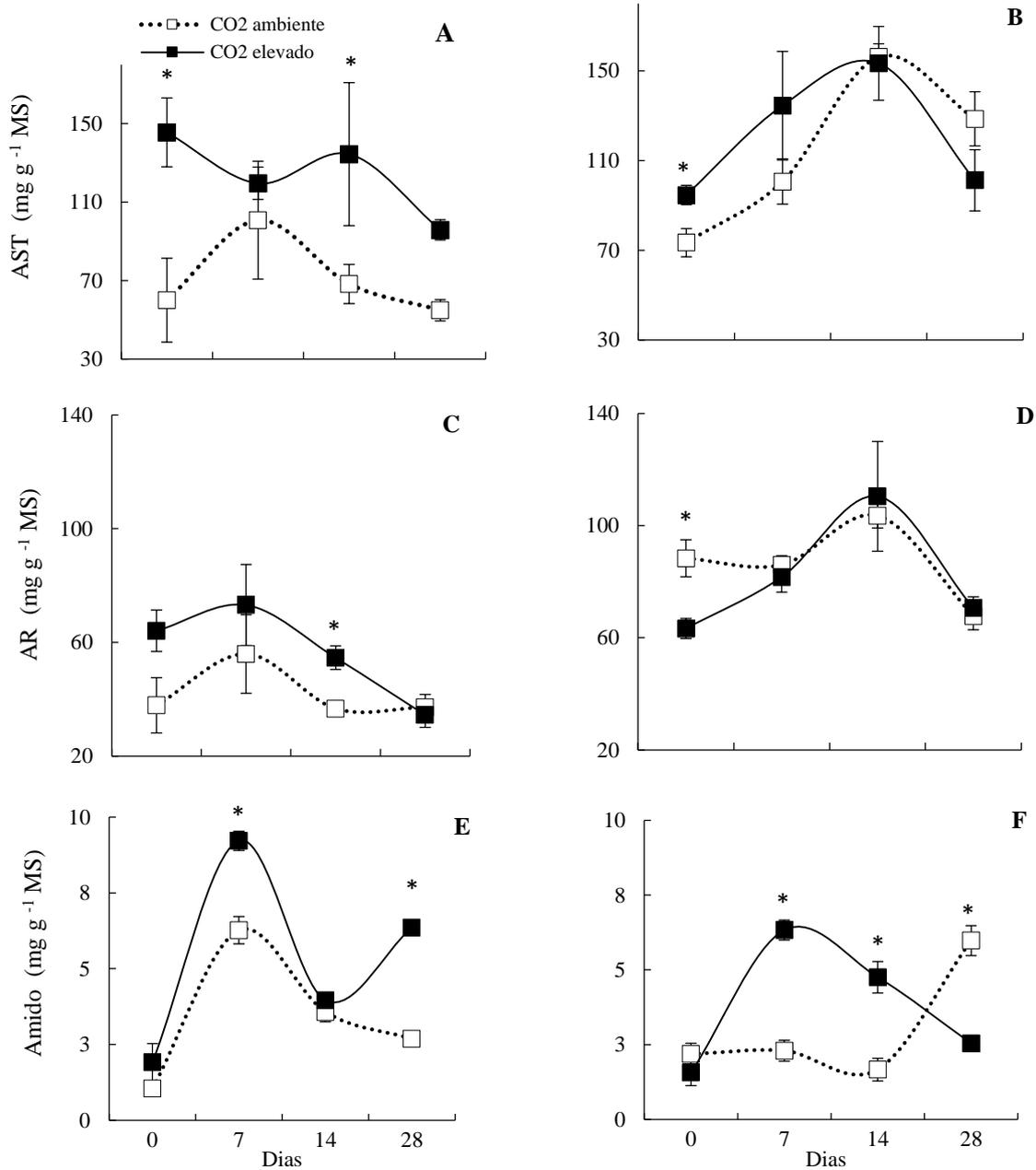
Os perfis cromatográficos de açúcares solúveis indicaram que cafeeiros suscetíveis não inoculados e cultivados em alto CO<sub>2</sub> tiveram reduções médias de 29% nos teores de glucose (Figura 16A), de 40% nos teores de frutose (Figura 16C), de 7% nos teores de sacarose (Figura 16E), de 17% nos teores de rafinose (Figura 16G) e de 28% nos teores de estaquiose (Figura 16I). Quando inoculados com o patógeno, os cafeeiros cultivados em alto CO<sub>2</sub> apresentaram redução geral média dos teores de açúcares solúveis. As reduções médias foram de 11% para glicose (Figura 16B) e de 27% para frutose (Figura 16D).

Os cafeeiros resistentes à ferrugem (Obatã) não inoculados e cultivados em CO<sub>2</sub> elevado apresentaram aumento médio dos teores de glucose (92%), de frutose (31%), de sacarose (22%), de estaquiose (11%) enquanto os teores de rafinose diminuíram em média 17% (Figuras 17A,C, E, I, G, respectivamente).

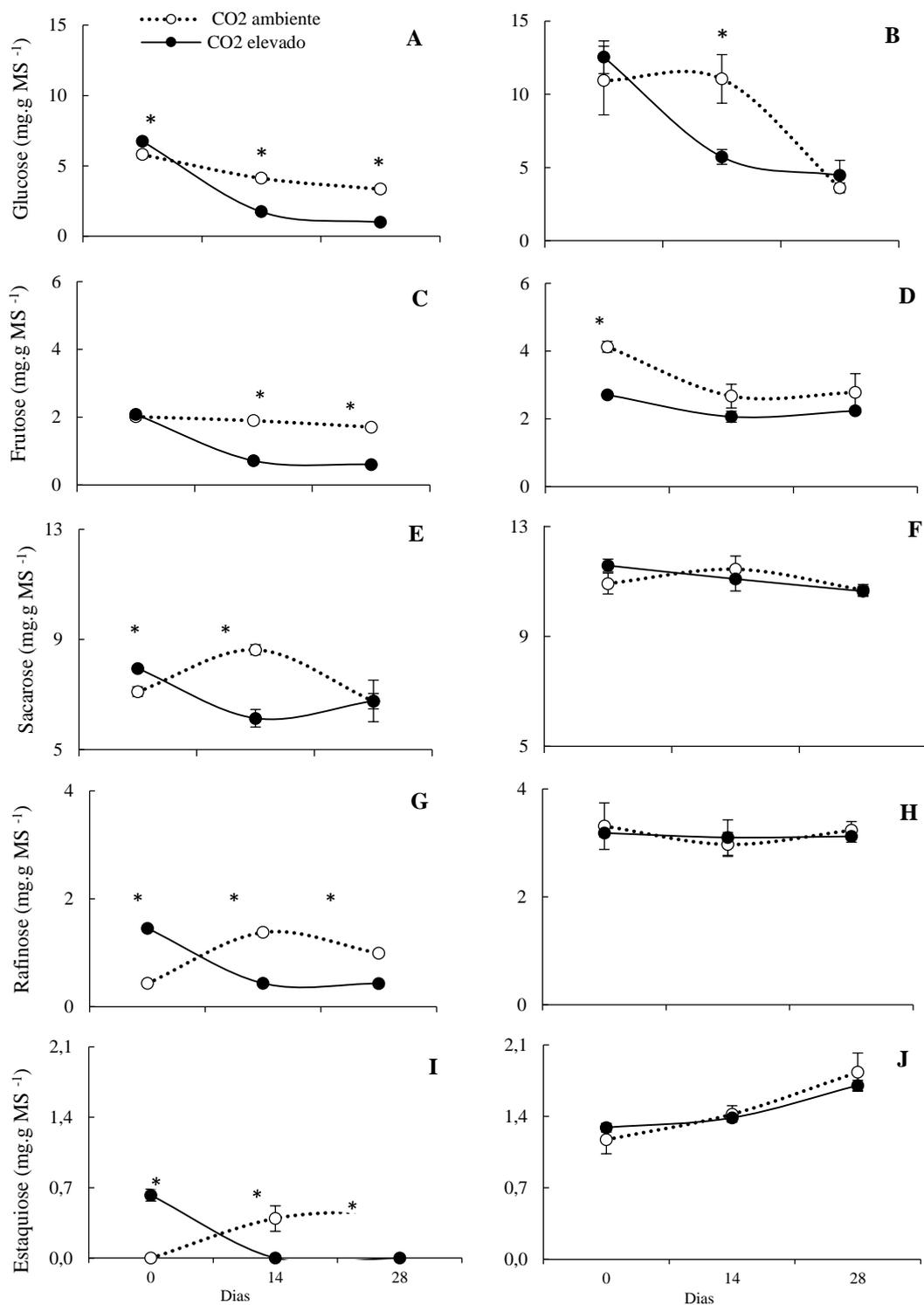
Os cafeeiros resistentes inoculados com *H. vastatrix* e cultivados em CO<sub>2</sub> elevado apresentaram elevação média dos teores de glucose (42%), de frutose (69%), de estaquiose (8%) conforme indicado nas figuras 17B, D e J, respectivamente. Os teores de sacarose apresentaram redução aos 28 dias, porém em média não foram alterados pelos tratamentos (Figura 17F) enquanto que os teores de rafinose tiveram redução média de 11% (Figura 17H).



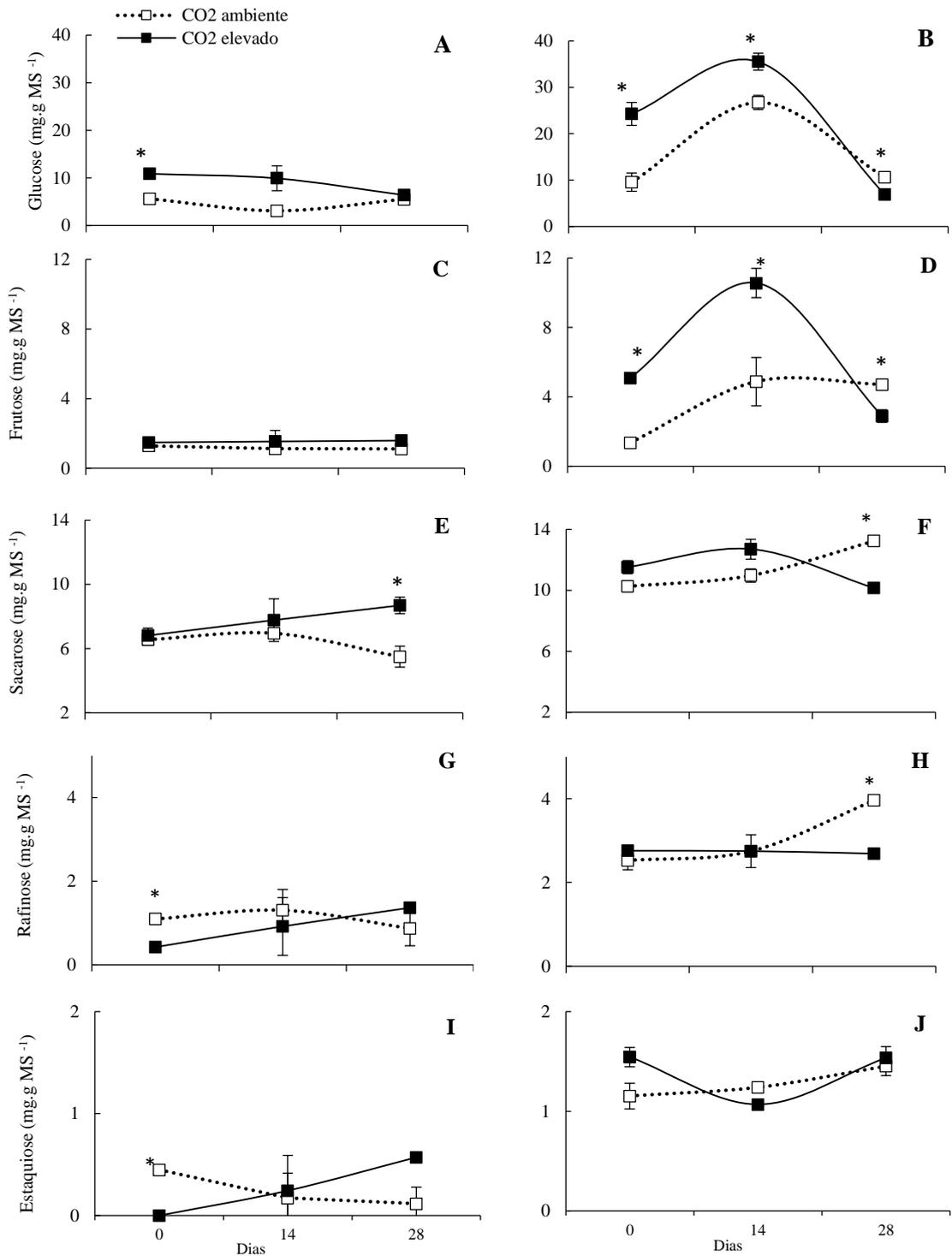
**Figura 14** : Teores de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e amido de folhas de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho não inoculados com *H. vastatrix* (A, C, E) e inoculados (B, D, F), analisados nos dias 0, 7, 14 e 28 de cultivo em CO<sub>2</sub> ambiente (380ppm) e CO<sub>2</sub> elevado (~760ppm) em OTCs. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de três amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos com CO<sub>2</sub> (Teste de Tukey, P < 0,05).



**Figura 15:** Teores de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e amido de folhas de *Coffea arabica* cv. Obatã vermelho não inoculados (A, C, E) e inoculados (B, D, F) com o fungo *H. vastatrix* e analisados nos dias 0, 7, 14 e 28 de cultivo sob atmosfera ambiente de CO<sub>2</sub> (380 ppm) e atmosfera com CO<sub>2</sub> elevado (760 ppm) em OTCs. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de três amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos com CO<sub>2</sub> (Teste de Tukey, P < 0,05).



**Figura 16:** Teores de glucose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho não inoculados com o fungo *H. vastatrix* (A, C, E, G, I) e inoculados (B, D, F, H, J), analisados nos dias 0, 7, 14 e 28 de cultivo sob concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> ambiente (380ppm) e CO<sub>2</sub> elevado (760 ppm) em OTCs. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de três amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos com CO<sub>2</sub> (Teste de Tukey, P < 0,05).



**Figura 17:** Teores de glucose, frutose, sacarose, rafinose e estaquios em *Coffea arabica* cv. Obatã vermelho não inoculados com o fungo *H. vastatrix* (A,C,E,G,I) e inoculados (B,D,F,H,J), analisados nos dias 0, 7, 14 e 28 de cultivo sob concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> ambiente (380ppm) e CO<sub>2</sub> elevado (760ppm) em OTCs. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de três amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos com CO<sub>2</sub> (Teste de Tukey, P < 0,05).

### ***Teores de fenólicos solúveis totais e de lignina***

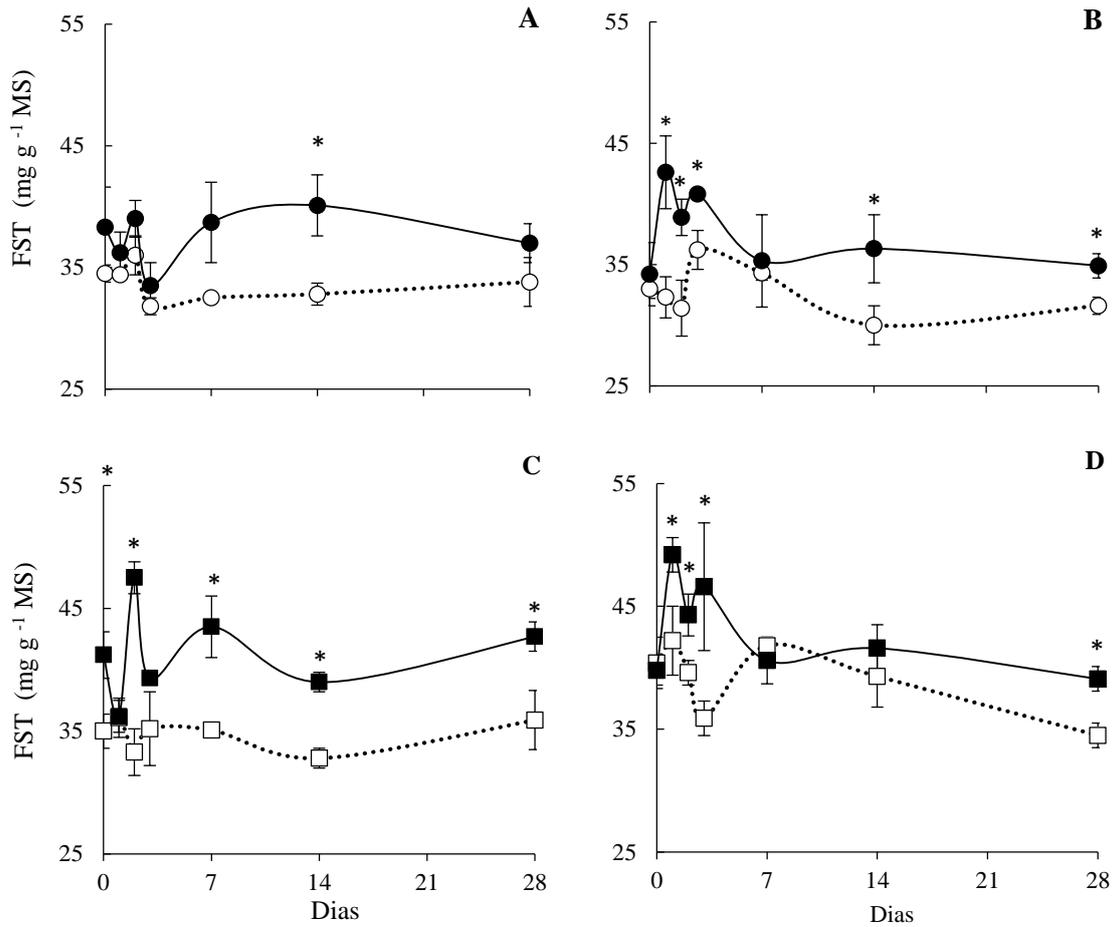
Os teores de compostos fenólicos solúveis (FST) foram determinados em folhas coletadas nos dias: 0, 1, 2,4,7,14 e 28 de cultivo nas OTCs.

Os cafeeiros suscetíveis (Catuaí) não inoculados com o patógeno e cultivados em elevado CO<sub>2</sub> apresentaram aumento de 12% dos teores de FST (Figura 18A) enquanto que os cafeeiros inoculados tiveram em média 15% de aumento (Figura 18B). Nos cafeeiros suscetíveis inoculados com o fungo causador da ferrugem alaranjada, os teores foram maiores nos dias 1, 2, 4, 14 e 28 enquanto que nos cafeeiros não inoculados as diferenças significativas ocorreram somente no 14º dia, porém foi observada uma tendência de elevação desses teores.

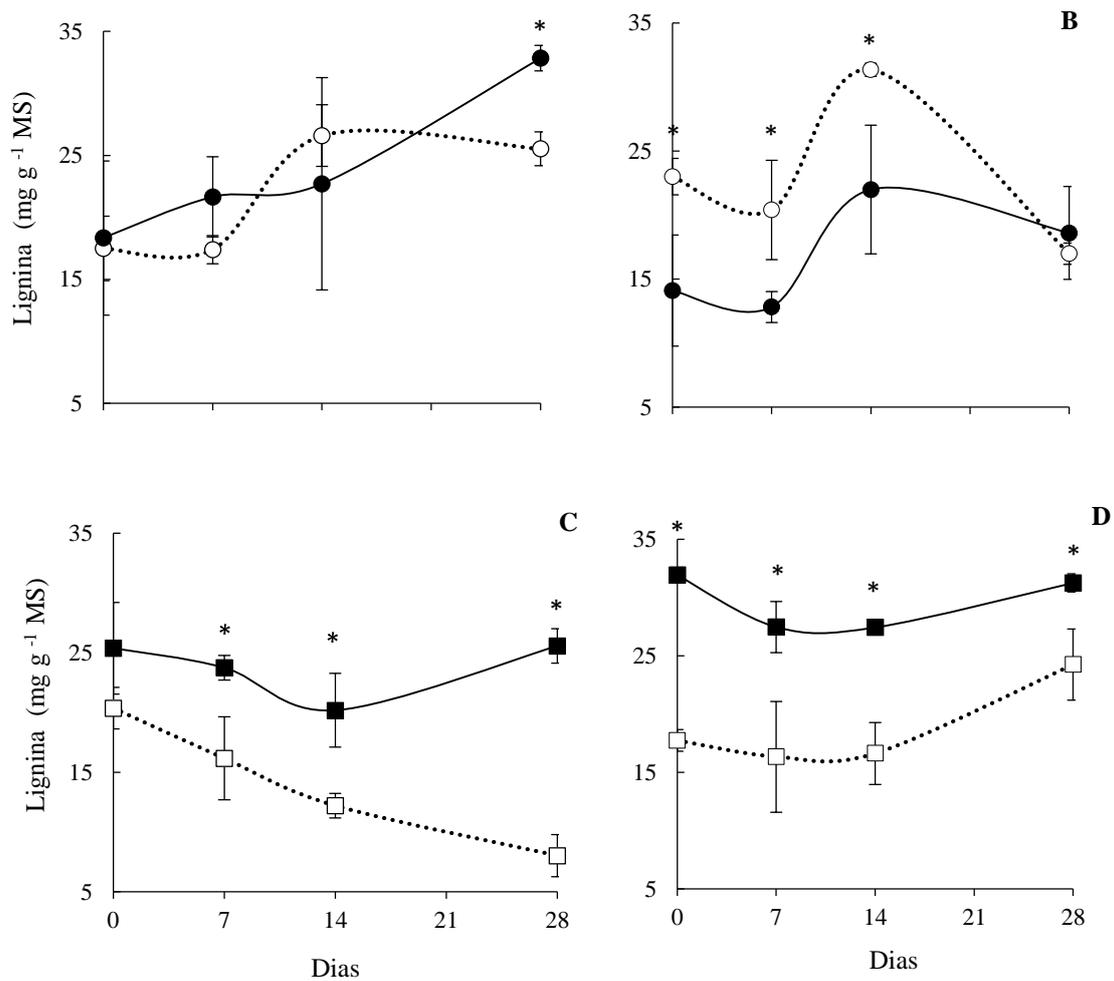
Os cafeeiros resistentes (Obatã) não inoculados com *H. vastatrix* apresentaram, no cultivo em CO<sub>2</sub> elevado, aumento médio (19%) dos teores de FST com alterações significativas nos dias 0, 2, 7, 14 e 28 (Figura 18C). Os cafeeiros resistentes que foram inoculados com o patógeno também apresentaram elevação média dos teores de FST (10%) com efeitos significativos nos dias 1, 2, 4 e 28 (Figura 18D).

Assim como foi observado no caso dos compostos fenólicos, os teores de lignina variaram entre todos os tratamentos. Cafeeiros suscetíveis não inoculados com *H. vastatrix* e cultivados em alto CO<sub>2</sub>, apresentaram elevação média dos teores de lignina com alterações significativas no dia 28 (Figura 19A). Já os cafeeiros suscetíveis inoculados com o patógeno tiveram redução média de 26% nos teores de lignina com diferenças significativas nos dias 0, 7 e 14 (Figura 19B).

Os cafeeiros resistentes (Obatã) não inoculados com *H. vastatrix* cultivados em alto CO<sub>2</sub> apresentaram elevação média de 67% nos teores de lignina com alterações significativas nos dias 7, 14 e 28 (Figura 19C). Os cafeeiros resistentes inoculados com o patógeno também apresentaram elevação dos teores de lignina, em média de 58%, com alterações significativas em todos os dias analisados (Figura 19D).



**Figura 18:** Teores de fenólicos solúveis totais (FST) de folhas de *Coffea arabica* não inoculados (A, C) e inoculados (B, D) com o fungo *H. vastatrix*, analisados nos dias 0, 1, 2, 4, 7, 14 e 28 de cultivo sob diferentes concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub>, em OTCs. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de três amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos atmosféricos (Teste de Tukey, P < 0,05). Cultivar Catuaí vermelho: CO<sub>2</sub> ambiente (○) e CO<sub>2</sub> elevado (●); Cultivar Obatã vermelho: CO<sub>2</sub> ambiente (□) e CO<sub>2</sub> elevado (■).



**Figura 19** : Teores de lignina de folhas de *Coffea arabica* não inoculados (A, C) e inoculados (B, D) com o fungo *H. vastatrix*, analisados nos dias 0, 7, 14 e 28 de cultivo, sob diferentes concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub>, em OTCs. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de três amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos atmosféricos (Teste de Tukey, P < 0,05). Cultivar Catuaí vermelho: CO<sub>2</sub> ambiente (○) e CO<sub>2</sub> elevado (●); Cultivar Obatã vermelho: CO<sub>2</sub> ambiente (□) e CO<sub>2</sub> elevado (■).

### 3.2.3 DISCUSSÃO

As curvas  $A \times DFFF$  indicaram maiores valores de  $A$  nos cafeeiros cultivados em  $CO_2$  elevado em todos os dias analisados. Ao contrário do que foi observado no experimento 1, neste ensaio não houve aclimação da fotossíntese pois ambas as cultivares mantiveram taxas assimilatórias maiores em  $CO_2$  elevado conforme observado aos 41, 42 e 45 dias. Esse efeito pode ter ocorrido em função do menor tempo de cultivo de 45 dias neste caso e de 100 dias no ensaio anterior. Este experimento foi realizado entre março e abril de 2013 quando então as temperaturas registradas foram em geral mais elevadas que aquelas observadas nos meses de maio a julho de 2012, época em que o experimento 1 foi executado. Como já observado anteriormente, temperaturas baixas afetam negativamente as taxas de fotossíntese de cafeeiros (Silva *et. al.*, 2004). Há que se considerar também que, em relação ao experimento anterior, as plantas utilizadas foram as mesmas, no entanto, as folhas em que as medidas de fotossíntese foram avaliadas cresceram em  $CO_2$  ambiente até que este ensaio fosse iniciado e mantiveram resposta positiva ao  $CO_2$  elevado até 45 dias de cultivo nas OTCs.

Os cafeeiros cultivados em  $CO_2$  elevado apresentaram aumento dos valores de PCL e de PSL, efeitos coerentes com a maior razão  $CO_2/O_2$  nos sítios de carboxilação favorecendo a fotossíntese e reduzindo a fotorrespiração, bem como o aumento na taxa de transporte de elétrons em função das maiores taxas assimilatórias observadas nessa condição atmosférica (Taiz & Zeiger, 2010)

A respiração no escuro apresentou redução nas duas cultivares estudadas. Os efeitos do incremento de  $CO_2$  na respiração variam entre espécies, podendo causar aumentos ou reduções, porém há abundante literatura indicando que geralmente levam a reduções (Amthor, 1991; Drake *et al.*, 1997). Diversos estudos apontam para uma redução de 10% a 20% na respiração em resposta a uma duplicação na concentração de  $CO_2$  (Curtis, 1996; Drake *et al.*, 1997; Drake *et al.*, 1999). Os supostos mecanismos através dos quais o incremento do  $CO_2$  reduz as taxas de respiração ainda estão sendo elucidados, e as principais hipóteses incluem alterações na disponibilidade de carboidratos, nas taxas de crescimento e na alocação de biomassa, mudanças na composição química de tecidos e interações entre a concentração de  $CO_2$  e as enzimas respiratórias (Amthor, 1991; Curtis, 1996; González-Meler *et al.*, 1996; Drake *et al.*, 1997). Uma vez que neste experimento as dosagens de carboidratos e as curvas de resposta de fotossíntese à luz não

foram realizadas diuturnamente e nem simultaneamente não foi possível associar as alterações respiratórias com acúmulo e translocação de carboidratos.

As variações detectadas nos teores de carboidratos indicaram alterações complexas ocorridas de acordo com: a cultivar considerada, a concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> das OTCs, o tempo de cultivo e a presença ou ausência do patógeno. Pode-se afirmar, de acordo com as observações, que as respostas dos cafeeiros cultivados em maiores concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> foram profundamente influenciadas pela presença do fungo nos tecidos foliares. A natureza das alterações é devida principalmente ao caráter da planta hospedeira quanto à suscetibilidade ou a resistência à infecção pelo fungo *H. vastatrix*.

Quando cultivados em CO<sub>2</sub> ambiente, tanto cafeeiros suscetíveis quanto resistentes ao patógeno, aumentaram os teores foliares de AST, AR, glucose, frutose e sacarose e reduziram os teores de amido ao serem inoculados com *H. vastatrix*. No cultivo em CO<sub>2</sub> elevado, o efeito nos teores dos carboidratos na cultivar suscetível se manteve, porém houve maior investimento das plantas no acúmulo de AR, cujos teores mais que dobraram nas plantas inoculadas pelo patógeno. A cultivar resistente, ao contrário do que se observou em CO<sub>2</sub> ambiente, reduziu os teores de AST e manteve as tendências observadas para os demais carboidratos. Proporcionalmente, no entanto, os teores de AST aumentaram mais em CO<sub>2</sub> ambiente do que em CO<sub>2</sub> elevado.

A elevação dos teores de AST, AR, glucose, frutose e sacarose observada nos cafeeiros inoculados é um efeito que tem sido descrito na literatura em resposta à infecção vegetal por patógenos, principalmente fungos biotróficos, como é o caso de *H. vastatrix*. Muitos trabalhos descrevem a importância dos níveis de açúcares na resistência de plantas ao ataque de patógenos fúngicos, porém, seu papel como moléculas sinalizadoras na resposta de defesa vegetal foi descrito mais recentemente a partir do estudo de mutantes, transgênicos e análise de expressão gênica (Doehlemann *et al.* 2008; Morkunas *et al.* 2011; Bolouri Moghaddam & Van den Eden, 2012; Cho *et al.*, 2012; Schenket *et al.*, 2012).

Após a inoculação, o teor de sacarose apoplástica aumenta durante horas ao longo da interação incompatível entre *Nicotiana tabaccum* e *Phytophthora nicotianae* (Scharte *et al.*, 2005). O aumento dos teores de sacarose se deve a atividade de duas enzimas, as

sacarose- sintases e as invertases (Ehness *et al.*, 1997). Ambas utilizam a sacarose como substrato para gerar glucose e frutose que estarão disponíveis para serem utilizadas na produção de energia, macromoléculas e biossíntese de aminoácidos (Roitsch *et al.*, 2003; Koch, 2004; Berger *et al.* 2007; Vargas & Salerno, 2010). No caso deste experimento, os teores de sacarose foram maiores nos cafeeiros resistentes quando cultivados em CO<sub>2</sub> ambiente. O aumento dos teores de sacarose nos cafeeiros resistentes foi menor em CO<sub>2</sub> elevado, igualando-se, em termos proporcionais, às elevações desses teores observadas na cultivar suscetível. Esse efeito poderia indicar um comprometimento da resistência da cultivar Obatã ao patógeno conforme observado no trabalho de Vaughan *et al.* (2014), que investigaram o efeito de CO<sub>2</sub> elevado na interação milho e micotoxinas do fungo *Fusarium verticillioides*.

As diferenças observadas nos cafeeiros quanto aos teores de carboidratos em respostas à inoculação por *H. vastatrix* estão relacionadas à rapidez e intensidade de resposta de defesa vegetal. Quando as respostas de defesa são tardias e/ou pouco intensas, a planta hospedeira apresenta suscetibilidade ao agente patogênico e a interação denomina-se compatível. Pelo contrário, quando as respostas de defesa são rápidas e/ou intensas permitem bloquear eficazmente o avanço do agente patogênico e a planta apresenta resistência, sendo a interação denominada incompatível (Duhoux & Nicole, 2004; van Loon *et al.*, 2006; Bari & Jones, 2009).

Neste experimento, observou-se que os teores de AST e AR na cultivar resistente se elevaram rapidamente desde o início da inoculação, atingindo valores superiores aos da cultivar suscetível aos 14 dias de tratamento tanto em atmosfera com CO<sub>2</sub> elevado quanto em CO<sub>2</sub> ambiente. Os teores de glucose foram muito maiores (cerca de 200% em CO<sub>2</sub> ambiente e 600% em CO<sub>2</sub> elevado) na cultivar resistente, que aqueles observados na cultivar suscetível. Já os teores de frutose também foram maiores (o dobro em CO<sub>2</sub> ambiente e 6 vezes maiores em CO<sub>2</sub> elevado) na cultivar resistente inoculada como fungo. Os teores de sacarose, aumentaram de forma semelhante nas cultivares suscetível e resistente e foram semelhantes entre si. Embora os oligossacarídeos rafinose e estaquiose, de acordo com a literatura, ainda não tenham sido relacionados às respostas de defesa vegetal e sim a outros tipos de estresse vegetal em cafeeiros (De Lima *et al.*, 2014) observou-se neste experimento elevação dos teores desses açúcares com intensidades semelhantes em ambas as cultivares inoculadas.

Em relação ao envolvimento de compostos do metabolismo secundário nas respostas de defesa vegetal, estudos citológicos em cafeeiros com resistência completa ao fungo *H. vastatrix* revelaram que uma das primeiras respostas de resistência consistiu na morte rápida das células do hospedeiro no sítio de infecção (Guerra-Guimarães *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2002). Esta reação de hipersensibilidade foi acompanhada, dentre outros efeitos, de deposição de compostos fenólicos e lignificação e espessamento da parede celular (Guzzo *et al.*, 2004). A reação de hipersensibilidade (RH) é uma forma de morte celular programada que consiste na morte rápida das células da planta no local de penetração do agente patogênico (Lecouls *et al.*, 2006; Mur *et al.*, 2008).

Estudos sobre o efeito de alto CO<sub>2</sub> nos teores de compostos fenólicos e a influência na resposta de defesa vegetal contra o ataque de fungos patogênicos em espécies arbóreas indicaram efeitos diversos de acordo com o patossistema analisado (McElrone *et al.* 2005; 2010). No entanto, não foram encontrados na literatura estudos descrevendo os efeitos de elevadas concentrações de CO<sub>2</sub> na reação de hipersensibilidade de cafeeiros ao patógeno causador da ferrugem alaranjada. A intensidade e velocidade da resposta de hipersensibilidade é o que distingue os diferentes níveis de resistência ou suscetibilidade de cafeeiros a *H. vastatrix*. Nosso experimento indicou que os cafeeiros suscetíveis ao fungo *H. vastatrix* praticamente não alteraram os teores médios de FST quando inoculados com o patógeno tanto em CO<sub>2</sub> ambiente quanto em CO<sub>2</sub> elevado. Por outro lado, os cafeeiros resistentes apresentaram elevação média desses teores quando inoculados com o fungo em ambas as concentrações de CO<sub>2</sub> atmosférico. Ao serem inoculados com o fungo *H. vastatrix*, os cafeeiros suscetíveis e resistentes apresentaram diferentes padrões temporais de alterações nos teores de FST. Quando cultivados em CO<sub>2</sub> elevado, tanto os cafeeiros suscetíveis quanto os cafeeiros resistentes inoculados apresentaram exatamente os mesmos padrões temporais de alterações dos teores de FST com elevações no 1º e 4º dias e manutenção dos teores elevados até o final do experimento.

Guzzo *et al.* (2009) descreveram a ativação de genes relacionados à síntese de lignina e de compostos fenólicos em resposta ao tratamento com indutor de resistência à ferrugem em cafeeiros suscetíveis. Adicionalmente, Maia *et al* (2012) detectaram aumento nos teores foliares de compostos fenólicos e lignina solúveis em folhas de cafeeiros Catuaí aos 7 dias após inoculação com *Colletotricum gloesporioides*, agente

causador da antracnose. Nosso estudo mostrou que os teores de lignina em resposta aos tratamentos foram diferentes entre as cultivares analisadas. Em concentração ambiente de CO<sub>2</sub>, os cafeeiros suscetíveis não tiveram alteração na média dos teores de lignina enquanto que a cultivar resistente apresentou elevação média (35%) desses teores. Quando cultivados em CO<sub>2</sub> elevado as respostas foram antagônicas. Enquanto a cultivar suscetível reduziu os teores de lignina (~30%) os cafeeiros resistentes tiveram elevação dos teores de lignina (25%). É possível que a redução observada nos cafeeiros suscetíveis tenha ocorrido em função das lesões foliares causadas pela infecção.

Os cafeeiros cultivados nas OTCs apresentaram elevação dos teores de FST associados ao acúmulo de carboidratos nas folhas crescidas em CO<sub>2</sub> ambiente porém com maiores incrementos no tratamento com CO<sub>2</sub> atmosférico elevado. Observou-se ainda que a cultivar Catuaí, além de apresentar maior acúmulo de AST e AR também acumulou mais FST que a cultivar Obatã quando cultivados em CO<sub>2</sub> elevado. Observou-se que os cafeeiros Catuaí e Obatã, não inoculados com *H. vastatrix*, tiveram aumento dos teores de FST quando cultivados em CO<sub>2</sub> elevado. Quando inoculados com o patógeno, nessa mesma concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> (elevado) os cafeeiros apresentaram respostas diferentes: a cultivar Catuaí teve redução nos teores de FST enquanto a cultivar Obatã obteve maiores teores de FST.

Estudos sobre a influência de elevadas concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> na interação *H. vastatrix* e *Coffea sp* são preliminares. Mendes *et al.* (2009) avaliaram o efeito de concentrações elevadas de CO<sub>2</sub> sobre agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro constatando que não houve alteração na efetividade dos antagonistas, porém, quanto maiores as concentrações de CO<sub>2</sub>, menores foram os períodos de latência da doença nas condições experimentais. Tozzi (2013) estudou o efeito do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> sobre cafeeiros das cultivares Catuaí (susceptível à ferrugem) e Obatã (resistente) e sobre a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) em estufas de topo aberto. A severidade da doença foi menor no tratamento com maior concentração de CO<sub>2</sub> para a cultivar Catuaí, indicando diminuição da doença em função do aumento do CO<sub>2</sub>. Para a cultivar Obatã, o aumento do gás não teve efeito na doença. Por outro lado, ambas as cultivares apresentaram incremento no diâmetro do caule e altura de plantas no tratamento com adição de CO<sub>2</sub>.

Este experimento demonstrou que o cultivo em maior concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> promoveu elevações médias dos teores de AST, amido, FST e lignina e redução de todos os oligossacarídeos e de AR em cafeeiros suscetíveis à ferrugem que não foram inoculados com *H. vastatrix*. Ao serem inoculados com o patógeno, esses cafeeiros, entretanto, apresentaram redução média dos teores de AST, glucose, frutose e lignina; elevação dos teores de AR e amido e não foram influenciados os teores de sacarose, rafinose e estaquiose. Em relação aos cafeeiros resistentes à ferrugem não inoculados com o fungo, o cultivo em alto CO<sub>2</sub> resultou em elevação dos teores de todos os carboidratos, FST e lignina, a única exceção foi observada nos teores de frutose que não se modificaram. Os cafeeiros resistentes inoculados apresentaram maiores teores de AST, amido e demais açúcares solúveis, exceto sacarose que não foi alterada, além de elevações nos teores de FST e lignina.

Conclui-se, portanto, que o cultivo em alto CO<sub>2</sub> promove alterações nos teores de carboidratos, FST e lignina em cafeeiros. A natureza e intensidade das alterações ocorrem de acordo com a suscetibilidade ou resistência do cafeeiro ao fungo *H. vastatrix* e também de acordo com a presença ou ausência efetiva dos fungos nos tecidos vegetais.

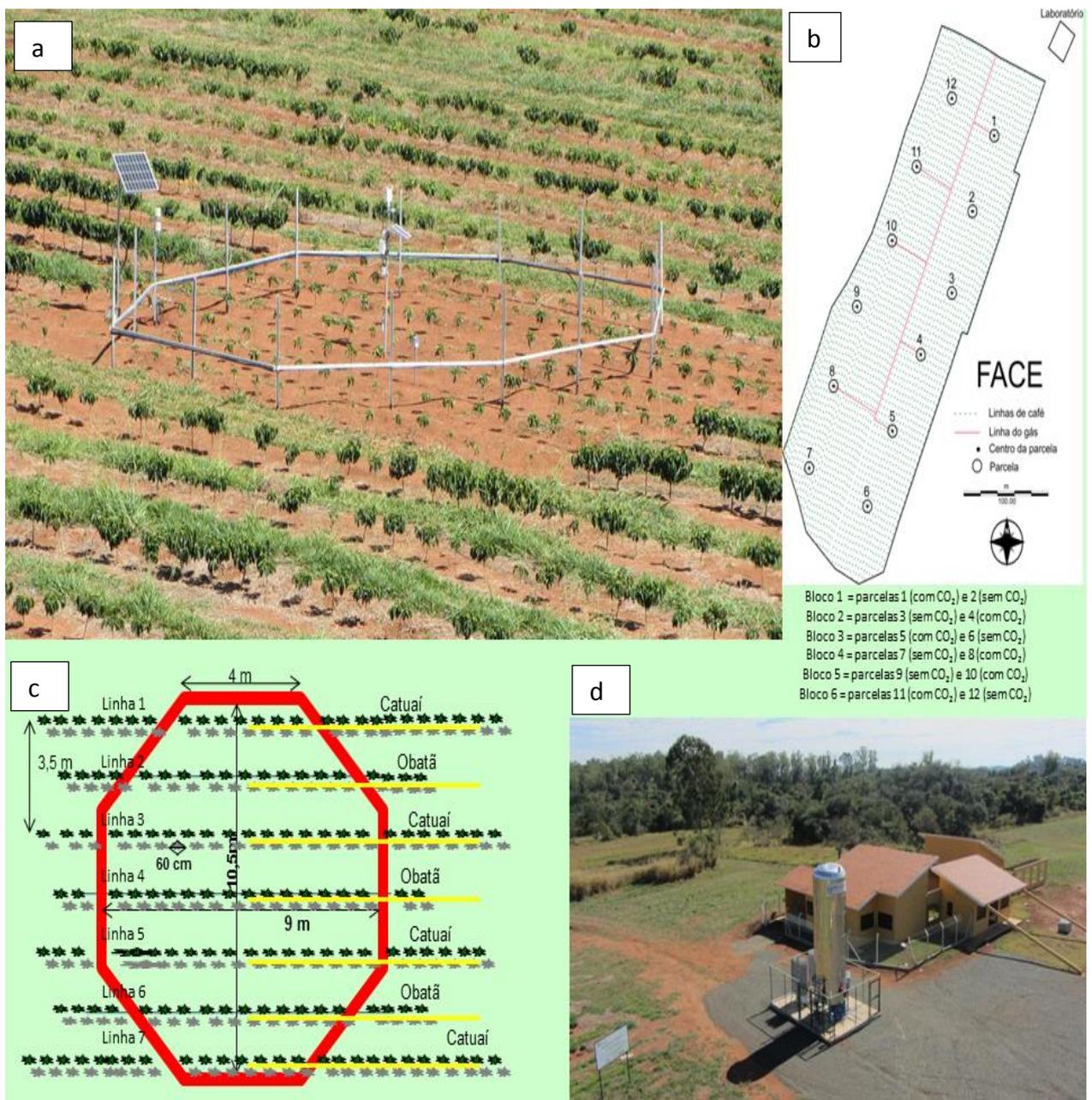
### 3.3 EXPERIMENTO III: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE CAFEEIROS CULTIVADOS SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CO<sub>2</sub> EM ESTRUTURAS DO TIPO “FREE AIR CARBON ENRICHMENT” (FACE)

#### 3.3.1 MATERIAL E MÉTODOS

##### 3.3.1.1 MATERIAL VEGETAL, CONDIÇÕES DE CULTIVO E DELINEAMENTO

###### EXPERIMENTAL

A estrutura experimental FACE está localizada na Embrapa Meio Ambiente, município de Jaguariúna (SP) sob coordenadas geográficas 22° 42' 21" Sul, 46° 59' 10" Oeste, altitude 581m e Clima subtropical úmido, de acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger: Cfa. O delineamento experimental do FACE é de seis blocos casualizados com duas parcelas por bloco. Os tratamentos consistem em CO<sub>2</sub> ambiente (seis parcelas) e CO<sub>2</sub> elevado (seis parcelas). Cada parcela é composta por estruturas metálicas em formato octogonal com a proximadamente 1,5 m de comprimento em cada face poligonal. Seis octógonos dispõem de sistema de injeção de gás carbônico fornecido a partir de um tanque central. A injeção de CO<sub>2</sub> é efetuada entre 7 h e 17 h com o objetivo de manter a concentração em torno de 550 ppm. Miniestações meteorológicas instaladas no centro das parcelas captam as concentrações atmosféricas do gás e enviam os dados por sistema eletrônico sem fio até a central de monitoramento e registro localizada em um prédio separado. Quando a velocidade dos ventos fica abaixo de 0,5 m/s ou acima de 4 m/s, a injeção do gás é bloqueada. Plântulas de *Coffea arabica* L. cultivares Catuaí vermelho IAC-144 e Obatã vermelho IAC-1669-20 com cinco a sete pares de folhas foram distribuídas entre as 12 parcelas da estrutura experimental FACE e cultivadas conforme as recomendações agrônômicas (Fazuoli, 1998). O plantio nas parcelas foi realizado em fevereiro de 2011 e a injeção de CO<sub>2</sub> iniciou-se em 25/08/2011. Em cada parcela, os cafeeiros Catuaí e Obatã foram cultivados em linhas alternadas. Cafeeiros da cultivar Catuaí vermelho IAC-144, com seis a oito pares de folhas, foram plantados fora das parcelas em fevereiro de 2010. Detalhes adicionais da estrutura FACE estão descritas em Ghini *et al.* (2015) e podem ser visualizados na figura 20.



**Figura 20:** Estrutura experimental do sistema FACE. Detalhes de uma das parcelas (a), distribuição e identificação das parcelas (b), disposição dos cafeeiros em cada parcela (c), detalhes do tanque de CO<sub>2</sub> e do laboratório (d)

### 3.3.1.2 TAXAS DE ASSIMILAÇÃO LÍQUIDA DE CARBONO E EFICIÊNCIA INTRÍNSECA DO USO DA ÁGUA (EIUA).

Mensalmente, a partir de novembro/2011 e por um período de 24 meses, foram realizadas medidas das taxas de assimilação líquida de carbono ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) nos cafeeiros cultivados nas parcelas do FACE, utilizando-se um analisador de gás por infravermelho (LI-6400 XT, LI-COR Inc., Nebraska, USA). As medidas foram realizadas utilizando-se uma DFFF de  $600 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  em concentrações controladas de  $\text{CO}_2$  ajustadas no IRGA, conforme os tratamentos de 380 ppm e 550 ppm de  $\text{CO}_2$ . As medições foram realizadas em dias ensolarados, preferencialmente sem nuvens, entre 8 e 11 h da manhã. Para as medições mensais, foram escolhidas aleatoriamente três plantas de cada genótipo em quatro parcelas, sendo duas parcelas com atmosfera ambiente ( $\sim 380 \text{ ppm CO}_2$ ) e duas parcelas de atmosfera enriquecida com  $\text{CO}_2$  ( $\sim 550 \text{ ppm}$ ). As medidas foram efetuadas em folhas íntegras, totalmente expandidas do  $3^\circ/4^\circ$  pares a partir do ápice de ramos plagiotrópicos, do terço superior das plantas, expostas ao sol. Ao todo, foram avaliadas mensalmente seis plantas de cada cultivar por tratamento atmosférico de  $\text{CO}_2$ . A partir dos dados de  $A$  e  $g_s$  foi calculada a eficiência intrínseca do uso da água (EIUA).

### 3.3.1.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DE CARBOIDRATOS

#### *Teores de carboidratos solúveis*

Folhas totalmente expandidas do  $3^\circ/4^\circ$  pares a partir do ápice de ramos plagiotrópicos, do terço superior da planta, expostas ao sol e de ambas as cultivares de cafeeiros cultivados no sistema FACE, foram coletadas de três plantas de três parcelas diferentes por tratamento, totalizando nove plantas amostradas por tratamento em cada coleta. Duas das parcelas amostradas correspondem àquelas onde foram medidas as taxas de trocas gasosas. As folhas foram acondicionadas em caixa térmica refrigerada e encaminhadas ao laboratório, onde foram rapidamente lavadas em água destilada, secas em papel absorvente, maceradas em nitrogênio líquido, armazenadas em freezer ( $-20^\circ\text{C}$ ) sendo posteriormente liofilizadas. As coletas foram efetuadas mensalmente nos quadrimestres maio/junho/julho/agosto (estação seca) e outubro/novembro/dezembro/janeiro (estação chuvosa) de 2012/2013 e de 2013/2014, totalizando duas estações secas e duas estações chuvosas. Cada amostra biológica composta foi analisada quanto aos teores de açúcares solúveis totais (AST), açúcares

redutores (AR) e amido, de acordo com as metodologias descritas no item 3.1.1.4. Cada tipo de análise foi conduzido em triplicata técnica.

*Teores de carboidratos solúveis por cromatografia líquida de troca aniônica de alta resolução (HPAEC/PAD)*

A análise qualitativa dos carboidratos solúveis, glucose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose foi realizada nas amostras de folhas de cafeeiros obtidas conforme a descrição no item acima. Os procedimentos analíticos foram os mesmos descritos no item 3.1.1.4. As análises foram realizadas em triplicata técnica. Os resultados foram expressos em mg g MS<sup>-1</sup>.

*3.3.1.4 TEORES DE FENÓLICOS SOLÚVEIS TOTAIS*

Foram determinados os teores de compostos fenólicos solúveis totais em folhas de cafeeiros, obtidas conforme descrito no item 3.3.1.3, em duas estações secas e duas estações chuvosas. A metodologia utilizada foi descrita no item 3.1.1.5. Foram analisadas oito amostras compostas por cultivar por tratamento atmosférico para cada estação (n=24). As análises foram realizadas em triplicata técnica. Os teores foram expressos em mg equivalentes de ácido tânico g MS<sup>-1</sup>.

*3.3.1.5 TEORES DE LIGNINA*

Os teores de lignina foram determinados em amostras de folhas de cafeeiros, obtidas conforme a descrição no item 3.3.1.3 em duas estações secas e duas estações chuvosas. Neste caso, as amostras analisadas foram coletadas nos bimestres junho/julho e dezembro/janeiro de 2012/2013 e de 2013/2014. As análises foram efetuadas conforme metodologia descrita no item 3.2.1.5. Foram analisadas quatro amostras compostas por cultivar por tratamento atmosférico para cada estação. As análises foram realizadas em triplicata técnica. Os teores de lignina foram expressos em mg g MS<sup>-1</sup>, sendo utilizada como padrão Lignin,alkali, 2-hydroxypropyl ether (Sigma-Aldrich ®).

### 3.3.1.6 TEORES DE CARBONO (C) E NITROGÊNIO (N), RAZÃO C/N, DISCRIMINAÇÃO ISOTÓPICA DO CARBONO ( $\Delta^{13}C$ ) E RAZÃO PI/PA

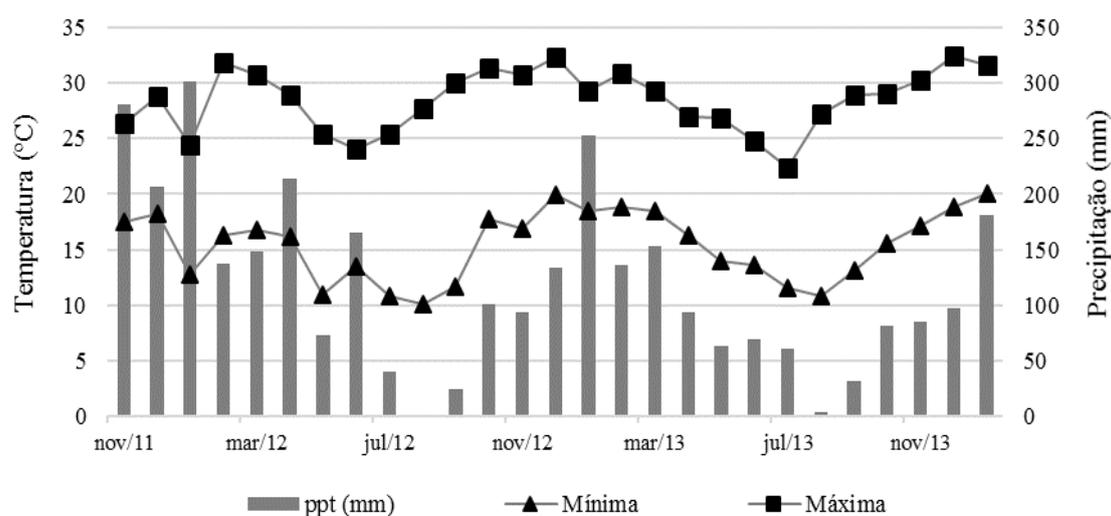
Nos mesmos dias em que foram realizadas as medições de trocas gasosas de descritas no item 3.3.1.2, foram coletadas folhas em expansão (1º par) e folhas totalmente expandidas (3º/4º par) para determinação dos teores e das composições isotópicas de carbono (C) e de nitrogênio (N). As folhas coletadas foram secas a 60°C em estufa com circulação forçada de ar até peso constante, moídas a pó fino em moinho de bolas e enviadas ao Laboratório de Ecologia Isotópica do CENA/ESALQ/USP, onde foram analisadas conforme metodologia descrita no item 3.1.1.6. Foram analisadas duas amostras compostas por genótipo e por tratamento. As análises foram conduzidas em duplicata técnica. Os teores de C e N foram expressos em (%), a composição de isótopos de C e N foi expressa em (‰) e a discriminação isotópica do carbono foi expressa em (‰).

### 3.3.1.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de dois fatores (cultivar x tratamento com CO<sub>2</sub>) e, quando pertinente, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P≤0,05). As análises foram efetuadas com auxílio do software R.

### 3.3.2 RESULTADOS

As miniestações meteorológicas instaladas no FACE passaram por ajustes técnicos durante o período de coletas, conseqüentemente, neste trabalho, optou-se pela utilização dos dados disponibilizados pelo sistema CIIAGRO online (<http://www.ciiagro.sp.gov.br>). A figura 21 apresenta as médias de temperaturas máxima e mínima e a precipitação acumulada mensal no período entre outubro/2011 e janeiro de 2014 na cidade de Jaguariúna (CIIAGRO on line, 2014). Os quadrimestres escolhidos para coletas de folhas de cafeeiros cultivados no FACE se caracterizaram, entre os meses de maio e agosto, por baixas temperaturas médias ( $\pm 18^{\circ}C$ ) e baixas médias pluviométricas (5–10mm), enquanto que entre outubro e janeiro as temperaturas médias foram mais elevadas ( $\pm 26^{\circ}C$ ), assim como as médias pluviométricas (10-50mm). As concentrações de CO<sub>2</sub> nas parcelas ficaram próximas à concentração alvo (550 ppm) conforme apresentado por Ghini *et al.* (2015).



**Figura 21:** Valores médios mensais de temperaturas máxima e mínima e total acumulado mensal de precipitação (mm) no período de novembro de 2011 a janeiro de 2014 na cidade de Jaguariúna (SP).

### *Taxas de trocas gasosas*

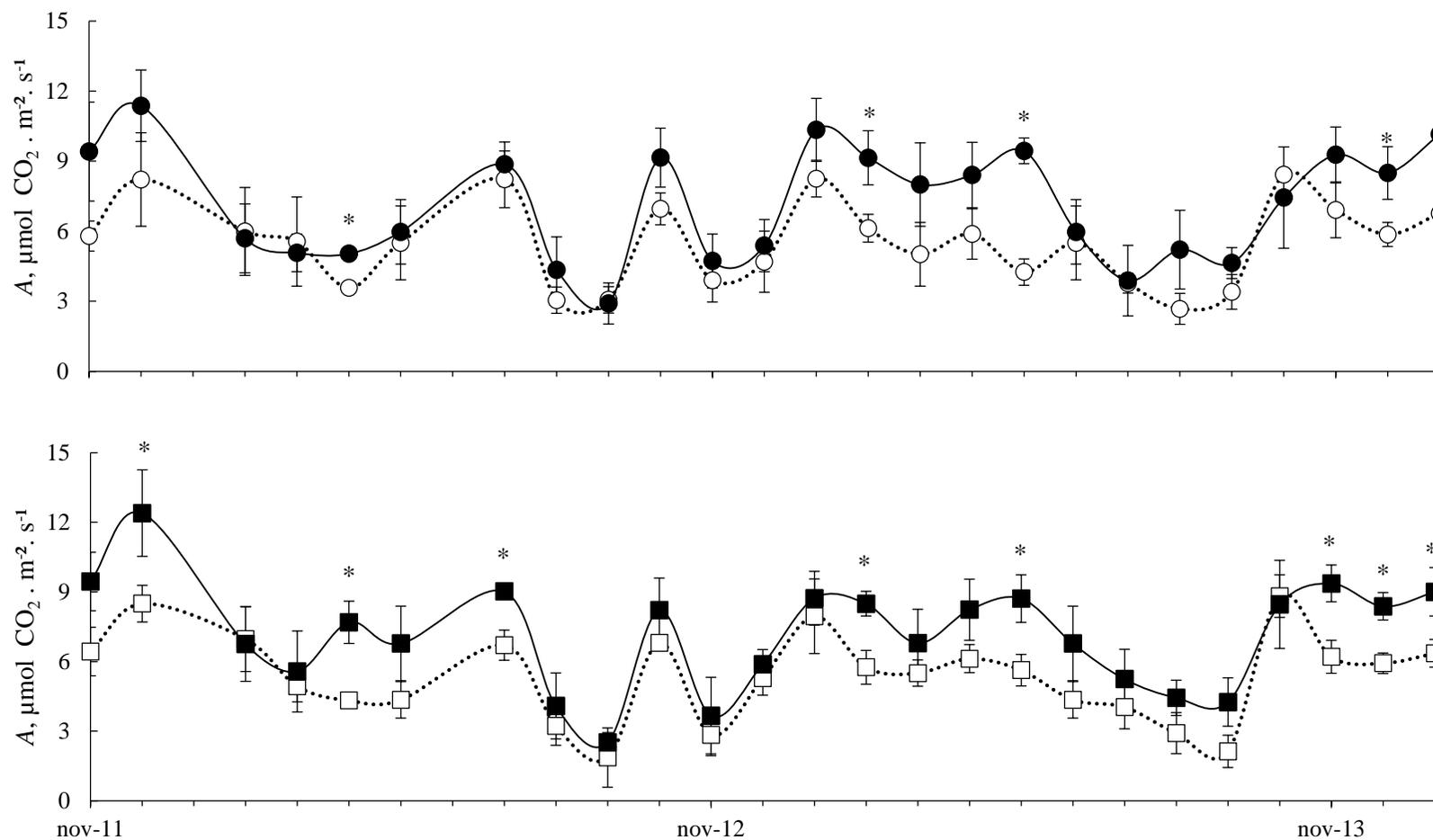
As taxas de assimilação líquida de carbono ( $A$ ) nos cafeeiros cultivados no FACE variaram entre as cultivares e tratamentos ao longo do período observado (Figura 22). Houve tendência de elevação dos valores de  $A$  em todos os cafeeiros cultivados em  $\text{CO}_2$  elevado, no entanto, diferenças significativas entre os tratamentos atmosféricos ocorreram poucas vezes sendo mais frequentes na cultivar Obatã. Os valores de  $A$  variaram entre 2,5 e 12  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  para os cafeeiros cultivados sob  $\text{CO}_2$  elevado e entre 2 e 8  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  medidos nos cafeeiros sob  $\text{CO}_2$  ambiente. Os menores valores médios de  $A$  medidos nos cafeeiros Obatã foram 1,9  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  sob  $\text{CO}_2$  ambiente e 2,5  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  sob  $\text{CO}_2$  elevado, ambos medidos em setembro/2012. Os maiores valores de  $A$  foram 8,8  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  sob  $\text{CO}_2$  ambiente e 12,4  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  em elevado  $\text{CO}_2$ , medidos em outubro/2013 e dezembro de 2011, respectivamente. Os menores valores médios de  $A$  medidos nos cafeeiros Catuaí foram 2,7  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  sob  $\text{CO}_2$  ambiente e 2,9  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  sob  $\text{CO}_2$  elevado, medidos em agosto/2013 e setembro/2012, respectivamente, sendo que os maiores valores de  $A$  nessa cultivar foram 8,4  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  sob  $\text{CO}_2$  ambiente (outubro/2013) e 11,4  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  em elevado  $\text{CO}_2$  (dezembro/2011).

Tanto em condições de  $\text{CO}_2$  ambiente quanto de  $\text{CO}_2$  elevado, o padrão sazonal

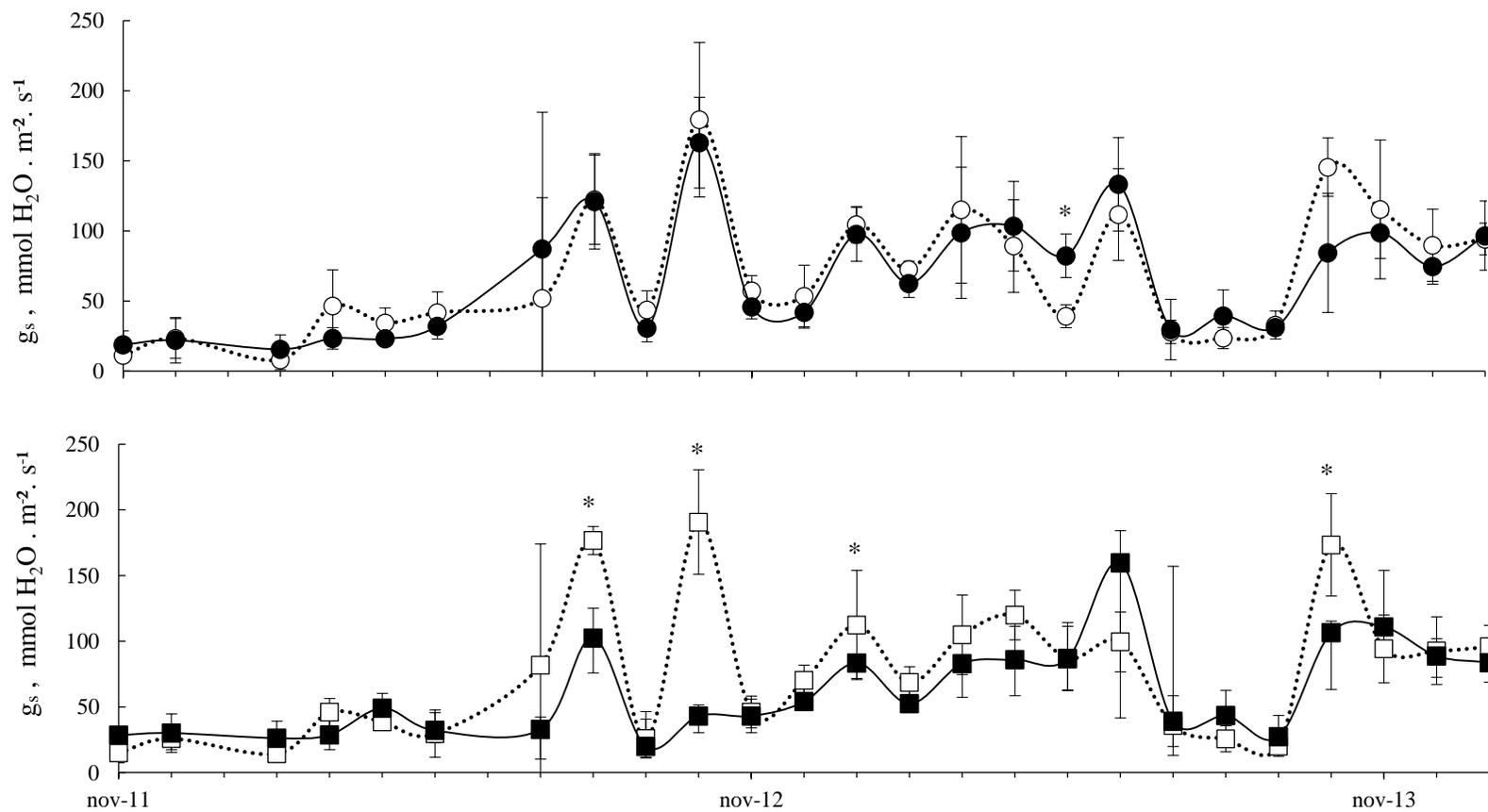
da fotossíntese de cafeeiros foi mantido. Foram observadas altas taxas no período quente e úmido e redução da fotossíntese na época seca e fria. Conforme observado na Figura 22, os menores valores de  $A$  coincidiram com menores valores médios de temperatura, as quais, na região onde está instalado o FACE, coincidiram com o período de redução de chuvas. Exceções foram observadas, por exemplo, no mês de julho/2012, quando a assimilação fotossintética de carbono pelos cafeeiros foi favorecida por elevação atípica da temperatura média, a despeito da taxa de pluviosidade registrada naquele período ter sido nula (Figura 21).

Os valores de condutância estomática ( $g_s$ ) apresentaram tendência de diminuição no tratamento com  $CO_2$  elevado, sendo que diferenças significativas entre os tratamentos ocorreram poucas vezes e com mais frequência nos cafeeiros Obatã (Figura 23). De forma geral, foram observadas diminuições consideráveis nos valores de  $g_s$  nos cafeeiros cultivados sob elevado  $CO_2$  (43% em Catuaí e 77% em Obatã). Nos cafeeiros cultivados em  $CO_2$  ambiente, os valores de  $g_s$  oscilaram entre o mínimo de  $8,0 \pm 7,1$  (fev/2012) e o máximo de  $179,4 \pm 55,1$  (out/2012) na cultivar Catuaí e entre  $14,5 \pm 4,9$  (fev/12) e  $190,7 \pm 39,8$  (out/2012) na cultivar Obatã. Nos cafeeiros cultivados em atmosfera enriquecida com  $CO_2$  os valores variaram entre  $15,6 \pm 10,3$  (fev/12) e  $163,0 \pm 32,3$  (out/12) na cultivar Catuaí e entre  $19,9 \pm 8,4$  (set/12) e  $159,7 \pm 118,1$  (jun/13).

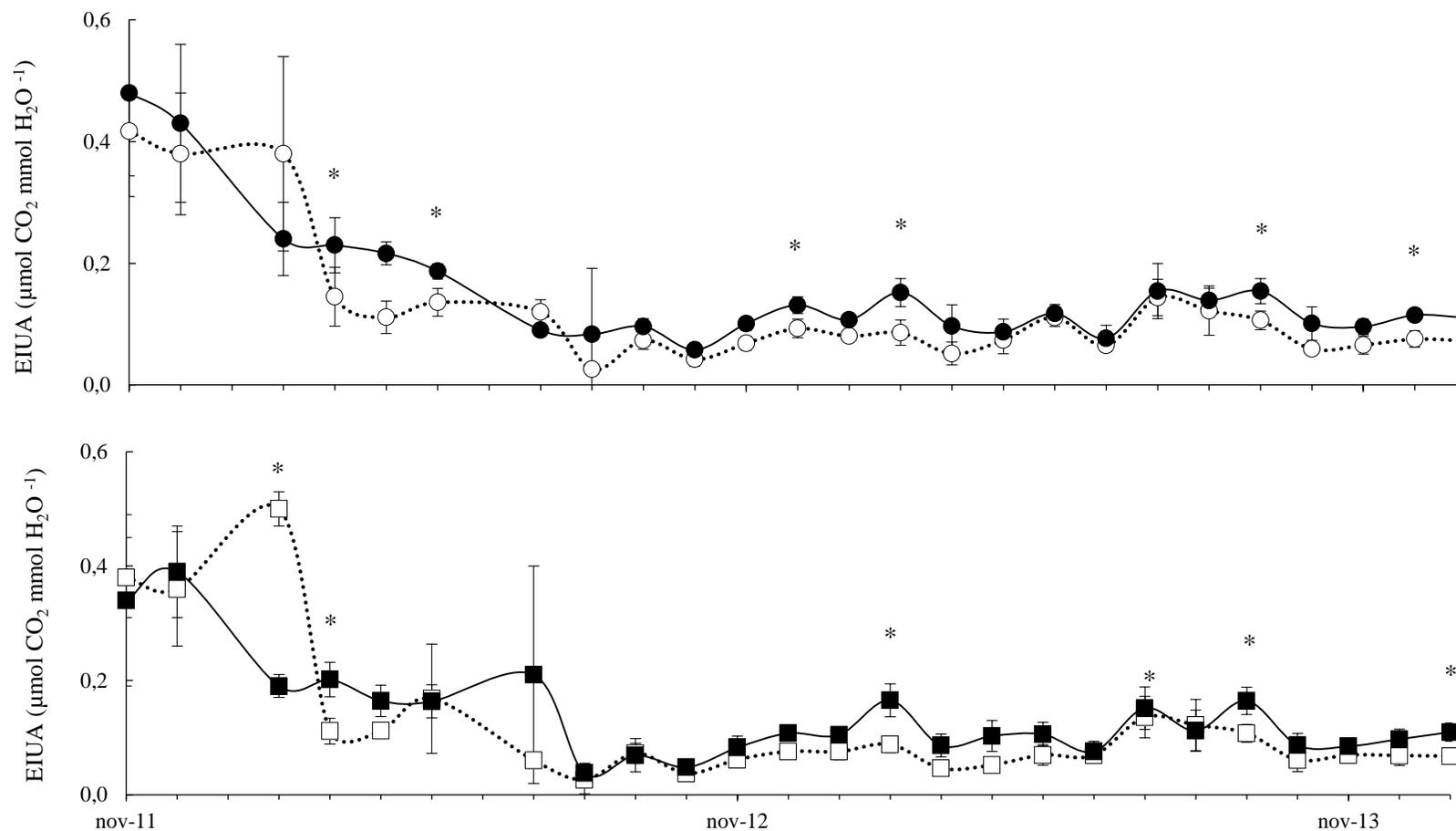
Os valores de eficiência intrínseca do uso da água (EIUA) dos cafeeiros cultivados em  $CO_2$  ambiente oscilaram entre  $0,03 \pm 0,0$  e  $0,14 \pm 0,05$  na cultivar Catuaí e entre  $0,03 \pm 0,02$  e  $0,17 \pm 0,10$  na cultivar Obatã (Figura 24). Os maiores valores foram observados com maior frequência nos meses da estação seca. Nos cafeeiros cultivados em  $CO_2$  elevado, os valores de EIUA oscilaram entre  $0,06 \pm 0,01$  e  $0,23 \pm 0,05$  na cultivar Catuaí e entre  $0,04 \pm 0,02$  e  $0,17 \pm 0,03$  na cultivar Obatã e mostraram tendência de serem maiores que os valores observados para cafeeiros cultivados em  $CO_2$  ambiente, especialmente nos meses da estação seca, com exceções na estação chuvosa de 2012/2013.



**Figura 22:** Taxas de assimilação líquida de carbono (A) em *Coffea arabica* cultivados em diferentes concentrações atmosféricas de  $\text{CO}_2$  em sistema FACE. Cultivar Catuaí vermelho IAC-144:  $\text{CO}_2$  ambiente ( $\circ$ ) e  $\text{CO}_2$  elevado ( $\bullet$ ); Cultivar Obatã vermelho IAC-1669-20:  $\text{CO}_2$  ambiente ( $\square$ ) e  $\text{CO}_2$  elevado ( $\blacksquare$ ). Medidas mensais de novembro de 2011 a janeiro de 2014. Cada ponto corresponde à média  $\pm$  desvio padrão de seis plantas ( $n=6$ ). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos atmosféricos (Teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).



**Figura 23:** Condutância estomática ao vapor de água ( $g_s$ ) em *Coffea arabica* cultivados em diferentes concentrações atmosféricas de  $\text{CO}_2$  em sistema FACE. Cultivar Catuaí vermelho IAC-144:  $\text{CO}_2$  ambiente (○) e  $\text{CO}_2$  elevado (●); Cultivar Obatã vermelho IAC-1669-20:  $\text{CO}_2$  ambiente (□) e  $\text{CO}_2$  elevado (■). Medidas mensais de novembro de 2011 a janeiro de 2014. Cada ponto corresponde à média  $\pm$  desvio padrão de seis plantas (n=6). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos atmosféricos (Teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).



**Figura 24:** Eficiência intrínseca do uso da água (EIUA) em *Coffea arabica* cultivados em diferentes concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> em sistema FACE. Cultivar Catuaí vermelho IAC-144: CO<sub>2</sub> ambiente (○) e CO<sub>2</sub> elevado (●); Cultivar Obatã vermelho IAC-1669-20: CO<sub>2</sub> ambiente (□) e CO<sub>2</sub> elevado (■). Medidas mensais de novembro de 2011 a janeiro de 2014. Cada ponto corresponde à média ± desvio padrão de seis plantas (n=6). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos atmosféricos (Teste de Tukey, P < 0,05).

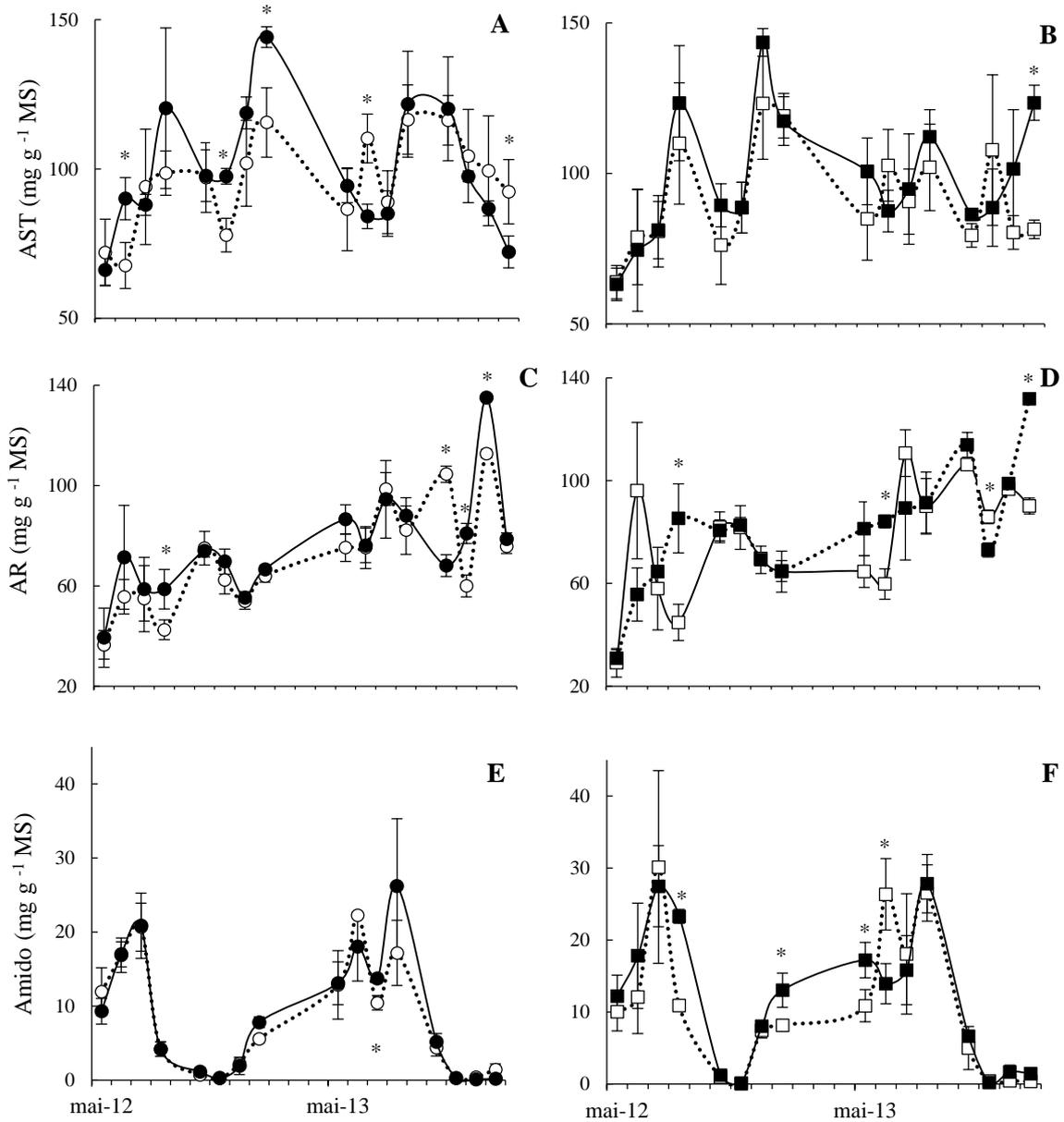
### *Análise dos teores de carboidratos*

Nas duas cultivares de cafeeiro estudadas, os AST representaram de 6 a 15 % do peso seco das folhas, com maior acúmulo na estação seca nos dois períodos estudados (Figura 25A,). Nos cafeeiros Catuaí, o tratamento com CO<sub>2</sub> elevado resultou em uma tendência de elevação dos teores de AST (Figura 25A). Os cafeeiros Obatã também apresentaram tendência geral de elevação dos teores de AST em CO<sub>2</sub> elevado, porém com alteração significativa observada apenas em jan/14 (Figura 25B). Comparando-se as estações secas e chuvosas, foi observado que as duas cultivares seguiram, na maior parte do tempo, o mesmo padrão de oscilação de AST e que essas oscilações ocorrem em ambas as estações climáticas

Os açúcares redutores (AR) perfizerem de 3 a 13% do peso seco de folhas nos cafeeiros Catuaí e Obatã (Figura 25 C, D) ao longo do período estudado, o que indica que grande parte dos AST quantificados nas folhas são representados por AR. Esses açúcares mostraram tendência geral de elevação em todos os tratamentos ao longo do período analisado (Figura 25 C, D). Por exemplo, na estação chuvosa de 2013 os teores quantificados foram maiores que aqueles da estação chuvosa anterior. O mesmo foi observado na 2ª estação seca em relação a 1ª. Foi observado ainda que, na primeira estação chuvosa, praticamente não houve diferenças entre os teores de AR nos diferentes tratamentos em todos os cafeeiros analisados. Nos cafeeiros Catuaí, diferenças significativas entre CO<sub>2</sub> ambiente e CO<sub>2</sub> elevado foram observadas nos meses de outubro, novembro e dezembro de 2013, enquanto que na cultivar Obatã tais diferenças ocorreram em ago/12; jun/13; nov/13 e jan/14.

Os teores de amido, que representaram até 3% do peso seco das folhas, foram expressivamente maiores (entre quatro e seis vezes) nas estações secas em todos os tratamentos (Figura 25 E,F). De maneira predominante, o cultivo em CO<sub>2</sub> elevado estimulou o acúmulo de amido em ambas as cultivares, no entanto, na cultivar Catuaí, a influência do elevado CO<sub>2</sub> atmosférico foi perceptível na 2ª estação seca. Os cafeeiros Obatã, por sua vez, responderam aos tratamentos atmosféricos desde o primeiro mês de avaliação e de forma geral houve maior acúmulo de amido em CO<sub>2</sub> elevado nas estações secas. Uma única exceção ocorreu no mês de janeiro/2013 quando os teores de amido foram maiores em CO<sub>2</sub> elevado, o que não ocorreu em nenhum outro mês de estação chuvosa.

Sacarose, seguida de glicose e frutose foram os principais açúcares solúveis encontrados em folhas das duas cultivares de café. Os oligossacarídeos da série da rafinose, rafinose e estaquiose, foram encontrados em proporções bem menores (Figura 26). Conforme indicado na figura 26 (A, B), os teores de glicose foram pouco influenciados pelo tratamento com CO<sub>2</sub>

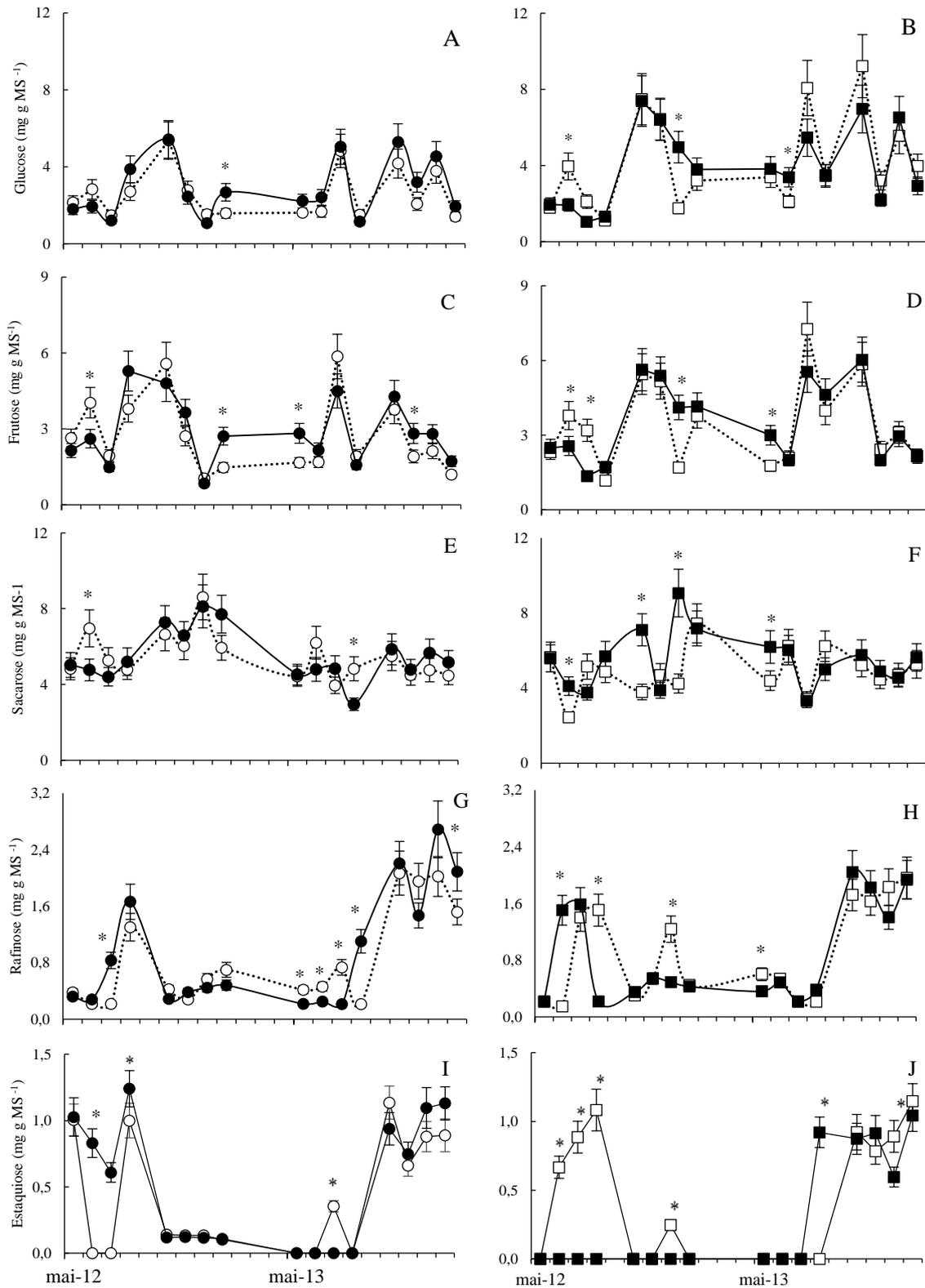


**Figura 25:** Teores de açúcares solúveis totais (A,B), açúcares redutores (C,D) e amido (E,F) de folhas de *C. arabica* determinados em duas estações frias (maio a agosto de 2012 e 2013) e duas estações quentes (outubro a janeiro de 2012/13 e 2013/14) e cultivados sob diferentes concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> em FACE. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de três amostras (n=3). Cultivar Catuaí vermelho: CO<sub>2</sub> ambiente (○) e CO<sub>2</sub> elevado (●); Cultivar Obatã vermelho: CO<sub>2</sub> ambiente (□) e CO<sub>2</sub> elevado (■). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos (Teste de Tukey,  $P \leq 0,05$ ).

elevado, tendo sido observadas apenas uma alteração significativa nos cafeeiros Catuaí (jan/13) e três alterações significativas nos cafeeiros Obatã (jun/12; dez/12; jun/13). O cultivo em CO<sub>2</sub> elevado resultou em algumas alterações significativas, tanto reduções quanto aumentos nos teores foliares de frutose, que foram observados nas duas cultivares e em estações secas e estações chuvosas (Figura 26 C,D).

Cafeeiros cultivados em CO<sub>2</sub> ambiente praticamente não apresentaram alterações sazonais nos teores de sacarose (Figura 26 E,F). No cultivo em CO<sub>2</sub> elevado, no entanto, foram observados aumentos desses teores nas estações chuvosas e diminuição nas estações secas no em cafeeiros cultivar Catuaí. Esse efeito também foi observado nos cafeeiros Obatã. Foram observadas reduções (jun/12 e ago/13) na cultivar Catuaí e elevações na cultivar Obatã (junho, outubro e dezembro de 2012 e maio/2013).

Os teores de rafinose apresentaram alterações em ambos os cafeeiros em cultivo em CO<sub>2</sub> elevado, com maiores aumentos observados nas estações secas (Figura 26 G,H). Apesar de serem muito baixos e até mesmo nulos, os teores de estaquiose apresentaram diferenças entre cafeeiros Catuaí e Obatã cultivados em CO<sub>2</sub> elevado em todas as estações (Figura 26 I,J).

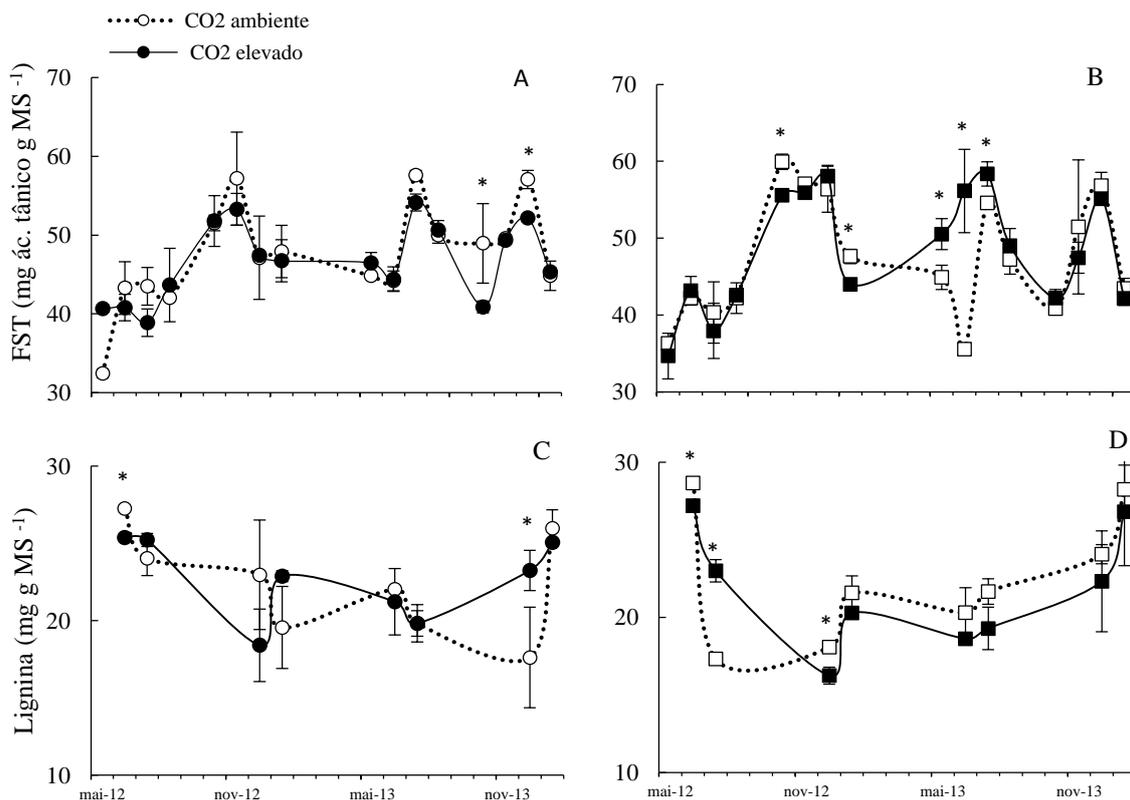


**Figura 26:** Teores de glicose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose de folhas de *Coffea arabica* determinados em duas estações frias (maio a agosto de 2012 e 2013) e duas estações quentes (outubro a janeiro de 2012/13 e 2013/14) e cultivados sob diferentes concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> em FACE. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de três amostras (n=3). Cultivar Catuaí vermelho: CO<sub>2</sub> ambiente (○) e CO<sub>2</sub> elevado (●); Cultivar Obatã vermelho: CO<sub>2</sub> ambiente (□) e CO<sub>2</sub> elevado (■). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos (Teste de Tukey, P < 0,05).

### Análise dos teores de fenólicos solúveis e de ligninas

Os cafeeiros cultivados em elevado CO<sub>2</sub> apresentaram poucas alterações significativas nos teores foliares de FST ao longo do período analisado (Figura 27 A,B). Os cafeeiros Catuaí tiveram uma elevação (mai/12) e duas reduções (jul/13 e dez/13) nesses teores enquanto que os cafeeiros Obatã tiveram duas reduções (out/12 e jan/13) e três elevações (mai/13; jun/13 e jul/13) teores de FST apresentaram. Observou-se uma tendência de influência positiva do CO<sub>2</sub> elevado no acúmulo de FST nas folhas da cultivar Obatã enquanto que na cultivar Catuaí essa tendência foi negativa.

Os teores de lignina foram reduzidos na cultivar Catuaí nos meses jun/12 e ago/12 e aumentaram em jan/13 em função do tratamento com alto CO<sub>2</sub> (Figura 27 C). Nos cafeeiros Obatã foram observadas reduções (jun/12 e ago/12) e elevação (jul/12) (Figura 27 D).



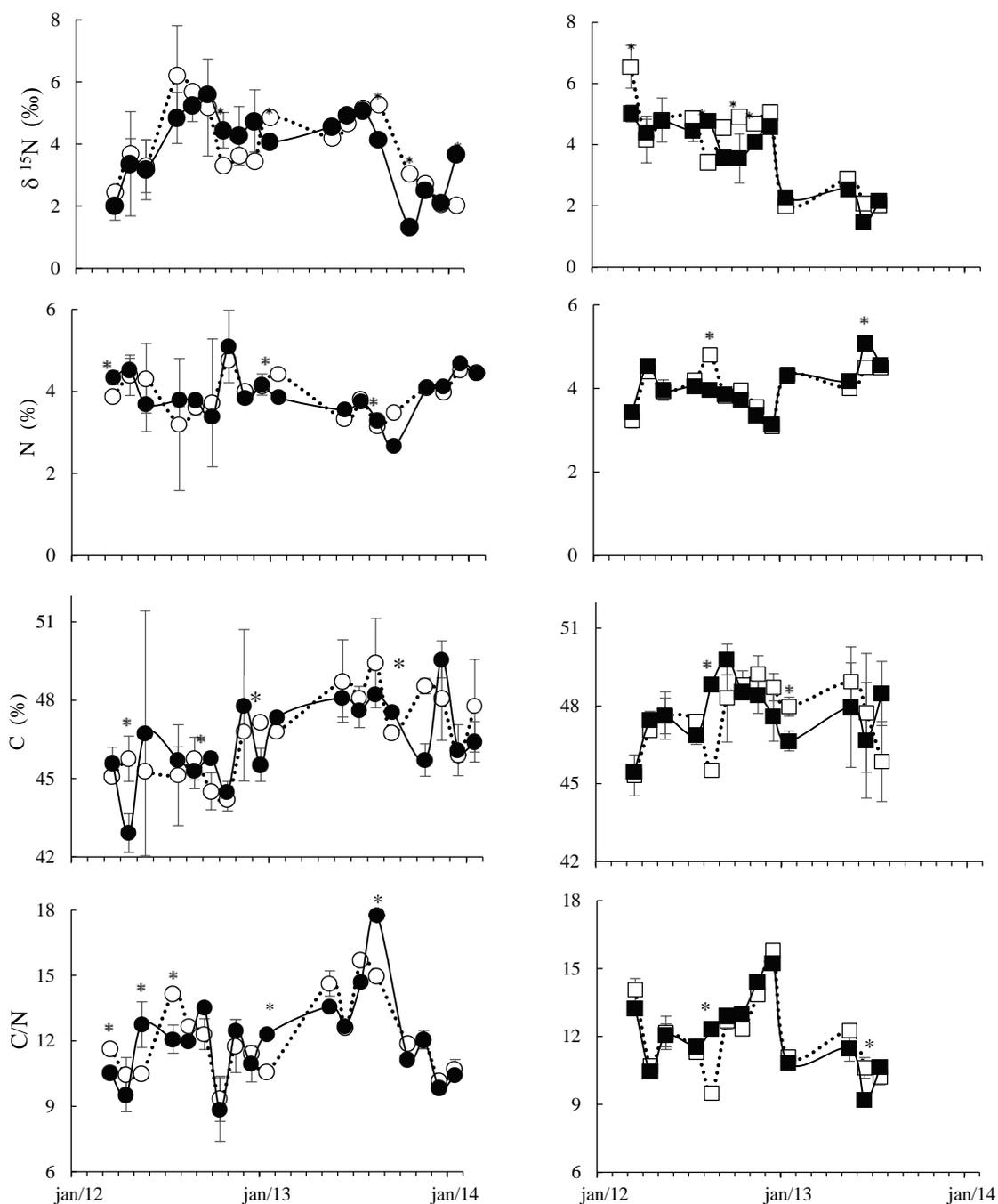
**Figura 27:** Teores de fenólicos solúveis totais e de lignina determinados em folhas de *C. arabica* cv. Catuaí vermelho (A,C) e cv. Obatã vermelho (B,D) cultivados em CO<sub>2</sub> ambiente (380 ppm) e CO<sub>2</sub> elevado (550 ppm) em FACE e avaliados em duas estações secas e duas estações chuvosas. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de três amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos (Teste de Tukey, P < 0,05).

***Análise dos teores de Carbono (C) e Nitrogênio (N), Razão C/N, discriminação isotópica do carbono ( $\Delta^{13}C$ ) e razão  $pi/pa$ .***

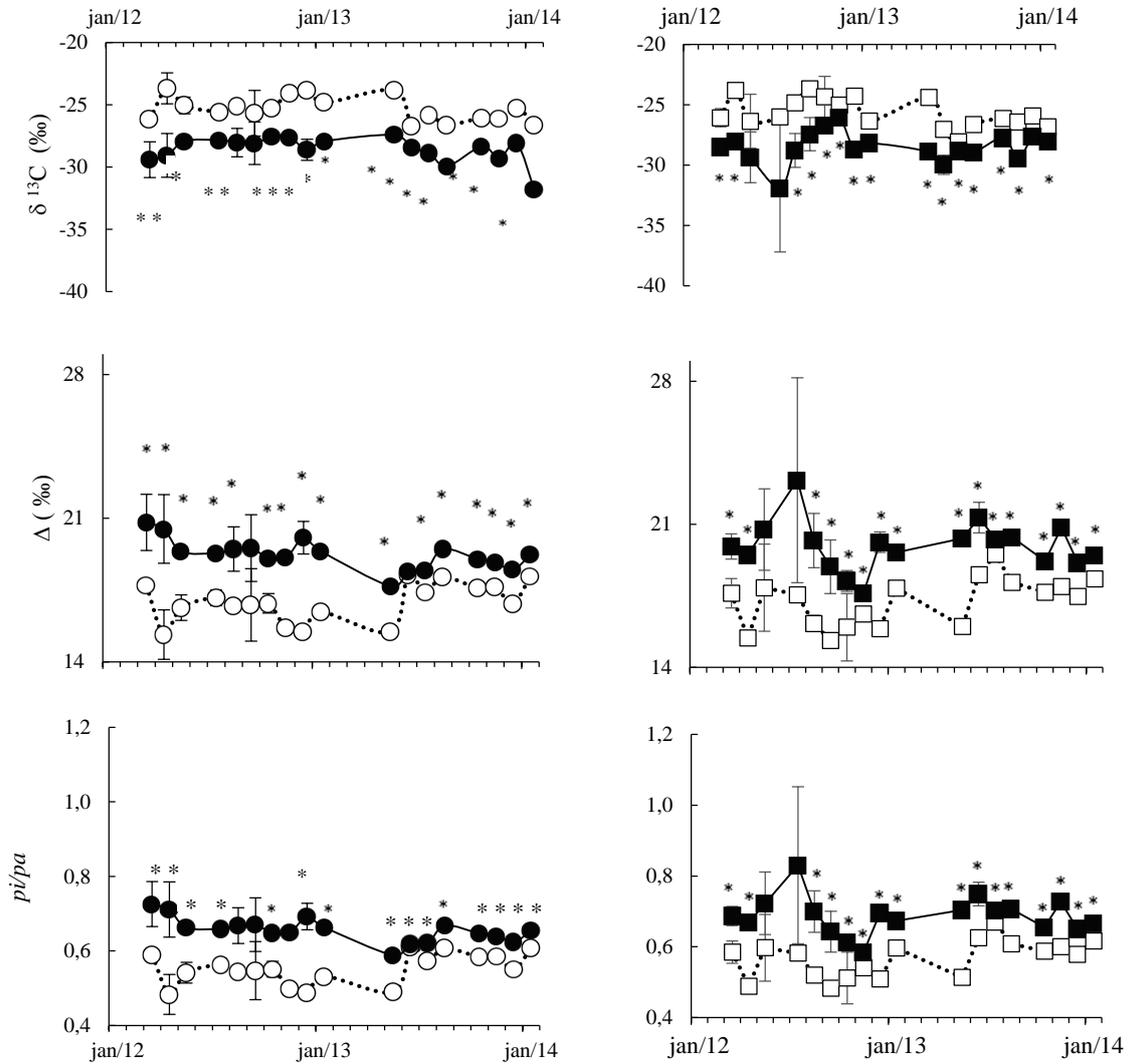
A composição isotópica e os teores de carbono (C) e nitrogênio (N) foram analisados, em folhas em expansão (FE) e folhas totalmente expandidas (FTE) de cafeeiros Catuaí e Obatã cultivados em FACE sob duas concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub>. Os teores foram analisados no período de março de 2012 a janeiro de 2014.

Os teores de  $\delta^{15}N$ , N, C e razões C/N determinados em folhas em expansão, podem ser visualizados na figura 28. Os cafeeiros Catuaí e Obatã cultivados em atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub>, os valores médios de  $\delta^{15}N$  apresentaram algumas alterações significativas tanto de elevação quanto de redução dos teores que ocorreram tanto em meses de estação seca quanto de estação chuvosa. Os teores de N apresentaram mais oscilações na cv. Catuaí com poucas alterações significativas, tanto de redução quanto de elevação dos teores nas duas cultivares. Os teores de C variaram em ambas as cultivares e apresentaram tanto aumentos como reduções. As razões C/N aumentaram ou reduziram conforme o mês analisado, essas alterações ocorreram com maior frequência na cultivar Catuaí. Os valores de  $\delta^{13}C$ ,  $\Delta^{13}C$  e  $pi/pa$  foram significativamente alterados pelo cultivo em elevado CO<sub>2</sub> em todos os cafeeiros (Figura 29). Houve diminuição dos valores de  $\delta^{13}C$ , enquanto os valores de  $\Delta^{13}C$  e  $pi/pa$  aumentaram.

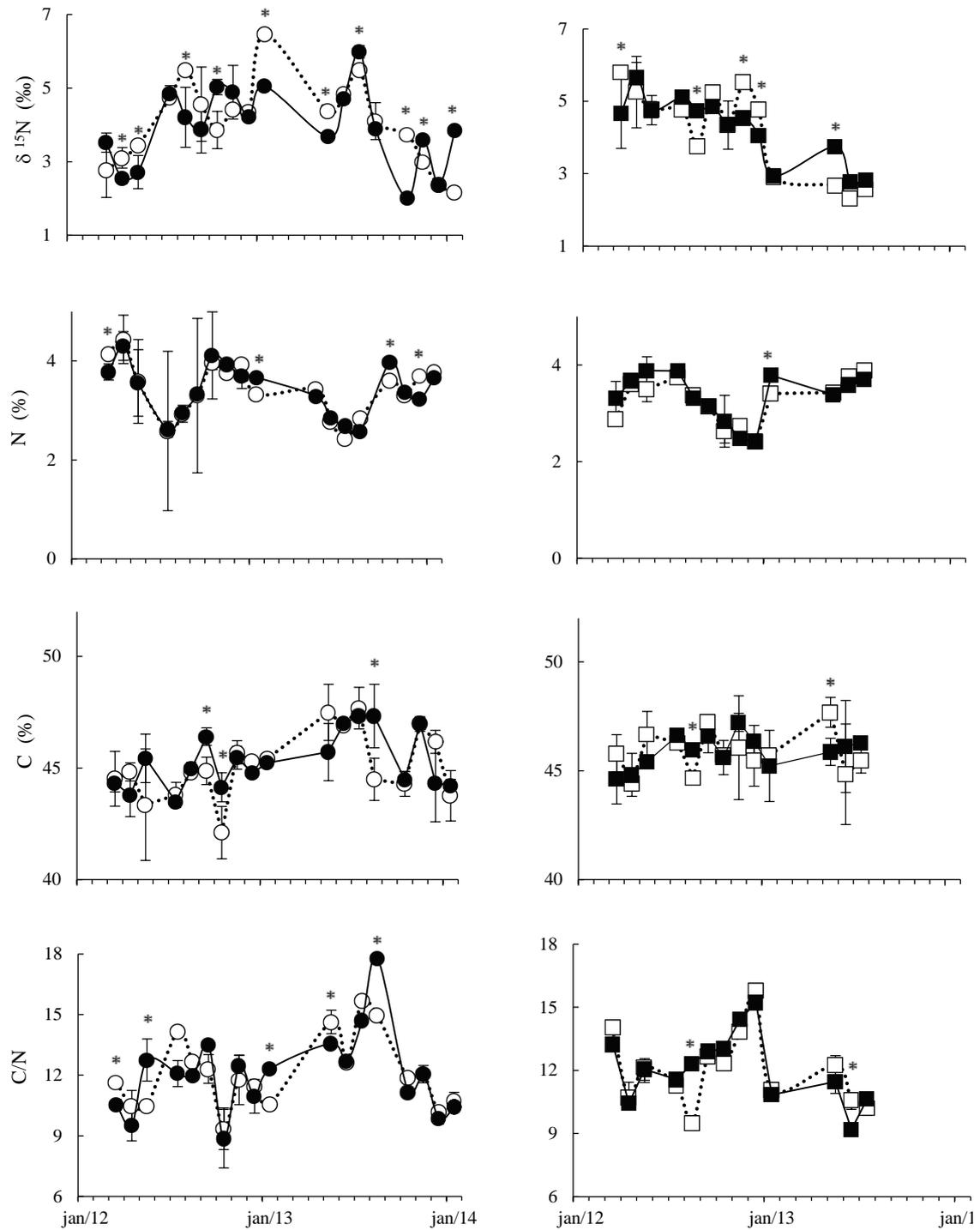
As folhas totalmente expandidas dos cafeeiros cultivados em atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> apresentaram alterações significativas em ambas as cultivares, porém essas alterações foram pontuais e aumentaram ou diminuíram conforme o mês analisado (Figura 30). Os valores de  $\delta^{13}C$ ,  $\Delta^{13}C$  e  $pi/pa$  foram significativamente alterados nessas folhas pelo cultivo em elevado CO<sub>2</sub> em todos os cafeeiros. Os valores de  $\delta^{13}C$  diminuíram e os valores de  $\Delta^{13}C$  e  $pi/pa$  aumentaram (Figura 31).



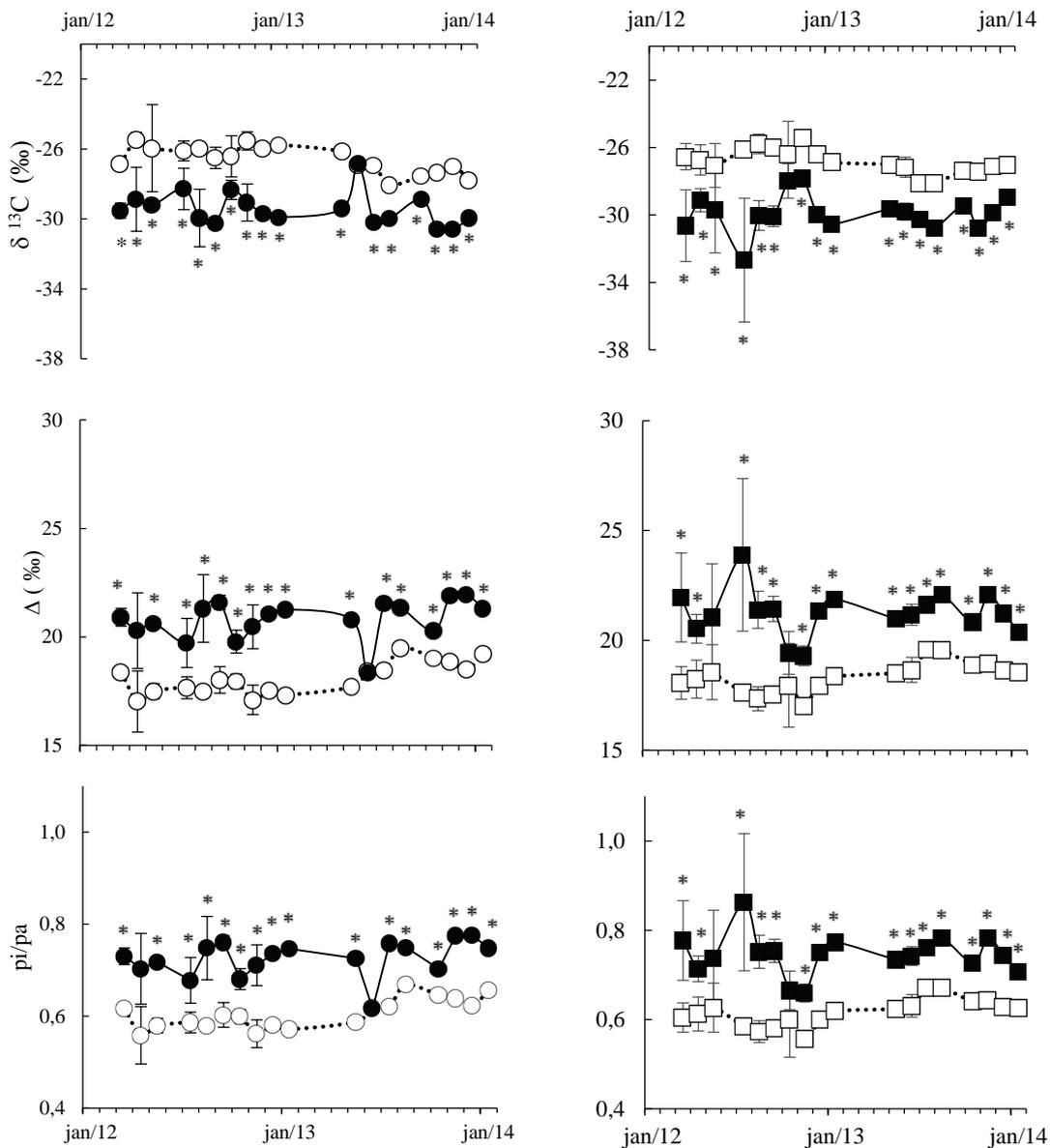
**Figura 28:** Composição isotópica de nitrogênio ( $\delta^{15}\text{N}$ ); teores de nitrogênio (N), de carbono (C) e razão C/N de folhas em expansão de *C. arabica* cultivados sob duas concentrações atmosféricas de  $\text{CO}_2$  (380 e 550 ppm) no sistema FACE. Cultivar Catuaí vermelho IAC-144  $\text{CO}_2$  ambiente (○) e  $\text{CO}_2$  elevado (●), cultivar Obatã-vermelho IAC-1669-20  $\text{CO}_2$  ambiente (□) e  $\text{CO}_2$  elevado (■). Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de duas amostras (n=2). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos atmosféricos (Teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).



**Figura 29:** Composição isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ), discriminação isotópica do carbono ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) e razão entre a pressão interna e a pressão atmosférica de  $\text{CO}_2$  (pi/pa) de folhas em expansão de *Coffea arabica* cultivados sob duas concentrações atmosféricas de  $\text{CO}_2$  (380 e 550 ppm) no sistema FACE. Cultivar Catuaí vermelho IAC-144  $\text{CO}_2$  ambiente (○) e  $\text{CO}_2$  elevado (●), cultivar Obatã-vermelho IAC-1669-20  $\text{CO}_2$  ambiente (□) e  $\text{CO}_2$  elevado (■). Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de duas amostras (n=2). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos atmosféricos (Teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).



**Figura 30:** Composição isotópica de nitrogênio ( $\delta^{15}\text{N}$ ); teores de nitrogênio (N), de carbono (C) e razão C/N de folhas totalmente expandidas de *Coffea arabica* cultivados sob duas concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> (380 e 550 ppm) no sistema FACE. Cultivar Catuaí vermelho IAC-144 CO<sub>2</sub> ambiente (○) e CO<sub>2</sub> elevado (●), cultivar Obatã-vermelho IAC-1669-20 CO<sub>2</sub> ambiente (□) e CO<sub>2</sub> elevado (■). Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de duas amostras (n=2). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos atmosféricos (Teste de Tukey, P < 0,05).



**Figura 31:** Composição isotópica de carbono ( $\delta^{13}C$ ), discriminação isotópica do carbono ( $\Delta^{13}C$ ) e razão entre a pressão interna e a pressão atmosférica de  $CO_2$  ( $pi/pa$ ) de folhas totalmente expandidas de *Coffea arabica* cultivados sob duas concentrações atmosféricas de  $CO_2$  (380 e 550 ppm) no sistema FACE. Cultivar Catuaí vermelho IAC-144  $CO_2$  ambiente (○) e  $CO_2$  elevado (●), cultivar Obatã-vermelho IAC-1669-20  $CO_2$  ambiente (□) e  $CO_2$  elevado (■). Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de duas amostras (n=2). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos atmosféricos (Teste de Tukey,  $P < 0,05$ ).

### 3.3.3 DISCUSSÃO

Estudos sobre o efeito de elevadas concentrações de CO<sub>2</sub> em espécies vegetais indicaram aumento nas taxas de fotossíntese líquida, a despeito da aclimação da Rubisco, especialmente em espécie cultivadas com via fotossintética do tipo C3 (Kimball *et al.*, 2002; Leakey *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2004; Ainsworth & Rogers, 2007; Rosenthal *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Talhelm *et al.*, 2014). Neste experimento, os valores de *A* observados nos cafeeiros cultivados em FACE apresentaram de forma predominante uma tendência de elevação uma vez que as taxas de assimilação de carbono na cultivar Catuaí chegaram a ser 122% superiores (mai/2013) e até 100% maiores na cultivar Obatã (set/2013) no cultivo em elevado CO<sub>2</sub> atmosférico. Nesse tratamento, o aumento médio das taxas fotossintéticas no período observado, foram de 32% nos cafeeiros Catuaí e de 37% na cv.Obatã sob CO<sub>2</sub> elevado. Observou-se que os maiores valores de *A* sob atmosfera com CO<sub>2</sub> elevado foram medidos em meses tipicamente caracterizados por altas irradiâncias, alta demanda evaporativa do ar atmosférico e temperaturas médias entre 20°C e 22°C que é a faixa ótima de crescimento do cafeeiro. Em condições atmosféricas de CO<sub>2</sub>, nos meses de baixas temperaturas, o cafeeiro exhibe menores taxas de fotossíntese (DaMatta *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2004) padrão esse que se manteve nos cafeeiros cultivados em alto CO<sub>2</sub> de acordo com este estudo.

Em todo o caso, mesmo as taxas máximas de *A* observadas (~13 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) foram muito inferiores à capacidade fotossintética potencial do cafeeiro (30-40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; DaMatta *et al.*, 2007), o que tem sido explicado por uma baixa condutância mesofílica dessa espécie (Araújo *et al.*, 2008).

Neste experimento, os valores de *g<sub>s</sub>* nem sempre foram elevados, variando entre 80 -100 mmol H<sub>2</sub>O.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (considerados altos para o cafeeiro) e ao redor de 30 mmol H<sub>2</sub>O.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (considerados baixos). De forma geral os valores de *g<sub>s</sub>* reduziram entre 50% e 75% nos cafeeiros Catuaí e Obatã, respectivamente, cultivados em CO<sub>2</sub> elevado. Ao analisarmos as variações de *g<sub>s</sub>* nos dois anos de cultivo analiados neste estudo (Figura 21) verificamos baixos valores de *g<sub>s</sub>* associados a baixas taxas de fotossíntese nos meses de inverno, ao passo que os maiores valores de *g<sub>s</sub>*, em ambas as cultivares, ocorreram nos meses de setembro e outubro nos quais as temperaturas estão em elevação. As reduções nos valores de *g<sub>s</sub>* estão de acordo com estudos de espécies C3 cultivadas em FACE sob elevado CO<sub>2</sub> (Kimball *et al.*, 2002; Leakey *et al.*, 2009).

Decréscimos em  $A$  e  $g_s$ , ao longo do dia, principalmente em dias ensolarados, podem estar relacionados a muitos fatores, tais como: excesso de irradiância, o qual pode causar fotoinibição da fotossíntese (DaMatta, 2004); alta temperatura foliar e aumentos em no déficit de pressão de vapor entre o interior e o exterior da folha acarretando reduções em  $g_s$  e limitando o fluxo de  $CO_2$  para a câmara subestomática (Ronquim *et al.*, 2006). Salienta-se que é fato bem estabelecido que o estômato do cafeeiro arábico exhibe alta sensibilidade a à demanda evaporativa da atmosfera (Fanjul *et al.*, 1985; Barros *et al.*, 1997; Ronquim *et al.*, 2006; Chaves *et al.*, 2008; DaMatta *et al.*, 2008) o que impõe forte restrição às trocas gasosas na espécie. Em várias regiões cafeeicultoras, essa limitação ocorre associada a altas temperaturas diurnas e irradiâncias e baixas temperaturas noturnas (DaMatta, 2004) que são características climáticas de inverno no local onde está instalado o FACE.

Outro efeito amplamente reportado na literatura promovido pelo cultivo em elevadas concentrações atmosféricas de  $CO_2$  é o aumento de EIUA resultante da manutenção ou diminuição de  $g_s$  (Kimball *et al.*, 2002; Leakey *et al.*, 2009;) e da elevação em paralelo das taxas fotossintéticas. Neste trabalho, os valores de EIUA apresentaram aumentos de até 225% e 98% na cultivar Catuaí e Obatã respectivamente. Em relação ao período observado houve aumento médio de EIUA nos cafeeiros Catuaí (46%) e Obatã (32%) cultivados em  $CO_2$  elevado. O aumento das taxas assimilatórias de  $CO_2$  foram determinantes para a elevação de EIUA uma vez que os valores de  $g_s$  demonstraram menores alterações.

Alguns trabalhos recentes foram publicados sobre efeitos de elevado  $CO_2$  atmosférico em cafeeiros. Ramalho *et al.* (2013) por exemplo verificaram tendência de elevação entre 34% e 49% nas taxas fotossintéticas de cafeeiros de diferentes genótipos, cultivados em condições controladas sob atmosfera com  $700 \mu mol CO_2 L^{-1}$ . Os autores reportaram ainda reduções de  $g_s$ , entre 4% e 28%, e aumentos nos valores de EIUA de 56% e 112%. Adicionalmente, Ghini *et al.* (2015) verificaram em cafeeiros cultivados em FACE ausência de efeito significativo do enriquecimento atmosférico com  $CO_2$  nos valores de  $A$  embora tenham observado maiores taxas fotossintéticas em duas das quatro medidas realizadas (Curvas  $A \times C_i$ ) ao longo do dia nas duas cultivares (Catuaí e Obatã).

Os autores verificaram também, em ambas as cultivares, alterações negligenciáveis nos valores de  $g_s$  que associadas às elevações de  $A$  resultaram em

aumentos significativos dos valores de EIUA (60% em média) no tratamento com alto CO<sub>2</sub>, independente da cultivar e do horário de avaliação. Nosso estudo corrobora os efeitos observados nos estudos citados.

De acordo com nossos resultados não foi observado um padrão claro de elevação dos teores foliares de carboidratos em folhas de cafeeiros cultivados em CO<sub>2</sub> elevado no sistema FACE. De acordo com Long *et al.* (2004), o aumento dos teores de carboidratos em folhas cultivadas em CO<sub>2</sub> elevado, ocorre devido às maiores taxas assimilatórias de carbono, no entanto, a manutenção desses teores dependerá da capacidade de aumentar a relação fonte-dreno o que é amplamente possível no cultivo em FACE ao contrário do que foi observado no 1º experimento deste trabalho, realizado em OTCs, no qual foi observado acúmulo de carboidratos nas folhas associado a redução nas taxas fotossintéticas.

Walter *et al* (2005) observaram diversas variações nos pools diurnos de carboidratos em folhas maduras de *Populus deltoides* em resposta ao elevado CO<sub>2</sub> atmosférico: houve redução dos níveis de glucose e frutose; elevação dos teores de sacarose e aumento dos teores de amido. Zhao *et al.* (2012) verificaram que aumento dos teores de sacarose, frutose e amido em folhas de *Populus cathayana* cultivada em alto CO<sub>2</sub> (~700ppm). Nem sempre o aumento dos teores de carboidratos é observado no cultivo em elevado CO<sub>2</sub>. Por exemplo, Arenque *et al.* (2014) verificaram reduções nos teores de glucose, frutose, sacarose e elevações nos teores de amido em folhas de *Senna reticulata* cultivada em CO<sub>2</sub> elevado (760 ppm). O trabalho realizado por Ramalho *et al.* (2013) indicou alterações não significativas nos níveis de diversos sacarídeos, amido e açúcares solúveis totais em folhas de cafeeiros cultivados em atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub>, havendo tendências de aumentos e reduções conforme o genótipo do cafeeiro. Os autores atribuíram esses resultados à ausência de limitações ao desenvolvimento dos tecidos dreno.

Este estudo evidenciou tendências de elevação dos teores foliares de carboidratos não estruturais, associadas às elevações pontuais desses teores observadas nas duas cultivares de cafeeiros cultivados em elevado CO<sub>2</sub> atmosférico em FACE. A ausência de aumentos significativos nos níveis foliares de carboidratos de cafeeiros cultivados no FACE provavelmente ocorreram em função da plena manutenção da força dreno que resultou em maiores taxas de crescimento em altura (cm/mês) e em diâmetro

do caule (mm/mês) detectadas por Ghini *et al.* (2015) nas duas cultivares, entre fevereiro de 2013 e janeiro de 2014, período que coincide parcialmente com aquele no qual foram quantificados os teores de carboidratos apresentados neste trabalho.

Os cafeeiros cultivados em alto CO<sub>2</sub> no FACE tiveram poucas alterações significativas nos teores de compostos fenólicos e de lignina que aumentaram ou diminuíram conforme o mês de coleta. Essas alterações foram mais frequentes na cultivar Obatã. McElrone *et al.* (2010) estudaram efeitos de elevadas concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> em espécies arbóreas e verificaram não terem ocorrido alterações significativas nos teores foliares de fenólicos após vários anos de avaliações. Por sua vez, Novriyanti *et al.* (2012) verificaram que o cultivo em CO<sub>2</sub> elevado causou alterações significativas em teores de fenólicos solúveis totais em folhas de diferentes espécies de *Eucalyptus* sp., porém, os efeitos estiveram relacionados à concentração de nitrogênio. .

Diversos estudos relatam ausência de interferência de elevado CO<sub>2</sub> nos teores de lignina como, por exemplo, o estudo realizado por Matros *et al.* (2006) com folhas de *Nicotiana tabacum*. Também foi verificado nesse mesmo estudo que não houve influência nos teores foliares de lignina. Rezende *et al.* (2014) verificaram elevações nos teores de taninos e não houve alterações nos teores de lignina em folhas de *Psidium guajava* cultivada em CO<sub>2</sub> elevado (720 ppm).

Os compostos fenólicos e ligninas pertencem a uma classe de moléculas com inúmeras funções celulares, tais como estrutural e defesa contra estresses bióticos e abióticos (Dixon & Paiva, 1995). Contudo alterações no conteúdo de substâncias fenólicas afetam diretamente a interação da planta com o ambiente no qual ela está inserida assim como a quantidade de lignina presente nos tecidos pode variar com diferentes tipos de estresse. Estudos com estresse por alta luminosidade e altas temperaturas apontam para um aumento desses compostos enquanto que, estudos com estresse hídrico mostraram redução dos mesmos (Moura *et al.*, 2010).

É possível que a variação na concentração atmosférica de CO<sub>2</sub>, associada a outros fatores tais como, a ocorrência de pragas e doenças, tenham influenciado as modificações observadas nos teores desses compostos ao longo deste estudo. Essa hipótese é bastante plausível uma vez que o estudo realizado por Ghini *et al.* (2015) indicou a ocorrência de

predadores e microorganismos nas folhas dos cafeeiros em grande parte do período avaliado em nosso estudo.

Diferente do observado nos experimentos em OTCs, onde condições ambientais incluem concentrações de CO<sub>2</sub> maiores (760 ppm) e as plantas estão em estágio inicial de crescimento, no FACE (550 ppm), o efeito do cultivo em CO<sub>2</sub> elevado nos teores foliares de C, N e  $\delta^{15}\text{N}$  e razão C/N foi pouco significativo uma vez que ocorreram apenas alterações pontuais, tanto no sentido de redução quanto de elevação dos teores e aparentemente não estiveram relacionados a padrões de variações climáticas quando comparados os meses de estação seca ou de estação chuvosa nas duas cultivares. As variações observadas nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  acompanharam em sentido oposto as variações dos teores de nitrogênio indicando que a maior disponibilidade de N foliar está associada a menor discriminação do isótopo  $^{15}\text{N}$ .

Ainda que diversos estudos tenham apontado diminuição dos teores de N em diversas espécies C3 principalmente em função de diluição do N pelo aumento da área foliar (Kimball *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2012), esse efeito não foi confirmado nos cafeeiros cultivados em FACE. Segundo a literatura à respeito de plantas cultivadas em estruturas do tipo FACE, o efeito nos teores de carbono em geral são positivos e resultam em maior crescimento e produtividade da planta enquanto que alterações nos teores de nitrogênio podem ou não ocorrer conforme a espécie considerada, de acordo com o tempo de cultivo além da influência de outros fatores como disponibilidade hídrica e elevadas temperaturas (Kimball *et al.*, 2002; Long *et al.*, 2006; Leakey *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2009; McElrone *et al.*, 2010; Rosenthal *et al.*, 2012; Novriyant *et al.*, 2012; Manea *et al.*, 2014).

O aumento da concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> no FACE propiciou uma clara diluição isotópica de  $^{13}\text{C}$ , de modo que os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  apresentaram reduções significativas nas folhas dos cafeeiros cultivados em CO<sub>2</sub> elevado. De acordo com Farquhar (1989) valores mais negativos de  $\delta^{13}\text{C}$  podem ser decorrentes de altos valores de  $g_s$  ou de menores valores de  $A$ . Nos cafeeiros cultivados em FACE analisados neste estudo raramente foram observadas reduções de  $A$  mas oscilações positivas e negativas de  $g_s$  foram recorrentes. Por outro lado, ainda de acordo com o mesmo autor e que vem ao encontro dos nossos resultados, os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  estão correlacionados negativamente à razão  $c_i/c_a$  (CO<sub>2</sub> intercelular/CO<sub>2</sub> atmosférico) que por sua vez equivale à razão  $p_i/p_a$

expressa em outra unidade de medida. Em plantas C3 os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  da biomassa vegetal são bons indicadores de  $c_i$  em intervalos de tempo maiores que aqueles obtidos pela medida instantânea de trocas gasosas. O valor de  $c_i$  reflete a relação entre  $g_s$  e  $A$  e consequentemente fornece informação sobre a eficiência instantânea do uso da água (EIUA). Se  $c_i$  é alta então  $g_s$  é menor em relação à  $A$  e há maior discriminação do isótopo  $^{13}\text{C}$  pela Rubisco, logo  $\Delta^{13}\text{C}$  é direta e positivamente correlacionado a  $c_i$ . Seguindo este raciocínio, nos cafeeiros cultivados no sistema FACE, os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  foram mais negativos em relação a  $A$  em  $\text{CO}_2$  elevado refletindo, portanto, menores valores de  $g_s$  em relação a  $A$  o que foi reforçado pela tendência de maiores valores de  $A$  e de menores valores de  $g_s$  medidos nos cafeeiros assim como nos maiores valores de EIUA calculados para os cafeeiros cultivados no FACE. Adicionalmente, os valores mais positivos de  $\Delta^{13}\text{C}$  e das razões  $pi/pa$  foram coerentes com as premissas teóricas supra citadas para plantas C3 em resposta à maior concentração atmosférica de  $\text{CO}_2$ . Uma vez que as medidas instantâneas de  $g_s$  nem sempre refletiram a influência positiva da maior razão  $pi/pa$  nas taxas fotossintéticas de cafeeiros cultivados em  $\text{CO}_2$  elevado, conclui-se que os valores de  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\Delta^{13}\text{C}$  e  $pi/pa$  descreveram com credibilidade os efeitos positivos do aumento atmosférico de  $\text{CO}_2$  em  $A$ .

Recentemente foram publicados os primeiros resultados do efeito do cultivo em elevado  $\text{CO}_2$  nos cafeeiros cultivados em FACE. Ghini *et al.* (2015) observaram tendência de elevação das taxas fotossintéticas que contribuíram significativamente para o aumento dos valores de EIUA o que corrobora nossos resultados. Os autores observaram redução dos teores foliares de nitrogênio na cultivar Obatã, porém esse resultado se referiu a uma coleta realizada em janeiro de 2013. Nossos resultados, portanto, são mais representativos dos efeitos de atmosfera enriquecida com  $\text{CO}_2$  em cafeeiros cultivados no sistema FACE.

Ainda que nossos resultados tenham indicado algumas alterações significativas ocorridas em alguns meses do período avaliado, de forma geral, eles reforçam a hipótese de que a concentração atmosférica de  $\text{CO}_2$  aplicada nos cafeeiros cultivados no sistema FACE não influenciou significativamente os parâmetros de acúmulo de carboidratos, de fenólicos solúveis totais, de lignina, de nitrogênio e de carbono em folhas das duas cultivares de cafeeiros ao longo do período de 27 meses de cultivo. A tendência de elevação nas taxas de fotossíntese, de redução da condutância estomática e consequentemente de elevação dos valores de eficiência intrínseca do uso da água,

associados ao aumento dos valores de discriminação isotópica de carbono, indicaram influência positiva da maior concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> na assimilação de carbono pelos cafeeiros.

#### 4. CONCLUSÕES

O estudo das respostas de duas cultivares de *Coffea arabica*, que diferem quanto à resistência ao fungo causador da ferrugem do cafeeiro, ao incremento da concentração atmosférica de CO<sub>2</sub>, sob condições de casa de vegetação e de campo, permitiu concluir que:

Tanto nas condições de OTC (760 ppm CO<sub>2</sub>) como em sistema FACE (~550ppm), observou-se que a atual concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> é limitante para a fotossíntese do cafeeiro arábica, uma vez que, sob elevada concentração atmosférica, tanto a cultivar Catuaí como a Obatã, apresentaram maiores taxas fotossintéticas.

Sob condições de OTC, o aumento da concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> resultou em taxas fotossintéticas máximas ( $A_{max}$ ) de até 16  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , valores nunca antes descritas para o cafeeiro. Estas taxas estiveram associadas a aumentos no ponto de saturação luminoso da fotossíntese.

A maior concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> não modificou a severidade de ferrugem na cultivar suscetível, Catuaí em condições de OTC. Conforme esperado, a cultivar Obatã, resistente, não apresentou infecção pelo patógeno.

Para os cafeeiros cultivados no FACE, o aumento da concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> não alterou o padrão sazonal da fotossíntese do cafeeiro, que apresenta as maiores taxas fotossintéticas no período quente e úmido (fase ativa de crescimento) e baixas taxas no período frio e seco (fase quiescente de crescimento). No entanto, sob o aumento da concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> (~550ppm) os cafeeiros apresentaram maiores valores de taxas fotossintéticas ( $A$ ) e reduções de condutância estomática ( $g_s$ ) resultando em aumento dos valores de eficiência intrínseca do uso da água (EIUA) ao longo de todo o período experimental.

O aumento da concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> propiciou um aumento na razão  $p_i/p_a$ , o que pode explicar em certa extensão os aumentos na discriminação isotópica do carbono ( $\Delta$ ), reduções na  $g_s$  e aumentos na EIUA.

Os teores de carboidratos, compostos fenólicos e lignina, os quais estão envolvidos nas respostas de defesa ao patógeno causador da ferrugem, não foram significativamente alterados em resposta à maior concentração atmosférica de CO<sub>2</sub>. O

incremento da disponibilidade de carbono não afetou severidade de ferrugem na cultivar suscetível, Catuaí nos experimentos realizados em OTC.

## 5. REFERÊNCIAS

- Ackerly, D.D., Coleman, J.S., Morse, S.R. & Bazzaz, F.A. 1992. CO<sub>2</sub> and temperature effects on leaf area production in two annual plant species. *Ecology* 73:1260- 1269.
- Agrios, G.N. 1997. Plant Pathology. 4ed. San Diego: Academic. 635 p.
- Aidar, M.P.M, Martinez, C.A., Costa, A.C., Costa, P.M.F., Dietrich, S.M.C. & Buckeridge, M.S. 2002. Effect of atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment on the establishment of seedlings of Jatobá, *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Biota Neotropica* 2: 1-10.
- Ainsworth, E.A. & Long, S.P. 2005. What have we learned from 15 years of free-air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO<sub>2</sub>. *New Phytologist*, Cambridge, 165: 351-372.
- Ainsworth, E.A. & Rogers, A. 2007. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising (CO<sub>2</sub>): mechanisms and environmental interactions. *Plant, Cell and Environment* 30: 258-270.
- Ainsworth, E.A., Leakey, A.D.B., Ort, D.R. & Long, S.P. 2008. FACE-ing the facts: inconsistencies and interdependence among field, chamber and modeling studies of elevated [CO<sub>2</sub>] impacts on crop yield and food supply. *New Phytologist* 179: 5–9.
- Amaral, L.I.V., Gaspar, M., Costa, P.M.F., Aidar, M.P.M. & Buckeridge, M.S. 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34: 425-431.
- Amthor, J.S. 1991. Respiration in a future, higher-CO<sub>2</sub> world. *Plant, Cell and Environment* 14:13-20.
- Andersson, I. & Backlund, A. 2008. Structure and function of Rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:275-291.

- Aranjuelo, I., Pardo, A., Biel, C., Save, R., Azcón-Bieto, J. & Nogues, S. 2009. Leaf carbon management in slow-growing plants exposed to elevated CO<sub>2</sub>. *Global Change Biology*, 15(1), 97-109. Leaf carbon management in slow - growing plants exposed to elevated CO<sub>2</sub>. *Global Change Biology* 15: 97-109.
- Araújo, W.L., Cunha, R.L., Celin, E.F., Dias, P.C., Moraes, G.A.B.K., Antunes, W.C., Martins, S.C.V., Cavatte, P.C., Matos, F.S. & DaMatta, F.M. 2007. Metabolismo do carbono e limitações bioquímicas da fotossíntese em folhas de diferentes posições da copa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). V Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2007, Águas de Lindóia. *Anais do V Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*. Brasília: Embrapa Café, 2007. v. (CD ROM)
- Araújo, W.L., Dias, P.C., Moraes, G.A.B.K., Celin, E.F., Cunha, R.L., Barros, R.S. & DaMatta, FM. 2008. Limitations to photosynthesis in coffee leaves from different canopy positions. *Plant Physiology & Biochemistry* 46: 894-890
- Arenque, B.C., Grandis, A., Pocius, O., Souza, A.P. de & Buckeridge, M.S. 2014. Responses of *Senna reticulata*, a legume tree from the Amazonian floodplains, to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration and waterlogging. *Trees* 28: 1021-1034.
- Assad, E.D., Pinto, H.S., Zullo, J.R.,J, & Marin, F. 2007. Mudanças climáticas e agricultura: uma abordagem agroclimatológica. *Ciência e Ambiente* 34:169-182.
- Avelino J, Barboza B, Araya JC, Fonseca C, Davrieux F, Guyot B, et al. 2005. Effects of slope exposure, altitude and yield on coffeequality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa Mar´ia de Dota. *JSci Food Agric* 85:1869–1876.
- Bachmann, M., Matile, P. & Keller, F. 1994. Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L.. *Plant Physiology* 105:1335- 1345.
- Baliza, D.P., Santos, M.O., Alves, J.D., Guimarães, R.J. & Cunha, R.L. 2014. Metabolismo da sacarose em cafeeiros submetidos a diferentes níveis de sombreamento. *Coffee Science* 9: 445-455.
- Bari R., & Jones, J.D.G. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69: 473-488.
- Barratt, D.P., Derbyshire, P., Findlay, K., Pike, M., Wellner, N., Lunn, J. & Smith, A.M. 2009. Normal growth of Arabidopsis requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:13124-13129.

- Barros, R.S., Motta, J.W.S., DaMatta, F.M. & Maestri, M. 1997. Decline of vegetative growth in *Coffea arabica* L. in relation to leaf temperature, water potential and stomatal conductance. *Field Crops Research* 54: 65-72.
- BassiriRad, H., Constable, J.V., Lussenhop, J., Kimball, B.A., Norby, R.J., Oechel, W.C. & Silim, S. 2003. Widespread foliage  $\delta^{15}\text{N}$  depletion under elevated  $\text{CO}_2$ : inferences for the nitrogen cycle. *Global Change Biology* 9: 1582-1590.
- Batista, K.D., Araújo, W.L., Antunes, W.C., Cavatte, P.C. & Moraes, G.A.B.K. 2012. Photosynthetic limitations in coffee plants are chiefly governed by diffusive factors. *Trees* 26: 459-468.
- Bauer, H., Wierer, R., Hatheway, H. & Larcher, W. 1985. Photosynthesis of *Coffea arabica* L. after chilling. *Physiologia Plantarum* 64: 449-454
- Berger, S., Papadopoulos, M., Schreiber, U., Kaiser, W. & Roitsch, T. 2004. Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum* 122: 419-428.
- Berger, S., Sinha, A.K. & Roitsch, T. 2007. Plant physiology meets phytopathology: Plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* 58: 4019-4026.
- Bernacchi, C. J., Morgan, P. B., Ort, D. R., & Long, S. P. 2005. The growth of soybean under free air  $[\text{CO}_2]$  enrichment (FACE) stimulates photosynthesis while decreasing in vivo Rubisco capacity. *Planta*, 220: 434-446.
- Bettiol, W., Ghini, R., Morandi, M.A.B., Stadnik, M.J., Krauss, U., Stefanova, M. & Cotes Prado, A.M. 2008. Controle biológico de doenças de plantas na América Latina. In: Alves, S. B.; Lopes, R. B. (Ed.). Controle microbiano de pragas na América Latina. Piracicaba; FEALQ, p.303-331
- Bettiol, W., Ghini, R., Morandi, M.A.B. 2005. Alguns métodos alternativos para o controle de doenças de plantas disponíveis no Brasil. In: Venzon, M.; de Paula Júnior, T.J.; Pallini, A. (Org.). Controle alternativo de pragas e doenças. 1ed. Viçosa: EPAMIG. p.163-184.
- Bloom, A.J., Burger, M., Asensio, J.S.R. & Cousins, A.B, 2010. Carbon Dioxide Enrichment Inhibits Nitrate Assimilation in Wheat and Arabidopsis. *Science* 328:899-903.

- Bolouri-Moghaddam, M.R., Le Roy, K., Xiang, L., Rolland, F. & Van den Ende, W. 2010. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS Journal* 277: 2022–2037.
- Bolton, M.D. 2009. Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 22: 487–497.
- Boudet, A.M. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68: 2722-2735.
- Bourne, E.J., Walter, M.E. & Pridham, J.B. 1965. The biosynthesis of raffinose. *Biochemistry Journal* 97:802-806.
- Braga, M.R., Aidar, M.P., Marabesi, M.A. & Godoy, J.R. 2006. Effects of elevated CO<sub>2</sub> on the phytoalexin production of two soybean cultivars differing in the resistance to stem canker disease. *Environmental and Experimental Botany* 58: 85-92.
- Brugnoli, E. & Farquhar, G.D. 2000. Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. In: Leegood, R. C.; Sharkey, T.D.; von Caemmerer, S. (Eds.). *Photosynthesis*. Springer Netherlands. p. 399-434.
- Buckeridge, M.S. & Aidar, M.P.M. 2002. Carbon sequestration in the rain forest: alternatives using environmentally friendly biotechnology. *Biota Neotropica* 21:1-5.
- Buckeridge, M. S., Mortari, L. C., Machado, M. R. 2007. Respostas fisiológicas de plantas às mudanças climáticas: alterações no balanço de carbono nas plantas podem afetar o ecossistema? In: Rego, G. M., Negrelle, R. R. B, Morellato, L. P. C. (Eds) *Fenologia - Ferramenta para conservação e manejo de recursos vegetais arbóreos*. Colombo, PR: Embrapa Florestas. Cap. 12. p.213-230.
- Bunce, J.A. 2005. Response of respiration of soybean leaves grown at ambient and elevated carbon dioxide concentrations to day-to-day variation in light and temperature under field conditions. *Annals of Botany* 95: 1059-1066.
- Butterworth, M.H., Semenov, M.A., Barnes, A., Moran, D., West, J.S. & Fitt, B.D.L. 2010. North-South divide: Contrasting impacts of climate change on crop yields in Scotland and England. *Journal of the Royal Society* 7:123-130.

- Cabello, J.V., Lodeyro, A.F. & Zurbriggen, M.D. 2014. Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 26: 62-70
- Calfapietra, C., Fares, S. & Loreto, F. 2009. Volatile organic compounds from Italian vegetation and their interaction with ozone. *Environmental Pollution*, 157: 1478-1486.
- Camargo, M.B.P.D. 2010. The impact of climatic variability and climate change on arabic coffee crop in Brazil. *Bragantia* 69: 239-247.
- Campa, C., Mondolot, L., Rakotondravao, A., Bidel, L. P., Gargadennec, A., Couturon, E., & Davis, A. P. 2012. A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves: biological implications and uses. *Annals of botany*, 110: 595-613.
- Carelli, M.L.C., Fahl, J.I., Trivelin, P.C.O. & Queiroz-V, R.B. 1999. Carbon isotope discrimination and gas exchange in *Coffea* species grown under different irradiance regimes. *Revista Brasileira Fisiologia Vegetal* 11: 63-68.
- Carvalho, M.A.M., Zaidan, L.B.P. & Dietrich, S.M.C. 1997. Growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from rhizophores. *New Phytologist* 136: 153-161.
- Castro, J. C., Dohleman, F. G., Bernacchi, C. J. & Long, S. P. 2009. Elevated CO<sub>2</sub> significantly delays reproductive development of soybean under Free-Air Concentration Enrichment (FACE). *Journal of Experimental Botany* 60: 2945-2951.
- Centritto, M., Lee, H.S.J. & Jarvis, P.G. 1999. Increased growth in elevated [CO<sub>2</sub>]: in early, short-term response? *Global Change Biology* 5: 623-633.
- Cernusak, L.A., Winter, K. & Turner, B.L. 2009. Plant  $\delta^{15}\text{N}$  correlates with the transpiration efficiency of nitrogen acquisition in tropical trees. *Plant Physiology* 151: 1667-1676.
- Cernusak, L.A., Ubierna, N., Winter, K., Holtum, J.A., Marshall, J.D. & Farquhar, G.D. 2013. Environmental and physiological determinants of carbon isotope discrimination in terrestrial plants. *New Phytologist*, 200: 950-965.

- Chakraborty, S., Luck, J., Hollaway, G., Freeman, A., Norton, R., Garrett, K.A., Percy, K., Hopkins, A., Davis, C. & Karnosky, D.F. 2008. Impacts of Global Change on Diseases of Agricultural Crops and Forest Trees. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 3: 1-15.
- Chaves, A.R.M., Martins, S.C.V., Batista, K.D., Celin, E.F. & DaMatta, F.M. 2012. Varying leaf-to-fruit ratios affect branch growth and dieback, with little to no effect on photosynthesis, carbohydrate or mineral pools, in different canopy positions of field-grown coffee trees. *Environmental and Experimental Botany* 77: 207-218.
- Chaves, A.R.M., Ten-Caten, A., Pinheiro, H.A., Ribeiro, A. & DaMatta, F.M. 2008. Seasonal changes in photoprotective mechanisms of leaves from shaded and unshaded fieldgrown coffee (*Coffea arabica* L.) trees. *Trees* 22: 351-361.
- Cheeseman, J.M. 2007. Hydrogen Peroxide and Plant Stress: A Challenging Relationship. *Plant Stress* 1(1), 4-15. Global Science Books.
- Chen, F., Ge, F. & Parajulee, M.N. 2005. Impact of elevated CO<sub>2</sub> on tritrophic interaction of *Gossypium hirsutum*, *Aphis gossypii* and *Leis axyridis*. *Environmental Entomology* 34: 37-46.
- Cheng, S.H., Moore, B.D. & Seemann, J.R., 1998. Effect on short and long term elevated CO<sub>2</sub> on the expression of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. *Plant Physiol.* 116: 715-723.
- Cho, Y.H., Hong J.W., Kim, E.C. & Yoo, S.D. 2012. Regulatory functions of SnRK1 in stress-responsive gene expression and in plant growth and development. *Plant Physiology* 158:1955–1964.
- Chou, H., Bundock, N., Rolfe, S. & Scholes, J. 2000. Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* causes a reprogramming of host metabolism. *Molecular Plant Pathology* 1: 99–111.
- CIIAGRO-Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas. "CIIAGRO Online [base de dados na internet]." São Paulo: Instituto Agrônômico. Disponível em: <<http://www.ciiagro.sp.gov.br>> Acesso em 14/01/2014
- CO2Now. Disponível em: <<http://co2now.org/>>. Acesso em 10 de agosto de 2014.

- Condon, A.G., Richards, R.A., Farquhar, G.D. 1987. Carbon isotope discrimination is positively correlated with grain yield and dry matter production in field-grown wheat. *Crop Sci* 27: 996-1001.
- Corcuera, L., Morales, F., Abadía, A. & Gil-Pelegrín, E. 2005. Seasonal changes in photosynthesis and photoprotection in a *Quercus ilex* subsp. *ballota* woodland located in its upper altitudinal extreme in the Iberian Peninsula. *Tree Physiology* 25: 599-608.
- Costa, M.J.N., Zambolim, L. & Rodrigues, F.A. 2006. Efeito de níveis de desbaste de frutos do cafeeiro na incidência da ferrugem, no teor de nutrientes, carboidratos e açúcares redutores. *Fitopatologia Brasileira* 31: 564-571.
- Coviella, C.E., Stipanovic, R.D. & Trumble, J.T. 2002. Plant allocation to defensive compounds: interactions between elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen in transgenic cotton plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 323-331.
- Cure, J.D. & Acock, B. 1986. Crop responses to carbon dioxide doubling: a literature survey. *Agricultural and Forest Meteorology* 38:127-145.
- Curtis, P.S. 1996. A meta-analysis of leaf gas exchange and nitrogen in trees grown under elevated carbon dioxide. *Plant, Cell and Environment* 19:127-137.
- DaMatta, F.M., Maestri, M., Mosquim, P.R. & Barros, R.S. 1997. Photosynthesis in coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) as affected by winter and summer conditions. *Plant Science* 128: 43-50.
- DaMatta, F.M. & Maestri, M. 1997. Photoinhibition and recovery of photosynthesis in *Coffea arabica* and *C. canephora*. *Photosynthetica* 34: 439-446. DaMatta FM. 2004. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. *Field Crops Research* 86: 99-114.
- DaMatta, F.M. & Rena, A.B. 2002. Ecofisiologia de cafezais sombreados e a pleno sol. In: Zambolim L (ed). O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café. UFV, Viçosa, p. 93-135
- DaMatta, F.M. 2004. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 16: 1-6.

- DaMatta, F.M. & Ramalho, J.D.C. 2006. Impact of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18: 55-81.
- DaMatta, F.M, Ronchi, C.P., Maestri, M. & Barros, R.S. 2007. Ecophysiology of coffee growth and production. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19: 485-510.
- DaMatta, F.M., Cunha, R.L., Antunes, W.C., Martins, S.C.V., Araújo, W.L., Fernie, A.R. & Moraes, G.A.B.K. 2008. In field-grown coffee trees source-sink manipulation alters photosynthetic rates, independently of carbon metabolism, via alterations in stomatal function. *New Phytologist* 178: 348-357.
- DaMatta, F.M., Grandis, A., Arenque, B.C. & Buckeridge, M.S. 2010. Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. *Food Research International* 43: 1814–1823.
- Davis, A.P., Tosh, J., Ruch, N. & Fay, M.F. 2011. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 167: 357-377.
- Davis, A.P., Gole, T.W., Baena, S. & Moat, J. 2012. The impact of climate change on indigenous Arabica coffee (*Coffea arabica*): predicting future trends and identifying priorities. *PloS One* 7: e47981.
- Davis, A.S. & Ainsworth, E.A. 2012. Weed interference with field-grown soyabean decreases under elevated [CO<sub>2</sub>] in a FACE experiment. *Weed Research* 52: 277–285.
- De Lima, R. B., dos Santos, T. B., Vieira, L. G. E., Ferrarese, M. D. L. L., Ferrarese-Filho, O., Donatti, L., & de Oliveira Petkowicz, C. L. 2014. Salt stress alters the cell wall polysaccharides and anatomy of coffee (*Coffea arabica* L.) leaf cells. *Carbohydrate polymers* 112: 686-694.
- den Hertog, J., Stulen, I., Fonseca, F. & Delea, P. 1996. Modulation of carbon and nitrogen allocation in *Urtica dioica* and *Plantago major* by elevated CO<sub>2</sub>: impact of accumulation of nonstructural carbohydrates and ontogenetic drift. *Physiologia Plantarum* 98: 77-88.

- Dewick, P.M. 2009. Medicinal Natural Products – A biosynthetic approach. Third edition. John Wiley and Sons. West Sussex. UK. 327 p.
- Dixon, R.A. & Paiva, N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R.J., Voll, L.M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, U., Kahmann, R. & Kämper, J. 2008. Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *The Plant Journal* 56:181–195.
- Dos Santos, T. B., Budzinski, I. G. F., Marur, C. J., Petkowicz, C. L. O., Pereira, L. F. P. & Vieira, L. G. E. 2011. Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 441–448.
- Doster, M. A. & Bostock, R. M. 1988. Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. *Phytopathology*, 78: 473-477.
- Drake, B.G., González-Meler, M.A. & Long, S.P. 1997. More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO<sub>2</sub>? *Annual Reviews on Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 609-639.
- Drake, B. G., Azcon-Bieto, J., Berry, J., Bunce, J., Dijkstra, P., Farrar, J., & Wullschleger, S. 1999. Does elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration inhibit mitochondrial respiration in green plants?. *Plant, Cell & Environment*, 22: 649-657.
- Dubois, M. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry* 28: 350-356.
- Duhoux, E. & Nicole, M. 2004. Réponse des plantes aux agents pathogènes. In: Biologie végétale: associations et interactions chez les plantes. Dunod. Paris. p. 117-136.
- Eastburn, D.M., Degennaro, M.M., Delucia, E.H., Dermody, O. & McElrone, A. 2010. Elevated atmospheric carbon dioxide and ozone alter soybean diseases at SoyFACE. *Global Change Biology* 16: 320–330.

- Edwards, G.E. & Baker, N.R. 1993. Can CO<sub>2</sub> assimilation in maize leaves be predicted accurately from chlorophyll fluorescence analysis? *Photosynthesis Research* 37: 89-102.
- Ehness, R., Ecker, M., Godt, D.E. & Roitsch, T. 1997. Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell* 9: 1825–1841.
- Esmeijer-Liu, A.J., Kürschner, W.M., Lotter, A.F., Verhoeven, J.T.A. & Goslar, T.S.A. 2012. Stable carbon and nitrogen isotopes in a peat profile are influenced by early stage diagenesis and changes in atmospheric CO<sub>2</sub> and N deposition. *Water, Air and Soil Pollution* 223: 2007-2022.
- Evans, J.R., Sharkey, T.D., Berry, J.A. & Farquhar, G.D. 1986. Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas exchange to investigate CO<sub>2</sub> diffusion in leaves of higher plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 13: 281-292.
- Evans, J.R. & Loreto, F. 2000. Acquisition and diffusion of CO<sub>2</sub> in higher plant leaves. In: Leegood, R. C.; Sharkey, T.; Von Caemmerer, S. (Eds). *Photosynthesis: physiology and metabolism*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. p. 321-351.
- Eyles, A., Bonello, P., Ganley, R. & Mohammed, C. 2010. Induced resistance to pests and pathogens in trees. *New Phytologist* 185: 893-908.
- Fanjul, L., Arreola-Rodriguez, R. & Mendez-Castrejon, M.P. 1985. Stomatal responses to environmental variables in shade and sun grown coffee plants in Mexico. *Experimental Agriculture* 21: 249-258.
- FAO, F. 2013. *Statistical Yearbook 2013: World Food and Agriculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 289p.
- Farah, A. 2006. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry* 98: 373-380.
- Farquhar, G.D., von Caemmerer, S. & Berry, J.A. 1980. A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta* 149:78–90.

- Farquhar, G.D., O'Leary, M.H. & Berry, J.A. 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 9: 121–137.
- Farquhar, G.D. & Sharkey, T.D. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 33: 317-345.
- Farquhar, G.D. & Richards, R.A. 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* 11: 539–552.
- Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R. & Hubick, T. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:503-537.
- Farquhar, G.D. & Cernusak, L.A. 2012. Ternary effects on the gas exchange of isotopologues of carbon dioxide. *Plant, Cell and Environment* 35: 1221-1231.
- Fazuoli, L.C. 1998. Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arábica obtidas no Instituto Agrônômico de Campinas. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.) O estado da arte de tecnologias na produção de café. Viçosa: UFV, 2002. p. 163-215.
- Fazuoli, L.C., Braghini, M.T., Silvarolla, M.B. & Oliveira, A.C.B. 2007. A ferrugem alaranjada do cafeeiro e a obtenção de cultivares resistentes. *O Agrônômico*, 59: 48-53.
- Fertig, B.M. 2010. Stable nitrogen isotopes ( $\delta^{15}\text{N}$ ) in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) as an indicator of nitrogen source. Dissertation. University of Maryland, College Park. 258p.
- Flügge, U.I. 2000. Metabolite transport across the chloroplast envelope of C3 plants. In: Leegood, R.C.; Sharkey, T.D.; von Caemerer, S. (Eds). Photosynthesis: physiology and metabolism. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p.137-152.
- Foyer, C.H., Ferrario-Méry, S. & Huber, S.C. 2000. Regulation of carbon fluxes in the cytosol: coordination of sucrose synthesis, nitrate reduction and organic acid and amino acid biosynthesis. In: Leegood, R.C.; Sharkey, T.D.; Von Caemerer, S. (Eds). Photosynthesis: physiology and metabolism. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 177-203.

- Franck, N., Vaast, P., Génard, M. & Dauzat, J. 2006. Soluble sugars mediate sink feedback down-regulation of leaf photosynthesis in field-grown *Coffea arabica*. *Tree Physiology* 26: 517-525.
- Gallego-Giraldo, L., Escamilla-Trevino, L., Jackson, L.A. & Dixon, R.A. 2011. Salicylic acid mediates the reduced growth of lignin down-regulated plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 20814-20819.
- Geiger, D.R., Servaites, J.C. & Fuchs, M.A. 2000. Role of starch in carbon translocation and partitioning at the plant level. *Australian Journal of Plant Physiology* 27:571-582.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z. & Rahmat, A. 2010. Elevated carbon dioxide increases contents of flavonoids and phenolic compounds, and antioxidant activities in Malaysian young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe.) varieties. *Molecules*, 15: 7907-7922.
- Ghini, R. Mudanças Climáticas globais e doenças de plantas. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2005. 104p.
- Ghini, R., Hamada, E., Bettioli, W. 2008. Climate change and plant diseases. *Scientia Agricola* 65: 98-107.
- Ghini, R., Torre-Neto, A., Dentzien, A.F.M., Guerreiro-Filho, O., Iost, R., Patrício, F.R.A., Prado, J.S.M., Thomaziello, R.A., Bettioli, W. & DaMatta, F.M. 2015. Coffee growth, pest and yield responses to free-air CO<sub>2</sub> enrichment. *Climatic Change*. <online version doi:10.1007/s10584-015-1422-2>.
- Goufo, P., Pereira, J., Moutinho-Pereira, J., Correia, C.M., Figueiredo, N., Carranca, C. & Trindade, H. 2014. Rice (*Oryza sativa* L.) phenolic compounds under elevated carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) concentration. *Environmental and Experimental Botany* 99: 28-37.
- González-Meler, M.A., Ribas-Carbó, M., Siedow, J.N., Drake, B.G. 1996. Direct inhibition on plant mitochondrial respiration by elevated CO<sub>2</sub>. *Plant Physiology* 112:1349-1355.
- Granot, D., David-Schwartz, R. & Kelly, G. 2013. Hexose kinases and their role in sugar-sensing and plant development. *Frontiers in Plant Science* 4: 44.

- Grandis, A. 2010. Respostas fotossintéticas e de crescimento da espécie amazônica *Senna reticulata* sob elevada concentração de CO<sub>2</sub>. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 126 p.
- Griffin, K.L. & Seemann, J.R. 1996. Plants, CO<sub>2</sub> and photosynthesis in the 21st century. *Chemistry & Biology*, 3: 245-254.
- Guerra-Guimarães, L. 2009. Chitinases of *Coffea arabica* genotypes resistant to orange rust *Hemileia vastatrix*. *Biologia Plantarum* 53: 702-706.
- Guia Rio+20- Conferência das Nações unidas sobre desenvolvimento sustentável. 2012, 112p.
- Guo, H., Sun, Y., Ren, Q., Zhu-Salzman, K., Wang, C.Z., Kang, L. & Ge, F. 2012. Elevated CO<sub>2</sub> reduces the resistance and tolerance of tomato plants to *Helicoverpa armigera* by suppressing the JA signaling pathway. *PloS ONE* 7: e41426.
- Guzzo, S.D. 1987. Indução de resistência em cafeeiros suscetíveis a *Hemileia vastatrix* por exopolissacarídeos de *Xanthomonas campestris* pv. manihotis. Induced resistance in coffee plants susceptible to *Hemileia vastatrix* with exopolisaccharides of *Xanthomonas campestris* pv. manihotis. *Fitopatologia Brasileira* 12: 130.
- Guzzo, S.D., Castro, R.M. de; Kyda, K. & Martins, E.M.F. 2001. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. *Arquivos do Instituto Biológico* 68: 89-94.
- Guzzo, S.D., Harakava, R., Lucon, C.M.M. & Tsai, S.M. 2004. Resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix* e indução local e sistêmica de quitinases e β-1,3-glucanases por acibenzolar-S-metil. *Summa Phytopathologica* 30: 376–381.
- Guzzo, S.D., Harakava, R. & Tsai, S.M. 2009. Identification of Coffee Genes Expressed During Systemic Acquired Resistance and Incompatible Interaction with *Hemileia vastatrix*. *Journal of Phytopathology* 157: 625–638.
- Hamada, E., Ghini, R., Fernandes, J.L., Pedro Júnior, M.J. & Rossi, P. 2008. Spatial and temporal variability of leaf wetness duration in the State of São Paulo, Brazil. *Scientia Agricola* 65: 26-31.

- Hartley, S.E., Jones, C.G., Couper, G.C. & Jones, T.H. 2000. Biosynthesis of plant phenolic compounds in elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. *Global Change Biology* 6: 497-506.
- Heath, M.C, Nimchuk, Z. & Xu, H. 1997. Plant nuclear migrations as indicators of critical interactions between resistant or susceptible cowpea epidermal cells and invasion hyphae of the cowpea rust fungus. *New Phytologist* 135: 689-700.
- Heath, M.C. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44: 321-334.
- Herbers, K., Meuwly, P., Frommer, W.B., Metraux, J.P. & Sonnewald, U. 1996. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell* 8: 793–803.
- Herbers, K., Takahata, Y., Melzer, M., Mock, H.P., Hajirezaei, M. & Sonnewald, U. 2000. Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of Potato virus Y with tobacco. *Molecular Plant Pathology* 1: 51–59.
- Hey, S.J, Byrne, E. & Halford, N.G. 2010. The interface between metabolic and stress signaling. *Ann Bot* 105:197–203.
- Hikosaka, K., Kinugasa, T., Oikawa, S., Onoda, Y. & Hirose, T. 2011. Effects of elevated CO<sub>2</sub> concentration on seed production in C<sub>3</sub> annual plants. *Journal of Experimental Botany* 62: 1523-1530.
- Hoagland, D. & Arnon, D.I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. *California Agriculture Experimental Station Circular*, 1950. p.347.
- Hobbie, E.A. & Ouimette, A.P. 2009. Controls of nitrogen isotope patterns in soil profiles. *Biogeochemistry* 95: 355-371.
- Huber, S.C. & Huber, J.L. 1996. Role and regulation of sucrose phosphate synthase in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 431–444.
- Hungate, B.A., Canadell, J. & Chapin III, F. S. 1996. Plant species mediate changes in soil microbial N response to elevated CO<sub>2</sub>. *Ecology* 77:2505–2515.
- INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Annual Review 2011/12. IOC document. London: International Coffee Organization (ICO). 2013. 40 p.

- IPCC- Working Group I Contribution to the IPCC Fifth Assessment Report: The Physical Science Basis. Climate Change 2013.
- Iost, R. 2013. Problemas fitossanitários e crescimento de duas cultivares de café durante o primeiro ano em experimento FACE (“Free Air Carbon Dioxide Enrichment”). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP. 77p.
- Jablonski, L.M., Wang, X. & Curtis, P.S. 2002. Plant reproduction under elevated CO<sub>2</sub> conditions: a meta-analysis of reports on 79 crop and wild species. *New Phytologist* 156: 9-26.
- Jifon, J.L. & David, W.W. 2002. Photosynthetic acclimation to elevated CO<sub>2</sub> in *Phaseolus vulgaris* L. is altered by growth response to nitrogen supply. *Global Change Biology* 8: 1018-1027.
- Johnson, D.A., Asay, K.H., Tiesen, L.L., Ehleringer, J.R., Jefferson, P.G. 1990. Carbon isotope discrimination: potential in screening cool-season grasses for water-limited environments. *Crop Sci* 30: 338-343.
- Kelly, J.J., Bansal, A., Winkelman, J., Janus, L.R., Hell, S., Wencel, M., Belt, P., Kuehn, A., Rier, S.T. & Tuchman, N.C. 2010. Growth of trees under elevated atmospheric CO<sub>2</sub> alters microbial communities colonizing leaf litter in a temperate woodland stream. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 4950-4959.
- Kim, M.S., Cho, S.M., Kang, E.Y., Im, Y.J., Hwangbo, H., Kim, Y.C., et al. 2008. Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance caused by *Pseudomonas chlororaphis* root colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 1643–1653.
- Kimball, B., Kobayashi, K. & Bindi, M. 2002. Responses of agricultural crops to free-air CO<sub>2</sub> enrichment. *Advances in Agronomy* 77: 293-368.
- Kocal, N., Sonnewald, U. & Sonnewald, S. 2008. Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Plant Physiology* 148: 1523–1536.
- Koch, K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 235–246.

- Kretschmar, F.S., Aidar, M.P.M., Salgado, I. & Braga, M.R. 2009. Elevated CO<sub>2</sub> atmosphere enhances production of defense-related flavonoids in soybean elicited by NO and a fungal elicitor. *Environmental and Experimental Botany* 65: 319–329.
- Kuo, T.M., VanMiddlesworth, J.F. & Wolf, W.J. 1988. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 36:32-36.
- Lake, J.A., Woodward, F.I. & Quick, W.P. 2002. Long-distance CO<sub>2</sub> signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* 53:183-193.
- Lambers, H., Chapin III, F.S. & Pons, T.L. 2008. *Plant Physiology Ecology*. Springer-Verlag New York. 605 p.
- Leakey, A.D.B., Ainsworth, E.A., Bernacchi, C.J., Rogers, A., Long, S.P. & Ort, D.R. 2009. Elevated CO<sub>2</sub> effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany* 60: 2859-2876.
- Lecoq, A.C., Petitot, A.S., Marmey, P., Silva, M.C., Guerra-Guimarães, L., Fernandez, D. & Nicole, M. 2006. Physiology and defense mechanisms to pathogens in tropical woody plants. In: *Molecular Biology of Tropical Plants. Recent Research Developments in Microbiology*, Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India. p. 1-15.
- Leegood, R. C.; Sharkey, T., Von Caemmerer, S. 2000. Introduction. In: Leegood, R. C., Sharkey, T., Von Caemmerer, S. (Eds.) *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publishers. p.1-8.
- Lehle, L. & Tanner, W. 1973. The function of myo-inositol in the biosynthesis of raffinose. *European Journal of Biochemistry* 38:103-110.
- Lincoln, D.E., Fajer, E.D. & Johnson, E.H. 1993. Plant-insect herbivore interactions in elevated CO<sub>2</sub> environments. *Trends in Ecological Evolution* 8: 64-68.
- Long, S.P. & Hällgren, J.E. 1993. Measurements of CO<sub>2</sub> assimilation by plants in the field and laboratory. In: Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhar-Nordenkampf, H.R., Leegood, R.C. & Long, S.P. (Eds.). *Photosynthesis and productivity in a changing environment: a field and laboratory manual*. Chapman and Hall, London, pp.129-167.

- Long, S.P., Ainsworth, E.A., Rogers, A. & Ort, D.R. 2004. Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the Future. *Annual Review of Plant Biology* 55: 591-628.
- Long, S.P., Ainsworth, E.A., Leakley, A.D.B. & Ort, D.R. 2006. Food for thought: lower-than-expected crop yield stimulation with rising CO<sub>2</sub> concentrations. *Science* 312: 1918-1921.
- Luo, Y. & Reynolds, J.F. 1999. Validity of extrapolating field CO<sub>2</sub> experiments to predict carbon sequestration in natural ecosystems. *Ecology*, 80: 1568-1583.
- Maffia, L.A., Haddad, F. & Mizubuti, E.S.G. 2009. Controle biológico da ferrugem do cafeeiro. In: Wagner Bettiol; Marcelo A. B. Morandi. (Org.). Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente 1: 267-275.
- Maia, F.G.M., Ogoshi, C., Vieira, J.F., Pierre, R.O., Maia, J.B., Ribeiro Júnior, P.M. & Abreu, MS de. 2012. Pigmentos, fenóis solúveis totais e lignina em plântulas de cafeeiro inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides*. *Coffee Science* 7: 152-159.
- Makino, A., Harada, M., Sato, T., Nakano, H. & Mae, T. 1997. Growth and N allocation in rice plants under CO<sub>2</sub> enrichment. *Plant Physiology* 115: 199-203.
- Malavolta, E., Favarin, J.L., Malavolta, M., Cabral, C.P., Heinrichs, R. & Silveira, J.S.M. 2002. Repartição de nutrientes nos ramos, folhas e flores do cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 1017-1022.
- Manea, A., & Leishman, M. R. 2014. Leaf area index drives soil water availability and extreme drought-related mortality under elevated CO<sub>2</sub> in a temperate grassland model system. *PloS One* 9: e91046.
- MAPA, 2014 - Relatório sobre o mercado de café – Outubro de 2014. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe/oic>>. Acesso em 01/12/2014
- Marchi, C.E., Borges, M.F. & Resende, M.L.V. 2002. Proteção induzida por benzotiadiazole contra a ferrugem-alaranjada (*Hemileia vastatrix*) em cafeeiro. *Ciência e Agrotecnologia* 26:1103-1106.

- Marabesi, M. A. 2007. Efeito do alto CO<sub>2</sub> no crescimento inicial e na fisiologia da fotossíntese em plântulas *Senna alata* (L.) Roxb. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo, SP. 78p.
- Markelz, R.C., Lai, L.X., Vosseler, L.N. & Leakey, A.D. 2014. Transcriptional reprogramming and stimulation of leaf respiration by elevated CO<sub>2</sub> concentration is diminished, but not eliminated, under limiting nitrogen supply. *Plant, Cell and Environment* 37: 886-898.
- Martins, L.D., Tomaz, M.A., Lidon, F.C., DaMatta, F.M. & Ramalho, J.C. 2014. Combined effects of elevated [CO<sub>2</sub>] and high temperature on leaf mineral balance in *Coffea* spp. plants. *Climatic Change* 126: 365-379.
- Matiello, J.B., Santinato, R., Garcia, A.W.R., Almeida, S.R. & Fernandes, D.R. 2002. Podas. In: Cultura de café no Brasil: novo manual de recomendações. Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFÉ. p. 256-274
- Matros, A., Amme, S., Kettig, B., Buck-Sorlin, G.H., Sonnewald, U. & Mock, H.P. 2006. Growth at elevated CO<sub>2</sub> concentrations leads to modified profiles of secondary metabolites in tobacco cv. SamsunNN and to increased resistance against infection with potato virus Y. *Plant, Cell and Environment* 29: 126–137.
- Maxemiuc-Naccache, V. & Dietrich, S.M.C. 1985. Changes in phenols and oxidative enzymes in resistant and susceptible *Coffea arabica* inoculated with *Hemileia vastatrix* (coffee rust). *Revista Brasileira de Botânica* 8:185-190.
- McElrone, A.J., Hamilton, J.G., Krafnick, A.J., Aldea, M., Knepp, R.G. & DeLucia, E.H. 2010. Combined effects of elevated CO<sub>2</sub> and natural climatic variation on leaf spot diseases of redbud and sweetgum trees. *Environmental Pollution* 158: 108-114.
- Melloy, P., Hollaway, G., Luck, J., Norton, R., Aitken, E. & Chakraborty, S. 2010. Production and fitness of *Fusarium pseudograminearum* inoculum at elevated CO<sub>2</sub> in FACE. *Global Change Biology* 16: 3363-3373.
- Melloy, P., Aitken, E., Luck, J., Chakraborty, S. & Obanor, F. 2014. The influence of increasing temperature and CO<sub>2</sub> on *Fusarium* crown rot susceptibility of wheat genotypes at key growth stages. *European Journal of Plant Pathology* 140: 19-37.
- Mendes, L., Ghini, R. & Bettiol, W. 2009. Efeito do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico sobre o controle biológico da ferrugem do cafeeiro por *Lecanicillium*

- longisporum*. In: Tropical Plant Pathology v.33, supl., p.S307. Resumos do 41º Congresso Brasileiro de Fitopatologia.
- Moglia, A., Lanteri, S., Comino, C., Acquadro, A., de Vos, R. & Beekwilder, J. 2008. Stress-induced biosynthesis of dicaffeoylquinic acids in globe artichoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 8641-8649.
- Mooney, H.A., Drake, B.G., Luxmoore, R.T., Oechel, W.C. & Pitelka, L.F. 1991. Predicting ecosystem responses to elevated CO<sub>2</sub> concentrations. *BioScience* 41: 96-104.
- Moraes, F.R.P. 1981. Adubação do cafeeiro: macronutrientes e adubação orgânica. In Nutrição e adubação do cafeeiro. (E Malavolta, T Yamada, JA Guidolin, ed.). p.77-89. Instituto Internacional da Potassa, Piracicaba
- Morkunas, I., Narozna, D., Nowak, W., Samardakiewicz, W. & Remlein-Starosta, D. 2011. Cross-talk interactions of sucrose and *Fusarium oxysporum* in the phenylpropanoid pathway and the accumulation and localization of flavonoids in embryo axes of yellow lupine. *Journal of Plant Physiology* 168: 424-433.
- Morkunas, I. & Ratajczak, L. 2014. The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum* 36: 1607-1619.
- Mortari, L. C. 2012. Efeitos de uma atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> sobre a fotossíntese, o crescimento e o metabolismo de carboidratos do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 111p.
- Moura, J.C.M.S., Bonine, C.A.V., Viana, J.O.F., Dornelas, M.C. & Mazzafera, P. 2010. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 360-376.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H. & Prats, E. 2008. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany* 59: 501-520.
- Nadelhoffer, K.J. & Fry, B. 1994. Nitrogen isotope studies in forest ecosystems. In: Stable isotopes in ecology and environmental science. Blackwell, Oxford, 316 p.
- Nicholson, R.L. & Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30: 369-389.

- NOOA- National Oceanic & Atmospheric Administration. Disponível em: <<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>>. Acesso em 10 de agosto de 2014.
- Norby, R.J., Gunderson, C.A., Wullschleger, S.D., O'Neill, E.G. & McCracken, M.K. 1992. Productivity and compensatory responses of yellow-poplar trees in elevated CO<sub>2</sub>. *Nature* 357: 322-324.
- Norby, R.T. & O'Neill, E.G. 1989. Growth dynamics and water use of seedlings of *Quercus alba* L. in CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres. *New Phytologist* 111: 491- 500.
- Novriyanti, E., Watanabe, M., Kitao, M., Utsugi, H., Uemura, A. & Koike, T. 2012. High nitrogen and elevated [CO<sub>2</sub>] effects on the growth, defense and photosynthetic performance of two eucalypt species. *Environmental Pollution*, 170, 124-130.
- Orians, C.M. 2000. The effects of hybridization in plants on secondary chemistry: implications for the ecology and evolution of plant-herbivore interactions. *American Journal of Botany* 87: 1749-1756.
- Parry, M.A.J., Keys, A., Madgwick, P.J., Carmo-Silva, A.E. & Andralojc, P.J. 2008. Rubisco regulation: a role for inhibitors. *Journal of Experimental Botany* 59: 1569-1580.
- Pascholati, S.F. & Leite, B. 1994. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. In: Wilmar C da Luz. (Org.). Revisão Anual de Patologia de Plantas. 1 ed. Passo Fundo, RS: *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 2: 1-51.
- Paul, M.J. & Foyer, C.H. 2001. Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52: 1383-1400.
- Paul, M.J. & Pellny, T.K. 2003. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany* 54: 539-547.
- Peltonen, P.A., Vapaavuori, E. & Julkunen-tiitto, R. 2005. Accumulation of phenolic compounds in birch leaves is changed by elevated carbon dioxide and ozone. *Global Change Biology* 11: 1305-1324.
- Pompelli, M.F., Martins, S.C., Antunes, W.C., Chaves, A.R. & DaMatta, F.M. 2010. Photosynthesis and photoprotection in coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions. *Journal of Plant Physiology* 167: 1052-1060.

- Poorter, H. 1989. Interspecific variation in relative growth rate: On ecological causes and physiological consequences. In: Lambers, H., Cambridge, M.L., Konings, H. & Pons, T.L. (Eds.) *Causes and Consequences of Variation in Growth Rate and Productivity of Higher Plants*. SPB Academic Publishing, The Hague pp.45-68.
- Poorter, H., Gifford, R.M., Kriedemann, P.E., Wong, S.C. 1992. A quantitative analysis of dark respiration and carbon content as factors in the growth response of plants to elevated CO<sub>2</sub>. *Australian Journal of Botany* 40:501-513.
- Poorter, H. & Nagel, O. 2000. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO<sub>2</sub>, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 595-607.
- Poorter, H. & Pérez-Soba, M. 2002. Plant Growth at Elevated CO<sub>2</sub>. In: Mooney, H.A. & Canadell, J.G. (Eds.). *The Earth system: biological and ecological dimensions of global environmental change*, Vol. 2. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester. p. 489-496.
- Pozza, E.A. & Alves, M. de C. 2008. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças fúngicas do cafeeiro no Brasil. In: Ghini, R. & Hamada, E. (eds) *Mudanças climáticas: impactos sobre doenças de plantas no Brasil*. 1ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, cap. 13, p. 216-233.
- Ramalho, J.C., Rodrigues, A.P., Semedo, J.N., Pais, I.P., Martins, L.D., Simões-Costa, M.C., Leitão, A.E., Fortunato, A.S., Batista-Santos, P., Palos, I.M., Tomaz, M.A., Scotti-Campos, P., Lindon, F.C. & DaMatta, F.M. 2013. Sustained photosynthetic performance of *Coffea* spp. under long-term enhanced [CO<sub>2</sub>]. *PLoS One* 8: e82712.
- Ramiro, D., Escoute, J., Petitot, A.S., Nicole, M., Maluf, M.P. & Fernandez, D. 2009. Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defense responses in resistant and susceptible coffee cultivars. *Plant Pathology* 58: 944-955.
- RAN1- Primeiro Relatório de Avaliação Nacional sobre Mudanças Climáticas, 2013. Base científica das mudanças climáticas, 197 p.
- Read, J., Sanson, G.D. & Caldwell, E, *et al.* 2009. Correlations between leaf toughness and phenolics among species in contrasting environments of Australia and New Caledonia. *Annals of Botany* 103: 757-767.

- Rezende, F. M. 2014. Efeito da atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> em mudas de *Psidium guajava* L. cv. Pedro Sato. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 119p.
- Rezende, F.M. de, Souza, A.P., Buckeridge, M.S. & Furlan, C.M. 2015. Is guava phenolic metabolism influenced by elevated atmospheric CO<sub>2</sub>?. *Environmental Pollution*, 196: 483-488.
- Rogers, H.H., Runion, G.B. & Krupa, S.V. 1994. Plant responses to atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment with emphasis on roots and the rhizosphere. *Environmental pollution*, 83: 155-189.
- Roitsch, T., Balibrea, M.E., Hofmann, M., Proels, R. & Sinha, A.K. 2003. Extracellular invertase: Key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany* 54: 513-524.
- Roitsch, T. & González, M.C. 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* 9: 606-613.
- Rolland, F.; Baena-Gonzalez, E. & Sheen, J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 675– 709.
- Ronchi, C.P., DaMatta, F.M., Batista, K.D., Moraes, G.A.B.K., Loureiro, M.E. & Ducatti, C. 2006. Growth and photosynthetic down-regulation in *Coffea arabica* in response to restricted root volume. *Functional Plant Biology* 33: 1013-1023.
- Ronquim, J.C., Prado, C.H.B.A., Novaes, P., Fahl, J.I. & Ronquim, C.C. 2006. Carbon gain in *Coffea arabica* during clear and cloudy days in the wet season. *Experimental Agriculture* 42:147-164.
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J.A. & Hilal, M. 2009. Soluble sugars - metabolism, sensing and abiotic stress: a complex network in the life of plants. *Plant Signal Behavior* 4: 388–393.
- Rosenthal, D.M. 2012. Cassava about - FACE: Greater than expected yield stimulation of cassava (*Manihot esculenta*) by future CO<sub>2</sub> levels. *Global Change Biology* 18: 2661-2675.
- Saxe, H., Ellsworth, D.S. & Heath, J. 1998. Tree and forest functioning in an enriched CO<sub>2</sub> atmosphere. *New Phytologist* 139:395-436.

- Sage, R.F., Sharkey, T.D. & Seemann, J.R. 1989. Acclimation of photosynthesis to elevated CO<sub>2</sub> in five C<sub>3</sub> species. *Plant Physiology* 89: 590-569.
- Sage, R.F. 1994. Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO<sub>2</sub>: The gas exchange perspective. *Photosynthesis Research* 39: 351–368.
- Sah, S.P. & Brumme, R. 2003. Altitudinal gradients of natural abundance of stable isotopes of nitrogen and carbon in the needles and soil of a pine forest in Nepal. *Journal of Forest Science* 49: 19-26.
- Saldanha, C.W., Otoni, C.G., Rocha, D.I., Cavatte, P.C., Detmann, K.S.C. & Tanaka, F.A.O. 2014. CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of in vitro Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 118: 87-99.
- Salgado, P.R. 2008. Total phenol concentrations in coffee tree leaves during fruit development. *Scientia Agricola* 65: 354-359.
- Santiago L.J.M, Louro, R.P & De Oliveira, D.E. 2000. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their induction by copper sulphate. *Annals of Botany* 86: 1023–1032.
- Santos, F.S., Souza, P.E., Pozza, E.A., Miranda, J.C., Carvalho, E.A., Fernandes, L.H.M. & Pozza, A.A.A. 2008. Adubação orgânica, nutrição e progresso de cercosporiose e ferrugem-do-cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43: 783-791.
- Sanz-Sáez, A., Erice, G., Aranjuelo, I., Nogués, S., Irigoyen, J.J. & Sánchez-Díaz, M. 2010. Photosynthetic down-regulation under elevated CO<sub>2</sub> exposure can be prevented by nitrogen supply in nodulated alfalfa. *Journal of Plant Physiology* 167:1558-1565.
- Sasek, T.W., DeLucia, E.H., Strain, B.R. 1985. Reversibility of photosynthetic inhibition in cotton after long-term exposure to elevated CO<sub>2</sub> concentrations. *Plant Physiology* 78:619-622.
- Sasek, T.W. & Strain, B.R. 1989. Effects of carbon dioxide enrichment on the expansion and size of kudzu (*Pueraria lobata*) leaves. *Weed Science* 37: 23-28.

- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. & Jiménez, L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45: 287-306.
- Scharte, J., Schon, H. & Weis, E. 2005. Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant, Cell and Environment* 28: 1421–1435.
- Schenk, P.M., Carvalhais, L.C. & Kazan, K. 2012. Unraveling plant–microbe interactions: can multi-species transcriptomics help? *Trends in Biotechnology* 30: 177–184.
- Scholes, J.D., Lee, P.J., Horton, P. & Lewis, D.H. 1994. Invertase - understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytologist* 126: 213-222.
- Shahidi, F. & Zhong, Y. 2010. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112: 930-940.
- Shimada, C., Lipka, V., O’Connell, R., Okuno, T., Schulze-Lefert, P. & Takano, Y. 2006. Nonhost resistance in *Arabidopsis* – *Colletotrichum* interactions acts at the cell periphery and requires actin filament function. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 270-279.
- Silva, E.A., DaMatta, F.M., Ducatti, C., Regazzi, A.J. & Barros, R.S. 2004. Seasonal changes in vegetative growth and photosynthesis of *Arabica coffee* trees. *Field Crops Research* 89: 349-357.
- Silva, M.C. 2002. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60: 169-183.
- Silva, P.E.M., Cavatte, P.C., Morais, L.E., Medina, E.F. & DaMatta, F.M. 2013. The functional divergence of biomass partitioning, carbon gain and water use in *Coffea canephora* in response to the water supply: Implications for breeding aimed at improving drought tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 87: 49-57.
- Sinha, A.K., Hofmann, M.G., Romer, U., Kockenberger, W., Elling, L. & Roitsch, T. 2002. Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato. *Plant Physiology* 128: 1480-1489.

- Smith, A.M. & Stitt, M. 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell and Environment* 30: 1126-1149.
- Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61–63.
- Somporn, C., Kamtuo, A., Theerakulpisut, P. & Siriamornpun, S. 2012. Effect of shading on yield, sugar content, phenolic acids and antioxidant property of coffee beans (*Coffea Arabica* L. cv. Catimor) harvested from north - eastern Thailand. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 1956-1963.
- Spanos, G.A. & Wrolstad, R.E. 1990. Influence of variety, maturity, processing and storage on the phenolic composition of pear juice, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 817–824.
- Stangarlin, J.R. & Leite, B. 2011. Alterações fisiológicas na suscetibilidade. In: Pascholati, S.F.; Leite, B.; Stangarlin, J.R.; CIA, P. Interação planta-patógenos: fisiologia, bioquímica e biologia molecular 13: 177-284.
- Stitt, M., Herzog, B. & Weldt, H.W. 1984. Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose 2,6-bisphosphate. *Plant Physiology* 75:548-553.
- Stitt, M. 1991. Rising CO<sub>2</sub> levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* 14: 741-762.
- Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V. & Midgley, PM [Eds]. IPCC, 2013: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Working group I contribution to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 p.
- Stokes, M.E., Chattopadhyay, A., Wilkins, O., Nambara, E. & Campbell, M.M. 2013. Interplay between sucrose and folate modulates auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 162: 1552–1565.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2010. Plant Physiology. 5ª edição, editora Artmed, 2010, 782p.
- Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. 2002. Important roles of drought- and cold-inducible

genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 29 :417-426.

Talhelm, A.F., Pregitzer, K.S., Kubiske, M.E., Zak, D.R., Company, C.E., Burton, A.J. & Karnosky, D.F. 2014. Elevated carbon dioxide and ozone alter productivity and ecosystem carbon content in northern temperate forests. *Global Change Biology* 20: 2492-2504.

Thomas, S.C. & Bazzaz, F.A. 1996. Elevated CO<sub>2</sub> and leaf shape: are dandelions getting toothier? *American Journal of Botany* 83:106-111.

Terashima, I., Yanagisawa, S. & Sakakibara, H. 2014. Plant Responses to CO<sub>2</sub>: Background and Perspectives. *Plant and Cell Physiology* 55: 237-240.

Torre Neto, A., Ghini, R. 2011. Rede de sensores sem fio para monitoramento e controle de processos em ambiente agrícola. In: Inamasu, R. Y.; Naime, J. de M.; Resende, A. V. de; Bassoi, L. H.; Bernardi, A. C. de C. (Org.). Agricultura de precisão: um novo olhar. 1ª ed. São Carlos: Embrapa Instrumentação, p. 115-119.

Tozzi, F.R.O. 2013. Impacto do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> do ar sobre a ferrugem e o crescimento de mudas de cafeeiro em estufas de topo aberto. Tese Doutorado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP. 59 p.

Trethewey, R.N. & Smith, A.M. 2000. Starch metabolism in leaves. In: Leegood, R. C.; Sharkey, T.; Von Caemmerer, S. (eds). Photosynthesis: physiology and metabolism. Kluwer Academic Publishers. p. 205-231.

Urban, L., Léchaudel, M. & Lu, P. 2004. Effect of fruit load and girdling on leaf photosynthesis in *Mangifera indica* L. *Journal of Experimental Botany* 55: 2075-2085.

van Loon, L.C., Rep, M. & Pieterse, C.M.J. 2006. Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.

Vargas, W.A. & Salerno, G.L. 2010. The Cinderella story of sucrose hydrolysis: alkaline/neutral invertases, from cyanobacteria to unforeseen roles in plant cytosol and organelles. *Plant Science* 178: 1-8.

Vlot, A.C., Dempsey, D. & Klessig, D.F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177-206.

- Voegelé, R. T., Struck, C., Hahn, M., & Mendgen, K. 2001. The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:8133-8138.
- Walter, A., Christ, M.M., Barron-gafford, G.A., Grieve, K.A., Murthy, R. & Rascher, U. 2005. The effect of elevated CO<sub>2</sub> on diel leaf growth cycle, leaf carbohydrate content and canopy growth performance of *Populus deltoides*. *Global Change Biology* 11: 1207-1219.
- Walter, A., Silk, W.K. & Schurr, U. 2009. Environmental effects on spatial and temporal patterns of leaf and root growth. *Annual Reviews on Plant Biology* 60: 279-304.
- Wang, D., Heckathorn, S.A., Wang, X. & Philpott, S.M. 2012. A meta-analysis of plant physiological and growth responses to temperature and elevated CO<sub>2</sub>. *Oecologia* 169: 1-13.
- Wind, J., Smeekens, S. & Hanson, J. 2010. Sucrose: metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry* 71: 1610–1614.
- Wolfe, D.W., Gifford, R.M., Hilbert, D. & Luo, Y. 1998. Integration of photosynthetic acclimation to CO<sub>2</sub> at the whole-plant level. *Global Change Biology* 4: 879-893.
- Wu, G., Chen, F.J., Ge, F. & Xiao, N.W. 2011. Impacts of elevated CO<sub>2</sub> on expression of plant defensive compounds in Bt-transgenic cotton in response to infestation by cotton bollworm. *Agricultural and Forest Entomology* 13: 77-82.
- Zak, D.R., Pregitzer, K.S., Burton, A.J., Edwards, I.P. & Kellner, H. 2011. Microbial responses to a changing environment: implications for the future functioning of terrestrial ecosystems. *Fungal Ecology* 4: 386-395.
- Zambolim, L.; Ribeiro do Vale, F. X.; Pereira, A. A.; Chaves, G. M. 1997. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças. In: Ribeiro do Vale, F. X.; Zambolim, L. (Eds) Controle de doenças de plantas: grandes culturas. Viçosa, UFV: Departamento de Fitopatologia, p. 83-179.
- Zambolim, L., Vale, F.X.R., Pereira, A.A., Costa, E., Pereira, A.A. & Chaves, G.M. 2002. Epidemiologia e controle integrado da ferrugem do cafeeiro. In: Zambolim, L. (Ed). Estado da arte de tecnologias na produção de café. Viçosa, UFV: Departamento de Fitopatologia, p. 369-450.

- Zhao, H., Li, Y., Zhang, X., Korpelainen, H. & Li, C. 2012. Sex-related and stage-dependent source-to-sink transition in *Populus cathayana* grown at elevated CO<sub>2</sub> and elevated temperature. *Tree Physiology* 32: 1325-1338.
- Ziska, L.H., Hogan, K.P., Smith, A.P., Drake, B.G., Hogen, K.P. 1991. Growth and photosynthetic response of nine tropical species with long-term exposure to elevated carbon dioxide. *Oecologia* 86: 383-389.
- Ziska, L.H. 2003. Evaluation of the growth response of six invasive species to past, present and future atmospheric carbon dioxide. *Journal of Experimental Botany* 54: 395-404.
- Zullo Jr, J., Pinto, H.S. & Assad, E.D. 2006. Impact assessment study of climate change on agricultural zoning. *Meteorological Applications* (supplement) 13: 69–80.