

WEBERT SATURNINO PINTO

**PARÂMETROS CINÉTICOS DA ABSORÇÃO DE NITRATO E  
FOTOSSÍNTESE EM CAFEEIROS ADULTOS SOB ESTRESSE HÍDRICO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Fitotecnia, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016

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

T

P659p  
2016  
Pinto, Webert Saturnino, 1988-  
Parâmetros cinéticos da absorção de nitrato e fotossíntese  
em cafeeiros adultos sob estresse hídrico / Webert Saturnino  
Pinto. – Viçosa, MG, 2016.  
ix, 41f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Hermínia Emília Prieto Martinez.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.36-41.

1. Café - Fisiologia. 2. Café - Consumo hídrico. 3. Análise  
foliar. 4. Fotossíntese. 5. Plantas - Teor de nitrogênio. 6. Plantas  
e solo. 7. Cinética. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em  
Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.73

WEBERT SATURNINO PINTO

**PARÂMETROS CINÉTICOS DA ABSORÇÃO DE NITRATO E  
FOTOSSÍNTESE EM CAFEIROS ADULTOS SOB ESTRESSE HÍDRICO**

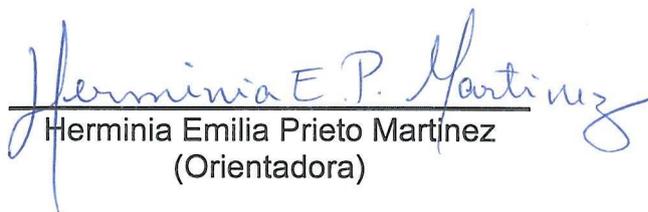
Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Fitotecnia, para obtenção do título  
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2016.

  
Leonardo Duarte Pimentel

  
Renildes Lúcio Ferreira Fontes

  
Ricardo Henrique Silva Santos  
(Coorientador)

  
Herminia Emilia Prieto Martinez  
(Orientadora)

“Nós somos aquilo que fazemos repetidamente. Excelência, então, não é um modo de agir, mas um hábito. Só fazemos melhor aquilo que repetidamente insistimos em melhorar. A busca da excelência não deve ser um objetivo, e sim um hábito. ”

**Aristóteles**

“O sentimento do dever cumprido vos dará a tranquilidade de espírito e a resignação. ”

**Alan Kardec**

Aos meus pais,  
Aos meus irmãos,  
**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Sirlene e Benoit, pelo amor incondicional, pelo carinho e por todo esforço que empenharam para que eu pudesse realizar meus sonhos.

À Professora Herminia E. P. Martinez, pela orientação, confiança, compreensão e amizade.

Aos meus irmãos Kelem, Weverton e Wellion, pelo amor e companheirismo fraternos.

Aos meus companheiros de trabalho e amigos Edimaldo Garcia e Vinicius B. Castro, por toda ajuda e suporte nas tarefas mais difíceis e cansativas desta empreitada.

A minha amiga Amanda Guedes, pela amizade e pelo apoio nas horas certas.

Ao Professor Ricardo Henrique Silva Santos, pela orientação e pelas relevantes sugestões na realização deste projeto.

Ao professor Leonardo Pimentel pelas relevantes sugestões.

Ao Professor Renildes L. F. Fontes pelas importantes sugestões e correções a este trabalho.

Aos demais colegas e amigos do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas por toda a ajuda e colaboração.

Aos colegas e amigos da Fruticultura, Francisco de Assis, Thiago Pereira Pires e Sebastián Giraldo Montoya, pelo importante apoio técnico e sugestões.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

**A todos,**

**Muito obrigado.**

## BIOGRAFIA

WEBERT SATURNINO PINTO, filho de Sirlene Maria Eleutério de Cristo e Benoit Saturnino Pinto, nasceu no dia 13 de dezembro de 1988, no município de Manhuaçu, Minas Gerais.

Em fevereiro de 2008 concluiu o curso Técnico em Agropecuária no Colégio Agrícola Nilo Peçanha, instituição localizada em Pinheiral (RJ), então vinculado à Universidade Federal Fluminense, e, atualmente, Campus Pinheiral do Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ).

Em março de 2008 ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa. Durante a graduação foi monitor das disciplinas de Química, no Colégio de Aplicação (CAp-COLUNI), de março de 2009 a setembro de 2010, bolsista de iniciação científica de outubro de 2010 a novembro de 2011 no Laboratório de Elementos-traço do Departamento de Solos. De dezembro a julho de 2012 foi bolsista de extensão no projeto “Inclusão Digital com Software Livre”. De agosto de 2012 a agosto de 2013 foi aluno de mobilidade acadêmica na University of Illinois at Urbana-Champaign, pelo Programa Ciência Sem Fronteiras, como bolsista da CAPES.

Formou-se em Agronomia em março de 2014, ingressando, logo em sequência, no curso de Mestrado em Fitotecnia no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, setor de Nutrição Mineral de Plantas, da Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em fevereiro de 2016.

## RESUMO

PINTO, Webert Saturnino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Parâmetros cinéticos da absorção de nitrato e fotossíntese em cafeeiros adultos sob estresse hídrico.** Orientadora: Herminia Emilia Prieto Martinez. Coorientador: Ricardo Henrique Silva Santos.

O nitrogênio (N) é o elemento requerido em maior quantidade pelo cafeeiro, e, no entanto, sua eficiência de uso é consideravelmente baixa, da ordem de 50%. Além de aspectos ligados ao solo (fertilidade, disponibilidade hídrica) e à planta (fenologia e fatores genéticos), outros relacionados à absorção e ao metabolismo do N contribuem para esta baixa eficiência. A determinação de parâmetros cinéticos da absorção de nitrogênio, aliada a informações de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* podem propiciar um melhor entendimento sobre o efeito conjunto destes fatores na dinâmica de aquisição deste nutriente. O objetivo geral deste trabalho foi determinar a influência do estresse hídrico e da etapa do ciclo fenológico na absorção e metabolismo de nitrogênio em cafeeiros (*Coffea arabica* L.) cv. Catuaí Vermelho IAC 99. O experimento foi conduzido em casa de vegetação com plantas adultas aos cinco anos de idade cultivadas em solução nutritiva. O esquema experimental foi o de parcelas subdivididas no tempo, sendo a presença de déficit hídrico (EH+), ou não (controle), os tratamentos, com três repetições, estudados ao longo das fases fenológicas de prefloração (PF), floração/chumbinho (F-Ch), primeira expansão rápida (PER) e enchimento de grãos (EG) (subparcelas). O estresse hídrico foi induzido pela adição de polietilenoglicol 6.000 g mol<sup>-1</sup> à solução nutritiva. Após período de condicionamento pré-experimental com restrição nutricional, procedeu-se a um ensaio de exaustão de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. A solução pré-experimental foi substituída por solução de KNO<sub>3</sub> 500 μmol L<sup>-1</sup> (controle) ou KNO<sub>3</sub> 500 μmol L<sup>-1</sup> + PEG 290,0 g L<sup>-1</sup> (EH+), e iniciou-se a circulação. Após período para estabilização do sistema, iniciou-se a amostragem de 1,0 mL de solução a cada 0,5 h por 7 h. Posteriormente as amostras tiveram as concentrações remanescentes de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> determinadas por espectrofotometria de absorção molecular, pelo método da redução do nitrato pelo vanádio III. Com os dados de concentração de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no tempo, massa de matéria fresca de raízes finas e volumes iniciais e finais de solução, estimou-se por meio método da aproximação gráfico-matemática os

valores de  $K_m$  (Constante de Michaelis–Menten, em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ),  $v_{\text{max}}$  (velocidade máxima de absorção, em  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) e  $C_{\text{min}}$  (concentração mínima para absorção, em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). A cada avaliação coletaram-se também dados de trocas gasosas [taxa fotossintética, taxa transpiratória (E), condutância estomática ( $g_s$ ),  $\text{CO}_2$  subestomático ( $C_i$ )] e fluorescência da clorofila *a* (fluorescência inicial ( $F_0$ ), eficiência quântica potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), razão entre fluorescência variável e fluorescência inicial ( $F_v/F_0$ ) e coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência (qP). Calculou-se a eficiência no uso da água (EUA) pela razão  $A/E$ . Os valores médios de  $K_m$ ,  $v_{\text{max}}$ ,  $C_{\text{min}}$  para nitrato em cafeeiros adultos foram, respectivamente,  $152,03 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $0,66 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$  e  $41,67 \mu\text{mol L}^{-1}$  sob disponibilidade hídrica suficiente e  $120,49 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $0,33 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$  e  $67,13 \mu\text{mol L}^{-1}$  em plantas submetidas a déficit hídrico. O estresse hídrico reduziu significativamente os valores  $v_{\text{max}}$ , aumentou os valores  $C_{\text{min}}$  e não afetou significativamente os valores  $K_m$ . Os valores de  $K_m$  foram maiores na PER e intermediários nas fases PF e F-Ch e menores em EG. Já  $v_{\text{max}}$  foi significativa menor em EG quando comparada as outras fases. Os valores de  $C_{\text{min}}$  foram menores em EG. O estresse hídrico afetou a fase bioquímica da fotossíntese, reduzindo os valores de A, E,  $g_s$ . Os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* não foram afetados de maneira significativa pelo déficit hídrico imposto.

## ABSTRACT

PINTO, Weibert Saturnino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Kinetics of nitrate uptake and photosynthesis parameters in fully grown coffee trees under drought stress.** Advisor: Herminia Emilia Prieto Martinez. Co-advisor: Ricardo Henrique Silva Santos.

In spite of being the most required mineral nutrient by coffee trees, the use nutrient efficiency (NUE) of nitrogen is considerably low, below 50% of total applied N. In addition to matters related to soil management, such as water availability, and related specifically to the plant, such as phenology and genetic factors, others related to uptake and metabolism contribute for this low efficiency. The determination of kinetic parameters of nitrogen uptake, coupled with gas exchange information and chlorophyll a fluorescence can provide a better understanding of the combined effect of these factors on the dynamics of N acquisition. Therefore, the aim of this study was to determine the influence of drought stress and the phenological stage on the absorption and nitrogen metabolism in adult coffee trees (*Coffea arabica* L.) cv. Catuaí Vermelho IAC 99. The experiment was conducted in a greenhouse with five years old mature plants grown in hydroponic nutrient solution. The experimental design was the split plot. The whole plots were two, water deficit (EH+) and control treatments, with three replicates studied along the phenological phases of pre-flowering (PF), flowering/pin head fruit (F-PH), fruit first quick expansion (FQE) and fruit filling (FF), the subplots. Drought stress was induced by the addition of polyethylene glycol 6.000 g mol<sup>-1</sup> to the nutrient solution. After pre-experimental conditioning period with nutritional shortage, we proceeded to a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrate) exhaustion essay. The pre-experimental solution was replaced by a KNO<sub>3</sub> solution containing only KNO<sub>3</sub> 500 μmol L<sup>-1</sup> (control) or KNO<sub>3</sub> 500 μmol L<sup>-1</sup> + PEG 290,0 g L<sup>-1</sup> (EH+), and then system circulation was started. After a period for system stabilization (2 h), we started sampling 1.0 mL from each line every 0.5 h for 7 h straight. Subsequently, the samples had the remaining concentrations of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> determined by molecular absorption spectrophotometry employing the method proposed by Doane and Horwath (2003). Based on NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration data over time, fresh weight of fine roots, and initial and final solution volumes, the numerical values of the kinetics parameters K<sub>m</sub> (Michaelis-Menten Constant, μmol L<sup>-1</sup>), V<sub>max</sub>

(maximum absorption rate,  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) and  $C_{\text{min}}$  (minimal concentration for uptake,  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) were estimated by the graphic-mathematical method. Data of gas exchange [photosynthetic rate, transpiration rate (E), stomatal conductance ( $g_s$ ), substomatic  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ )] and chlorophyll fluorescence (initial fluorescence ( $F_0$ ), potential quantum efficiency of photosystem II ( $F_v/F_m$ ), the ratio of variable fluorescence and initial fluorescence ( $F_v/F_0$ ) and photochemical quenching of fluorescence (qP). We calculated the water use efficiency (WUE) by the ratio  $A/E$ . The average values found for  $K_m$ ,  $v_{\text{max}}$ ,  $C_{\text{min}}$  in nitrate uptake were, respectively,  $152.03 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $0.66 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$  and  $41.67 \mu\text{mol L}^{-1}$  under sufficient water availability and  $120.49 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $0.33 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$  and  $67.13 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$  in plants under drought stress. Drought stress significantly reduced  $v_{\text{max}}$  values, increased  $C_{\text{min}}$  values and did not affected significantly  $K_m$  values. On the other hand,  $v_{\text{max}}$  values were significantly lower during FF when compared to the other phases. The  $C_{\text{min}}$  values were lower during FF. Drought stress also affected the biochemical phase of photosynthesis, reducing the values of A, E and  $g_s$ . The chlorophyll fluorescence parameters were not significantly affected by the drought stress.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
2.1	Demanda e funções do nitrogênio nas plantas .....	3
2.2	Fenologia do cafeeiro e absorção de nitrogênio .....	4
2.3	Absorção e metabolismo de nitrogênio.....	5
2.4	Absorção, metabolismo de N e estresse hídrico .....	7
2.5	Cinética de absorção.....	8
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
3.1	Condições experimentais .....	11
3.2	Esquema experimental.....	12
3.3	Condicionamento pré-experimental .....	13
3.4	Ensaio de exaustão de nitrato .....	14
3.5	Determinação da massa de raízes finas.....	15
3.6	Determinação de volume transpirado por linha.....	16
3.7	Determinação da concentração de nitrato na solução de exaustão .....	16
3.8	Cálculo dos parâmetros cinéticos de absorção de nitrato .....	17
3.9	Determinação de tensão hídrica foliar .....	18
3.10	Análise de trocas gasosas e da fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	18
3.11	Análise estatística.....	19
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>20</b>
4.1	Potencial hídrico foliar ( $\Psi_{wf}$ ).....	20
4.2	Influência do estresse hídrico nos valores de $K_m$ , $C_{min}$ e $v_{max}$ .....	20
4.3	Parâmetros cinéticos de absorção de nitrato e fase do ciclo fenológico .....	22
4.4	Trocas gasosas .....	27
4.5	Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	30
4.6	Metabolismo do carbono e absorção de nitrato .....	34
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>36</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma das atividades agrícolas de maior importância no Brasil. Em 2015 a produção estimada foi de 42.148,3 mil sacas beneficiadas de café e a área total utilizada para a produção de 1.930,1 mil hectares (CONAB, 2015). O Brasil ainda figura como o maior produtor e exportador, abastecendo o mercado mundial com 3.371.000 de sacas, cerca 37% das exportações mundiais em 2015, de acordo com ICO (2015).

Concomitante a esta elevada demanda de produção, o cafeeiro arábica (*Coffea arabica* L.) é uma cultura com requerimentos elevados de nitrogênio, sendo a faixa crítica de teor foliar situada entre 2,90 e 3,20 dag kg<sup>-1</sup> de matéria seca, de acordo com Martinez et al. (1999). As quantidades absorvidas e exportadas deste nutriente são também consideravelmente elevadas. Segundo Martinez e Neves (2015) uma lavoura cafeeira com uma população média de 5.000 plantas extrai, em um período de duas safras, 55 meses, quantidades da ordem de 490 kg ha<sup>-1</sup> de N. Deste total, 25% é exportado pelos frutos e considerando-se um espaçamento de 2 x 1 m, chega-se a valores em torno de 125 kg ha<sup>-1</sup> de N removidos pela colheita.

Embora os valores exportados não aparentem ser tão altos, cabe salientar que a eficiência no uso do nitrogênio aplicado é bastante baixa. Raun e Johnson (1999) estimam que apenas de 30 a 40% do nitrogênio aplicado sob a forma de fertilizantes às culturas agrícolas, em geral, é efetivamente utilizado pela planta para a produção de produtos úteis como grãos, por exemplo. Existe, portanto, uma grande parcela do N aplicado que é perdida (60 a 70%), através da lixiviação do nitrato, desnitrificação no solo e incorporação de N pela microbiota, processos erosivos e perdas por volatilização. Estes processos são causadores de perdas econômicas e efeitos danosos ao ambiente (LEA e AZEVEDO, 2006; VITOUSEK et al., 1997).

Em teoria, recomendações de adubação nitrogenada mais ajustadas às condições da planta e ao meio poderiam reduzir as perdas de nitrogênio. No entanto, diferentemente dos demais macronutrientes, em geral, as recomendações para N não se baseiam em análise química dos teores das formas disponíveis deste elemento no solo. Essa peculiaridade se deve, em grande parte, à intensa atividade biogeoquímica que este elemento apresenta

na biosfera, o que torna inviável a predição da efetiva disponibilidade do N para as plantas.

No entanto, estimativas de demanda de N podem ser feitas a partir de aproximações com base nos teores foliares, quantidades exportadas do nutriente pelos frutos, produtividade e eficiência na aplicação do fertilizante. Este último fator citado envolve sobretudo aspectos relacionados ao sistema de cultivo, ao solo e à capacidade da planta em absorver e empregar ou armazenar reservas deste nutriente.

Para otimizar a eficiência de aquisição e uso de nitrogênio é essencial que ele seja fornecido em concentrações ótimas em sincronia com a máxima capacidade das raízes de absorvê-lo, o que, em tese, permitiria alcançar a produção máxima por unidade de N aplicado (LAWLOR et al., 2001).

Fatores de estresse abiótico como os estresses hídrico e nutricional podem influenciar a absorção e assimilação de nitrogênio, devido a estreita interação entre o processo fotossintético e o de absorção e assimilação de N (NUNES et al., 1993; NUNES-NESI et al., 2010)

Além disso, aspectos ligados a fenologia das plantas também alteram a dinâmica de aquisição de nutrientes no cafeeiro, como demonstrado em diversos trabalhos (CARVAJAL et al., 1969; NETO et al., 2014; CARELLI, 1987; CARELLI e FAHL, 2006).

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi determinar a influência do estresse hídrico e de etapa do ciclo fenológico na absorção e metabolismo de nitrogênio em cafeeiros (*Coffea arabica* L.) adultos. Os específicos foram determinar os parâmetros cinéticos de absorção de nitrato, quantificar a influência do estresse hídrico na absorção deste ânion e, por fim, avaliar a influência de etapa do ciclo fenológico na absorção e metabolismo do nitrato em cafeeiros adultos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Demanda e funções do nitrogênio nas plantas

Depois do carbono, oxigênio e hidrogênio, o nitrogênio (N) é o elemento mais requerido pelas plantas, cujos teores variam de 1,0 dag kg<sup>-1</sup> a 5,0 dag kg<sup>-1</sup> na massa de matéria seca (MS), sendo componente integral de proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, hormônios vegetais e metabólitos secundários (TAIZ e ZEIGER, 2010; HAWKESFORD et al., 2012). Uma vez que o carbono (C) requerido pelas plantas é obtido do CO<sub>2</sub>, obtido via processo fotossintético, o hidrogênio (H) via fotólise da água e o oxigênio (O) também via fotossíntese e quebra da molécula de água com energia provinda da radiação luminosa, o N é o elemento mineral mais exigido pelas plantas superiores.

De acordo com Nelson et al. (2008), as proteínas estão entre os compostos macromoleculares mais abundantes nas formas de vida, possuindo uma enorme gama de funções biológicas como, por exemplo, estruturais, catalíticas e de replicação, regulação e expressão gênica. Este grupo amplo de substâncias é constituído pelo arranjo de um grupo consideravelmente pequeno de cerca de 20 unidades monoméricas, relativamente simples, denominadas aminoácidos que, por sua vez, possuem uma estrutura típica em que uma cadeia carbônica com uma terminação carboxila (-COOH), denominado grupo R, liga-se a um radical amino (-NH<sub>3</sub>).

As enzimas são, de uma forma geral, proteínas com atividade catalítica nas mais diversas reações bioquímicas. Nas plantas superiores uma enzima que merece destaque é a ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase/oxigenase (rubisco). Segundo Taiz e Zeiger (2010), o conteúdo desta enzima pode chegar até a compor até 400 mg g<sup>-1</sup> do conteúdo de proteínas solúveis nas folhas. A rubisco é responsável pela etapa de carboxilação no Ciclo de Calvin, o qual termina por fixar o carbono proveniente de CO<sub>2</sub> em um esqueleto carbônico a cada ciclo culmina com a formação de carboidratos.

No processo fotossintético como um todo, além das reações do carbono, o nitrogênio tem papel fundamental nas reações envolvendo a luz, sendo importante componente das clorofilas, os principais pigmentos fotossinteticamente ativos nas membranas tilacoides. Estes pigmentos são compostos por anéis pirrólicos, os quais possuem uma substituição de um átomo

de C por um de N formando um heterociclo que permite a coordenação de quatro destes anéis com o átomo de  $Mg^{+2}$  no centro da molécula.

Esta configuração molecular permite que a clorofila, juntamente com proteínas de ligação específica que formam os complexos coletores de luz (LHC's), absorva energia da radiação luminosa do espectro visível que será posteriormente armazenada em compostos intermediários e finalmente em carboidratos (NELSON et al. 2008).

## **2.2 Fenologia do cafeeiro e absorção de nitrogênio**

O ciclo fenológico dos cafeeiros da espécie *Coffea arabica* L. apresenta uma sucessão de fases vegetativas e reprodutivas que ocorrem em aproximadamente dois anos, diferentemente da maioria das plantas que emitem as inflorescências na primavera e frutificam no mesmo ano fenológico (CAMARGO, 1985). Após várias propostas de metodologias para a determinação das etapas do ciclo fenológico do cafeeiro, Camargo e Camargo (2001) propuseram a segmentação do ciclo em seis grandes fases: vegetação e formação das gemas florais, indução e maturação das gemas florais, florada, granação dos frutos, maturação dos frutos e repouso e senescência dos ramos terciários e quaternários. As etapas florada, granação dos frutos, maturação, podem ser desdobradas em cinco subfases: chumbinho, expansão rápida, crescimento suspenso, granação e maturação.

Os processos de absorção, assimilação e transporte do nitrogênio são diferenciados a cada fase do ciclo fenológico do cafeeiro. Neto et al. (2014), estudando cafeeiros produtivos no oeste baiano e em Piracicaba (SP), encontraram que a absorção de nitrato é mais intensa antes da floração e durante o início da maturação dos frutos. Já a atividade da enzima nitrato redutase é mais intensa na fase vegetativa. Carelli (1987), estudando plantas em solução nutritiva, concluiu que a maior atividade desta enzima foi logo antes da floração e na fase final da expansão dos frutos.

Carvajal (1969), também estudando plantas de café em solução nutritiva, determinou maiores taxas de absorção de nitrato antes da antese e no início da maturação dos frutos, decrescendo após o florescimento.

### 2.3 Absorção e metabolismo de nitrogênio

No solo o nitrogênio encontra-se presente como uma complexa mistura de formas orgânicas e inorgânicas, de distribuição extremamente heterogênea e, variável ao longo das estações e das horas do dia (MILLER e CRAMER, 2004). Desta variedade de formas, as plantas são capazes de absorver tanto formas inorgânicas, como o nitrato e o amônio, quanto formas orgânicas como, como ureia e aminoácidos (MARSCHNER, 2012). A absorção de  $\text{NO}_3^-$  (nitrato) e  $\text{NH}_4^+$  (amônio) predomina em solos agricultados (HAWKESFORD et al., 2012).

Devido à maior concentração de nitrato (1 a 5  $\text{mmol L}^{-1}$ ) que de amônio (20 a 200  $\mu\text{mmol L}^{-1}$ ) em solos agricultados, (OWEN e JONES, 2001), e à maior mobilidade desse ânion (MILLER e CRAMER, 2004) esta forma é mais disponível para a absorção radicular e, portanto, de maior relevância para os estudos de absorção.

A absorção radicular de nitrato é mediada por proteínas carreadoras localizadas na membrana plasmática das células epidérmicas e do córtex radicular. Uma série de mecanismos fisiológicos de transporte intermediam a absorção de nitrato ou amônio, com diferentes afinidades. Os 'sistemas de transporte de alta afinidade', ditos HATS, operam em baixas concentrações ( $<0,5 \text{mmol L}^{-1}$ ) de nitrato ou amônio externo. Sob altas concentrações,  $> 0,5 \text{mmol L}^{-1}$ , a absorção é realizada, principalmente, por meio dos sistemas transportadores de baixa afinidade (LATS), permitindo maiores influxos de substrato (HAWKESFORD et al., 2012).

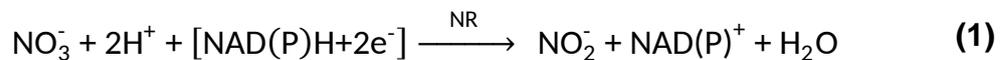
Segundo Crawford e Glass (1998) os HATS e os LATS são codificados respectivamente, pelas famílias de genes NRT2 e NRT1, tendo ambos expressão induzida em resposta aos níveis de nitrato no meio e por sinalizações internas na planta, como metabólitos nitrogenados e a demanda da parte aérea por N. Há evidências que os transportadores NRT2 codificam especificamente para carreadores de alta afinidade (iHATS), induzidos pela presença de nitrato, enquanto os transportadores NRT1 contribuem mais amplamente para a absorção de nitrogênio e apresentam tanto expressão induzida como constitutiva (iLATS e cLATS).

Por se tratar de um ânion, o transporte de nitrato do meio exterior para o interior das células epidérmicas e do córtex da raiz ocorre contra um gradiente

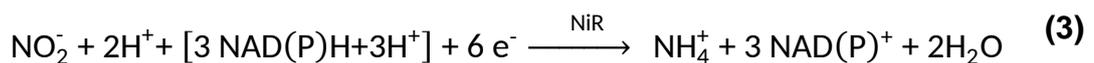
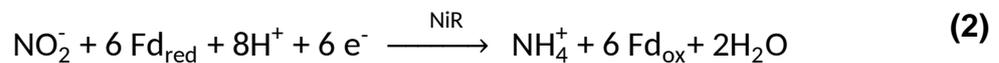
eletroquímico. A entrada do nitrato no citoplasma é então possível por meio de um sistema de simporte, onde dois prótons são bombeados para o exterior da célula através de uma ATP-ase transmembrana, os quais posteriormente ao retornarem passivamente ao interior da célula permitem a entrada de um íon nitrato.

De acordo com Martinoia e Heck (1981), o nitrato absorvido pode se acumular em elevadas quantidades no vacúolo, e serve tanto como reserva como também permite seu fluxo constante de absorção do meio exterior, por assim se evitar a inibição dos transportadores e da enzima nitrato-redutase pelo acúmulo do íon no citoplasma. DeAngeli et al. (2006) descrevem uma terceira família de genes com função no transporte de nitrato, denominada canais de cloreto (CLC). O gene descrito (CLCa) codifica para uma proteína simporter nitrato/próton capaz de carrear nitrato do citosol para o interior vacuolar.

Outro destino possível para o nitrato recém-absorvido pelas raízes ou remobilizado do vacúolo é ser reduzido pela enzima nitrato redutase (NR) a nitrito (Equação 1). Alternativamente, a redução do nitrato a nitrito pode ocorrer tanto nas folhas, como nas raízes.



O nitrito por sua vez pode ser reduzido, no cloroplasto, a amônio por ação da enzima nitrito-redutase (NiR) utilizando a ferredoxina reduzida ( $\text{Fd}_{\text{red}}$ ) como fonte de potencial redutor, quando em tecido fotossintetizante, e.g. folha (Equação 2), ou quando em outro tipo de plastídio em tecido não fotossintetizante, e.g. raiz, utilizando como potencial redutor NADH ou NAD(P)H (Equação 3).



O amônio é, então, incorporado em aminoácidos pelas enzimas sintase da glutamina (GS) e a sintase do glutamato (GOGAT), formando glutamina (GLN), glutamato (GLU) e outros aminoácidos e seus metabólitos

(BREDEMEIER e MUNDSTOCK, 2000; CRAWFORD , 1995; MILLER e CRAMER, 2004).

A partição do processo de redução do nitrato entre raiz e parte aérea é variável com a espécie, mas não é constante, e pode variar de acordo com aspectos ambientais e fisiológicos (ANDREWS, 1986). Carelli e Fahl (2006), estudando a partição da atividade de redução do nitrato em cafeeiros, concluíram que a relação entre a atividade da NR na raiz e na folha depende do regime de irradiância, sendo que quando maior a radiação fotossinteticamente ativa (PAR), maior era a redução de nitrato nas folhas em relação às raízes e quando menor a PAR a atividade da NR se concentrava majoritariamente nas raízes.

#### **2.4 Absorção, metabolismo de N e estresse hídrico**

A deficiência hídrica está entre os fatores de estresse abiótico mais importantes afetando o desenvolvimento e produtividade de plantas (MENG et al., 2016), o que tem sido agravado pelas mudanças climáticas globais e consequentes alterações nos padrões de precipitação (GUO et al., 2010).

Uma vez que o metabolismo de N e do C são intimamente relacionados (CHAMPIGNY, 1995; STITT, 1999; MILLER e CRAMER, 2004) é esperado que fatores que afetem a atividade fotossintética, tais como a restrição hídrica, também afetem o metabolismo do N.

MENG et al. (2016), estudando os efeitos do estresse hídrico induzido por polietilenoglicol na absorção e metabolismo de N em plantas da espécie arbórea *Populus simonii* C., verificaram que as plantas mantiveram a alta capacidade de absorção para sustentar um crescimento normal, no entanto, o crescimento foi limitado devido a inibição dos genes envolvidos no metabolismo de N.

O trabalho ainda apontou que a atividade da NR, tanto em raízes como folhas, foi reduzida sob estresse hídrico e que, ainda, a relação nitrato/amônio na planta diminuiu devido à redução na absorção de nitrato e na indução de genes *AMT1;2* e *AMT1;6*, que codificam para transportadores de amônio. Portanto, sob estresse hídrico, na espécie estudada, mecanismos de absorção de amônio tendem a ser preferidos, devido possivelmente a menor demanda energética para a incorporação do amônio (mais reduzido) em relação ao nitrato (mais oxidado).

Em amendoeiras, Martinez et al. (2015) verificaram que a absorção de nitrato e a atividade da NR são afetadas por curtos períodos de estresse hídrico, quando os potenciais hídricos ( $\Psi_w$ ) alcançam valores inferiores a -0,18 MPa.

Em cafeeiros arábica jovens, Souza (2015) observou que o estresse hídrico provocou aumentos na especificidade dos carreados para nitrato, com  $K_m$  (s) médios de 236,28  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em plantas sem estresse e de 104,27  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em plantas com estresse hídrico e, mas também, aumentou a concentração mínima ( $C_{min}$ ) para absorção deste íon, sendo os valores deste parâmetro 41,09 e 30,18  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, em plantas submetidas e não submetidas a estresse hídrico.

## 2.5 Cinética de absorção

Michaelis e Menten (1913) propuseram um modelo simples para descrever a taxa de atividade enzimática (Equação 4), sendo até hoje um dos melhores modelos conhecidos em cinética enzimática, de acordo com Li et al. (2013).

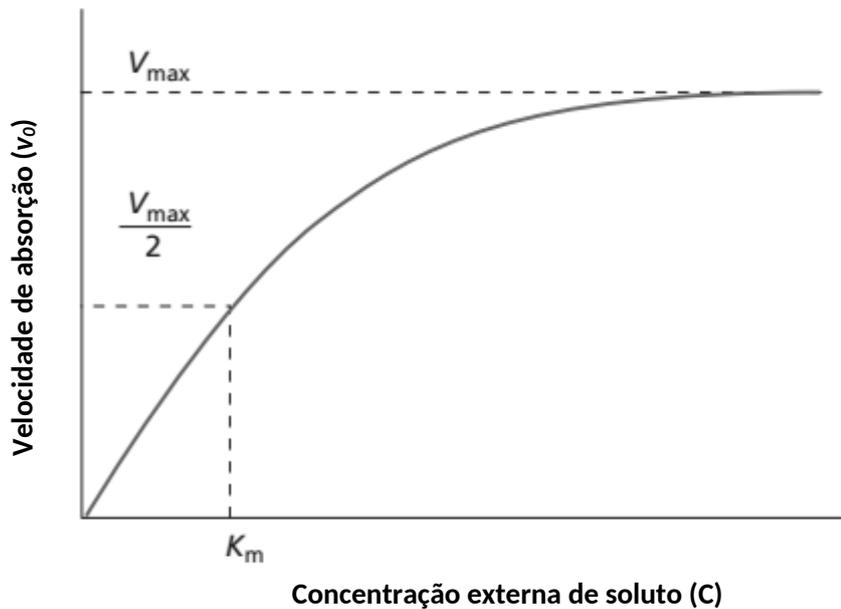
$$v_0 = v_{max} \frac{C}{K_m + C} \quad (4)$$

Onde  $v_0$  representa a velocidade instantânea da reação;  $v_{max}$  a velocidade máxima de reação, ou seja, a concentração<sup>1</sup> do substrato na qual a reação atinge a taxa máxima e ocorre a saturação enzimática;  $C$  a concentração<sup>1</sup> do substrato;  $K_m$  é a concentração de substrato na qual se atinge  $\frac{1}{2} v_{max}$  (LI et al., 2013).

A absorção de íons pelas plantas é dependente das concentrações destes no meio. Esta relação não é linear, mas segue um modelo que descreve uma curva assintótica (Figura 1). A curva é muito semelhante à que se obtém quando a velocidade de uma reação enzimática é colocada em função da concentração do substrato (FAQUIN, 2005). Esta semelhança foi primeiro evidenciada por Epstein e Hagen (1952).

---

<sup>1</sup> Embora consagrado na literatura, o termo “concentração” não se adequa em conceitos químicos ao que refere neste caso, sendo o termo “atividade” o mais adequado. No entanto, devido à grande proximidade entre os valores de “concentração” e “atividade” nos meios estudados, e evitando-se maiores conflitos entre os termos empregados no presente nos demais trabalhos, foi mantido o uso do termo “concentração” em equivalência à “atividade”.



**FIGURA 1.** Modelo de Michaelis-Menten adaptado para o transporte transmembrana de um soluto.

Adaptado de Taiz e Zeiger (2010)

Como as raízes das plantas não esgotam completamente o nutriente da solução, mas reduzem-no a uma “concentração mínima” onde o influxo = efluxo ( $v = 0$ ), daí a introdução de um novo parâmetro, também característica da própria planta, na equação de Michaelis-Menten, a “concentração mínima” ( $C_{min} = [M]_{min}$ ) (FAQUIN, 2005). Portanto a equação de Michaelis-Menten adaptada para a absorção de nitrato por exemplo, ficaria na forma mostrada na Equação 5.

$$v_0 = \frac{v_{max} ([NO_3^{-1}] - C_{min})}{K_m + ([NO_3^{-1}] - C_{min})} \quad (5)$$

Com base a depleção do íon em uma solução de volume e concentração conhecidos, Claassen e Baber (1974) elaboraram uma técnica em que a concentração de cada amostra é multiplicada pelo volume de solução no momento da retirada da amostra, obtendo-se uma função quantidade ( $q$ ) x tempo ( $t$ ). Os parâmetros cinéticos  $v_{max}$  e  $K_m$  são então calculados a partir derivada

dessa função,  $\delta q/\delta t$ . O  $C_{min}$  é dado pela estimativa da concentração no último ponto da curva  $q \times t$ .

Para simplificação dos cálculos dos parâmetros cinéticos, por Ruiz (1985) propôs o modelo gráfico-matemático, que divide a função  $q \times t$  em um segmento linear e um segmento assintótico.

Do ponto de vista prático espera-se, portanto, que menores valores de  $K_m$  e  $C_{min}$  e valores mais elevados de  $v_{max}$  sejam atributos de interesse, por, em tese, possibilitar maior disponibilidade do nutriente ao processo assimilatório e pela potencial redução de perdas no solo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

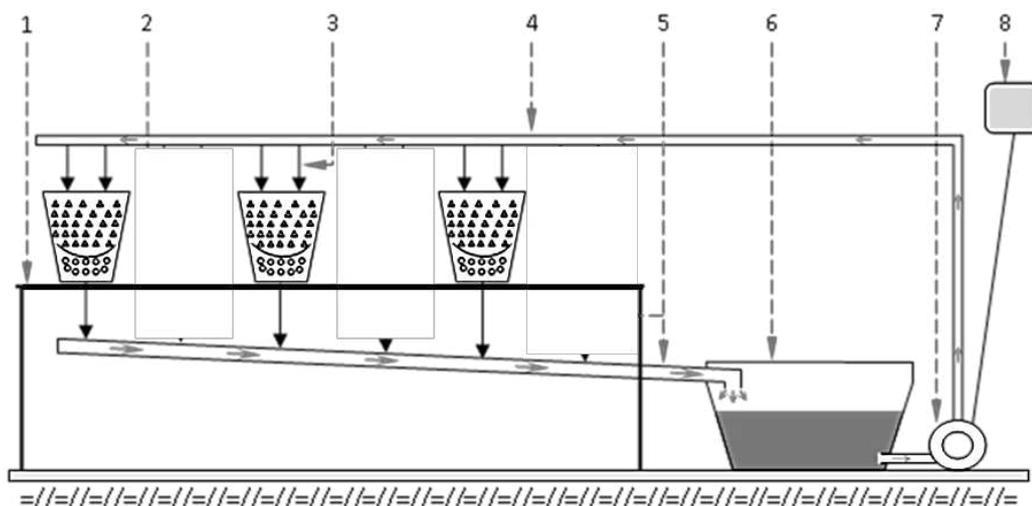
#### 3.1 Condições experimentais

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa com cafeeiros (*Coffea arabica* L.) cv. Catuaí Vermelho IAC 99. As plantas tinham a mesma idade aproximada de cinco anos e foram cultivadas em sistema hidropônico circulante de três fases, onde a fase sólida era composta por areia e argila expandida.

Este sistema consiste em um reservatório para a solução nutritiva de onde uma bomba de indução é acionada periodicamente através de um temporizador. A solução, então bombeada, irriga três vasos em linha, cada um contendo uma planta, como ilustrado na Figura 2. A solução nutritiva após permear a fase sólida é drenada novamente para o reservatório. A solução nutritiva utilizada para cultivo dos cafeeiros foi adaptada de Clemente et al. (2013) e tinha as seguintes concentrações de nutrientes: 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de N, 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de P, 4,0 mmol L<sup>-1</sup> de K, 2,3 mmol L<sup>-1</sup> Ca, 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de Mg, 1,8 mmol L<sup>-1</sup> de S, 23,0 µmol L<sup>-1</sup> de B, 1,0 µmol L<sup>-1</sup> de Cu, 12 µmol L<sup>-1</sup> de Mn, 0,5 µmol L<sup>-1</sup> de Zn, 60,0 µmol L<sup>-1</sup> de Fe e 0,5 µmol L<sup>-1</sup> de Mo.

Os vasos utilizados para o crescimento das plantas tinham capacidade de 30 L e continham, cada um, uma única planta. Do volume total, 1/3 (inferior) encontrava-se preenchido com argila expandida, e o restante com areia lavada em meio ácido. O topo do vaso continha um pequeno espaço com cerca de 5 cm, com a finalidade de se evitar o transbordamento de solução. Cada linha era composta por três plantas ligadas a um mesmo reservatório contendo um volume de 20 litros de solução nutritiva (Figura 2).

Para a reposição dos nutrientes absorvidos da solução utilizou-se como referência a condutividade elétrica, sendo a reposição feita de acordo com a depleção dos cátions e ânions em solução, sempre que a condutividade elétrica indicava depleção ≥ que 30%. O pH foi mantido na faixa ótima contida entre 4,50 e 5,50, sendo o ajuste feito pela adição solução de HCl 2,0 mol L<sup>-1</sup> ou NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup>.



**FIGURA 2.** Esquema do Sistema Hidropônico Trifásico Fechado.

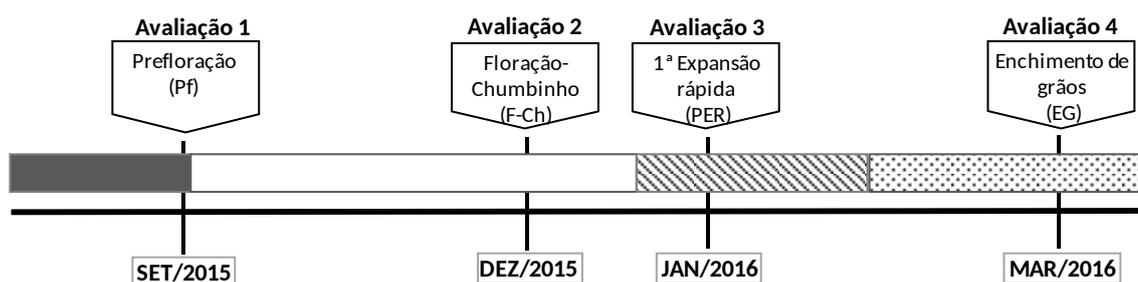
(Adaptado de Silva Filho, 2011)

1-Bancada de Sustentação; 2-Tubulação de alimentação 3-Tubulação de distribuição; 4 e 5- Tubulação de retorno (dreno); 6-Reservatório de solução nutritiva; 7- Motobomba; 8-Temporizador

### 3.2 Esquema experimental

A exaustão do nitrato de uma solução com concentração e volumes conhecidos e os parâmetros fotossintéticos foram avaliados três vezes ao longo do ciclo de desenvolvimento dos frutos empregando-se esquema experimental de parcelas subdivididas no tempo (Figura 4). Os tratamentos principais (parcelas) foram estresse hídrico (EH+) e sem estresse hídrico (controle), e as subparcelas as fases do ciclo fenológico: prefloração (PF), florescimento-chumbinho (F-Ch) e primeira expansão rápida (PER) enchimento de grãos (EG). Assim tem-se duas parcelas, quatro subparcelas com três repetições. Cada repetição foi composta por uma linha de circulação a qual possuía três vasos com uma planta cada um (Figura 2). Em cada avaliação utilizaram-se seis linhas (18 plantas), sendo que a três linhas adicionou-se PEG no reservatório de solução nutritiva, para indução de estresse hídrico, e três linhas permaneceram sem estresse hídrico. Admitiu-se que PEG adicionado ao reservatório teve solubilização perfeita e que todos os três vasos da linha receberam volumes iguais de solução nutritiva a cada circulação.

Foram empregados 20 L de solução de nitrato de potássio com 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3^-$  como solução de exaustão para cada repetição (três plantas). Com o decorrer do experimento esse volume se reduziu devido à evapotranspiração. O volume médio de água consumido pelas plantas de cada repetição ao longo do dia foi determinado pela diferença de peso do conjunto reservatório/solução/vasos com plantas ao início e ao final do período.



**Figura 4.** Cronologia das fases fenológicas observadas durante as quatro avaliações experimentais.

### 3.3 Condicionamento pré-experimental

As plantas foram condicionadas por quatro dias antes do dia do experimento de exaustão. Nessa etapa prévia, com o intuito de aumentar a capacidade de absorção de nitrato, as plantas foram submetidas a estresse nutricional, havendo a troca da solução nutritiva completa por uma contendo 2% da concentração de N usada para o crescimento e manutenção das plantas e 10% dos demais nutrientes.

Também nesta fase iniciou-se a adição gradual de polímero polietilenoglicol (PEG) com massa molecular 6.000  $\text{g mol}^{-1}$  U.S.P (PEG) à solução nutritiva, com a finalidade de submeter as plantas, gradualmente, até que se alcançasse -1,0 MPa de potencial hídrico foliar. Para este resultado, foram adicionados 290,0 g desta substância por litro de solução nutritiva, de acordo com Vilella et al. (1991).

Portanto, três das seis linhas instaladas para a avaliação receberam 1,450 kg de PEG por dia, durante quatro dias, parcelados em duas vezes (0,725 kg de manhã e 0,725 kg à tarde). Portanto, de maneira indireta, cada vaso

recebeu 1/3 da dose necessária, aproximadamente 483 g por dia, de maneira cumulativa, até a quantidade de PEG alcançar 5,8 kg em 20 L de solução (290,00 g L<sup>-1</sup>).

### **3.4 Ensaio de exaustão de nitrato**

Para obter os parâmetros cinéticos de absorção de nitrato pelo cafeeiro realizaram-se quatro ensaios de exaustão, um em cada fase fenológica relacionada em 3.2. As avaliações foram iniciadas aproximadamente quatro horas após o nascer do sol. No dia da avaliação substituiu-se a solução nutritiva contida nos reservatórios de todas as linhas por uma solução contendo apenas 500,0 µmol L<sup>-1</sup> de nitrato, preparada adicionando-se 1,011 g de nitrato de potássio a 20,0 L de água deionizada.

Às três linhas às quais o tratamento primário era EH+ adicionou-se também 5,8 kg de PEG ao recipiente reservatório e homogeneizou-se a mistura. Os vasos contendo as plantas e os reservatórios de solução tiveram a massa aferida por meio de balança eletrônica. Colocou-se então o sistema em funcionamento e aguardou-se duas horas para que o processo de absorção atingisse o estado estável, estimado como alcançado após cerca de 2 h da primeira circulação da solução nutritiva. Após este período, a cada 0,5 h, fez-se a coleta de 1,0 mL de solução nutritiva do reservatório de cada linha, durante cerca de 7,0 h, sendo o volume coletado repostado igualmente com água deionizada.

As amostras de solução coletadas foram armazenadas em tubos tipo *Falcon*, identificadas de acordo com a linha e tempo de coleta, e acondicionadas sob refrigeração em caixa térmica contendo gelo, para posterior determinação da concentração de nitrato. Ao final do período de exaustão cada conjunto reservatório-solução-vaso com plantas foi novamente pesado.

### 3.5 Determinação da massa de raízes finas

Para separação e determinação da massa de raízes finas ( $\varnothing \leq 2,00$  mm) fez-se a desmontagem dos recipientes contendo as plantas (Figura 5).



(a)



(b)



(c)



(d)

**FIGURA 5.** Detalhe de um maciço de raízes, areia e argila expandida retirado de um recipiente (a); maciço de raízes partido ao meio (b); separação da areia e argila expandida das raízes (c); massa de raízes finas e grossas separadas da areia e argila expandida (d).

As raízes de todos os diâmetros foram separadas e armazenadas em solução isotônica. Em um segundo momento retirou-se uma subamostra de cerca de 20% da massa de matéria fresca de raízes de uma das plantas que compunham cada repetição, e separou-se manualmente as raízes finas, utilizando-se o critério visual, calculando-se em seguida o percentual de raízes finas nessa amostra. Com a massa de matéria fresca total de raízes de cada recipiente e o percentual de raízes finas calculado, estimou-se a massa de raízes

finas de cada vaso. A soma da massa de raízes finas das três plantas de cada linha resultou na estimativa da massa total de raízes finas da linha (repetição).

### **3.6 Determinação de volume transpirado por linha**

O volume de água transpirado pelas plantas durante a avaliação foi determinado por diferença entre a massa, aferida antes do início da coleta de amostras e após sua finalização. Após o preparo das soluções de exaustão, por volta das 9:00 h fez-se a aferição da massa do reservatório contendo a solução nutritiva e dos recipientes contendo as plantas. Após o encerramento do ensaio de exaustão a cada avaliação, por volta das 17:00 h, fez-se a aferição das massas dos mesmos recipientes.

A diferença entre a massa total do conjunto antes e depois do ensaio de exaustão de nitrato representa o volume transpirado, considerando-se a densidade da água constante em ambas leituras e equivalente a  $1,0 \text{ kg dm}^{-3}$ .

### **3.7 Determinação da concentração de nitrato na solução de exaustão**

As concentrações de nitrato em solução foram determinadas pelo método colorimétrico descrito por Doane e Horwath (2003), que detecta e quantifica nitrato, pela adição de um único reagente à amostra. O reagente é preparado pela adição, em meio ácido, de cloreto de vanádio ( $\text{VCl}_3$ ), sulfanilamida e N-(1-naftil)-etilamina. Quando adicionado à amostra o V (III), proveniente da dissociação do  $\text{VCl}_3$ , quantitativamente reduz o nitrato presente na amostra a nitrito e óxido nitroso, que capturados pelo reagente de Griess, promovem a formação de uma coloração avermelhada/rósea. Após período de reação de aproximadamente 8,0 h e transferência das amostras para placas de microtitulação com 96 poços, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro de absorção molecular Biochrom EZ 400 READ, no comprimento de onda de 540 nm. Para garantir a inclusão do efeito de matriz nos resultados, foram preparadas curvas com e sem polietilenoglicol, uma vez que esta substância poderia interferir na formação do complexo que determina a coloração mensurada pelo aparelho.

### 3.8 Cálculo dos parâmetros cinéticos de absorção de nitrato

O volume instantâneo ( $V_{inst}$ ) de solução foi obtido somando-se o volume final e adicionando-se a variação entre o volume inicial ( $V_i$ ) e o volume final ( $V_f$ ) pelo tempo de avaliação ( $t_a$ ), em função do instante da coleta da amostra ( $\Delta t_{inst}$ ) como demonstrado na Equação 6.

$$V_{inst} = V_f + \frac{V_i - V_f}{t_a} \Delta t_{inst} \quad (6)$$

De posse dos dados concentração de nitrato nas amostras das soluções de exaustão, volume de água transpirado ao longo do período de exaustão pelas três plantas que compunham cada repetição (linha) e peso de matéria fresca de raízes finas das dessas mesmas plantas, calcularam-se os parâmetros cinéticos  $V_{max}$ , e  $K_m$  e  $C_{min}$  referentes à absorção de nitrato. Utilizou-se a técnica proposta por Claassen e Baber (1974) em que a concentração de cada amostra é multiplicada pelo volume de solução no momento da retirada da amostra, obtendo-se uma função quantidade ( $q$ ) x tempo ( $t$ ). Os parâmetros cinéticos  $V_{max}$  e  $K_m$  são então calculados a partir derivada dessa função,  $\delta q / \delta t$ . O  $C_{min}$  é dado pela estimativa da concentração no último ponto da curva  $q \times t$ .

Para efeito do cálculo do volume de solução no momento de retirada de cada amostra considerou-se a taxa de transpiração constante ao longo do período de exaustão. Para calcular os parâmetros cinéticos empregou-se o modelo gráfico-matemático, proposto por Ruiz (1985), que divide a função  $q \times t$  em um segmento linear e um segmento assintótico. Os cálculos foram realizados com o auxílio do software Cinética para Windows® (RUIZ e FERNANDES FILHO, 1992).

Os dados de entrada no software foram os tempos de coleta em h e concentrações instantâneas de nitrato em solução ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), o volume inicial de solução nutritiva (L), o volume amostrado (mL), a duração do período de amostragem (h), o volume final (L) e a massa de raízes finas (g).

### 3.9 Determinação de tensão hídrica foliar

A potencial hídrico foliar ( $\Psi_{wf}$ ) foi determinado utilizando-se uma câmara de pressão do tipo Scholander. Na antemanhã do dia de cada avaliação, coletaram-se três folhas de cada planta, determinando-se sua tensão hídrica imediatamente.

### 3.10 Análise de trocas gasosas e da fluorescência da clorofila *a*

Para a determinação de atividade fotossintética fez-se avaliações utilizando-se aparelho IRGA (Infrared Gas Analyzer) modelo LCI-SD (ADC BioScientific, Hoddesdon, Inglaterra) dos valores de condutância estomática ( $g_s$ ), taxa de assimilação de carbono ( $A$ ), taxa transpiratória ( $E$ ) e concentração de  $CO_2$  subestomático ( $C_i$ ). A eficiência intrínseca no uso da água ( $EUA_i$ ) foi calculada pela relação entre a taxa de assimilação de carbono e a taxa transpiratória ( $EUA_i = A/E$ ). Estas medições foram realizadas entre duas e três horas após o início de fornecimento de nitrato às plantas, pinçando-se uma das folhas do terceiro ou quarto par de um ramo plagiotrópico localizado na porção média da planta. Utilizou-se radiação fotossinteticamente ativa (PAR) natural ( $\sim 850-1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de fótons), concentração atmosférica de  $CO_2$  ( $C_a$ ) ( $\sim 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ), temperatura da câmara foliar ( $25-35 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e temperatura da folha ( $28-39 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

As informações de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (PPFD), temperatura do ar e umidade relativa do ar ao longo de cada dia de avaliação, foram obtidas de dados da estação meteorológica Viçosa-A510 do INMET, localizada em Viçosa-MG ( $-20.762607^\circ$ ,  $-42.864013^\circ$ ).

Também foram coletados dados referentes à resposta nos padrões de fluorescência da clorofila *a*, por meio do uso de um fluorômetro portátil modelo JUNIOR-PAM (H. Walz, Effeltrich, Alemanha). Nesse caso, as folhas foram adaptadas ao escuro por 30 minutos antes de expor os tecidos foliares a uma luz vermelha modulada ( $0,03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Em seguida, determinou-se a fluorescência inicial ( $F_0$ ). Posteriormente, foi feita aplicação de um pulso de 0,8 s de luz actínica saturante ( $>6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). A fluorescência momentânea ( $F_s$ ) e máxima ( $F_m'$ ) foram avaliadas em tecidos adaptados à luminosidade. Os valores de  $F_m$  e  $F_m'$  foram determinados pelo método do pulso de saturação

(BOLHAR-NORDENKAMPF e OQUIST, 1993). A fluorescência basal ( $F_0'$ ) foi medida após a excitação do fotossistema I com radiação infravermelha.

Com estes resultados, estimou-se o rendimento quântico potencial do fotossistema II (YII), utilizando-se a equação  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ . O coeficiente de extinção fotoquímica foi determinado aplicando-se os valores dos parâmetros obtidos na equação  $qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$ .

Estas medições foram simultâneas àquelas realizadas com o IRGA e sempre realizadas na folha alterna oposta àquela utilizada para realizar as medições com o IRGA, previamente isolada da radiação luminosa natural pelo uso de uma cobertura de papel-alumínio.

### **3.11 Análise estatística**

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, em delineamento inteiramente ao acaso com parcelas subdivididas no tempo. A significância efeito do estresse hídrico (parcelas) foi avaliada por meio do teste F, a 5% de probabilidade. Para comparações entre médias obtidas nas diferentes fases fenológicas (subparcelas) e com as interações estresse hídrico x fase fenológica foi aplicado o teste de médias Student-Newmann-Keuls (SNK) a 5% de probabilidade. Foi utilizado o programa estatístico Assistat<sup>®</sup> versão 7.7 (SILVA e AZEVEDO, 2009).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Potencial hídrico foliar ( $\Psi_{wf}$ )

A aplicação do PEG na concentração de 290,0 g L<sup>-1</sup> de solução nutritiva resultou em uma alteração significativa no potencial hídrico foliar ( $\Psi_{wf}$ ), medido na antemanhã (Tabela 1). Estes valores estão de acordo com o proposto por Vilella et al. (1991) para a concentração de PEG utilizada.

**Tabela 1.** Tensão hídrica foliar ( $\Psi_{wf}$ ) medida na antemanhã em cafeeiros em solução nutritiva contendo 0,0 g L<sup>-1</sup> (controle) e 290,0 g L<sup>-1</sup> (EH+) de polietilenoglicol 6.000 g mol<sup>-1</sup>.

Trat.	PF	F-Ch	PER	EG	CV-a* (%)
	MPa				
Controle	-0,50 bB	-0,62 bAB	-0,50 bB	-0,62 bAB	16,13
EH+	-0,98 aA	-1,05 aA	-0,75 aB	-0,94 aA	
CV-b** (%)	7,57				

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem pelo teste Student-Newmann-Keuls a 5% de probabilidade.

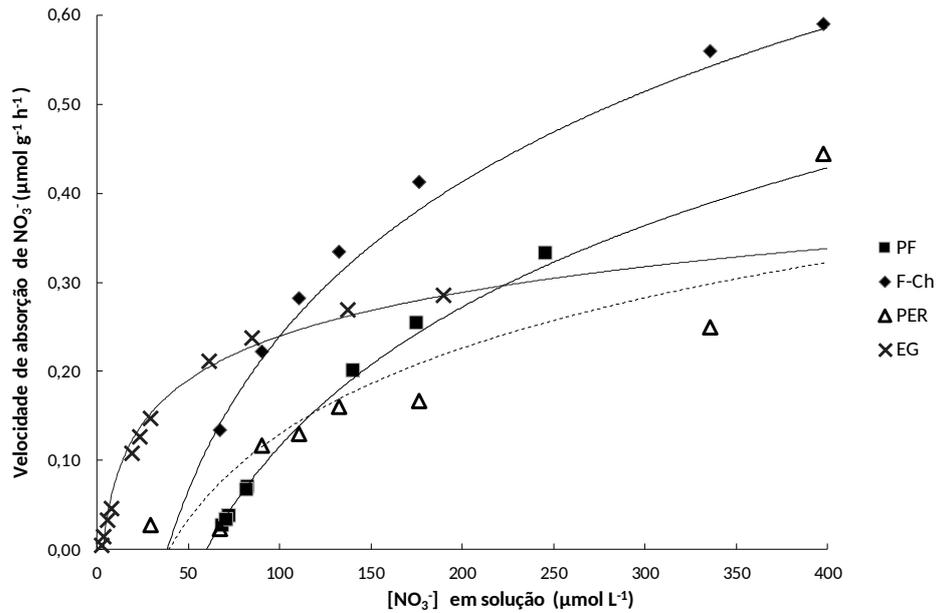
Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem pelo teste Student-Newmann-Keuls a 5% de probabilidade.

\*Coeficiente de variação na parcela;

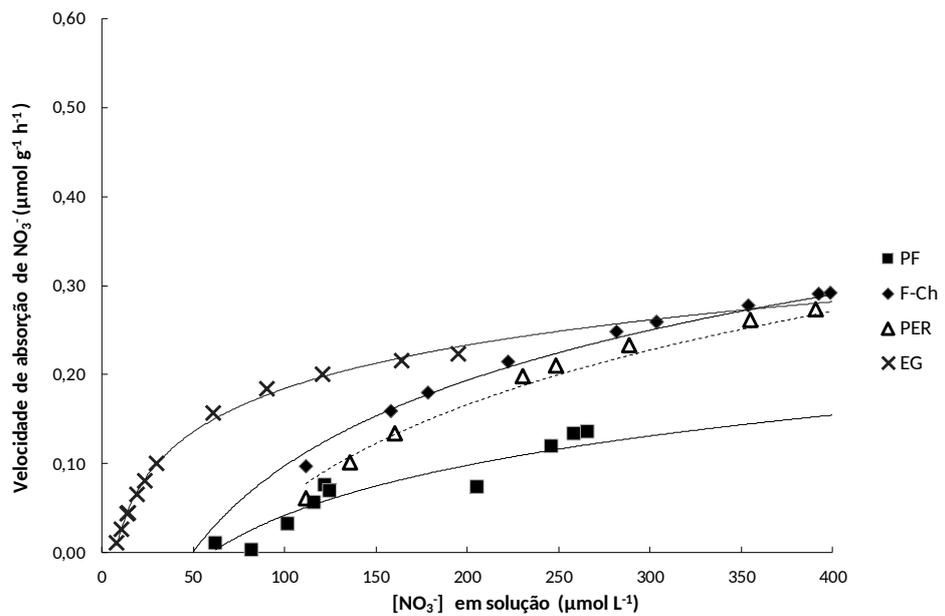
\*\*Coeficiente de variação na subparcelas.

### 4.2 Influência do estresse hídrico nos valores de $K_m$ , $C_{min}$ e $V_{max}$

A absorção de nitrato pelas plantas de café apresentou padrão bifásico, dependente da concentração externa, descrito pela equação de Michaelis-Menten, como o esperado para a faixa de baixas concentrações externas do íon (Figura 7 e 8). Os parâmetros cinéticos variaram de 120,48 a 264,98  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o  $K_m$ , 0,22 a 0,83  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$  para  $V_{max}$  e 41,84 a 107,90  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o  $C_{min}$  (Tabela 2), e sofreram influência da fase fenológica da planta e de seu potencial hídrico. Para  $K_m$  e  $C_{min}$ , esses valores são da mesma ordem dos encontrados por Souza (2015). Esse autor trabalhou com cafeeiros de 9,5 meses de idade e encontrou  $K_m$  (s) médios de 236,28  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em plantas sem estresse e de 104,27  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em plantas com estresse hídrico e,  $C_{min}$  de 41,09 e 30,18  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, em plantas submetidas e não submetidas a estresse hídrico.



**Figura 7.** Absorção de nitrato por cafeeiros adultos ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) sem restrição hídrica (controle) em quatro diferentes fases do ciclo fenológico em função da variação externa da concentração em solução ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).



**Figura 8.** Absorção de nitrato por cafeeiros adultos ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) sob restrição hídrica (EH+) em quatro diferentes fases do ciclo fenológico em função da variação externa da concentração em solução ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Para  $v_{max}$ , no entanto, os valores encontrados por Souza (2015), em plantas jovens, foram bem mais elevados que os observados neste estudo, de 1,60 e 3,47  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ , em média, com e sem estresse hídrico, respectivamente. Sabe-se, entretanto, que os parâmetros cinéticos podem variar com a espécie, cultivar, idade da planta, concentração do nutriente em solução, temperatura e intensidade luminosa.

Os parâmetros cinéticos de absorção de nitrato  $v_{max}$  e  $C_{min}$  sofreram efeito significativo do estresse hídrico, enquanto que  $K_m$  não apresentou variações significativas (Tabela 2), não havendo, portanto, efeito do déficit hídrico sobre este parâmetro. Entretanto, Souza (2015) verificou que o estresse hídrico promoveu reduções em  $K_m$  e  $v_{max}$ ,  $C_{min}$  em oito cultivares de cafeeiros com 9,5 meses de idade, o que pode, novamente, ter relação com a diferente idade das plantas avaliadas por este autor (9,5 meses) e as deste presente trabalho, com cerca de 60 meses.

### **4.3 Parâmetros cinéticos de absorção de nitrato em cafeeiros adultos e fase do ciclo fenológico**

Houve efeito significativo do estresse hídrico sobre o valor da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) na fase PER, na qual o valor médio de  $K_m$  do tratamento controle foi superior ao valor médio observado nas plantas submetidas ao EH+ (Tabela 2 e Figura 8). Quando se consideram as fases fenológicas da planta, foi observado maior valor deste parâmetro na fase PER em relação as fases de F-Ch e PF as quais não difeririam entre si, e estas maiores que a fase EG, que exibiu o menor valor para este parâmetro (Tabela 2).

O valor de  $K_m$  é um indicativo da especificidade dos carreadores envolvidos na absorção da forma do nutriente em estudo e representa a concentração externa do ânion em que se atinge a metade da velocidade máxima de absorção. Portanto, quanto menores os valores de  $K_m$ , maior a especificidade dos carreadores atuando no transporte do nutriente do meio externo para o interior radicular.

Com base nestes resultados, há indicação de que a especificidade de absorção de nitrato no cafeeiro foi maior nas fases de F-Ch e PF, e ainda maior

na fase EG, muito embora somente na fase de primeira expansão rápida as plantas tenham apresentado ajuste por redução de  $K_m$  frente ao estresse hídrico.

**Tabela 2.** Valores dos parâmetros cinéticos de absorção de nitrato: constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), velocidade máxima de absorção ( $v_{max}$ ) e concentração mínima de equilíbrio de absorção ( $C_{min}$ ) influenciados pela fase fenológica e da presença (EH+) e ausência de déficit hídrico (controle).

Trat.	Fases de avaliação				Média	CV-a (%)
	PF	F-Ch	PER	EG		
<b><math>K_m</math></b>						
$\mu\text{mol L}^{-1}$						
<b>Controle</b>	181,13 aB	126,09 aB	264,98 aA	35,91 aC	152,03 a	27,29
<b>EH+</b>	120,48 aA	157,23 aA	164,87 bA	39,37 aB	120,49 a	
<b>Média</b>	150,80 B	141,66 B	214,93 A	37,64 C		
<b>CV-b (%)</b>	27,16					
<b><math>v_{max}</math></b>						
$\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$						
<b>Controle</b>	0,66 aA	0,80 aA	0,83 aA	0,34 aB	0,66 a	32,66
<b>EH+</b>	0,22 bA	0,43 bA	0,42 bA	0,27 aA	0,33 b	
<b>Média</b>	0,44 B	0,61 A	0,63 A	0,31 C		
<b>CV-b (%)</b>	20,32					
<b><math>C_{min}</math></b>						
$\mu\text{mol L}^{-1}$						
<b>Controle</b>	60,88 aA	41,84 bA	59,13 bA	2,26 aB	41,67 b	31,14
<b>EH+</b>	60,00 aB	89,83 aA	107,90 aA	10,81 aC	67,13 a	
<b>Média</b>	60,44 B	65,84 B	83,51 A	6,54 C		
<b>CV-b (%)</b>	23,09					

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem pelo teste Student-Newmann-Keuls a 5% de probabilidade.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem pelo teste Student-Newmann-Keuls a 5% de probabilidade.

\*Coeficiente de variação na parcela;

\*\*Coeficiente de variação nas subparcelas.

A literatura de trabalhos que relatem parâmetros cinéticos de absorção de nutrientes em cafeeiros é escassa, e tampouco há relatos desses parâmetros associados às fases do ciclo fenológico. Alguns trabalhos relatam a variação nos teores foliares de nitrato e atividade da NR e da sazonalidade da absorção de N.

Neto et al. (2014) encontraram que a absorção de nitrato é mais intensa antes da floração e no início da maturação dos frutos. Já a atividade da enzima nitrato redutase foi mais intensa na fase vegetativa. Carelli (1987), estudando plantas de café arábica também em solução nutritiva, concluiu que a maior atividade desta enzima foi logo antes da floração e na fase final da expansão dos frutos. Carvajal e Acevedo (1969) também estudando plantas de café em solução

nutritiva, encontraram maiores taxas de absorção de nitrato antes da antese e no início da maturação dos frutos, os quais decresceram após o florescimento.

Diversos autores (VALARINI et al. 2005; REIS et al. 2009; BRUNO et al., 2011) relataram taxas mais elevadas de atividade da NR e de absorção de nitrato durante as fases vegetativas ou de baixa demanda para o fruto de compostos nitrogenados. Por outro lado, durante as fases reprodutivas, e de maior demanda de N para os frutos, é comumente relatada intensa atividade de enzimas proteolíticas e aumento dos teores foliares de proteínas solúveis e por fim remobilização de N.

Ivashikina e Sokolov (1997) estudando o efeito de diversos pré-tratamentos nos parâmetros cinéticos de absorção de nitrato em milho, observaram um padrão semelhante de feedback negativo e de especificidade de absorção em resposta ao fornecimento de compostos nitrogenados mais reduzidos. O fornecimento de amônio e do aminoácido glutamina em pré-tratamento reduziu a atividade da NR e aumentou os valores de  $K_m$  para nitrato.

Sugere-se, portanto, que durante a fase PER, ocorre uma maior concentração de compostos nitrogenados sendo translocados na planta para o desenvolvimento dos tecidos do fruto, e que tal maior concentração interna de N pode promover uma regulação com efeito negativo na absorção de nitrato do meio extrarradicular, o que reflete no aumento do valor médio de  $K_m$  nesta fase, em comparação às fases PF e F-Ch e EG, quando as quantidades internas de N sendo remobilizado são menores.

Nesta fase, também, os valores de  $K_m$  para o tratamento EH+ foram menores, indicando uma maior especificidade dos carreadores pelo nitrato para este tratamento e esta fase. Possivelmente esta resposta é devida a uma mais alta concentração de compostos nitrogenados internamente na planta nesta fase, e o estresse hídrico termina por contribuir ainda mais para a redução do conteúdo de água, diminuindo a velocidade de realocação do N já internalizado.

De maneira complementar a estas inferências, o valor médio da concentração mínima de equilíbrio de absorção  $C_{min}$  (Figura 9) foi maior para a fase PER e ainda o estresse hídrico durante as fases F-Ch e PER foi mais efetivo em incrementar estes valores, uma vez que a  $C_{min}$  apresentou variação significativa.

Esta última observação aponta, mais uma vez, que durante as fases de maior demanda de N há uma tendência que seja dada prioridade a formas internas e já reduzidas de N e que o estresse hídrico terminou por delinear mais claramente esta preferência.

Este aparente paradoxo para os valores de  $K_m$  e  $C_{min}$  e a demanda de N pelo metabolismo da planta, pode ser, portanto, esclarecido atribuindo-se um efeito regulatório das concentrações internas de N sobre a cinética de absorção do nitrato. Quando há maior disponibilidade interna de N já reduzido, há uma tendência a uma diminuição do  $K_m$  indicando a ativação dos carreadores de alta afinidade, menos dispendiosos energeticamente, no entanto, também de menor capacidade de influxo. Por outro lado, quando há demanda interna de N nota-se um aumento nos valores de  $K_m$ , indicando uma menor especificidade dos carreadores de nitrato, permitindo um maior influxo deste íon para o meio interno da raiz.

Os valores de  $C_{min}$  também exibiram diferença significativa em função do estresse hídrico (Figura 9), sendo que a média deste parâmetro para as plantas submetidas ao déficit hídrico foi superior à daquelas sem restrição hídrica, ou seja, sob as condições de déficit hídrico imposto, as plantas passaram a exigir concentrações maiores do nutriente em solução para que continuasse havendo absorção ou, mais precisamente, influxo líquido do ânion nitrato.

Durante a fase EG os valores obtidos para  $C_{min}$  foram extremamente baixos e os assim como os valores de  $K_m$ . Este fato sugere a alta afinidade dos carreadores ativados durante esta fase fenológica, como indicado pelo baixo  $K_m$ , o que termina por refletir em uma também muito baixa concentração remanescente de nitrato em solução, representado pela baixa  $C_{min}$ . Durante esta fase há uma forte ação de dreno por parte fruto em enchimento, contudo não se deve deixar notar o importante papel das reservas da planta durante esta fase, e que muito provavelmente, considerável parte deste N absorvido avidamente durante esta fase será armazenado e apenas exportado na próxima safra.

Em aspectos práticos, o valor de  $C_{min}$  apenas é relevante quando a concentração do nutriente no solo, ou em outro meio de cultivo, é limitante (HORN et al., 2006) e, portanto, condições ligadas intrinsecamente à planta (BATISTA, 2014; LIMA et al. 2005; MACHADO e FURLANI, 2004) e ao ambiente, e.g. estresses abióticos, podem ser determinantes na absorção, como o estresse

hídrico e nutricional, por exemplo. Desta forma, também, os resultados do presente trabalho indicam que o estresse hídrico pode ser significativo fator de restrição na absorção de N, sobretudo nas fases do ciclo fenológico de maior demanda de aquisição deste nutriente, como antes da F-Ch e repouso (após a maturação dos frutos).

Os valores de  $v_{max}$  foram sempre superiores para o controle. Na cinética de absorção, o parâmetro cinético  $v_{max}$ , segundo Li et al. (2013), denota o valor máximo da capacidade que o sistema radicular tem de absorver determinada forma de um nutriente nas condições da situação avaliada, quando todos os carreadores se encontram ocupados no transporte do íon, ou quando todos os carreadores efetivamente ativos se encontram saturados, ou seja, alcançam a taxa máxima de transporte.

O estresse hídrico afetou os valores de  $v_{max}$ , reduzindo-os consistentemente em todas as fases fenológicas estudadas, cerca de 67% na fase PF e aproximadamente 50% nas fases F-Ch e PER e 30% na EG. De acordo com Larsson et al., 1989, a velocidade e transporte de íons através de membranas é regulada por pelo menos dois fatores: o número de carreadores e o ambiente para estes carreadores na membrana.

Buljovic e Engels (2001) relacionam os possíveis efeitos diretos do estresse hídrico na inibição da capacidade que as raízes possuem para absorverem nitrato, como a perda da vitalidade celular, deposição de compostos hidrofóbicos na parede celular, deficiência de carboidratos e inibição dos mecanismos de transporte transmembrana. No entanto, nesse mesmo trabalho, estudando o efeito do estresse hídrico na absorção de nitrato durante a privação hídrica e após, com o restabelecimento do fornecimento hídrico suficiente, os autores descartaram a ação de todos estes fatores, restando apenas o relacionado à inibição dos mecanismos de transporte.

Portanto, o decréscimo da  $v_{max}$  no presente trabalho tem forte indicativo de estar relacionado à inibição dos mecanismos de transporte transmembrana, possivelmente pela inativação de carreadores constitutivos de baixa afinidade (cLATS), uma vez que os valores de  $K_m$  foram pouco ou não influenciados pelo estresse hídrico, e que, por outro lado, os valores de  $C_{min}$  foram superiores para o tratamento com estresse hídrico.

#### 4.4 Trocas gasosas

No presente trabalho, os valores da taxa de assimilação de carbono ( $A$ ) (Tabela 3) foram afetadas pelo déficit hídrico, sendo os valores médios do controle superiores ao do tratamento EH+. Estes valores em média geral são baixos quando comparados aos obtidos por Souza (2015), trabalhando com condições controladas e plantas com 9,5 meses, no entanto, similares aos encontrados sob condições de campo por Nunes et al. (1993), Chaves et al., (2008) e Dias (2006).

Por outro lado, os valores obtidos por Souza (2015) para  $A$  ( $5,68 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $3,10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para plantas sem e com estresse hídrico) e  $E$  ( $1,44$  e  $0,50 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , para plantas sem e com estresse hídrico, respectivamente) para plantas sem e com estresse hídrico, respectivamente, são aproximados àqueles obtidos pelo presente trabalho durante PER. É possível que esta resposta similar de plantas em fases de desenvolvimento bastante distintas se deva ao aspecto comum entre estas, que é a intensa atividade metabólica para o desenvolvimento vegetativo, no caso nas plantas jovens, e desenvolvimento dos frutos na PER, nas adultas.

Esperava-se aumentos significativos nas taxas fotossintética e de transpiração, coincidindo com o aumento da demanda por fotoassimilados no fruto em desenvolvimento. No entanto a baixa carga de frutos das plantas, em média 40 frutos por ramo produtivo, pode ter sido o motivo para a não ocorrência desta significância, muito embora observe-se uma tendência neste sentido. Se por um por um lado o carregamento de frutos tenha sido baixo, por outro as plantas exibiam abundante crescimento de ramos e folhas na fase F-Ch em relação a fase PF. Este reduzido número de frutos foi, principalmente, devido às altas temperaturas durante a fase de floração que reduziu o número de flores viáveis e causou o abortamento de flores e frutos.

Valores médios de condutância estomática ( $g_s$ ) também e reduzidos em função do déficit hídrico e, também, tenderam a ser maiores nas fases PER e EG menores nas fases F-Ch e PF. Silva et al. (2010) encontraram resultados semelhantes de queda de  $g_s$  em cafeeiros submetidos a privação de P, em razão da disfunção no metabolismo fotossintético por limitações de origem estomática

e metabólica. De maneira análoga, o déficit hídrico deve ter levado a planta a privações de caráter nutricional, o que afetou seu metabolismo reduzindo  $g_s$  e  $A$ .

Esta variação nos valores de  $A$ ,  $E$  e  $g_s$  ocorre no metabolismo da planta para que haja redução na perda de água e otimização no uso deste recurso, sobretudo em situações de estresse hídrico. Isto pode ser evidenciado pela observação dos valores de eficiência do uso da água intrínseca ( $EUA_i$ ) que relacionam a quantidade de carbono fixada em relação à quantidade de água perdida para a atmosfera. Com a única exceção da observação média do tratamento EH+ na fase PF, os valores de EUA (Tabela 3) mostraram-se consistentemente estáveis em relação ao estresse hídrico e a fase fenológica, não havendo diferença em nenhuma época e nenhum tratamento.

Cabe observar que o valor da tensão hídrica mensurada na antemanhã, da ordem de -1,0 MPa, e mesmo daquela estimada, com base na redução do volume de solução nutritiva devido a evapotranspiração, da ordem de -1,3 MPa (dados não exibidos), são capazes apenas de causar estresses hídrico moderados, os quais podem não terem sido suficientes para causar modificações significativas nestes parâmetros.

A concentração de  $CO_2$  subestomática ou interna ( $C_i$ ) foi maior nas plantas sob estresse hídrico, maior para a fase PF em relação F-Ch e, esta, por sua vez, superior a PER e EG. Tal resultado era esperado nesta situação, uma vez que o  $CO_2$  já internalizado para a câmara subestomática tende a permanecer lá pela baixa  $g_s$  e por não ser utilizado para a carboxilação. Uma causa plausível para esta permanência na câmara subestomática é a redução da condutividade mesofílica ( $g_m$ ), a qual se processa em meio aquoso, e que, portanto, é muito mais sensível a variações de disponibilidade hídrica.

Konrad et al. (2005) estudando o estresse de alumínio em cafeeiros se depararam com situação semelhante e sugeriram que neste caso o estresse abiótico teria causado não apenas redução na fotossíntese por impedimentos estomáticos, causando queda na  $g_s$ , mas também a nível bioquímico e fotoquímico. No presente trabalho, porém, o último fator não recebeu evidência para ser constatado, haja vista os dados obtidos por fluorescência da clorofila a indicarem que o estresse hídrico não chegou a causar danos relevantes à fase fotoquímica da fotossíntese, como se discutirá a seguir.

**Tabela 3.** Taxa fotossintética (A), taxa transpiratória (E), condutância estomática ( $g_s$ ), concentração interna de  $CO_2$  subestomático ( $C_i$ ) e eficiência intrínseca de uso da água ( $EUA_i$ ) influenciados pela fase fenológica e pela presença (EH+) e ausência de déficit hídrico (controle).

Trat.	Fases de avaliação				Média	CV-a (%)*
	PF	F-Ch	PER	EG		
<b>Taxa fotossintética (A)</b> $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$						
Controle	0,74 aC	1,84 aB	4,04 aA	3,20 aA	2,45 a	19,16
EH+	0,01 bC	0,64 bB	2,47 bA	1,55 bB	1,17 b	
Média	0,37 D	1,24 C	3,26 A	2,38 B		
CV-b(%)**						27,51
<b>Taxa Transpiratória (E)</b> $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$						
Controle	0,21 aC	0,85 aB	1,54 aA	1,74 aA	1,09 a	59,87
EH+	0,11 aB	0,45 aA	0,87 bA	0,62 bA	0,51 b	
Média	0,16 C	0,65 B	1,21 A	1,17 A		
CV-b(%)						39,39
<b>Condutância estomática (<math>g_s</math>)</b> $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$						
Controle	6,7 aC	16,7 aC	76,7 aA	56,7 aB	39,2 a	43,30
EH+	5,9 aA	10,0 aA	23,3 bA	16,7 bA	14,0 b	
Média	6,3 C	13,4 C	50,0 A	36,7 B		
CV-b (%)						36,34
<b><math>CO_2</math> subestomático (<math>C_i</math>)</b> $\mu\text{mol mol}^{-1}$						
Controle	263,2 bA	250,0 bA	299,7 aA	261,5 aA	270,1 b	12,64
EH+	483,8 aA	343,1 aB	248,1 bC	206,6 bC	358,3 a	
Média	373,5 A	296,6 B	273,9 B	234,1 C		
CV-b (%)						9,67
<b>Eficiência de uso da água (<math>EUA_i</math>)</b> $\mu\text{mol mol}^{-1}$						
Controle	3,43 aA	2,38 aA	2,85 aA	2,01 aA	2,67 a	12,30
EH+	0,01 bB	2,11 aA	3,01 aA	2,85 aA	1,99 a	
Média	1,71 A	2,24 A	2,93 A	2,43 A		
CV-b (%)						10,66

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem pelo teste Student-Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem pelo teste Student-Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

\*Coeficiente de variação na parcela; \*\*Coeficiente de variação na subparcela.

De acordo com DaMatta et al. (2002), à medida que se intensifica o estresse hídrico, pode ocorrer também uma inibição não-estomática da fotossíntese, determinada pelo comprometimento da regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato e também por um decréscimo na atividade de carboxilação dessa enzima, levando, portanto, à inibição da fotossíntese por aspectos bioquímicos.

#### 4.5 Fluorescência da clorofila a

Outra modalidade de estratégias que as plantas utilizam para evitar o estresse luminoso é através da dissipação da energia absorvida em excesso por meio da fluorescência da clorofila a. A quantificação do estresse luminoso no presente trabalho teve como intuito avaliar a perda de capacidade fotossintética pela planta em razão do déficit hídrico. Por princípio, se a planta reduzir a capacidade de utilizar o gradiente eletroquímico, gerado nos fotossistemas como resultado da radiação luminosa, o excesso deste terá de ser dissipado de forma não fotoquímica, por meio de calor e emissão fluorescente.

Os parâmetros  $F_v/F_m$  e fluorescência inicial ( $F_0$ ) podem fornecer informações sobre a integridade do fotossistema e qual o status da planta quanto a capacidade de disponibilizar energia para a etapa bioquímica da fotossíntese. Quanto maiores os valores de  $F_v/F_m$ , maior a eficiência do FSII em receber a radiação luminosa captada pelos complexos coletores de luz e transferir a energia ao longo da cadeia transportadora de elétrons, que, por fim, produzirá potencial redutor na forma de NADH e finalmente ATP. Portanto, estresses abióticos promovem uma redução nos valores deste parâmetro. De maneira complementar os valores de  $F_0$  tendem a aumentar em situações de estresse, uma vez que a energia dissipada na forma de fluorescência inicial deveria estar sendo empregada na formação de produtos reduzidos ao final da etapa fotoquímica.

De maneira geral, no presente estudo, os padrões de fluorescência da clorofila a variaram com a fase fenológica, havendo uma tendência de os valores da fase PER e EG serem superiores aos valores das fases PF e F-Ch (Tabela 4). Esta tendência, no entanto, é explicada por diversos autores como função da fase fenológica e por aspectos sazonais como a radiação luminosa (CAMPOSTRINI, 1998; BOLHAR-NORDENKAMPF et al., 1989).

Cabe salientar que o experimento foi desenvolvido em condições semelhantes às de campo, e que as leituras foram realizadas sob iluminação natural. Os resultados encontrados foram semelhantes àqueles descritos por Chaves et al. (2008) avaliando os efeitos do sombreamento sobre mecanismos de fotoproteção em *Coffea arabica* L. em condição de campo.

De acordo com Dias (2006), esta variação na proporção entre valores dos padrões de fluorescência em função destas condições pode ser interpretado como um indicativo de conjunto de mecanismos de defesa que conferem a grande plasticidade ecofisiológica que o cafeeiro arábica apresenta e lhe permite dissipar eficientemente o excesso de radiação luminosa absorvida por vias fotoquímicas e não-fotoquímicas e assim, mesmo sendo uma planta com origem ambiente sombreado (sub-bosque) (CHAVES et al. 2008), desenvolver-se e apresentar elevadas produtividades cultivada a pleno sol. Martins et al. (2014) estudando os meios pelos quais esta espécie modula sua maquinaria fotossintética contra o estresse foto-oxidativo, encontraram que, sob situação de estresse luminoso, ocorre uma reprogramação dos metabolismos primário e secundário, aumentando a capacidade antioxidativa em até cinco vezes sob condições de elevada irradiância.

O valor de eficiência quântica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ) é proporcional a eficiência da fase fotoquímica e tem sido amplamente utilizado como indicador de dano foto-inibitório em plantas submetidas a estresses abióticos (CAMPOSTRINI, 1998). Resultados que corroboram com esta linha foram encontrados por Silva (2010), ao avaliar os efeitos do estresse nutricional de fósforo sob a fotossíntese em cafeeiro, onde os autores observaram drástica queda na relação  $F_v/F_m$  nas plantas sob deficiência de fósforo.

Konrad et al. (2005) também relatam quedas em  $F_v/F_m$  e elevação nos valores de fluorescência inicial  $F_0$  em cafeeiros submetidos a níveis tóxicos de alumínio. Souza (2015) submetendo cafeeiros jovens a tensões hídricas de -1,5 MPa, encontrou valores médios de  $F_v/F_m$  de 0,571 para a mesma variedade em estudo, valor este que se situa entre os valores encontrados no presente trabalho para as fases F-Ch (0,51) e EG (0,65).

Nunes et al. (1993) também encontraram que plantas cultivadas com suprimento suficiente de N apresentaram maiores valores de  $F_v/F_m$  e menores valores de  $F_0$  que plantas cultivadas sob deficiência deste nutriente, indicando menor estresse e danos aparelho fotossintético das plantas em melhor estado nutricional em relação ao N. No presente trabalho, o estresse hídrico a diferença nos valores de  $F_v/F_m$  não chegou a ser significativa entre plantas sob condições de boa disponibilidade hídrica e aquelas sob estresse hídrico, no entanto a média

dos valores de  $F_0$  foi significativamente superior para a média das plantas sob EH+ (Tabela 4).

**Tabela 4.** Valores dos padrões de fluorescência da clorofila a fluorescência inicial ( $F_0$ ), eficiência quântica potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), razão entre fluorescência variável e fluorescência inicial ( $F_v/F_0$ ), coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência (qP) influenciados pela fase fenológica e pela presença (EH+) e ausência de déficit hídrico (controle).

Trat.	Fases de avaliação				Média	CV-a (%)
	PF	F-Ch	PER	EG		
	$F_0$ u.r.*					
<b>Controle</b>	305,9 aA	288,9 aA	352,6 aA	349,7 aA	309,3 a	6,13
<b>EH+</b>	482,9 aB	328,1 aAB	353,8 aA	355,3 aA	380,0 b	
<b>Média</b>	277,1 B	308,5 AB	353,1 A	352,5 A		
<b>CV-b (%)</b>	13,62					
	$F_v/F_m$ u.r.*					
<b>Controle</b>	0,51 aB	0,55 aB	0,64 aA	0,65 aA	0,65 a	14,37
<b>EH+</b>	0,41 bC	0,48 aB	0,66 aA	0,64 aA	0,64 a	
<b>Média</b>	0,46 B	0,52 B	0,65 A	0,64 A		
<b>CV-b (%)</b>	9,69					
	$F_v/F_0$ u.r.*					
<b>Controle</b>	1,35 aAB	1,06 aB	1,97 aA	1,96 aA	1,58 a	30,59
<b>EH+</b>	0,93 aB	1,22 aB	1,93 aA	1,90 aA	1,49 a	
<b>Média</b>	1,14 B	1,14 B	1,95 A	1,93 A		
<b>CV-b (%)</b>	23,65					
	qP u.r.*					
<b>Controle</b>	0,58 aA	0,74aA	0,95 aA	0,95 aA	0,80 a	25,34
<b>EH+</b>	0,84 aA	0,34 bB	0,97 aA	1,00 aA	0,79 a	
<b>Média</b>	0,71 A	0,54 B	0,96 A	0,97 A		
<b>CV-b (%)</b>	22,52					

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste Student-Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste Student-Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

\*u.r.: unidade relativa ao padrão de fluorescência.

Ramalho et al. (1998) em um trabalho com o mesmo design verificaram que as melhores respostas contra o estresse oxidativo nas plantas sob melhor nutrição de N deveram-se à mudança no perfil de lipídios das membranas tilacoides, maior atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APer) e glutathione redutase (GRed), e ainda aos conteúdos mais elevados de carotenoides que conferiram mais efetiva neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Com exceção do parâmetro  $F_0$ , no presente trabalho, nenhum outro dos parâmetros de fluorescência da clorofila avaliados apresentou diferença significativa entre o tratamento controle e o EH+. Esta divergência entre os trabalhos pode estar relacionada à escala de tempo e intensidade do estresse abiótico em estudo, uma vez que o trabalho atual foi realizado com estresse hídrico bastante moderado e de curta duração, tempo possivelmente insuficiente para a variação da resposta fisiológica da planta a níveis perceptíveis através da metodologia empregada.

Contudo, os resultados de  $F_v/F_m$  e  $F_0$  encontrados (Tabela 4) corroboram com aqueles de NUNES et al. (1993), avaliando o efeito do estresse nutricional de N.

Segundo Konrad et. al. (2005), a razão  $F_v/F_0$  tem sido utilizada em alguns trabalhos como uma forma de amplificar as pequenas variações indicadas pela razão  $F_v/F_m$ . No presente trabalho, no entanto este parâmetro indicou as mesmas variações que as indicadas por  $F_v/F_m$ .

Por outro lado, o valor da tensão hídrica mensurada na antemã foi da ordem de -1,0 MPa e o estimado para o momento das leituras dos parâmetros de fluorescência da ordem de -1,40 MPa para a fase PER, -1,55 MPa na fase F-Ch e -1,60 MPa na fase PF, é capaz apenas de causar um estresse hídrico moderado. Lima et al. (2002) induziram tensões hídricas foliares ainda mais elevadas, da ordem de -3,0 MPa para estudar os efeitos do déficit hídrico sobre os parâmetros fotoquímicos em dois clones de *Coffea canephora*.

Os resultados obtidos foram análogos aos obtidos no presente trabalho, onde o estresse hídrico foi de muito sutil ou nulo efeito sobre os parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, embora também tenha havido redução na taxa de assimilação de carbono. Os autores sugeriram que a manutenção do funcionamento do transporte de elétrons pela CTE sob taxas de assimilação de CO<sub>2</sub> mais baixas tenha sido possível graças à dissipação desta energia por meio da reação de Mehler e da fotorrespiração.

#### 4.6 Metabolismo do carbono e absorção de nitrato

A regulação dos carreadores de formas iônicas inorgânicas de N é associada não somente a fatores extrarradiculares como, por exemplo, a concentração do íon e seus competidores, pH da solução e temperatura, como também de aspectos internos, sobretudo fisiológicos. A assimilação de nitrato em órgãos iluminados utiliza tanto composto com potencial redutor do cloroplasto, e.g. ferredoxina, como esqueletos carbônicos recém-formados, para a biossíntese de aminoácidos (CHAMPIGNY, 1995). A redução de nitrato, que em órgãos não iluminados, principalmente nas raízes, também é dependente da fotossíntese uma vez que o potencial redutor provém de carboidratos, compostos produto do processo fotossintético (CRAWFORD, 1995).

Desta forma, há uma estreita regulação dos metabolismos do C e do N, sendo as duas cadeias de processos fisiológicos, simultaneamente, complementares e concorrentes por produtos fotossintéticos.

No presente trabalho as maiores taxas de assimilação de carbono (A) foram acompanhadas por maiores valores de velocidade de absorção de nitrato,  $v_{max}$ , assim como as menores A pelas menores  $v_{max}$ . Meng et al. (2016) relatam resultados semelhantes na espécie lenhosa *Populus simonii* para a qual o estresse hídrico reduziu o conteúdo de clorofilas, os valores dos parâmetros fotossintético e, por consequência absorção de nitrogênio, sobretudo nitrato.

Dluzniewska et al. (2007), em estudo com plantas do mesmo gênero, determinaram que as enzimas NR, NiR, GS e GOGAT tem a expressão e ativação não tão somente da presença de seus substratos, mas também do fluxo contínuo de N inorgânico sendo incorporado a aminoácidos. De maneira complementar as enzimas sacarose fosfato sintase (SPS), fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase) equalizam a partição de fotoassimilados para a fotossíntese e para a assimilação do nitrato.

Em suma vê-se que cadeia de eventos iniciada como a redução da taxa fotossintética termina por causar uma regulação negativa expressão dos genes NRT, que codificam para a síntese e ativação dos carreadores de nitrato, o que leva a uma conseqüente redução da taxa absorção deste nutriente.

## 5 CONCLUSÕES

- Os valores médios de  $K_m$ ,  $v_{max}$ ,  $C_{min}$  para nitrato em cafeeiros adultos foram, respectivamente,  $152,03 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $0,66 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$  e  $41,67 \mu\text{mol L}^{-1}$  sob disponibilidade hídrica suficiente e  $120,49 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $0,33 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$  e  $67,13 \mu\text{mol L}^{-1}$  em plantas submetidas a déficit hídrico.
- O estresse hídrico reduziu significativamente os valores de velocidade máxima de absorção ( $v_{max}$ ), aumentou os valores de concentração mínima de absorção ( $C_{min}$ ) e não afetou significativamente os valores da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ). Os valores de  $C_{min}$  foram menores em EG.
- O déficit hídrico afetou o processo fotossintético, reduzindo a taxa fotossintética ( $A$ ), a taxa transpiratória ( $E$ ) e a condutividade estomática ( $g_s$ ).
- Com exceção de  $F_0$ , que foi maior para plantas sob estresse hídrico, os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* não foram afetados de maneira significativa pelo déficit hídrico imposto.
- Os padrões de fluorescência da clorofila *a* variaram com a fase fenológica, havendo uma tendência de os valores da fase PER e EG serem superiores aos valores das fases PF e F-Ch.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, M. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. **Plant, Cell e Environment**. v. 9, p. 511–519 , 1986.

BATISTA, R. O. **Cinética de absorção de nutrientes, morfologia radicular e eficiência nutricional de clones de cedro australiano**. 2014. 105 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2014.

BOLHAR-NORDENKAMPF, H.R.; OQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. **Photosynthesis and Production in a changing environment: a field and laboratory manual**. [S.l: s.n.]. , 1993

BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R.; LONG, S. P.; BAKER, N. R.; *et al.* Chlorophyll Fluorescence as a Probe of the Photosynthetic Competence of Leaves in the Field: A Review of Current Instrumentation. **Functional Ecology** v. 3, n. 4, p. 497–514 , 1989.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**. v. 30, n. 2, p. 365–372 , 2000.

BRUNO, I. P.; UNKOVICH, M. J.; BORTOLOTTI, R. P.; *et al.* Fertilizer nitrogen in fertigated coffee crop: Absorption changes in plant compartments over time. **Field Crops Research** v. 124, n. 3, p. 369–377 , 2011.

BULJOVICIC, Z.; ENGELS, Christof. Nitrate uptake ability by maize roots during and after drought stress. **Plant and Soil** v. 229, n. 1, p. 125–135 , 2001.

CAMARGO, A. P. Florescimento e frutificação de café arábica nas diferentes regiões (cafeeiras) do Brasil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira** v. 20, n. 7, p. 831–839 , 1985.

CAMARGO, A. P.; CAMARGO, M. B. P.. Definição e Esquematização das Fases Fenológicas do Cafeeiro Arábica nas Condições Tropicais do Brasil. **Bragantia** v. 60, n. 1, p. 65–68 , 2001.

CAMPOSTRINI, E. Fluorescência da clorofila a, considerações teóricas e aplicações práticas. **UENF**, 198f p. 1–34 , 1998.

CARELLI, M. L. C.; FAHL, J. I. Partitioning of nitrate reductase activity in *Coffea arabica* L. and its relation to carbon assimilation under different irradiance regimes. **Brazilian Journal of Plant Physiology** v. 18, n. 3, p. 397–406 , 2006.

CARELLI, M. L. C. **Estudo do processo de redução do nitrato durante o desenvolvimento inicial e no estágio reprodutivo de plantas de café (*Coffea arabica* L.)**. 1987. 122 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1987.

CARVAJAL, J. F.; ACEVEDO, A. C.; LOPES, C. A. Nutrient uptake by the coffee tree during a yearly cycle. **Turrialba, San José** v. 19, p. 13–20 , 1969.

CHAMPIGNY, M. L. Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants. **Photosynthesis research** v. 46, n. 1-2, p. 117–27.

CHAVES, A. R. M.; TEN-CATEN, A.; PINHEIRO, H. A.; RIBEIRO, A.; DAMATTA, F. M. Seasonal changes in photoprotective mechanisms of leaves from shaded and unshaded field-grown coffee (*Coffea arabica* L.) trees. **Trees - Structure and Function** v. 22, n. 3, p. 351–361 , 2008.

CLAASSEN, N.; BARBER, S. A. A Method for Characterizing the Relation between Nutrient Concentration and Flux into Roots of Intact Plants. **Plant physiology** v. 54, n. 4, p. 564–568 , 1974.

CLEMENTE, J. M.; MARTINEZ, H. E. P.; ALVES, L. C.; LARA, M. C. R. Effect of N and K doses in nutritive solution on growth , production and coffee bean size. **Revista Ceres**, v. 60, n. 2, p. 279–285, 2013.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira: Café. v. 2, n. 3, p. 58 , 2015.

CRAWFORD, N. M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The Plant cell** v. 7, n. 7, p. 859–68 , 1995.1040-4651.

CRAWFORD, N. M; GLASS, A. D. M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science** v. 3, n. 10, p. 389–395 , 1998.

DAMATTA, F. M.; LOOS, R. A.; SILVA, E. A.; LOUREIRO, M. E. Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, n. 9, p. 975–981, 2002.

DE ANGELI, A.; MONACHELLO, D.; EPHRITIKHINE, G.; et al. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. **Nature**, v. 442, n. 7105, p. 939–942, 2006.

DIAS, P. C. **Variação espacial da fotossíntese e de mecanismos de fotoproteção no cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2006, 34 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

DLUZNIEWSKA, P.; GESSLER, A.; DIETRICH, H.; TEUBER, M.; RENNENBERG, H. Nitrogen uptake and metabolism in. **New Phytologist**, n. 173, p. 279–293, 2007.

DOANE, T. A.; HORWATH, W. R. Spectrophotometric determination of nitrate with a single reagent. **Analytical Letters** v. 36, n. 12, p. 2713–2722 , 2003.

EPSTEIN, E.; HAGEN, C. E. A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. **Plant physiology** v. 27, n. 3, p. 457–474 , 1952.

FAQUIN, V. **Nutrição Mineral de Plantas**. Lavras: Gráfica Universitária/UFLA, 2005. 186 p.

GUO, J.; YANG, Y.; WANG, G.; YANG, L.; SUN, X. Ecophysiological responses of *Abies fabri* seedlings to drought stress and nitrogen supply. **Physiologia Plantarum**, v. 139, p. 335–347, 2010.

HAWKESFORD, W.; HORST, M.; KICHEY, T.; et al. Functions of Macronutrients. In: P. Marschner (Org.); **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. 3<sup>a</sup> ed, p.135–189, 2012. London: Academic Press.

HORN, D.; ERNANI, P. R.; SANGOI, L.; SCHWEITZER, C.; CASSOL, P. C. Parâmetros cinéticos e morfológicos da absorção de nutrientes em cultivares de milho com variabilidade genética contrastante. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 30, n. 1, p. 77–85, 2006.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). **Monthly export statistics - April 2015**. 2015. Disponível em < [http://www.ico.org/trade\\_statistics.asp](http://www.ico.org/trade_statistics.asp)>. Acesso em 13/01/2016.

IVASHIKINA, N.V.; SOKOLOV, O. A. Regulation of nitrate uptake and distribution in maize seedlings by nitrate, nitrite, ammonium and glutamate. **Plant Science** v. 123, n. 1-2, p. 29–37 , 1997.

KONRAD, M. L. F.; BEZERRA DA SILVA, J. A.; FURLANI, P. R.; MACHADO, E. C. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, v. 64, n. 3, p. 339–347, 2005.

LARSSON, M.; LARSSON, C.-M.; WHITFORD, P. N.; CLARKSON, D. T. Influence of osmotic stress on nitrate reductase activity in wheat (*Triticum aestivum* L.) and the role of abscisic acid. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, n. 11, p. 1265–1271, 1989. Soc Experiment Biol.

LAWLOR, D.; LEMAIRE, G.; GASTAL, F. Nitrogen, Plant Growth and Crop Yield. In: P. Lea; J.-F. Morot-Gaudry (Orgs.); **Plant Nitrogen SE - 13**. p.343–367, 2001. Springer Berlin Heidelberg.

LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. **Annals of Applied Biology** v. 149, n. November 2015, p. 243–247 , 2006.0003-4746.

LI, S. X. X.; WANG, Z.-H. H.; STEWART, B. A. Responses of Crop Plants to Ammonium and Nitrate N. **Advances in Agronomy**. v. 118, p.205–397, 2013. Elsevier.

LIMA, A. L. S.; DAMATTA, F. M.; PINHEIRO, H. A.; TOTOLA, M. R.; LOUREIRO, M. E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, n. 3, p. 239–247, 2002.

LIMA, A. M. N.; NEVES, J. C. L.; SILVA, I. R.; et al. Cinética de absorção e eficiência nutricional de K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> em plantas jovens de quatro clones de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 4, p. 903–909, 2005.

MACHADO, C.T.T; FURLANI, A. M. C. Kinetics of phosphorus uptake and root morphology of local and improved varieties of maize. **Scientia Agricola** v. 61, n. 1, p. 69–76 , 2004.

MARSCHNER, H.; MARSCHNER, P. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher**

**Plants**. 3<sup>a</sup> ed. London: Academic Press, 2012.

MARTINEZ, H. E. P.; NEVES, J. C. L. Nutrição Mineral, Calagem, Gessagem e Adubação. In: N. S. Sakiyama; H. E. P. Martinez; M. A. Tomaz; A. Borém (Orgs.); **Café Arábica: do Plantio à Colheita**. p.316, 2015. Viçosa.

MARTINEZ, H. E. P.; OLIVOS, A.; BROWN, P. H.; et al. Short-term water stress affecting NO<sub>3</sub><sup>-</sup> absorption by almond plants. **Scientia Horticulturae**, v. 197, n. 3, p. 50–56, 2015.

MARTINEZ, H. E. P.; CARVALHO, J. G.; SOUZA, R. B. Diagnose Foliar. In: A. C. Ribeiro; P. T. G. Guimarães; V. H. Alvarez V. (Orgs.); **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais - 5<sup>o</sup> Aproximação** . p.359, 1999. Viçosa.

MARTINOIA, E.; HECK, U.; WIEMKEN, A.. Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves. **Nature**, v. 289, n. 5795, p. 292–294 , 1981.

MARTINS, S. C. V.; ARAÚJO, W. L.; TOHGE, T.; FERNIE, A. R.; DAMATTA, F. M. In high-light-acclimated coffee plants the metabolic machinery is adjusted to avoid oxidative stress rather than to benefit from extra light enhancement in photosynthetic yield. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–11, 2014.

MENG, S.; ZHANG, C.; SU, L.; LI, Y.; ZHAO, Z. Nitrogen uptake and metabolism of *Populus simonii* in response to PEG-induced drought stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 123, p. 78–87, 2016.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die kinetik der invertinwirkung. **Biochem. Z.** v. 49, p. 333–369 , 1913.

MILLER, A. J.; CRAMER, M. D. Root Nitrogen Acquisition and Assimilation. **Plant and Soil** v. 274, n. 1-2, p. 1–36 , 2004.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. L. Lehninger, Principles of Biochemistry. p. 1100, 2008.

NETO, A. P.; FAVARIN, J. L.; DOS REIS, A. R.; et al. Nitrogen metabolism in coffee plants in response to nitrogen supply by fertigation. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 27, n. 1, p. 41–50, 2014.

NUNES, M. A.; RAMALHO, J. D. C.; DIAS, M. A. Effect of Nitrogen Supply on the Photosynthetic Performance of Leaves from Coffee Plants Exposed to Bright Light. **Journal of Experimental Botany** v. 44, n. 5, p. 893–899 , 1993.

NUNES-NESE, A.; FERNIE, A. R.; STITT, M. Metabolic and Signaling Aspects Underpinning the Regulation of Plant Carbon Nitrogen Interactions. **Molecular Plant** v. 3, n. 6, p. 973–996 , 2010.

OWEN, A. G.; JONES, D. L. Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. **Soil Biology and Biochemistry** v. 33, n. 4-5, p. 651–657 , 2001.

RAMALHO, J. C.; CAMPOS, P. S.; TEIXEIRA, M.; NUNES, M. A. Nitrogen

dependent changes in antioxidant system and in fatty acid composition of chloroplast membranes from *Coffea arabica* L. plants submitted to high irradiance. **Plant Science**, v. 135, p. 115–124, 1998.

RAUN, W. R.; JOHNSON, G. V. Improving nitrogen use efficiency for cereal production. **Agronomy Journal** v. 91, n. 3, p. 357–363 , 1999.

REIS, A. R.; FAVARIN, J. L.; GALLO, L. A.; et al. Nitrate Reductase and Glutamine Synthetase Activity in Coffee Leaves During Fruit. **Revista Brasileira de Ciência do. Solo**, v. 33, n. 6, p. 315–324, 2009.

RUIZ, H. A.; FERNANDES FILHO, E. I. Cinética: Software para estimar as constante  $V_{max}$  e  $K_m$  da equação de Michaelis-Menten. Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas. **Anais** . p.124–125, 1992. Piracicaba.

RUIZ, H. A. Estimativa dos Parâmetros Cinéticos  $K_m$  e  $V_{máx}$  por uma aproximação gráfico-matemática. **Revista Ceres** v. 32, n. 179, p. 79–84 , 1985.

SILVA FILHO, J. B. **Índices de nitrogênio na planta e produtividade de tubérculos de batata-semente em sistema hidropônico de três fases**. 2011, 89 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, A. C. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

DA SILVA, L.; MARCHIORI, P. E. R.; MACIEL, C. P.; MACHADO, E. C.; RIBEIRO, R. V. Fotossíntese, relações hídricas e crescimento de cafeeiros jovens em relação à disponibilidade de fósforo. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 45, n. 9, p. 965–972, 2010.

SILVA, L.; *et al.* Fotossíntese, relações hídricas e crescimento de cafeeiros jovens em relação à disponibilidade de fósforo. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira** v. 45, n. 9, p. 965–972 , 2010.

SOUZA, B. P. **Aspectos fisiológicos e moleculares da absorção e metabolismo do nitrogênio e do déficit hídrico em café arábica**. 2015, 78 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

STITT, M. Nitrate regulation of metabolism and growth. **Current Opinion in Plant Biology** v. 2, p. 178–186 , 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3º ed. Sinauer Associates, 2010.

VALARINI, V.; BATAGLIA, O. C.; FAZUOLI, L. C. Macronutrientes em folhas e frutos de cultivares de café arábica de porte baixo. **Bragantia** v. 64, n. 4, p. 661–672 , 2005.

VILELLA, F. A.; FILHO, L. D.; SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietilenoglicol 6.000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 26, n. 99, p. 1957–1968 , 1991.

VITOUSEK, P. M.; *et al.* Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. **Ecological Applications** v. 7, n. 3, p. 737–750 , 1997.