

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

**ANÁLISE SISTÊMICA DA FOTOSSÍNTESE DE CULTIVARES DE  
*COFFEA ARABICA* L. EM CONDIÇÕES DE CAMPO E DE  
LABORATÓRIO**

**- LÍVIA HAIK GUEDES DE CAMARGO BORTOLIN -**

**ORIENTADOR: DR. CARLOS HENRIQUE B. DE A. PRADO  
CO-ORIENTADOR: DR. GUSTAVO MAIA SOUZA**

SÃO CARLOS  
ESTADO DE SÃO PAULO – BRASIL  
MARÇO – 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

**ANÁLISE SISTÊMICA DA FOTOSSÍNTESE DE CULTIVARES DE  
*COFFEA ARABICA* L. EM CONDIÇÕES DE CAMPO E DE  
LABORATÓRIO**

**- LÍVIA HAIK GUEDES DE CAMARGO BORTOLIN -**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais, sob a orientação do professor Dr. Carlos Henrique Britto de Assis Prado e co-orientação do professor Dr. Gustavo Maia Souza.

SÃO CARLOS  
ESTADO DE SÃO PAULO – BRASIL  
MARÇO – 2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B739as

Bortolin, Livia Haik Guedes de Camargo.

Análise sistêmica da fotossíntese de cultivares de *Coffea arabica* L. em condições de campo e de laboratório / Livia Haik Guedes de Camargo Bortolin. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

158 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Fisiologia vegetal. 2. Análise de componentes principais. 3. Potencial hídrico foliar. 4. Trocas gasosas. 5. Redes de conectância. I. Título.

CDD: 581.1 (20<sup>a</sup>)

Lívia Haik Guedes de Camargo Bortolin

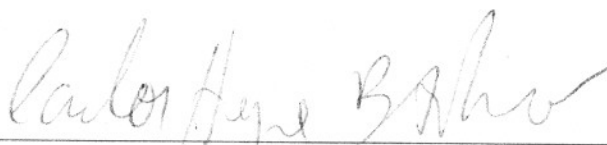
**Análise Sistêmica da Fotossíntese de Cultivares de *Coffea arabica* L. em Condições de Campo e de Laboratório**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 03 de março de 2008

BANCA EXAMINADORA

Presidente



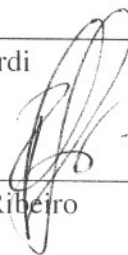
Prof. Dr. Carlos Henrique B. de Assis Prado  
(Orientador)

1º Examinador



Prof. Dra. Ana Teresa Lombardi  
PPGERN/UFSCar

2º Examinador



Prof. Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro  
IAC/Campinas-SP

  
Profa. Dra. Dalva Maria da Silva Matos  
Coordenadora  
PPGERN/UFSCar

À minha família,

Meu marido, Carlos Henrique, pelo amor, afeto, paciência e apoio que me incentivaram nessa caminhada.

Meu filho, Henrique, pela alegria e ternura que seus olhos e seu sorriso me proporcionam.

Meus pais, Saranita e João Otavio, por serem os meus exemplos de vida e por tudo o que fizeram e fazem pela minha felicidade.

Meus irmãos, Rafael e João, sempre ótimas companhias.

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Dr. Carlos Henrique Britto de Assis Prado pelo aprendizado, pelos seus conselhos, paciência e amizade.

Ao meu co-orientador Dr. Gustavo Maia Souza pelo apoio e pelas suas brilhantes colocações.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto e pela concessão da bolsa de mestrado.

*“Não existe vento favorável para aquele que não sabe para onde vai.”*

(Arthur Schopenhauer)

# SUMÁRIO

## SUMMARY

<b>Resumo.....</b>	<b>20</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>22</b>
<b>Principais Resultados.....</b>	<b>24</b>
<b>Main Results.....</b>	<b>26</b>
<b>I. Autonomia e modulação da rede da fotossíntese e das relações hídricas de <i>Coffea arabica</i>.....</b>	<b>28</b>
Resumo.....	28
1. Introdução.....	29
2. Materiais e Métodos.....	31
2.1. Área e período de estudo, pluviosidade antes dos dias das medidas, total de horas de brilho solar durante as medidas e material vegetal.....	31
2.2. Trocas gasosas foliares, potencial hídrico foliar e medidas micrometeorológicas durante os dias claro e nublado.....	31
2.3. Fotossíntese líquida ( $P_N$ ) em função da densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD).....	32
2.4. Valor integralizado da fotossíntese líquida no curso diário e a fotossíntese líquida diária potencial e realizada.....	34
2.5. Conectância da rede, autonomia e análise de componentes principais.....	35
3. Resultados.....	39
4. Discussão.....	49
<b>I. Autonomy and network modulation of photosynthesis and water relations in <i>Coffea arabica</i> .....</b>	<b>53</b>
Abstract.....	53
1. Introduction.....	54
2. Materials and Methods.....	56
2.1. Area and period of study, rainfall before the days of measurements, total hours of bright sunshine during measurements and plant materials.....	56
2.2. Leaf gas exchange, leaf water potential and micrometeorological measurements during clear and cloudy days.....	56
2.3. Net photosynthesis ( $P_N$ ) as a function of photosynthetic photon flux density (PPFD).....	57
2.4. Integrated value of net photosynthesis from daily course and the potential and actual net photosynthesis on daily basis.....	58
2.5. Connectance network, autonomy, and principal components analysis.....	59
3. Results.....	63
4. Discussion.....	73
<b>Referências bibliográficas (References).....</b>	<b>76</b>



<b>II. Eficiência de carboxilação, taxa de transporte de elétrons e capacidade fotossintética afetados pela temperatura foliar em plantas jovens de <i>Coffea arabica</i>.....</b>	<b>78</b>
Resumo.....	78
1. Introdução.....	79
2. Materiais e Métodos.....	83
2.1. Material vegetal e condições de crescimento.....	83
2.2. Tratamentos térmicos em incubadora e sistema de isolamento térmico das raízes.....	83
2.3. Fotossíntese líquida ( $P_N$ ) em função da densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD).....	84
2.4. Eficiência quântica aparente ( $\Phi$ ) na fase inicial, e condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração foliar (E) e concentração intercelular ( $C_i$ ) por externa ( $C_e$ ) de $CO_2$ ( $C_i/C_e$ ) na fase de saturação nas curvas de $P_N$ -PPFD.....	85
2.5. Taxa de transporte de elétrons (ETR) entre PSII-PSI em função de PPFD.....	86
2.6. Fotossíntese líquida ( $P_N$ ) em função da concentração intercelular ( $C_i$ ) de $CO_2$ .....	87
2.7. Limitações estomática ( $L_s$ ) e mesofílica ( $L_m$ ) da fotossíntese líquida.....	88
2.8. Conectância da rede e análise de componentes principais.....	88
3. Resultados.....	92
3.1. Fotossíntese líquida ( $P_N$ ) e taxa de transporte de elétrons (ETR) em função da densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD).....	92
3.2. Condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração foliar (E) e concentração intercelular ( $C_i$ ) por externa ( $C_e$ ) de $CO_2$ ( $C_i/C_e$ ) em função da temperatura foliar.....	97
3.3. Fotossíntese líquida ( $P_N$ ) em função da concentração intercelular de $CO_2$ ( $C_i$ ).....	99
3.4. Conectância da rede e análise de componentes principais.....	102
4. Discussão.....	107
<b>II. Carboxylation efficiency, electron transport rate and photosynthetic capacity affected by leaf temperature in saplings of <i>Coffea arabica</i>.....</b>	<b>116</b>
Abstract.....	116
1. Introduction.....	117
2. Materials and Methods.....	120
2.1. Plant material and growth conditions.....	120
2.2. Thermal treatments in incubator and thermal isolation of root system.....	120
2.3. Net photosynthesis ( $P_N$ ) as a function of photosynthetic photons flux density (PPFD).....	121
2.4. Apparent quantum efficiency ( $\Phi$ ) at initial phase, and stomatal conductance ( $g_s$ ), leaf transpiration (E), and intercellular ( $C_i$ ) per external ( $C_e$ ) $CO_2$ concentration ( $C_i/C_e$ ) at saturation phase in $P_N$ -PPFD curves.....	122
2.5. Electron transport rate (ETR) between PSII-PSI as a function of PPFD.....	122
2.6. Net photosynthesis ( $P_N$ ) as a function of intercellular ( $C_i$ ) $CO_2$ concentration.....	124
2.7. Stomatal ( $L_s$ ) and mesophyll ( $L_m$ ) limitations of net photosynthesis.....	125
2.8. Network connectance and principal component analysis.....	125
3. Results.....	129
3.1. Net photosynthesis ( $P_N$ ) and electron transport rate (ETR) as a function of photosynthetic photon flux density (PPFD).....	129
3.2. Stomatal conductance ( $g_s$ ), leaf transpiration (E), and intercellular ( $C_i$ ) per external ( $C_e$ ) $CO_2$ concentration ( $C_i/C_e$ ) as a function of leaf temperature.....	134

3.3. Net photosynthesis ( $P_N$ ) as a function of intercellular $CO_2$ concentration ( $C_i$ ).....	136
3.4. Network connectance and principal components analysis.....	139
4. Discussion.....	144
<b>Referências bibliográficas (References).....</b>	<b>152</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>155</b>
<b>Conclusions.....</b>	<b>157</b>

## LISTA DE TABELAS

### I. Autonomia e modulação da rede da fotossíntese e das relações hídricas de *Coffea arabica*

**Tabela 1.** Valores da fotossíntese líquida diária potencial ( $PDP_N$ ) e realizada ( $ADP_N$ ) ( $\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ ) de três cultivares de *Coffea arabica* francos e enxertados (Catuaí Vermelho, Icatu Amarelo e Obatã) crescendo em condições de campo na estação chuvosa durante os dias claro e nublado. São mostrados os valores de conectância global ( $C_g$ ) e de autonomia ( $At$ ) obtidos ao longo dos cursos diurnos.....46

### II. Eficiência de carboxilação, taxa de transporte de elétrons e capacidade fotossintética afetados pela temperatura foliar em plantas jovens de *Coffea arabica*

**Tabela 1.** Valores de conectância global da rede como um todo ( $C_{g_w}$ ), da sub-rede construída com dados das curvas de  $P_N$ -PPFD ( $C_{g_{PPFD}}$ ), e da sub-rede construída com os dados das curvas de  $P_N$ - $C_i$  ( $C_{g_{CO_2}}$ ) para *Coffea arabica* L. cultivares Catuaí Vermelho, Obatã e Ouro Verde, em temperaturas reduzidas (17-23°C) e elevadas (26-32°C). Os números entre parênteses denotam a diferença entre temperaturas reduzidas e elevadas.....104

# LISTA DE FIGURAS

## I. Autonomia e modulação da rede da fotossíntese e das relações hídricas de *Coffea arabica*

- Figura 1.** Topologia de uma rede representando as interações entre as variáveis de trocas gasosas foliares e potencial hídrico foliar ( $\Psi$ ). As linhas retas conectando componentes pareados representam relação próxima e recíproca entre variáveis fisiológicas utilizadas para determinar a conectância da rede nos dias claro e nublado. Cada seta no topo representa uma variável ambiental influenciando a força de conexão entre os componentes da rede. PPF<sub>D</sub> = densidade do fluxo de fótons fotossintéticos, T<sub>air</sub> = temperatura do ar, VPD<sub>air</sub> = déficit de pressão de vapor do ar, g<sub>s</sub> = condutância estomática ao vapor d'água, C<sub>i</sub>/C<sub>e</sub> = concentração intercelular (C<sub>i</sub>) por externa (C<sub>e</sub>) de CO<sub>2</sub>, P<sub>N</sub> = fotossíntese líquida, E = transpiração foliar, ITE = eficiência instantânea da transpiração e T<sub>leaf</sub> = temperatura foliar.....37
- Figura 2.** Fotossíntese líquida (P<sub>N</sub>) em função da densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) em folhas de *Coffea arabica* franco (○) e enxertado (●) em *Coffea canephora* durante o verão (Março de 2002, estação chuvosa). Duas curvas foram sobrepostas em cada painel antes dos ajustes. Os valores da fotossíntese líquida máxima (P<sub>Nmax</sub>, μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) e do ponto de saturação luminosa (I<sub>s</sub>, μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) estão demonstrados abaixo em cada painel.....40
- Figura 3.** Cursos diurnos da densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD), temperatura do ar (T<sub>air</sub>) e déficit de pressão de vapor do ar (VPD<sub>air</sub>) nos dias claro (símbolos abertos) e nublado (símbolos sólidos) na estação chuvosa. Os símbolos representam médias e a barra representa o erro-padrão obtido nos cultivares de *Coffea arabica* Catuaí Vermelho (□,■), Icatu Amarelo (○,●) e Obatã (Δ,▲) enxertados em *Coffea canephora*.....41
- Figura 4.** Variáveis das trocas gasosas entre folha-atmosfera medidas em três cultivares de *Coffea arabica* crescendo em condições de campo na estação chuvosa nos dias claro (símbolos abertos) e nublado (símbolos sólidos). Os símbolos representam médias e a barra representa o erro-padrão obtido nos cultivares de *Coffea arabica* Catuaí Vermelho (□,■), Icatu Amarelo (○,●) e Obatã (Δ,▲) enxertados em *Coffea canephora*. P<sub>N</sub> = fotossíntese líquida, g<sub>s</sub> = condutância estomática ao vapor d'água, E = transpiração foliar.....43
- Figura 5.** Temperatura foliar (T<sub>leaf</sub>), eficiência instantânea da transpiração (ITE), concentração intercelular (C<sub>i</sub>) por externa (C<sub>e</sub>) de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>/C<sub>e</sub>) e potencial hídrico foliar ( $\Psi$ ) em três cultivares de *Coffea arabica* crescendo em condições de campo na estação chuvosa durante os dias claro (símbolos abertos) e nublado (símbolos sólidos). Os símbolos representam médias e a barra representa o erro-padrão obtido nos cultivares de *Coffea arabica* Catuaí Vermelho (□,■), Icatu Amarelo (○,●) e Obatã (Δ,▲) enxertados sobre *Coffea canephora*.....44
- Figura 6.** Análise dos componentes principais das trocas gasosas foliares e potencial hídrico foliar ( $\Psi$ ) obtidos durante cursos diurnos em três cultivares de *Coffea arabica*. Cada painel representa um horário do dia. Dias claro e nublado estão representados por símbolos abertos (○) e sólidos (●), respectivamente. Cada símbolo indica um cultivar independente do tratamento (franco e enxertado). Os vetores (linhas retas de cor cinza)

representam os parâmetros ambientais ou fisiológicos mais importantes. PPFDF = densidade do fluxo de fótons fotossintéticos,  $T_{air}$  = temperatura do ar,  $VPD_{air}$  = déficit de pressão de vapor do ar,  $T_{leaf}$  = temperatura foliar,  $P_N$  = fotossíntese líquida,  $g_s$  = condutância estomática ao vapor d'água,  $E$  = transpiração foliar, ITE = eficiência instantânea da transpiração e  $C_i/C_e$  = concentração  $CO_2$  intercelular ( $C_i$ ) por externa ( $C_e$ ) de  $CO_2$  .....48

## II. Eficiência de carboxilação, taxa de transporte de elétrons e capacidade fotossintética afetados pela temperatura foliar em plantas jovens de *Coffea arabica*

**Figura 1.** Topologia da rede representando interações dos processos fotossintéticos fotoquímicos e bioquímicos. No lado esquerdo estão os parâmetros medidos sob concentração de  $CO_2$  atmosférica ( $355 \mu mol mol^{-1}$ ) obtidos nas curvas  $P_N$ -PPFD e no lado direito os parâmetros medidos sob  $CO_2$  mudando de  $1500$  a  $10 \mu mol mol^{-1}$  nas curvas  $P_N$ - $C_i$ . Ambos os lados estão conectados pela eficiência aparente de carboxilação ( $\epsilon$ ). No lado esquerdo:  $\Phi$  = eficiência quântica aparente,  $ETR_{max}$  = taxa máxima de transporte de elétrons entre PSII e PSI,  $I_c$  = ponto de compensação luminosa,  $I_s$  = ponto de saturação luminosa,  $R_d$  = respiração no escuro,  $P_{Nmax}$  = fotossíntese líquida máxima. No lado direito:  $P_{NmaxCO_2}$  = capacidade fotossintética,  $C_s$  = ponto de saturação de  $CO_2$ ,  $\Gamma_{CO_2}$  = ponto de compensação de  $CO_2$ ,  $L_m$  = limitação mesofílica da fotossíntese,  $L_s$  = limitação estomática da fotossíntese.....90

**Figura 2.** Fotossíntese líquida ( $P_N$ , símbolos abertos) e taxa de transporte de elétrons ( $ETR$ , símbolos sólidos) em função da densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) sob concentração atmosférica de  $CO_2$  ( $355 \mu mol mol^{-1}$ ) em cultivares de *Coffea arabica* (Catuaí Vermelho  $\square$ ,  $\blacksquare$ ; Obatã  $\circ$ ,  $\bullet$ ; e Ouro Verde  $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ) depois de 14 horas sob 17 (painéis superiores), 20, 23, 26, 29 e  $32^\circ C$  (painéis subsequentes).....93

**Figura 3.** Valores de fotossíntese líquida máxima ( $P_{Nmax}$ ), taxa máxima de transporte de elétrons entre PSII e PSI ( $ETR_{max}$ ), ponto de compensação luminosa ( $I_c$ ), ponto de saturação luminosa ( $I_s$ ), eficiência quântica aparente ( $\Phi$ ) e respiração no escuro ( $R_d$ ) de *Coffea arabica* (cultivares Catuaí Vermelho  $\blacksquare$ , Obatã  $\bullet$  e Ouro Verde  $\blacktriangle$ ) depois de 14 horas sob 17, 20, 23, 26, 29 e  $32^\circ C$ .....94

**Figura 4.** Razão entre a taxa máxima de transporte de elétrons entre PSII e PSI ( $ETR_{max}$ ) e a fotossíntese líquida máxima ( $P_{Nmax}$ ) em função da temperatura foliar nos cultivares de *Coffea arabica* Catuaí Vermelho ( $\square$ ), Obatã ( $\circ$ ) e Ouro Verde ( $\Delta$ ). Os dados foram coletados depois de 14 horas na incubadora a 17, 20, 23, 26, 29 ou  $32^\circ C$  em folhas de plantas jovens.....96

**Figura 5.** Condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração foliar ( $E$ ) e concentrações intercelular ( $C_i$ ) por externa ( $C_e$ ) de  $CO_2$  ( $C_i/C_e$ ) em folhas de *Coffea arabica*, cultivares Catuaí Vermelho ( $\square$ ), Obatã ( $\circ$ ) e Ouro Verde ( $\Delta$ ) sob densidade do fluxo de fótons fotossintéticos maiores que  $1200 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  e concentração atmosférica de  $CO_2$  ( $355 \mu mol mol^{-1}$ ) em função da temperatura foliar. Cada símbolo representa a média ( $32 < n < 43$ ) e as barras o erro padrão.....98

**Figura 6.** Fotossíntese líquida ( $P_N$ ) sob densidade do fluxo de fótons fotossintéticos saturante ( $1200 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ ) em função da concentração intercelular de  $CO_2$  ( $C_i$ ), em folhas de cultivares de *Coffea arabica* (Catuaí Vermelho  $\square$ ; Obatã  $\circ$ ; e Ouro Verde  $\Delta$ )

depois de 14 horas sob 17 (painéis superiores), 20, 23, 26, 29 e 32°C (painéis subseqüentes).....100

**Figura 7.** Capacidade fotossintética ( $P_{N_{maxCO_2}}$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), eficiência aparente de carboxilação ( $\epsilon$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), limitações estomática ( $L_s$ , %) e mesofílica ( $L_m$ , %) da fotossíntese líquida, ponto de compensação de  $\text{CO}_2$  ( $\Gamma_{\text{CO}_2}$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) e ponto de saturação de  $\text{CO}_2$  ( $C_s$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) em folhas de *Coffea arabica*, cultivares Catuaí Vermelho (■), Obatã (●) e Ouro Verde (▲) depois de 14 horas sob 17, 20, 23, 26, 29 e 32°C.....101

**Figura 8.** Análise de componentes principais das trocas gasosas foliares obtidas sob temperaturas elevadas (símbolos sólidos) e reduzidas (símbolos abertos) em três cultivares de *Coffea arabica* (Catuaí Vermelho □, ■; Obatã, ○, ●; e Ouro Verde Δ, ▲). As temperaturas estão indicadas acima de cada símbolo. Os vetores (linhas cinza) representam as principais variáveis fisiológicas influenciando a distribuição dos símbolos.  $P_{N_{max}}$  = fotossíntese líquida máxima,  $P_{N_{maxCO_2}}$  = capacidade fotossintética,  $\epsilon$  = eficiência aparente de carboxilação,  $L_m$  = limitação mesofílica da fotossíntese líquida,  $\Phi$  = eficiência quântica aparente,  $I_s$  = ponto de saturação luminosa,  $I_c$  = ponto de compensação luminosa,  $C_s$  = ponto de saturação de  $\text{CO}_2$  e  $\Gamma_{\text{CO}_2}$  = ponto de compensação de  $\text{CO}_2$ .....106

# LIST OF TABLES

## I. Autonomy and network modulation of photosynthesis and water relations in *Coffea arabica*

**Table 1.** Values of potential ( $PDP_N$ ) and actual ( $ADP_N$ ) daily net photosynthesis ( $\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ ) of three grafted and non-grafted *Coffea arabica* cultivars (Catuaí Vermelho, Icatu Amarelo and Obatã) growing under field conditions in wet season during clear and cloudy days. Values of global connectance ( $C_g$ ) and autonomy ( $A_t$ ) obtained along daily courses are shown.....70

## II. Carboxylation efficiency, electron transport rate and photosynthetic capacity affected by leaf temperature in saplings of *Coffea arabica*

**Table 1.** Global connectance values of the whole network ( $C_{g_w}$ ), of sub-network built with data from  $P_N$ -PPFD curves ( $C_{g_{PPFD}}$ ), and sub-network built with data from  $P_N$ - $C_i$  curves ( $C_{g_{CO_2}}$ ) for *Coffea arabica* L. cultivars Catuaí Vermelho, Obatã, and Ouro Verde, at reduced (17-23°C) and elevated (26-32°C) temperatures. Numbers in parenthesis denote the difference between reduced and elevated temperatures.....141

# LIST OF FIGURES

## I. Autonomy and network modulation of photosynthesis and water relations in *Coffea arabica*

- Figure 1.** Topology of a network representing the interactions of leaf gas exchange and leaf water potential ( $\Psi$ ) variables. Straight lines connecting paired components denote close and reciprocal relationship between physiological variables utilized to determine the network connectance in clear and cloudy days. Each arrow on the top represents one environmental parameter influencing the connection strength between network components. PPFDF= photosynthetic photon flux density,  $T_{\text{air}}$  = air temperature,  $\text{VPD}_{\text{air}}$  = air vapor pressure deficit,  $g_s$  = stomatal conductance to water vapor,  $C_i/C_e$  = intercellular ( $C_i$ ) per external ( $C_e$ )  $\text{CO}_2$  concentration,  $P_N$  = net photosynthesis,  $E$  = leaf transpiration, ITE = instantaneous transpiration efficiency,  $T_{\text{leaf}}$  = leaf temperature.....61
- Figure 2.** Net photosynthesis ( $P_N$ ) as a function of photosynthetic photon flux density (PPFD) on leaves of non-grafted ( $\circ$ ) and grafted ( $\bullet$ ) *Coffea arabica* on *Coffea canephora* during summer (March 2002, rainy season). Two curves were merged at each panel before adjustments. The values of maximum net photosynthesis ( $P_{N\text{max}}$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) and light saturation point ( $I_s$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) are shown at the bottom of each panel.....64
- Figure 3.** Diurnal courses of photosynthetic photon flux density (PPFD), air temperature ( $T_{\text{air}}$ ) and air vapor pressure deficit ( $\text{VPD}_{\text{air}}$ ) on clear (open symbols) and cloudy (solid symbols) days in wet season. Symbol denotes mean and bar represents standard error obtained on *Coffea arabica* cultivars Catuaí Vermelho ( $\square, \blacksquare$ ), Icatu Amarelo ( $\circ, \bullet$ ) and Obatã ( $\Delta, \blacktriangle$ ) grafted on *Coffea canephora*.....65
- Figure 4.** Leaf-atmosphere gas exchange variables measured on three *Coffea arabica* cultivars growing under field conditions in wet season on clear (open symbols) and on cloudy (solid symbols) days. Symbol denotes mean and bar represents standard error obtained on *Coffea arabica* cultivars Catuaí Vermelho ( $\square, \blacksquare$ ), Icatu Amarelo ( $\circ, \bullet$ ) and Obatã ( $\Delta, \blacktriangle$ ) grafted on *Coffea canephora*.  $P_N$  = net photosynthesis,  $g_s$  = stomatal conductance,  $E$  = leaf transpiration.....67
- Figure 5.** Leaf temperature ( $T_{\text{leaf}}$ ), instantaneous transpiration efficiency (ITE), intercellular ( $C_i$ ) per external ( $C_e$ )  $\text{CO}_2$  concentration ( $C_i/C_e$ ), and leaf water potential ( $\Psi$ ) in three *Coffea arabica* cultivars growing under field conditions in wet season during clear (open symbols) and cloudy (solid symbols) days. Symbol denotes mean and bar represents the standard errors obtained on *Coffea arabica* cultivars Catuaí Vermelho ( $\square, \blacksquare$ ), Icatu Amarelo ( $\circ, \bullet$ ), and Obatã ( $\Delta, \blacktriangle$ ) grafted on *Coffea canephora*.....68
- Figure 6.** Principal component analysis of leaf gas exchange and leaf water potential ( $\Psi$ ) obtained during daily courses in three *Coffea arabica* cultivars. Each panel represents one time of the day. Clear and cloudy days are represented by open ( $\circ$ ) and solid ( $\bullet$ ) symbols, respectively. Each symbol indicates one cultivar irrespective the treatment (grafted or non-grafted). Vector (grey straight line) represents most important environmental and physiological parameters. PPFDF = photosynthetic photon flux density,  $\text{VPD}_{\text{air}}$  = air vapour pressure deficit,  $T_{\text{air}}$  = air temperature,  $T_{\text{leaf}}$  = leaf temperature,  $P_N$  = net photosynthesis,  $g_s$  = stomatal conductance,  $E$  = leaf transpiration, ITE = instantaneous transpiration efficiency,  $C_i/C_e$  = intercellular ( $C_i$ ) per external ( $C_e$ )



## II. Carboxylation efficiency, electron transport rate and photosynthetic capacity affected by leaf temperature in saplings of *Coffea arabica*

**Figure 1.** Topology of network representing interactions of photochemical and biochemical photosynthetic processes. On the left side there are the parameters measured under atmospheric CO<sub>2</sub> concentration (355 μmol mol<sup>-1</sup>) obtained in P<sub>N</sub>-PPFD curves and on the right side the parameters measured under CO<sub>2</sub> ranged from 1500 to 10 μmol mol<sup>-1</sup> in P<sub>N</sub>-C<sub>i</sub> curves. Both sides are connected by apparent carboxylation efficiency (ε). On left side: Φ = apparent quantum efficiency, ETR<sub>max</sub> = maximum electron transport rate between PSII and PSI, I<sub>c</sub> = light compensation point, I<sub>s</sub> = light saturation point, R<sub>d</sub> = dark respiration, P<sub>Nmax</sub> = maximum net photosynthesis. On right side: P<sub>NmaxCO<sub>2</sub></sub> = photosynthetic capacity, C<sub>s</sub> = CO<sub>2</sub> saturation point, Γ<sub>CO<sub>2</sub></sub> = CO<sub>2</sub> compensation point, L<sub>m</sub> = mesophyll limitation of photosynthesis, L<sub>s</sub> = stomatal limitation of photosynthesis.....127

**Figure 2.** Net photosynthesis (P<sub>N</sub>, open symbols) and electron transport rate (ETR, solid symbols) as a function of photosynthetic photon flux density (PPFD) under atmospheric CO<sub>2</sub> concentration (355 μmol mol<sup>-1</sup>) in *Coffea arabica* cultivars (Catuaí Vermelho □, ■; Obatã ○, ●; and Ouro Verde Δ, ▲) after 14 hours under 17 (top panels), 20, 23, 26, 29, and 32°C (subsequent panels).....130

**Figure 3.** Values of maximum net photosynthesis (P<sub>Nmax</sub>), maximum electron transport rate between PSII and PSI (ETR<sub>max</sub>), light compensation point (I<sub>c</sub>), light saturation point (I<sub>s</sub>), apparent quantum efficiency (Φ), and dark respiration (R<sub>d</sub>) of *Coffea arabica* (cultivars Catuaí Vermelho ■, Obatã ●, and Ouro Verde ▲) after 14 hours under 17, 20, 23, 26, 29, and 32°C.....131

**Figure 4.** Ratio between maximum electron transport rate between PSII and PSI (ETR<sub>max</sub>) and maximum net photosynthesis (P<sub>Nmax</sub>) as a function of leaf temperature in *Coffea arabica* cultivars Catuaí Vermelho (□), Obatã (○) and Ouro Verde (Δ). Data were collected after 14 hours in incubator at 17, 20, 23, 26, 29, or 32°C on leaves of saplings.....133

**Figure 5.** Stomatal conductance (g<sub>s</sub>), leaf transpiration (E) and intercellular (C<sub>i</sub>) per external (C<sub>e</sub>) CO<sub>2</sub> concentration in leaves of *Coffea arabica*, cultivars Catuaí Vermelho □, Obatã ○, and Ouro Verde Δ under photosynthetic photon flux density higher than 1200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and regular atmospheric CO<sub>2</sub> concentration (355 μmol mol<sup>-1</sup>) as a function of leaf temperature. Each symbol represents mean (32<n<43) and bars the standard error.....135

**Figure 6.** Net photosynthesis (P<sub>N</sub>) under saturated photosynthetic photon flux density (1200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) as a function of intercellular (C<sub>i</sub>) CO<sub>2</sub> concentration, on leaves of *Coffea arabica* cultivars (Catuaí Vermelho □, ■; Obatã ○, ●; and Ouro Verde Δ, ▲) after 14 hours under 17 (top panels), 20, 23, 26, 29, and 32°C (subsequent panels).....137

**Figure 7.** Photosynthetic capacity (P<sub>NmaxCO<sub>2</sub></sub>, μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), apparent carboxylation efficiency (ε, mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), stomatal (L<sub>s</sub>, %) and mesophyll (L<sub>m</sub>, %) limitations of photosynthesis, CO<sub>2</sub> compensation point (Γ<sub>CO<sub>2</sub></sub>, μmol mol<sup>-1</sup>), and CO<sub>2</sub> saturation point (C<sub>s</sub>, μmol mol<sup>-1</sup>) on leaves of *Coffea arabica*, cultivars Catuaí Vermelho (■), Obatã (●),

and Ouro Verde (▲) after 14 hours under 17, 20, 23, 26, 29, and 32°C.....138

**Figure 8.** Principal component analyses of leaf gas exchange obtained under elevated (solid symbols) and reduced (open symbols) temperatures in three *Coffea arabica* cultivars (Catuaí Vermelho □, ■; Obatã, ○, ●; and Ouro Verde Δ, ▲). Temperatures are indicated above each symbol. Vectors (grey lines) represent main physiological variables influencing symbols distribution.  $P_{Nmax}$  = maximum net photosynthesis,  $P_{NmaxCO_2}$  = photosynthetic capacity,  $\epsilon$  = apparent carboxylation efficiency,  $L_m$  = mesophyll limitation of net photosynthesis,  $\Phi$  = apparent quantum efficiency,  $I_s$  = light saturation point,  $I_c$  = light compensation point,  $C_s$  = CO<sub>2</sub> saturation point, and  $\Gamma_{CO_2}$  = CO<sub>2</sub> compensation point.....143

## LISTA DE ABREVIACÕES

- **PPFD**: densidade do fluxo de fótons fotossintéticos
- **T<sub>air</sub>**: temperatura do ar
- **VPD<sub>air</sub>**: déficit de pressão de vapor do ar
- **g<sub>s</sub>**: condutância estomática ao vapor d'água
- **C<sub>i</sub>/C<sub>e</sub>**: concentração intercelular (C<sub>i</sub>) por externa (C<sub>e</sub>) de CO<sub>2</sub>
- **P<sub>N</sub>**: fotossíntese líquida
- **E**: transpiração foliar
- **ITE**: eficiência instantânea da transpiração
- **T<sub>leaf</sub>**: temperatura foliar
- **ADP<sub>N</sub>**: fotossíntese líquida diária realizada
- **PDP<sub>N</sub>**: fotossíntese líquida diária potencial
- **ε**: eficiência aparente de carboxilação
- **Φ**: eficiência quântica aparente
- **ETR<sub>max</sub>**: máxima taxa aparente de transporte de elétrons entre PSII e PSI
- **I<sub>c</sub>**: ponto de compensação luminosa
- **I<sub>s</sub>**: ponto de saturação luminosa
- **R<sub>d</sub>**: respiração no escuro
- **P<sub>Nmax</sub>**: fotossíntese líquida máxima
- **P<sub>NmaxCO<sub>2</sub></sub>**: capacidade fotossintética
- **C<sub>s</sub>**: ponto de saturação de CO<sub>2</sub>
- **Γ<sub>CO<sub>2</sub></sub>**: ponto de compensação de CO<sub>2</sub>
- **L<sub>m</sub>**: limitação mesofílica da fotossíntese
- **L<sub>s</sub>**: limitação estomática da fotossíntese
- **C<sub>g</sub>**: conectância global
- **At**: autonomia
- **C<sub>g<sub>w</sub></sub>**: conectância global da rede como um todo
- **C<sub>gPPFD</sub>**: conectância global da sub-rede construída com dados das curvas P<sub>N</sub>-PPFD
- **C<sub>gCO<sub>2</sub></sub>**: conectância global da sub-rede construída com dados das curvas P<sub>N</sub>-C<sub>i</sub>

## LIST OF ABBREVIATIONS

- **PPFD**: photosynthetic photon flux density
- **T<sub>air</sub>**: air temperature
- **VPD<sub>air</sub>**: air vapor pressure deficit
- **g<sub>s</sub>**: stomatal conductance to water vapor
- **C<sub>i</sub>/C<sub>e</sub>**: intercellular (C<sub>i</sub>) per external (C<sub>e</sub>) CO<sub>2</sub> concentration
- **P<sub>N</sub>**: net photosynthesis
- **E**: leaf transpiration
- **ITE**: instantaneous transpiration efficiency
- **T<sub>leaf</sub>**: leaf temperature
- **ADP<sub>N</sub>**: actual daily net photosynthesis
- **PDP<sub>N</sub>**: potential daily net photosynthesis
- **ε**: apparent carboxylation efficiency
- **Φ**: apparent quantum efficiency
- **ETR<sub>max</sub>**: maximum electron transport rate between PSII and PSI
- **I<sub>c</sub>**: light compensation point
- **I<sub>s</sub>**: light saturation point
- **R<sub>d</sub>**: dark respiration
- **P<sub>Nmax</sub>**: maximum net photosynthesis
- **P<sub>NmaxCO<sub>2</sub></sub>**: photosynthetic capacity
- **C<sub>s</sub>**: CO<sub>2</sub> saturation point
- **Γ<sub>CO<sub>2</sub></sub>**: CO<sub>2</sub> compensation point
- **L<sub>m</sub>**: mesophyll limitation of photosynthesis
- **L<sub>s</sub>**: stomatal limitation of photosynthesis
- **C<sub>g</sub>**: global connectance
- **At**: autonomy
- **C<sub>g<sub>w</sub></sub>**: global connectance of the whole network
- **C<sub>gPPFD</sub>**: global connectance of the sub-network built with data from P<sub>N</sub>-PPFD curves
- **C<sub>gCO<sub>2</sub></sub>**: global connectance of the sub-network built with data from P<sub>N</sub>-C<sub>i</sub> curves

## RESUMO

No primeiro capítulo, a análise da conectância global ( $C_g$ ) da rede de fotossíntese e a análise de componentes principais (PCA) indicaram, respectivamente, que a diminuição da fotossíntese líquida ( $P_N$ ) foi acompanhada por reduzida autonomia com relação ao ambiente de todos os cultivares e reduzida amplitude da variação de respostas de todas as variáveis fisiológicas da rede sob dia claro em relação ao dia nublado. A elevada sincronização entre os parâmetros fisiológicos e meteorológicos (reduzida autonomia dos cultivares com relação ao ambiente) no dia claro foi considerada a principal causa da diminuição de  $P_N$ . Essa conclusão foi corroborada por resultados provenientes da PCA, a qual mostrou um contraste entre os vetores fisiológicos e meteorológicos, reduzida variabilidade de comportamento dos indivíduos enxertados e francos no dia claro e uma distribuição dos símbolos dos dias claros e nublados próximos, respectivamente, dos vetores meteorológicos e fisiológicos. Portanto, a autonomia é claramente um indicador da condição de estresse de *Coffea arabica* em dias claros ou nublados sob condições de campo na estação de crescimento.

No segundo capítulo, plantas jovens de *C. arabica* apresentaram maior assimilação líquida de carbono quando permaneceram por 14 horas sob 17-23°C (temperaturas reduzidas) do que quando permaneceram por 14 horas sob 26-32°C (temperaturas elevadas). Sob 17-23°C, a eficiência quântica aparente é maior, a taxa de transporte de elétrons não é excessiva, os componentes negativos do processo fotossintético são reduzidos e os processos bioquímicos e fotoquímicos da fotossíntese estão em equilíbrio. A PCA mostrou que, nas temperaturas reduzidas (17-23°C) os cultivares apresentaram comportamentos semelhantes entre si. Por outro lado, sob temperaturas elevadas (26-32°C), os cultivares exibem maior variação de comportamentos fisiológicos e fotossíntese extremamente inibida sob temperatura foliar de 32°C. Sob essa temperatura extrema há diminuição da eficiência de carboxilação e aumento da limitação mesofílica da fotossíntese. A rede da fotossíntese de *C. arabica*

encontra-se fortemente conectada nas temperaturas elevadas (valores de Cg relativamente maiores). A análise de redes e a PCA foram apropriadas para discriminar o impacto de temperaturas estressantes e o tipo de respostas de cada cultivar sob mudanças no ambiente.

## ABSTRACT

On the first chapter, photosynthesis network global connectance analysis (Cg) and principal components analysis (PCA) indicate, respectively, that decrease on net photosynthesis ( $P_N$ ) was accompanied by reduced autonomy in relation to environment and reduced variation of answers of all physiological network variables in clear day. High synchronization among physiological and meteorological parameters (reduced autonomy of cultivars in relation to environment) on clear day was considered the main cause of  $P_N$  drop. This causal relationship was highlighted by results from PCA pointing out simultaneously: 1 - a clear contrast among physiological and meteorological vectors, 2 - reduced physiological variation of grafted and non-grafted individuals on clear day, and 3 - distribution of symbols representing clear and cloudy days close to meteorological and physiological vectors, respectively. Therefore, autonomy was strong parameter of stress condition of *Coffea arabica* on clear and cloudy days under field conditions in growing season.

On the second chapter, young plants of *C. arabica* cultivars presented higher net carbon assimilation and quantum efficiency when treated for 14 hours at 17-23°C (reduced temperatures) than when treated for 14 hours at 26-32°C (elevated temperatures). At 17-23°C, electron transport rate was not excessive, negative components of photosynthetic process are reduced, and biochemical and photochemical processes of photosynthesis are in equilibrium. The principal component analyses (PCA) showed that at reduced temperatures (17-23°C) there was similar physiological behavior among cultivars. On the other hand, at elevated temperatures (26-32°C), the cultivars displayed broader physiological variation and strong inhibition of photosynthesis at leaf temperature of 32°C. On this extreme temperature it was brought about a decrease of carboxylation efficiency and an increase of mesophyll limitation of photosynthesis. Photosynthesis network of *C. arabica* was tightly adjusted at elevated temperatures (Cg values higher than at reduced temperatures). Network analysis and PCA in

*C. arabica* were appropriate tools to discriminate the impact of stressing temperatures and the kind of responses of each cultivar under changing environment.



## PRINCIPAIS RESULTADOS

No primeiro capítulo o grau de conexão da fotossíntese líquida ( $P_N$ ) com as relações hídricas (conectância) e a correspondente autonomia em relação às condições ambientais foram avaliados em plantas adultas de *Coffea arabica* (cultivares Catuaí Vermelho, Icatu Amarelo e Obatã, enxertados e francos) crescendo sob condições de campo durante cursos diurnos na estação de crescimento. No segundo capítulo a conectância entre parâmetros bioquímicos e fotoquímicos da fotossíntese foi avaliada em cultivares de *C. arabica* (Catuaí Vermelho, Obatã e Ouro Verde) com 4 meses de idade expostos por 14 horas a temperaturas foliares de 17 a 32°C em condições controladas em laboratório.

Ambos capítulos foram baseados nas análises clássicas de fisiologia e ecofisiologia vegetal (fatores bióticos e abióticos considerados causais e em pares) em conjunto com uma abordagem sistêmica (análise simultânea de fatores bióticos e abióticos). Na abordagem clássica foi possível identificar relações de causa e consequência em uma parte do sistema. Na abordagem sistêmica foi possível identificar simultaneamente o comportamento das variáveis relacionadas ao balanço hídrico e de carbono em condições de campo (capítulo 1) e controladas (capítulo 2).

No primeiro capítulo, independente do cultivar de *C. arabica* ou do tratamento (enxertado; franco), a autonomia em relação às variações ambientais e os valores de  $P_N$  foram maiores no dia nublado. No entanto, três padrões de resposta foram observados: maior conectância e menos autonomia no dia claro, maior conectância e mais autonomia no dia nublado e conectância semelhante e menos autonomia no dia claro. A redução em 70% da  $P_N$  diária, o comportamento de agrupamento no espaço bidimensional da análise de componentes principais (PCA) e menor autonomia indicaram uma condição mais estressante para todos os tratamentos e cultivares estudados de *C. arabica* no dia claro.

No segundo capítulo, a conectância foi calculada por meio de uma rede construída com parâmetros fisiológicos obtidos a partir de curvas de resposta de  $P_N$  à intensidade luminosa e à concentração interna de  $CO_2$  na folha. Sob temperaturas reduzidas (17-23°C) todos os cultivares apresentaram fotossíntese líquida máxima ( $P_{Nmax}$ ) e eficiência quântica aparente ( $\Phi$ ) elevadas, e valores reduzidos dos pontos de compensação ( $I_c$ ) e de saturação ( $I_s$ ) luminosa. A respiração no escuro ( $R_d$ ) aumentou com a temperatura, porém, a 32°C por 14 horas, foi observada uma diminuição acentuada de  $R_d$ ,  $I_s$  e  $P_{Nmax}$ , especialmente no cultivar Ouro Verde, indicando colapso das estruturas das maquinarias fotossintética e mitocondrial. Os três cultivares com 4 meses de idade de *C. arabica* não apresentaram aumento de  $P_{Nmax}$  sob concentração de  $CO_2$  igual a  $1200 \mu\text{mol mol}^{-1}$  nos diferentes tratamentos térmicos (17-32°C). Sob elevadas temperaturas (26-32°C) e com  $1200 \mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $CO_2$ , a eficiência aparente de carboxilação ( $\epsilon$ ) e a limitação estomática da fotossíntese ( $L_s$ ) diminuíram incessantemente em contraste com o aumento da limitação mesofílica da fotossíntese ( $L_m$ ). O processo fotossintético foi extremamente inibido em todos os cultivares expostos por 14 horas à temperatura foliar de 32°C sob concentrações de  $CO_2$  atmosférica ( $355 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ) ou igual a  $1200 \mu\text{mol mol}^{-1}$ . A modulação de uma rede fisiológica e os resultados da PCA construídas em variáveis do metabolismo de carbono revelaram comportamentos contrastantes de *C. arabica* entre temperaturas reduzidas (17-23°C) e elevadas (26-32°C). Sob temperaturas reduzidas os componentes da rede estavam menos conectados uns aos outros e a amplitude de variação considerando todos os parâmetros estudados foi menor sob temperaturas elevadas.

## MAIN RESULTS

In the first chapter, connection degree of net photosynthesis ( $P_N$ ) with water relations (connectance) and the corresponding autonomy of them in regard to meteorological conditions were evaluated in adult *Coffea arabica* plants (cultivars Catuaí Vermelho, Icatu Amarelo, and Obatã, grafted and non-grafted) growing in field conditions during daily courses in growing season. In the second chapter, connectance among biochemical and photochemical photosynthetic parameters were also evaluated in 4-months-old *C. arabica* cultivars (Catuaí Vermelho, Obatã, and Ouro Verde) exposed for 14 hours at leaf temperatures from 17 to 32°C in controlled conditions.

Both chapters were based on classical plant physiological and ecophysiological analysis (biotic and abiotic parameters considered causal and in pairs) together with a systemic approach (simultaneous analysis of biotic and abiotic parameters). On classic approach it was possible to identify relations of cause and consequence in one part of the system. On systemic approach it was possible to identify simultaneously the behavior of parameters related to water and carbon balances in field (chapter 1) and in controlled (chapter 2) conditions.

In the first chapter, irrespective *C. arabica* cultivar or treatment (grafted; non-grafted), autonomy in relation to environmental conditions and  $P_N$  values were larger in cloudy day. However, three patterns of leaf response were observed: high connectance and less autonomy on clear day, high connectance and more autonomy on cloudy day, and similar connectance and less autonomy on clear day. Reduction by 70% of daily  $P_N$ , grouping behavior in the two-dimension space of principal components analysis (PCA) and less autonomy indicated stressful condition for all studied *C. arabica* cultivars and treatments in clear day.

In the second chapter, connectance was calculated by means of a network built with physiological variables obtained by means of curves of  $P_N$  as a function of photosynthetic photon flux density or internal  $CO_2$  leaf concentration. At reduced temperatures (17-23°C) all cultivars presented elevated maximum net photosynthesis ( $P_{Nmax}$ ) and apparent quantum efficiency ( $\Phi$ ), and reduced values of light compensation ( $I_c$ ) and saturation ( $I_s$ ) points. Respiration in dark ( $R_d$ ) increased with temperature but at 32°C for 14 hours there was a sharp decrease of  $R_d$ ,  $I_s$  and  $P_{Nmax}$ , especially in Ouro Verde cultivar; indicating the breakdown of mitochondrial and photosynthetic machinery structures. The three *C. arabica* 4-months-old cultivars did not present increase on  $P_{Nmax}$  under  $CO_2$  concentration of  $1200 \mu mol mol^{-1}$  at different thermal treatments (from 17 to 32°C). Under elevated temperatures (26-32°C) and  $1200 \mu mol mol^{-1}$  of  $CO_2$ , apparent carboxylation efficiency ( $\epsilon$ ) and stomatal limitation of photosynthesis ( $L_s$ ) decreased incessantly in contrast to increasing mesophyll limitation of photosynthesis ( $L_m$ ). Photosynthetic process was extremely inhibited in all cultivars exposed for 14 hours at leaf temperature of 32°C under atmospheric ( $355 \mu mol mol^{-1}$ ) or  $1200 \mu mol mol^{-1}$   $CO_2$  concentration. The modulation of a physiological network and the results from principal component analysis (PCA) built with parameters of carbon and water balances revealed contrasting behavior of *C. arabica* between reduced (17-23°C) and elevated (26-32°C) temperatures. At reduced temperatures, the network components were less connected to each other and the amplitude of variation considering all parameters studied was lower under elevated temperatures.

# I. AUTONOMIA E MODULAÇÃO DA REDE DA FOTOSSÍNTESE E DAS RELAÇÕES HÍDRICAS DE *COFFEA ARABICA*

## RESUMO

O grau de conexão (conectância) da fotossíntese líquida ( $P_N$ ) com as trocas de vapor d'água, o potencial hídrico foliar, e a autonomia desses parâmetros em relação às condições meteorológicas foram determinadas em três cultivares enxertados e francos de *Coffea arabica* durante a estação úmida de crescimento em condições de campo. Três comportamentos foram observados, elevada conectância e reduzida autonomia em dia claro, alta conectância e maior autonomia em dia nublado, e conectância similar e menor autonomia em dia claro. Independente do cultivar, da condição de enxertia, ou do grau de conectância entre os parâmetros foliares, a situação de estresse ao longo do dia claro resultou em uma menor autonomia em relação à temperatura do ar, ao déficit de pressão de vapor e à densidade do fluxo de fótons fotossintéticos.  $P_N$  no dia claro foi apenas 30% em relação ao dia nublado. A elevada sincronização entre os parâmetros fisiológicos e meteorológicos (reduzida autonomia) no dia claro foi considerada a principal causa da diminuição de  $P_N$ . Essa conclusão foi corroborada por resultados provenientes da análise de componentes principais, a qual mostrou um contraste entre os vetores fisiológicos e meteorológicos, reduzida variabilidade de comportamento dos indivíduos enxertados e francos no dia claro, e uma distribuição dos símbolos referentes aos dias claro e nublado próximos, respectivamente, dos vetores meteorológicos e fisiológicos. Portanto, a autonomia é claramente um indicador da condição de estresse de *C. arabica* em dias claros ou nublados sob condições de campo na estação de crescimento.

**Palavras-chave:** análise de componentes principais, biologia sistêmica, grau de conectância, potencial hídrico foliar, rede fisiológica foliar.

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo dos organismos como sistemas representados por redes se tornou central na ciência contemporânea (Barabási e Oltvai, 2004). Duas propriedades dos sistemas chamadas conectância global e autonomia são satisfatórias para o entendimento, respectivamente, da interação entre os componentes do sistema e sua relação com o ambiente (Souza *et al.*, 2005). A autonomia (At) representa quanto os parâmetros fisiológicos mudam independentemente no ambiente. At é determinada por meio das correlações entre as variáveis fisiológicas componentes de uma dada rede, e de parâmetros ambientais externos afetando a rede (Souza *et al.*, 2005). A conectância global (Cg) representa o grau com que os componentes da rede estão conectados uns aos outros. Cg é determinada pela correlação entre os parâmetros que apresentam evidente e próxima relação fisiológica (Amzallag, 2001, Souza *et al.*, 2005). A conectância da rede está relacionada à estabilidade do sistema (Edelman e Gally, 2001). Um valor elevado de conectância de uma dada rede implica em pronta resposta a distúrbios ambientais. Por outro lado, uma alta conectância de rede facilita a propagação de distúrbios pelo sistema da rede. Em contraste, redes fisiológicas com conectância reduzida entre seus componentes tendem a diminuir a propagação de distúrbios. Reduzido grau de conectância entre as variáveis fisiológicas poderia acontecer em espécies ou cultivares menos sensíveis a fatores de estresse. Além da valoração da modulação da rede, a análise de componentes principais (PCA) é útil por considerar simultaneamente todos os componentes da rede. A PCA mostra qual parâmetro é importante em dada circunstância e qual é o grau de variação de um conjunto de dados correspondente (Manly, 1994). Portanto, a conectância de redes, a autonomia e a PCA são ferramentas importantes na análise sistêmica para revelar a força das interconexões das variáveis fisiológicas nos vegetais, a sincronização dessas variáveis com o ambiente e a importância relativa de cada parâmetro no comportamento geral de uma dada rede afetada por condições externas. Neste estudo, a conectância global (Cg) e a autonomia

(At) da rede da fotossíntese foliar foram determinadas em três cultivares de *Coffea arabica* enxertados e francos durante cursos diurnos na região Sudeste do Brasil durante o verão úmido. As alterações em Cg e At representaram a modulação da rede fisiológica foliar sob condições meteorológicas naturais, sendo alterada ao longo de um dia claro e um dia nublado em campo.

Sob condições subtropicais no Brasil o período de crescimento no verão chuvoso está associado com elevada intensidade de irradiância e elevadas temperaturas do ar e foliar. No campo, a alta irradiância sobre *C. arabica* prejudica a assimilação líquida de carbono no período chuvoso de crescimento, reduzindo a eficiência potencial do fotossistema II e da condutância estomática (Ronquim *et al.* 2006). *C. arabica* é nativo de elevadas altitudes com clima tropical moderado, porém *C. canephora* é originário de regiões tropicais quentes, apresentando maior resistência a nematóides (Costa *et al.*, 1991). A enxertia de *C. arabica* aumenta a produção de grãos no cafeeiro provavelmente pela maior capacidade do sistema radicular de *C. canephora* em absorver água e nutrientes (Fahl *et al.*, 1998, Fahl *et al.* 2001). É esperado um comportamento diferente da fotossíntese líquida e das relações hídricas foliares de *C. arabica* enxertado em *C. canephora* uma vez que esse último é mais tolerante a elevadas temperaturas do ar e ao déficit hídrico do solo (Carelli *et al.*, 1999). A autonomia e a modulação da rede de fotossíntese líquida e das relações hídricas de *C. arabica* enxertado e franco foram avaliadas nesse trabalho para revelar o impacto de condições meteorológicas diárias sobre as trocas gasosas foliares e o potencial hídrico foliar. Vários parâmetros de trocas gasosas foliares, potencial hídrico foliar e condições meteorológicas diurnas foram analisados simultaneamente descrevendo as inter-relações entre eles e a resposta coordenada da folha em um ambiente em mudança. Portanto, o objetivo do trabalho foi testar a teoria da conectância em uma rede de fotossíntese foliar de cultivares de *C. arabica* francos e enxertados.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. ÁREA E PERÍODO DE ESTUDO, PLUVIOSIDADE ANTES DOS DIAS DAS MEDIDAS, TOTAL DE HORAS DE BRILHO SOLAR DURANTE AS MEDIDAS E MATERIAL VEGETAL**

O experimento foi realizado próximo ao município de São Carlos (22°02'15''S e 47°46'57''O, 957 m n.m.) no estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. As medições ambientais e fisiológicas foliares foram realizadas em 8 de Março de 2002 e em 18 de Março de 2003, em área experimental da fazenda privada São José, situada na estrada SP-215, km 115, entre os municípios de São Carlos e Descalvado. O clima da região, de acordo com a classificação de Köppen, está entre Aw e Cwa. De acordo com a estação meteorológica nacional número 83726, localizada a 12 km da área experimental, o total acumulado de chuvas nos 70 dias anteriores ao registro dos dados fisiológicos foliares foi 720 mm (em 8 de Março de 2002) e 581mm (em 18 de Março de 2003). O total de chuvas em Março de 2002 ou 2003 foi 100 mm, e o total de horas de brilho solar foi 6.0 h no dia claro (8 de Março de 2002) e 2.1 h no dia nublado (18 de Março de 2003).

Os cultivares francos e enxertados de *Coffea arabica* L (Rubiaceae) foram plantados em 1997. Todos os cultivares vieram do “Instituto Agrônômico de Campinas” (IAC), Brasil. Foram utilizados os cultivares Catuaí Vermelho (IAC 81), Icatu Amarelo (IAC 2944, a partir de hibridização com *C. canephora*) e Obatã (IAC 1669-20). A distância entre as plantas foi de 3.5 m x 1.0 m. A plantação foi mantida seguindo as práticas fitossanitárias e de adubação comerciais determinadas pelo IAC.

### **2.2. TROCAS GASOSAS FOLIARES, POTENCIAL HÍDRICO FOLIAR E MEDIDAS MICROMETEOROLÓGICAS DURANTE OS DIAS CLARO E NUBLADO**

Os dados diurnos das trocas gasosas foliares foram obtidos na estação chuvosa em um dia claro (8 de Março de 2002) e em um dia nublado (18 de Março de 2003) por meio de um analisador de gases por infravermelho (IRGA), modelo LCA-4 (ADC, Hodesddon, UK), conectado a uma câmara foliar Parkinson PLCN-4 (ADC). A temperatura foliar na câmara foi



mantida igual à temperatura ambiente do ar ( $T_{\text{air}}$ ) ao longo do curso diurno por meio de um sistema Peltier acoplado à extremidade da PLCN-4. A temperatura foliar ( $T_{\text{leaf}}$ ) foi determinada por um termopar cobre-constantã acoplado à PLCN-4. A densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) foi medido por um sensor na extremidade da PLCN-4. O LCA-4 funcionou como um sistema aberto determinando a fotossíntese líquida ( $P_N$ ), transpiração foliar (E), condutância estomática ao vapor d'água ( $g_s$ ), e concentrações intercelular ( $C_i$ ) e externa ( $C_e$ ) de  $\text{CO}_2$ . A eficiência instantânea da transpiração (ITE) foi calculada como  $P_N/E$  conforme indicado por Nogueira *et al.* (2004).

Todos os indivíduos eram adultos e em boas condições sanitárias mostrando altura e desenvolvimento similares em campo. Para cada um dos três cultivares estudados, dois indivíduos foram escolhidos, 7 m distantes uns dos outros e longe da borda da plantação. De cada planta foram escolhidos dois ramos plagiotrópicos diretamente expostos à radiação solar no terço superior da copa. Em cada ramo foram selecionadas duas folhas-de-sol completamente expandidas e saudáveis (geralmente o terceiro par de folhas a partir do ápice do ramo). As trocas gasosas foliares,  $T_{\text{leaf}}$  e PPFD foram medidos em intervalos de duas horas, das 07:00h às 17:30h. O potencial hídrico foliar ( $\Psi$ ) foi obtido com uma câmara de pressão modelo 3005 (Soil Moisture, Santa Barbara, USA), imediatamente após as determinações das trocas gasosas foliares. Plantas e folhas utilizadas para determinar o  $\Psi$  foram escolhidas seguindo os mesmos critérios utilizados nas determinações das trocas gasosas. A temperatura do ar e a umidade relativa do ar foram monitoradas pelo LCA-4 com a PLCN-4 aberta na sombra e sem folha antes de cada horário de determinação das trocas gasosas foliares ao longo do dia.

### **2.3. FOTOSSÍNTESE LÍQUIDA ( $P_N$ ) EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DO FLUXO DE FÓTONS FOTOSSINTÉTICOS (PPFD)**

As curvas  $P_N$ -PPFD foram obtidas no horário do dia favorável para a assimilação de  $\text{CO}_2$  pela planta (das 07:00h às 09:00h) em condições de campo no período chuvoso em 1 e

26 de Março de 2002. As curvas  $P_N$ -PPFD foram obtidas de manhã cedo utilizando o IRGA LCA-4 e a câmara foliar PLCN-4 previamente descritos. A PLCN-4 foi conectada à fonte de luz PLU-002 (ADC, Hoddesdon, UK) contendo uma lâmpada dicróica halógena (12 V, 20 W). Durante as medidas de  $P_N$ , a temperatura foliar foi mantida na temperatura ambiente ( $25 \pm 0.5$  °C) por um sistema Peltier. Os valores de PPFD entre  $800$ - $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foram obtidos controlando a voltagem aplicada sobre o PLU-002. Abaixo de  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , PPFD foi atenuado reduzindo-se a voltagem no PLU-002 e adicionando filtros de vidro neutros (Comar Instruments, Cambridge, UK) entre a folha e a fonte de luz. Duas plantas enxertadas e duas francas foram utilizadas para construir as curvas de  $P_N$ -PPFD. De cada planta foram escolhidas duas folhas-de-sol completamente expandidas e saudáveis em ramos plagiotrópicos do terço superior da copa. Foram obtidas duas curvas de  $P_N$ -PPFD em cada tratamento (enxertado e franco) para cada cultivar. Ambas curvas de  $P_N$ -PPFD correspondentes foram fundidas e ajustadas utilizando a Equação I descrita por Prado e Moraes (1997). O valor de PPFD quando  $P_N$  alcança 90% de  $P_{N\text{max}}$  foi chamado de ponto de saturação luminosa ( $I_s$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

$$(I) \quad P_N = P_{N\text{max}} \left( 1 - e^{-k(PPFD - I_c)} \right)$$

$P_N$  = fotossíntese líquida ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $P_{N\text{max}}$  = fotossíntese líquida máxima ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $e$  = base do logaritmo natural;  $k$  = constante de proporcionalidade; PPFD = densidade do fluxo de fótons fotossintéticos ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $I_c$  = ponto de compensação luminosa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

#### **2.4. VALOR INTEGRALIZADO DA FOTOSSÍNTESE LÍQUIDA NO CURSO DIÁRIO E A FOTOSSÍNTESE LÍQUIDA DIÁRIA POTENCIAL E REALIZADA**

Os valores de  $P_N$  obtidos durante os cursos diurnos foram integrados utilizando a Equação II, a qual gerou o valor integrado correspondente de  $P_N$  ao longo do dia ( $IP_N$ ) como descrito por Prado *et al.* (2001), Kikusawa *et al.*, (2004) e Ronquim *et al.* (2006):

$$(II) \quad IP_N = \int f(x)d(x)$$

$IP_N = P_N$  integrada,  $x =$  intervalo de tempo em segundos ao longo do dia (variável independente);  $f(x) =$  variável dependente ( $P_N$ ); e  $d(x) =$  intervalo de tempo derivado em segundos

Dois valores de fotossíntese líquida integradas (assimilação de  $CO_2$  líquida por dia) foram calculadas em cada curso diário, assimilações líquidas diárias potencial ( $PDP_N$ ) e realizada ( $ADP_N$ ).  $PDP_N$  foi calculada em dois passos.  $P_{Nmax}$  (proveniente da Equação I) e os valores de PPFD obtidos durante o curso do dia foram inicialmente aplicados na Equação I para determinar a assimilação líquida de  $CO_2$  esperada em cada horário do dia. A Equação II foi utilizada posteriormente para integrar esses valores potenciais de  $P_N$  ao longo do dia, resultando na fotossíntese líquida diária potencial ( $PDP_N$ ).  $PDP_N$  representa a assimilação líquida diária eventualmente limitada por PPFD ao longo do dia. A fotossíntese líquida diária realizada ( $ADP_N$ ) foi calculada utilizando  $P_N$  medida ao longo do dia e aplicada diretamente na Equação II.  $ADP_N$  representa a assimilação líquida diária limitada por impedimentos ambientais e internos da planta, tais como elevado  $VPD_{air}$  e reduzido  $\Psi$ , respectivamente. Comparando ambos,  $PDP_N$  e  $ADP_N$ , é possível estimar o quanto as plantas enxertadas ou francas diminuem a assimilação líquida de  $CO_2$  em função de impedimentos ambientais e internos ao longo do dia (Kikusawa *et al.* 2004, Ronquim *et al.*, 2006).

## 2.5. CONECTÂNCIA DA REDE, AUTONOMIA E ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

Foi testada a normalidade de cada conjunto de dados obtidos ao longo dos cursos diários antes de utilizar o coeficiente de correlação de Pearson para calcular a conectância e a autonomia. O teste de normalidade de Jarque-Bera (Zar, 1999) foi aplicado em cada conjunto de variáveis. Todos os conjuntos de variáveis apresentaram distribuição normal. Foi possível obter o coeficiente de correlação de Pearson entre qualquer par de variáveis selecionadas ao longo dos cursos diários, utilizando esse coeficiente nas determinações subsequentes de conectância e autonomia.

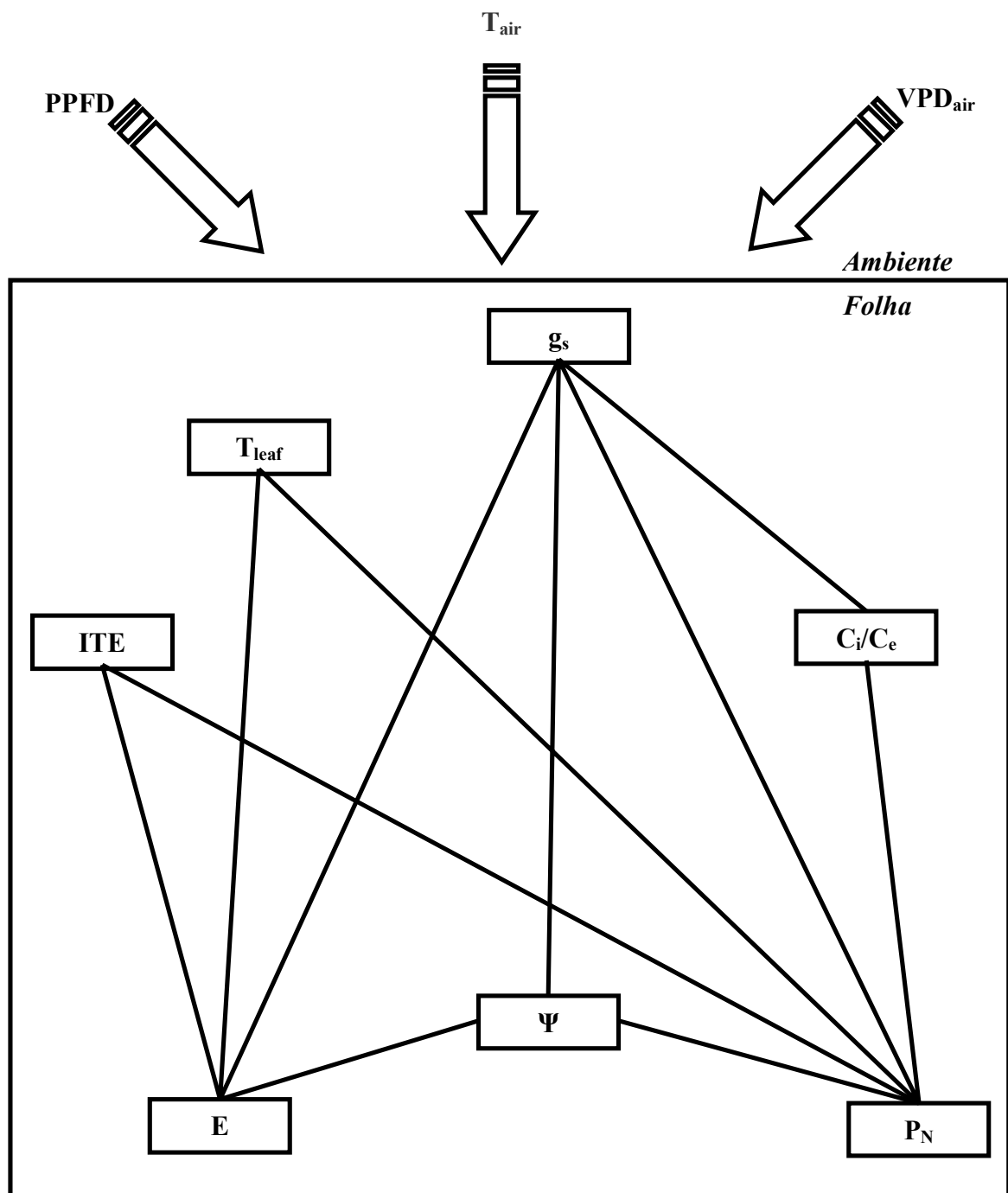
A modulação da rede de fotossíntese foliar foi avaliada utilizando o conceito de conectância global,  $C_g$  (Amzallag, 2001). O coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) obtido de cada par de variáveis na rede fisiológica da folha foi utilizado para determinar a força da relação (conexão) entre variáveis. Subseqüentemente, os valores- $r$  foram normalizados por meio de uma transformação- $z$ , tornando-se valores- $z$  (valores da conectância), como indicado por Amzallag (2001):

$$(III) \quad z = 0.5 \ln \left[ \frac{(1+|r|)}{(1-|r|)} \right]$$

A conectância global da rede ( $C_g$ ) foi representada pela media dos valores- $z$  (Amzallag, 2001):

$$(IV) \quad C_g = \frac{1}{m} \cdot [z(A, X_1) + \dots + z(A, X_m)]$$

A Figura 1 mostra a topologia da rede de fotossíntese foliar proposta resultando em um desenho similar àquele proposto por Prado *et al.* (2004). Sobre a rede de fotossíntese (Figura 1) estão as variáveis ambientais, que foram consideradas para a determinação da força de conexão entre as variáveis fisiológicas ao longo do dia. A autonomia da planta ( $At$ ) foi obtida por meio da correlação entre os parâmetros fisiológicos foliares (os componentes da rede fisiológica) e as variáveis ambientais (Souza *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2005). Sendo assim,  $At$  foi determinada nos dias claro e nublado como a média dos valores-z entre  $P_N$ ,  $g_s$ ,  $C_i/C_e$ ,  $E$ ,  $ITE$ ,  $\Psi$ ,  $T_{leaf}$  e  $PPFD$ ,  $T_{air}$ , e  $VPD_{air}$ . Portanto, uma menor conectância com o ambiente significa um maior grau de autonomia (Souza *et al.*, 2005).



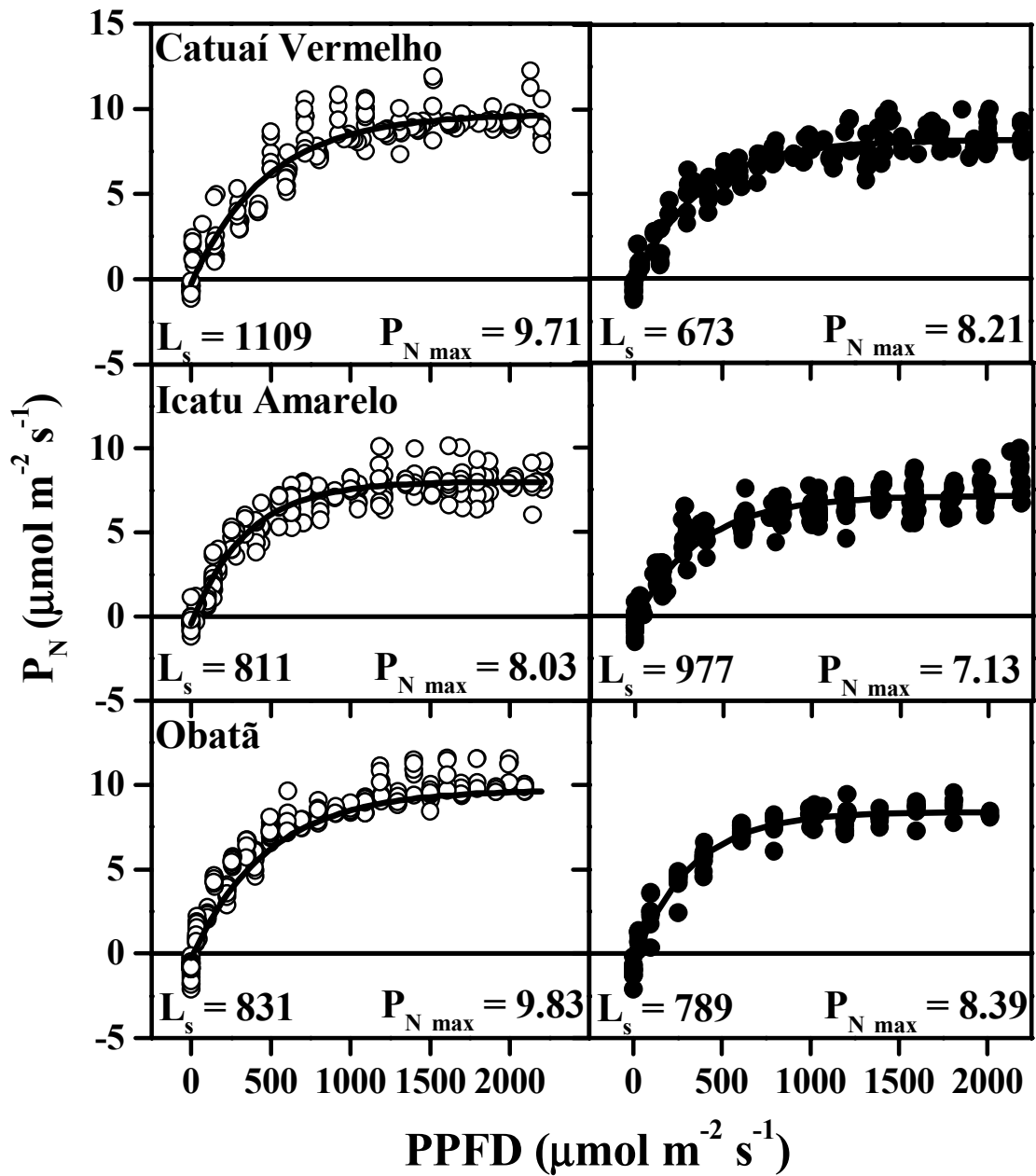
**Figura 1.** Topologia de uma rede representando as interações entre as variáveis de trocas gasosas foliares e potencial hídrico foliar ( $\Psi$ ). As linhas retas conectando componentes pareados representam relação próxima e recíproca entre variáveis fisiológicas utilizadas para determinar a conectância da rede nos dias claro e nublado. Cada seta no topo representa uma variável ambiental influenciando a força de conexão entre os componentes da rede.  $PPFD$  = densidade do fluxo de fótons fotossintéticos,  $T_{air}$  = temperatura do ar,  $VPD_{air}$  = déficit de pressão de vapor do ar,  $g_s$  = condutância estomática ao vapor d'água,  $C_i/C_e$  = concentração intercelular ( $C_i$ ) por externa ( $C_e$ ) de  $CO_2$ ,  $P_N$  = fotossíntese líquida,  $E$  = transpiração foliar,  $ITE$  = eficiência instantânea da transpiração e  $T_{leaf}$  = temperatura foliar.

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando o programa PC-ORD, versão 3.12, MJM Software Design (Gleneden Beach, Oregon). Cada um dos dois eixos do gráfico da PCA foi denominado componente principal (pc1 ou pc2) baseado nas correlações entre as variáveis analisadas. Esse procedimento permite a análise de todas as variáveis fisiológicas e ambientais em um espaço bidimensional guiado por dois eixos (pc1 e pc2). Os vetores da PCA em quadrantes representaram as variáveis fisiológicas ou ambientais mais importantes determinando a distribuição dos símbolos (Manly, 1994).

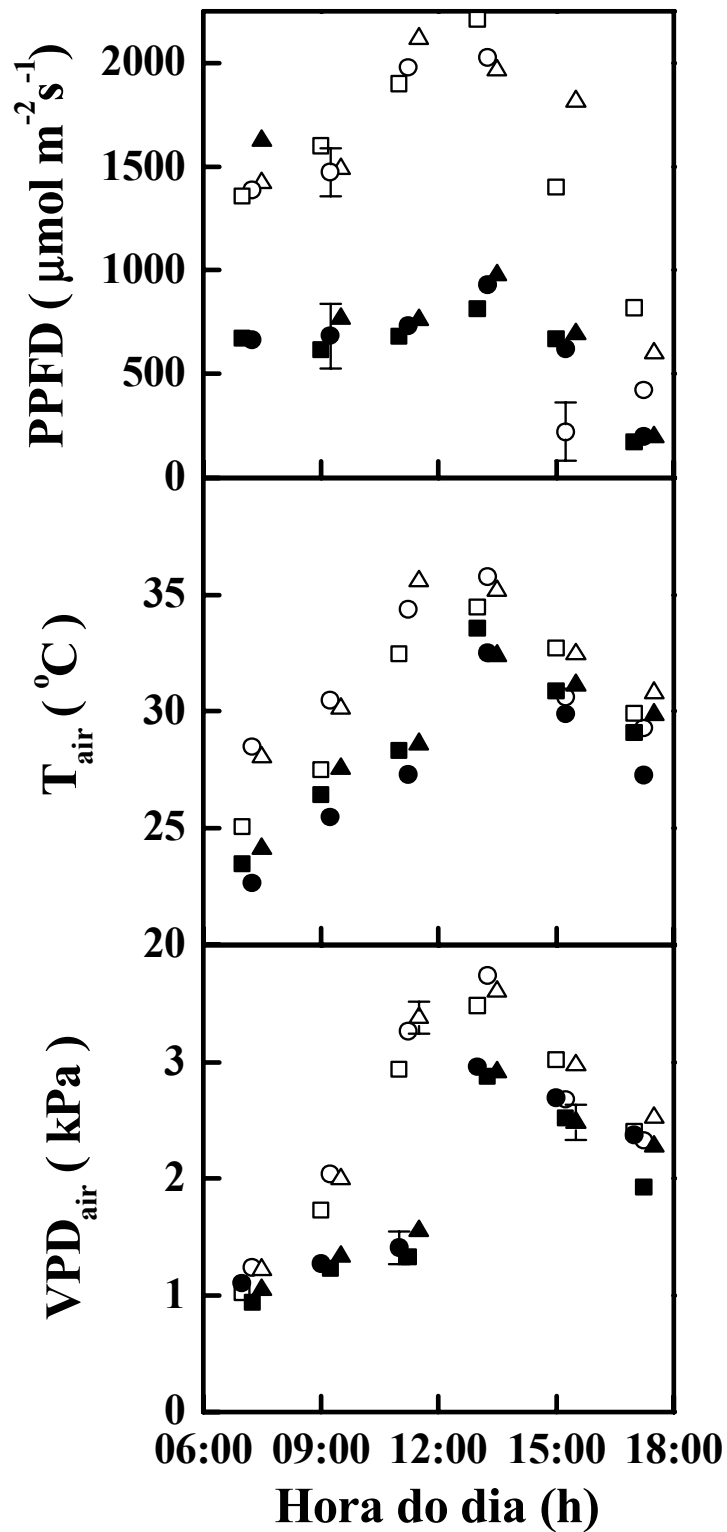
### 3. RESULTADOS

A Figura 2 mostra  $P_N$  em função de PPFD nos cultivares francos e enxertados de *C. arabica*. Em média,  $I_s$  foi de  $865 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mas Catuaí Vermelho e Obatã enxertados mostraram menor  $I_s$  ( $673$  e  $789 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente) que os mesmos cultivares francos.  $P_{N_{\text{max}}}$  foi menor em todos os cultivares enxertados que nos exemplares francos. Determinações diurnas das condições meteorológicas, das trocas gasosas foliares e do potencial hídrico foliar nos cultivares francos foram realizadas previamente (Ronquim *et al.*, 2006). A Figura 3 mostra os cursos diários de PPFD,  $T_{\text{air}}$ , e  $\text{VPD}_{\text{air}}$  ao longo dos dias claro e nublado durante o período de crescimento (estação chuvosa). Os maiores valores de PPFD,  $T_{\text{air}}$  e  $\text{VPD}_{\text{air}}$  aparecem no dia claro. Esses dados meteorológicos atingiram o pico em torno das 13:00h tanto no dia claro como no dia nublado. Apesar de PPFD ter sido menor no dia nublado que no dia claro, os valores de PPFD das 07:00h às 15:00h ficaram entre o máximo e o mínimo  $I_s$  obtido ( $673$ - $1109 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente).  $T_{\text{air}}$  e  $\text{VPD}_{\text{air}}$  foram maiores no dia claro que no dia nublado, especialmente entre às 09:00h e às 15:00h, por causa da elevada irradiância.



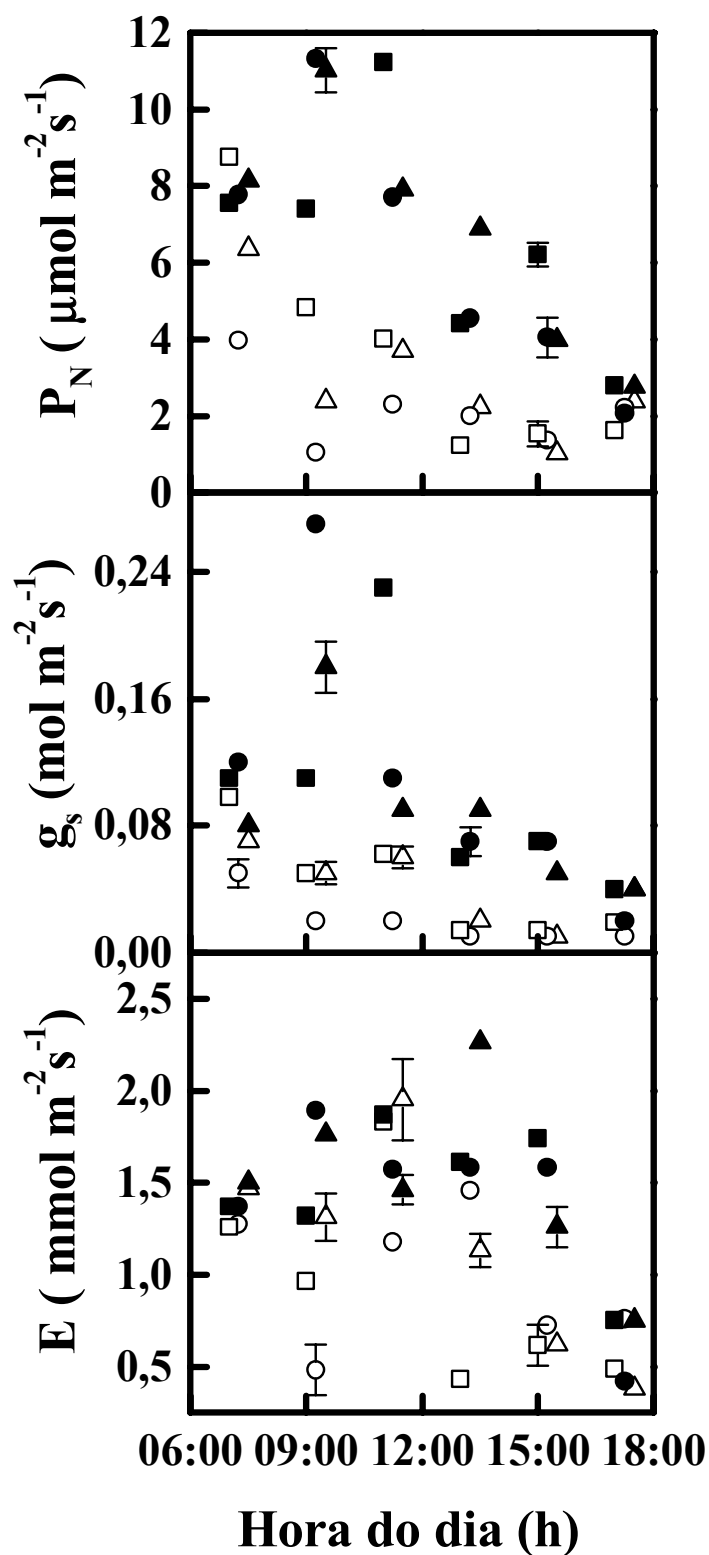


**Figura 2.** Fotossíntese líquida ( $P_N$ ) em função da densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) em folhas de *Coffea arabica* franco (○) e enxertado (●) em *Coffea canephora* durante o verão (Março de 2002, estação chuvosa). Duas curvas foram sobrepostas em cada painel antes dos ajustes. Os valores da fotossíntese líquida máxima ( $P_{N \max}$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e do ponto de saturação luminosa ( $L_s$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) estão demonstrados abaixo em cada painel.

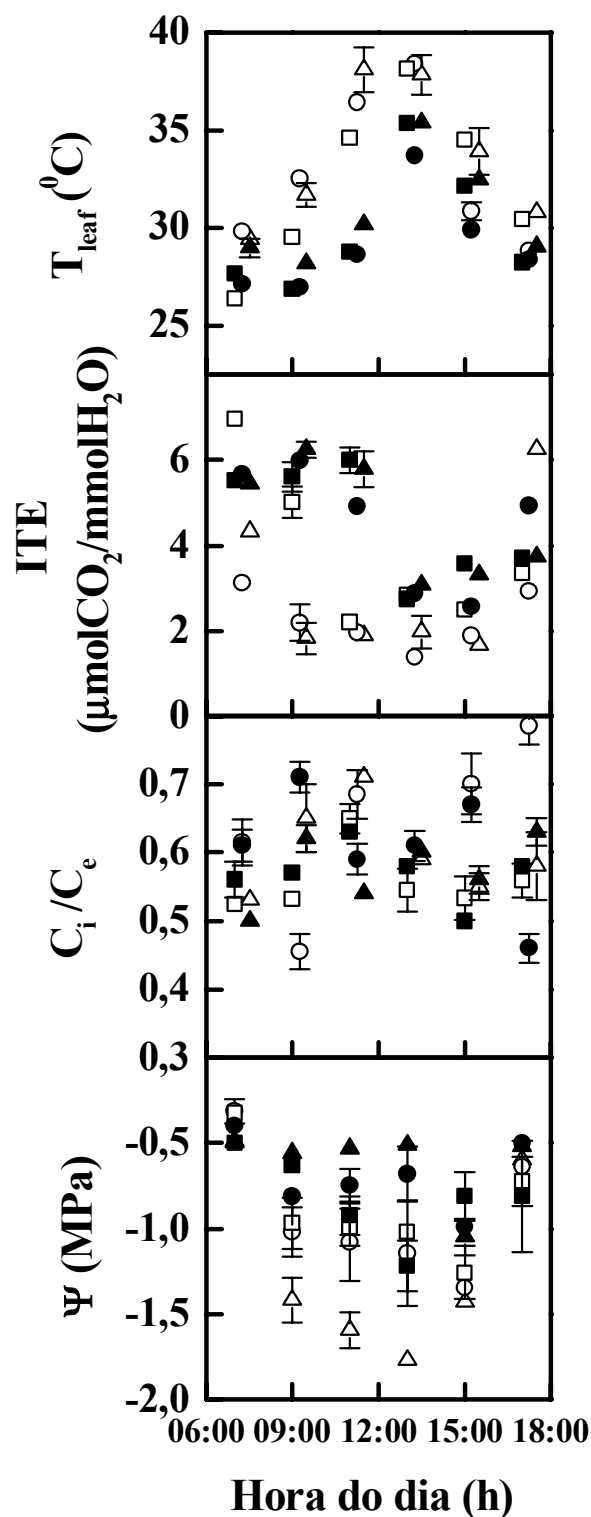


**Figura 3.** Cursos diurnos da densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD), temperatura do ar ( $T_{\text{air}}$ ) e déficit de pressão de vapor do ar ( $\text{VPD}_{\text{air}}$ ) nos dias claro (símbolos abertos) e nublado (símbolos sólidos) na estação chuvosa. Os símbolos representam médias e a barra representa o erro-padrão obtido nos cultivares de *Coffea arabica* Catuaí Vermelho ( $\square, \blacksquare$ ), Icatu Amarelo ( $\circ, \bullet$ ) e Obatã ( $\triangle, \blacktriangle$ ) enxertados em *Coffea canephora*.

A Figura 4 mostra os resultados das trocas gasosas diurnas entre folha-atmosfera. Apesar do menor PPFD, os valores de  $P_N$ ,  $g_s$  e  $E$  foram geralmente maiores durante o dia nublado que durante o dia claro em todos os cultivares. Na Figura 5 estão representados os valores médios de  $T_{leaf}$ , ITE,  $C_i/C_e$ , e  $\Psi$  durante os dias claro e nublado.  $\Psi$  e ITE foram maiores ao longo do dia nublado que no dia claro (Figura 5), apesar dos maiores valores correspondentes de  $E$  e  $g_s$  (Figura 4).  $T_{leaf}$  foi similar comparando os dias claro e nublado somente no início e no final dos cursos diurnos (Figura 5). Ao meio-dia,  $T_{leaf}$  foi entre 5 a 8°C maior no dia claro que no dia nublado. Considerando todos os cultivares juntos ou cada um individualmente, os valores médios de  $C_i/C_e$  (Figura 5) mostraram variação similar ao longo dos dias claro e nublado.



**Figura 4.** Variáveis das trocas gasosas entre folha-atmosfera medidas em três cultivares de *Coffea arabica* crescendo em condições de campo na estação chuvosa nos dias claro (símbolos abertos) e nublado (símbolos sólidos). Os símbolos representam médias e a barra representa o erro-padrão obtido nos cultivares de *Coffea arabica* Catuaí Vermelho (□, ■), Icatu Amarelo (○, ●) e Obatã (Δ, ▲) enxertados em *Coffea canephora*.  $P_N$  = fotossíntese líquida,  $g_s$  = condutância estomática ao vapor d'água,  $E$  = transpiração foliar.



**Figura 5.** Temperatura foliar ( $T_{leaf}$ ), eficiência instantânea da transpiração (ITE), concentração intercelular ( $C_i$ ) por externa ( $C_e$ ) de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_e$ ) e potencial hídrico foliar ( $\Psi$ ) em três cultivares de *Coffea arabica* crescendo em condições de campo na estação chuvosa durante os dias claro (símbolos abertos) e nublado (símbolos sólidos). Os símbolos representam médias e a barra representa o erro-padrão obtido nos cultivares de *Coffea arabica* Catuai Vermelho ( $\square, \blacksquare$ ), Icatu Amarelo ( $\circ, \bullet$ ) e Obatã ( $\Delta, \blacktriangle$ ) enxertados sobre *Coffea canephora*.

Os valores de fotossíntese diária potencial ( $PDP_N$ ) e realizada ( $ADP_N$ ) estão apresentados na Tabela 1, onde estão incluídos os resultados da conectância global ( $C_g$ ) e autonomia ( $A_t$ ) dos cultivares francos e enxertados durante os dias claro e nublado.  $ADP_N/PDP_N$  foi maior no dia nublado nos cultivares francos e enxertados. Há valores similares ou maiores de  $ADP_N/PDP_N$  nos cultivares francos do que nos enxertados apesar da condição meteorológica do dia, com exceção de Catuaí Vermelho no dia claro e Obatã no dia nublado. Sem considerar o tratamento de enxertia, todos os cultivares mostraram maior autonomia (menores valores de  $A_t$ ) no dia nublado. Valores similares de  $C_g$  entre os dias foram observados somente no cultivar Obatã enxertado. Três padrões de comportamento foram notados considerando a conectância global e a autonomia. Em Icatu Amarelo franco, Obatã franco e Catuaí Vermelho enxertado,  $C_g$  e  $A_t$  foram maiores no dia claro. Em Catuaí Vermelho franco e Icatu Amarelo enxertado,  $C_g$  foi maior, mas  $A_t$  foi menor no dia nublado. O terceiro comportamento foi observado somente em Obatã enxertado, no qual foi encontrada  $C_g$  semelhante entre os dias e  $A_t$  menor no dia claro.

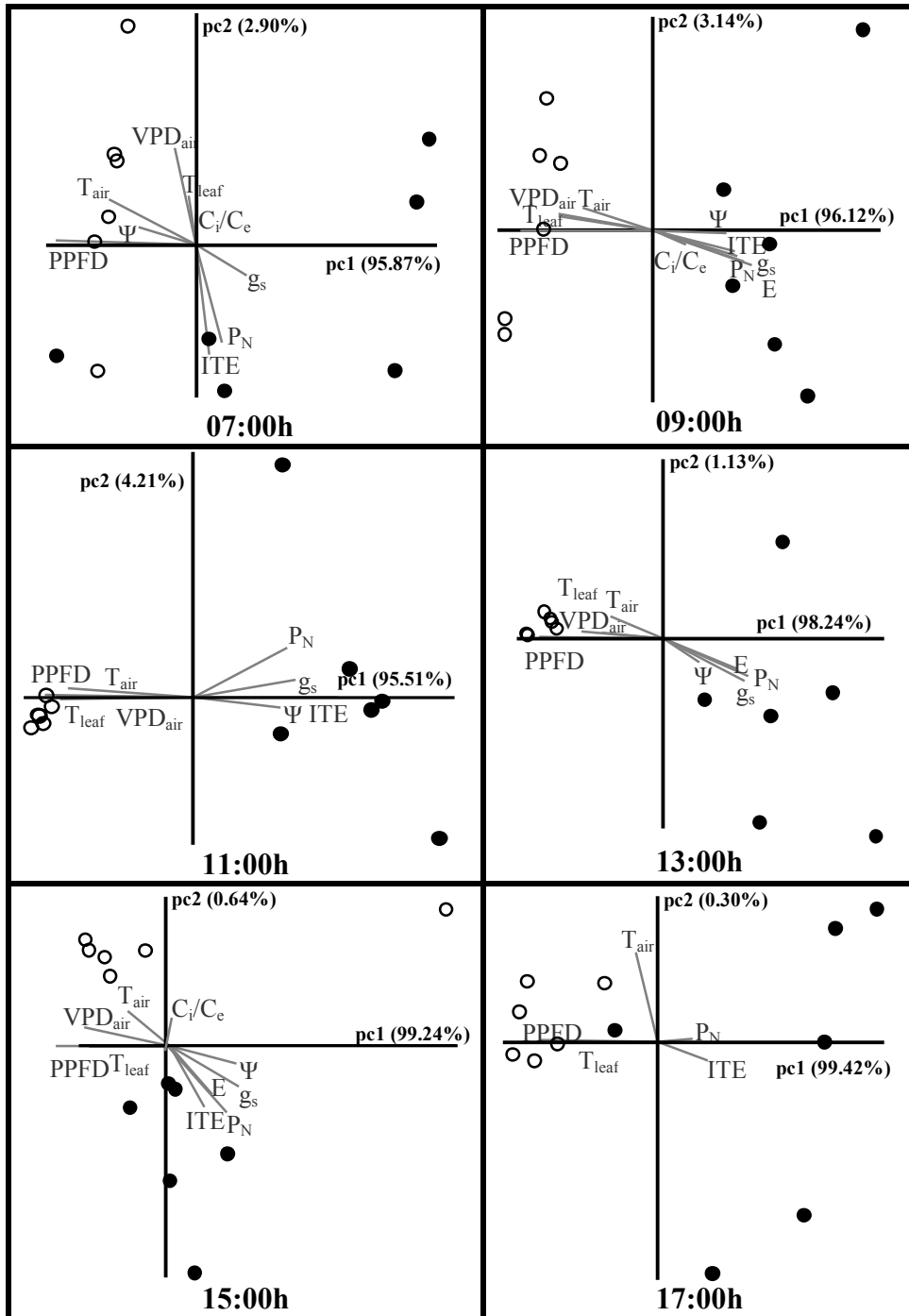
**Tabela 1.** Valores da fotossíntese líquida diária potencial ( $PDP_N$ ) e realizada ( $ADP_N$ ) ( $mmol\ CO_2\ m^{-2}\ dia^{-1}$ ) de três cultivares de *Coffea arabica* francos e enxertados (Catuaí Vermelho, Icatu Amarelo e Obatã) crescendo em condições de campo na estação chuvosa durante os dias claro e nublado. São mostrados os valores de conectância global ( $Cg$ ) e de autonomia ( $At$ ) obtidos ao longo dos cursos diurnos.

	<b>Cultivares francos</b>					
	<b>Catuaí Vermelho</b>		<b>Icatu Amarelo</b>		<b>Obatã</b>	
	<b>Claro</b>	<b>Nublado</b>	<b>Claro</b>	<b>Nublado</b>	<b>Claro</b>	<b>Nublado</b>
<b><math>PDP_N^*</math></b>	330	256	268	239	347	287
<b><math>ADP_N^*</math></b>	100	276	98	246	112	232
<b><math>ADP_N/PDP_N^*</math></b>	0.30	1.08	0.36	1.03	0.32	0.81
<b><math>Cg</math></b>	0.59	0.65	1.06	0.49	0.61	0.48
<b><math>At</math></b>	0.93	0.75	0.91	0.68	0.71	0.58
	<b>Cultivares enxertados</b>					
<b><math>PDP_N</math></b>	289	232	249	237	287	247
<b><math>ADP_N</math></b>	121	248	71	234	99	254
<b><math>ADP_N/PDP_N</math></b>	0.42	1.07	0.28	0.99	0.34	1.03
<b><math>Cg</math></b>	0.75	0.58	0.56	0.63	0.50	0.51
<b><math>At</math></b>	0.86	0.69	0.70	0.66	0.75	0.57

\*Obtidos por Ronquim *et al.* (2006).

A Figura 6 mostra os resultados da análise de componentes principais (PCA) levando em conta todos os dados micrometeorológicos (Figura 3) e fisiológicos (Figuras 4 e 5) obtidos ao longo dos dias claro e nublado. Em todos os painéis das PCAs, o eixo pc1 explica mais de 95% da distribuição dos símbolos em quadrantes. Vetores representando parâmetros ambientais e fisiológicos estão em posições opostas ladeando, respectivamente, os símbolos do dia claro e do dia nublado ao longo dos cursos diurnos. Portanto, os vetores para PPF<sub>D</sub>, T<sub>air</sub>, VPD<sub>air</sub> e T<sub>leaf</sub> aparecem inclinados para ou sobre os símbolos representando cultivares francos e enxertados no dia claro (Figura 6). Em contraste, os vetores para P<sub>N</sub>, E, g<sub>s</sub>, Ci/Ce, ITE e Ψ tendem a inclinar-se para os símbolos representando os cultivares no dia nublado (Figura 6). Há uma nítida separação entre os símbolos representando dias distintos (claro e nublado) ao longo dos cursos diurnos desde o início da manhã até o final da tarde, especialmente em torno do meio-dia. Além disso, o agrupamento dos símbolos no dia claro é mais pronunciado do que no dia nublado, especialmente sob alto PPF<sub>D</sub> às 11:00h e 13:00h.





**Figura 6.** Análise dos componentes principais das trocas gasosas foliares e potencial hídrico foliar ( $\Psi$ ) obtidos durante cursos diurnos em três cultivares de *Coffea arabica*. Cada painel representa um horário do dia. Dias claro e nublado estão representados por símbolos abertos (○) e sólidos (●), respectivamente. Cada símbolo indica um cultivar independente do tratamento (franco e enxertado). Os vetores (linhas retas de cor cinza) representam os parâmetros ambientais ou fisiológicos mais importantes. PPFD = densidade do fluxo de fótons fotossintéticos,  $T_{air}$  = temperatura do ar,  $VPD_{air}$  = déficit de pressão de vapor do ar,  $T_{leaf}$  = temperatura foliar,  $P_N$  = fotossíntese líquida,  $g_s$  = condutância estomática ao vapor d'água,  $E$  = transpiração foliar,  $ITE$  = eficiência instantânea da transpiração e  $C_i/C_e$  = concentração  $CO_2$  intercelular ( $C_i$ ) por externa ( $C_e$ ) de  $CO_2$ .

#### 4. DISCUSSÃO

A diminuição dos valores de  $P_N$  depois do meio-dia no dia claro deve estar relacionada ao estômato uma vez que os valores de  $g_s$  são menores nas horas do dia correspondentes (Figura 4). Além disso, valores elevados de PPFD indicam que a reduzida  $P_N$  observada durante o dia claro poderia também ser devido à fotoinibição. A eficiência potencial do fotossistema II de *C. arabica* avaliada pela razão entre a fluorescência da clorofila variável ( $F_v$ ) e máxima ( $F_m$ ) foi fortemente deprimida durante o dia claro ao meio-dia na estação chuvosa, mas  $F_v/F_m$  aumentou sob menor PPFD no final da tarde (Ronquim *et al.*, 2006). Esses últimos autores obtiveram correlação negativa significativa entre  $F_v/F_m$ -PPFD ou  $F_v/F_m$ -VPD<sub>air</sub> no dia claro em campo para os mesmos cultivares de *C. arabica* estudados aqui. Em adição ao elevado PPFD,  $T_{leaf}$  foi maior que 30°C no dia claro das 12:00h até as 15:00h, quando  $\Psi$  foi reduzido (Figura 5). Sendo assim, a depressão depois do meio-dia de  $P_N$  foi uma consequência de circunstâncias adversas relacionadas à fotoquímica (reduzida  $F_v/F_m$ ), biofísica (reduzidos  $g_s$  e  $\Psi$ ) e condição térmica (elevada  $T_{leaf}$ ) da folha, determinadas por elevados valores de PPFD,  $T_{air}$  e VPD<sub>air</sub> ao longo do dia. Conseqüentemente, independente do cultivar ou tratamento, os valores de ADP<sub>N</sub> e ADP<sub>N</sub>/PDP<sub>N</sub> foram menores no dia claro que no dia nublado (Tabela 1).

Os símbolos na PCA representando os cultivares francos e enxertados (Figura 6) estão mais agrupados durante o dia claro, indicando que  $\Psi$  e as trocas gasosas entre folha-atmosfera mostraram menor variação diurna. Os vetores dos parâmetros ambientais e de  $T_{leaf}$  estão inclinados para os símbolos do dia claro, com grande projeção em pc1 (especialmente o vetor-PPFD) desde o início da manhã até o final da tarde (Figura 6). Além disso, os parâmetros associados com elevados PPFD,  $T_{air}$  e VPD<sub>air</sub> (vetores meteorológicos) estão em contraste com parâmetros associados a elevados  $P_N$ ,  $C_i/C_e$ ,  $g_s$ ,  $E$ ,  $\Psi$  e ITE (parâmetros fisiológicos) na maioria das horas do dia (Figura 6). Isso sugere que as condições

meteorológicas estão determinando a configuração do agrupamento ao longo do dia claro. Ademais, o elevado grau de conectância com o ambiente (menor autonomia) encontrado em todos os cultivares e tratamentos no dia claro (Tabela 1) indica respostas fisiológicas da folha altamente sincronizadas com o ambiente sob elevados valores de PPFD,  $T_{\text{air}}$  e  $VPD_{\text{air}}$  (Figura 3). Isso implica no aumento da vulnerabilidade da folha, uma vez que os parâmetros fisiológicos da rede mostraram reduzida variação ao longo do dia claro (agrupamento na Figura 6), mas elevada sincronização com condições meteorológicas extremas (elevado  $A_t$  na Tabela 1).

Se  $A_t$  foi elevada e  $C_g$  foi reduzida no dia claro (Tabela 1, em Catuaí Vermelho franco e em Icatu Amarelo enxertado) isso significa que os parâmetros fisiológicos seguiram de perto as flutuações ambientais (elevado  $A_t$ ) sob menor influência de parâmetros fisiológicos relacionados (reduzida  $C_g$ ). Em tal situação, o impacto das condições meteorológicas na rede como um todo foi considerável, desacoplando os parâmetros fisiológicos. Em último caso, poderia romper a topologia da rede proposta na Figura 1 se for acentuada. Por outro lado, se  $C_g$  e  $A_t$  aumentam simultaneamente no dia claro (Tabela 1, em Icatu Amarelo e Obatã francos e Catuaí Vermelho enxertado) o distúrbio causado por valores extremos de PPFD,  $T_{\text{air}}$  e  $VPD_{\text{air}}$  dentro da rede fisiológica da folha é propagado rapidamente e com pouca ou nenhuma atenuação devido ao alto valor de  $C_g$ . Valores reduzidos de  $ADP_N/PDP_N$  ou  $F_v/F_m$  de *C. arabica* (Tabela 1 e Ronquim *et al.*, 2006, respectivamente) podem ser algumas das conseqüências prejudiciais e transitórias no aparato fotossintético promovidos pelo aumento de  $A_t$  no dia claro. Reduzida sincronia com o ambiente em *C. arabica* foi possível somente ao longo do dia nublado, quando a maior variação das variáveis fisiológicas promoveu ajustes metabólicos capazes de mitigar o impacto do ambiente na rede da fotossíntese. Portanto, ao longo do dia nublado, valores similares de  $ADP_N$  e  $PDP_N$  aconteceram em conjunto com valores elevados de  $g_s$ ,  $E$ ,  $\Psi$  e ITE.

Conseqüentemente, valores reduzidos de  $A_t$  (maior autonomia) parecem ser a chave em *C. arabica*, independente do cultivar ou tratamento, para alcançar elevada razão  $ADP_N/PDP_N$ . Catuaí Vermelho foi o único cultivar que aumentou  $ADP_N$  (21%) e  $ADP_N/PDP_N$  (40%), comparando o tratamento enxertado com o franco no dia claro, por meio do aumento de  $C_g$  e decréscimo de  $A_t$  (Tabela 1). Elevado valor de  $C_g$  e reduzido  $A_t$  resultaram em  $ADP_N/PDP_N$  3.6 vezes maior no dia nublado em Catuaí Vermelho franco e Icatu Amarelo enxertado (Tabela 1). Menor  $C_g$  e  $A_t$  no dia nublado foi outro padrão de modulação da rede que permitiu um aumento de  $ADP_N/PDP_N$  de 2.6 vezes em Icatu Amarelo e Obatã francos e em Catuaí Vermelho enxertado (Tabela 1). No terceiro padrão de modulação, encontrado somente em Obatã enxertado,  $C_g$  foi similar em ambos os dias além do reduzido  $A_t$  no dia nublado, resultando em um incremento de 2.6 vezes em  $ADP_N/PDP_N$  no dia nublado.

Ajustes não acoplados de  $C_g$  e  $A_t$  podem ser um dos fundamentos dos sistemas biológicos complexos para assegurar a estabilidade (Strogatz, 2003; Souza and Buckeridge, 2004; Souza *et al.*, 2005).  $C_g$  não mudou ou mudou de acordo com o cultivar, tratamento de enxertia ou condição do dia. Isso indica que a força de conexão entre os parâmetros fisiológicos foliares pode diminuir do dia nublado para o claro impedindo a propagação do distúrbio, ou pode aumentar tornando a rede fisiológica mais responsiva a perturbações. Esse tipo de plasticidade é importante para modular as trocas gasosas foliares, levando em conta a parte aérea (cultivar) e radicular (enxertado ou franco) de *C. arabica*. Nessa espécie, a relação entre a rede fisiológica e o ambiente ( $A_t$ ) foi mais clara e direta do que o grau de conectância entre as variáveis fisiológicas ( $C_g$ ), pois  $A_t$  foi sempre maior em situação estressante (dia claro). Portanto, os parâmetros micrometeorológicos e sua relação com os parâmetros fisiológicos foliares em *C. arabica* são peça-chave que afeta os comportamentos dos balanços de água e de carbono na estação úmida de crescimento.

Ronquim *et al.* (2006) utilizaram somente uma variável fisiológica foliar ( $P_N$ ) para inferir que elevados valores de PFD,  $T_{air}$  e  $VPD_{air}$  provocaram a depressão do meio-dia de

$P_N$  em *C. arabica*. Com a análise de conectância da rede e a PCA pôde-se inferir, respectivamente, que a redução de  $P_N$  foi acompanhada de reduzida autonomia e reduzida variação das variáveis fotossintéticas foliares sob dia claro. A PCA confirma a forte influência das condições meteorológicas diárias em todos os cultivares por meio dos vetores de PFD,  $T_{air}$  e  $VPD_{air}$  ladeando os símbolos do dia claro e devido à projeção acentuada desses vetores no eixo pc1 (especialmente PFD) ao longo do dia claro. As análises de autonomia e conectância e a PCA em *C. arabica* foram apropriadas para discriminar o impacto de fatores de estresse e as respostas de cada cultivar no campo revelando a modulação da rede de fotossíntese responsável pelas relações planta-ambiente.

## I. AUTONOMY AND NETWORK MODULATION OF PHOTOSYNTHESIS AND WATER RELATIONS IN *COFFEA ARABICA*

### ABSTRACT

The connection degree (connectance) of net photosynthesis ( $P_N$ ) with water vapor exchange, water potential, and the autonomy of these parameters in relation to meteorological environment were determined in three grafted and non-grafted *Coffea arabica* cultivars during wet growing season in field. Three behaviors were observed, high connectance and less autonomy on clear day, high connectance and more autonomy on cloudy day, and similar connectance but less autonomy on clear day. Irrespective the cultivar, graft condition, or connectance degree among leaf physiological parameters, the stressful situation along clear day resulted in less autonomy in relation to air temperature, vapor pressure deficit, and photosynthetic photon flux density. Daily  $P_N$  in clear day was only 30% in relation to cloudy day. High synchronization between leaf physiological and meteorological parameters (low autonomy) in clear day was considered the main cause of  $P_N$  drop. This conclusion was supported by results from principal component analyses, which showed contrast between physiological and meteorological vectors, low variability in behavior of grafted and non-grafted plants along sunny day, and symbols of sunny and cloudy days neighboring meteorological and physiological vectors, respectively. Therefore, autonomy was unequivocal indicator of *C. arabica* stress condition in field under clear or sunny days during growing season.

**Key-words:** connectance degree, leaf physiological network, leaf water potential, principal components analysis, system biology

## 1. INTRODUCTION

The study of organisms as systems represented by networks became central in contemporary science (Barabási and Oltvai, 2004). Two system properties named global connectance and autonomy are suitable for assessing, respectively, the interaction among network components and their relationship with environment (Souza *et al.*, 2005). Autonomy (At) depicts how much the physiological parameters change independently on environment. At is determined by means of the correlation between physiological parameters composing a given network and environmental parameters affecting the network. Global connectance (Cg) represents the degree that network components are connected to each other. Cg is determined through the correlation between network components with close physiological relationship (Amzallag, 2001, Souza *et al.*, 2005). Network connectance is related to system stability (Edelman and Gally, 2001). High value of connectance of a given network implicates in prompt response to environmental disturbances. On the other side, high network connectance facilitates the propagation of disturbance through the network system. Contrastingly, physiological networks with reduced connectance among components tend to diminish the disturbance propagation. Low degree of connectance among physiological variables may happen in species or cultivars less sensitive to stress factors. Besides the assessment of network modulation, the principal component analysis (PCA) is useful for considering simultaneously all components of physiological network. PCA depicts which parameter is important in a given circumstance and what is the degree of variation of a corresponding data set (Manly, 1994). Therefore, network connectance, autonomy and PCA are suitable tools in systemic analyses, revealing the strength of interconnections of plant physiological variables, the synchronization of those variables with ambient, and the relative importance of each parameter on the general behavior of a given network. In the present study, Cg and At of leaf photosynthesis network were determined in three grafted and non-grafted *Coffea arabica*

cultivars during daily courses in Southeast of Brazil in wet summer. Alterations in Cg and At represented the modulation of leaf physiological network under changing natural meteorological conditions along clear and cloudy days in field.

Under subtropical conditions in Brazil, summer rainy growing period is associated with high irradiance load and high air and leaf temperatures. In field, high irradiance on *C. arabica* prejudices net carbon assimilation in rainy growing period, lessening potential efficiency of photosystem II and the stomatal conductance (Ronquim *et al.* 2006). *C. arabica* is native of high altitude with mild tropical climate, but *C. canephora* is originated of hot tropical regions showing additional resistance to nematodes (Costa *et al.*, 1991). Grafted *C. arabica* increases growth and grain yield, probably by reason of higher capacity of root system of *C. canephora* in absorbing water and nutrients (Fahl *et al.*, 1998, Fahl *et al.* 2001). It is expected different behavior of net photosynthesis and leaf water relations of *C. arabica* grafted on *C. canephora*, since the latter is more tolerant to high air temperature and soil water deficit (Carelli *et al.*, 1999). Autonomy and network modulation of net photosynthesis and water relations of grafted and non-grafted *C. arabica* were assessed in this work for revealing the impact of contrasting meteorological daily conditions on leaf gas exchange and leaf water status. Several parameters of leaf gas exchange, leaf water potential and meteorological daily conditions were analyzed simultaneously depicting the interrelationships among them and the coordinated response of leaf in a changing environment. Therefore, the aim of this work was to test the connectance theory in a leaf photosynthesis network of grafted and non-grafted *C. arabica* cultivars.



## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. AREA AND PERIOD OF STUDY, RAINFALL BEFORE THE DAYS OF MEASUREMENTS, TOTAL HOURS OF BRIGHT SUNSHINE DURING MEASUREMENTS AND PLANT MATERIALS**

The experiment was carried out near São Carlos city (22°02'15''S- 47°46'57''W, at 957 m a.s.l.) in São Paulo state, Southeast of Brazil. Environmental and leaf physiological data were obtained on 8<sup>th</sup> March 2002 and on 18<sup>th</sup> March 2003, in experimental area of private farm named São José, situated at the road SP-215, km 115, between São Carlos and Descalvado counties. The climate of the region, according to Köppen's classification, is between Aw and Cwa. According to national meteorological station number 83726, located 12 km far from the experimental site, total rainfall accumulated over 70 days before leaf physiological measurements were 720 mm (at 8<sup>th</sup> March 2002) and 581 mm (at 18<sup>th</sup> March 2003). Total rainfall in March 2002 or 2003 was 100 mm, and the total hours of bright sunshine was 6.0 in clear (8<sup>th</sup> March 2002) and 2.1 in cloudy (18<sup>th</sup> March 2003) days.

Non-grafted and grafted cultivars of *C. arabica* L. (Rubiaceae) had been planted in 1997. All cultivars came from Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Brazil. It was utilized the cultivars Catuaí Vermelho (IAC 81), Icatu Amarelo (IAC 2944, from hybridization with *C. canephora*), and Obatã (IAC 1669-20). The distance between plants was 3.5 m x 1.0 m. The plantation was maintained following the commercial practices determined by IAC.

### **2.2. LEAF GAS EXCHANGE, LEAF WATER POTENTIAL AND MICROMETEOROLOGICAL MEASUREMENTS DURING CLEAR AND CLOUDY DAYS**

Diurnal leaf gas exchange data were acquired in rainy season on a clear (8<sup>th</sup> March 2002) and cloudy (18<sup>th</sup> March 2003) days using a portable infra red gas analyzer (IRGA), model LCA-4 (ADC, Hodesddon, UK), connected to a Parkinson leaf chamber PLCN-4 (ADC). Leaf chamber temperature was maintained tracking ambient air temperature ( $T_{\text{air}}$ ) along the diurnal course with Peltier system attached at the head of PLCN-4. Leaf temperature

( $T_{\text{leaf}}$ ) was determined by a copper-constantan thermocouple attached on PLCN-4. Photosynthetic photon flux density (PPFD) was measured through a quantum sensor on PLCN-4 head. LCA-4 worked as an open system determining net photosynthesis ( $P_N$ ), leaf transpiration (E), stomatal conductance to water vapor ( $g_s$ ), and intercellular ( $C_i$ ) and external ( $C_e$ )  $\text{CO}_2$  concentrations. Instantaneous transpiration efficiency (ITE) was calculated as  $P_N/E$  following Nogueira *et al.* (2004).

All individuals were adult and in good sanitary conditions showing similar height and development in field. For each one of three cultivars study two individuals were chosen at least 7 m distance each other and far from the border of the plantation. From each plant were chosen two plagiotropic branches directly exposed to solar irradiance in the upper third part of the canopy. On each branch were selected two sun-leaves completely expanded and healthy (usually the third leaf pair from the branch apex). Leaf gas exchange,  $T_{\text{leaf}}$ , and PPFD were measured about two hours interval, from 07:00h to 17:30h. Leaf water potential ( $\Psi$ ) were obtained with a pressure chamber model 3005 (Soil Moisture, Santa Barbara, USA), immediately after leaf gas exchange determinations. Plants and leaves used for determining  $\Psi$  were chosen following same criteria utilized in gas exchange determinations. Air temperature and air relative humidity were monitored by LCA-4 with opened PLCN-4 in shade, free of leaf, before each time of leaf gas exchange measurements along the day.

### **2.3. NET PHOTOSYNTHESIS ( $P_N$ ) AS A FUNCTION OF PHOTOSYNTHETIC PHOTON FLUX DENSITY (PPFD)**

$P_N$ -PPFD curves were carried out at favorable daytime for plant  $\text{CO}_2$  assimilation (from 07:00h to 09:00h) under field conditions in rainy period on 01<sup>st</sup> and 26<sup>th</sup> March 2002.  $P_N$ -PPFD curves were obtained during early morning using IRGA LCA-4 and PLCN-4 chamber described previously. PLCN-4 was connected to PLU-002 light cannon (ADC, Hoddesdon, UK) containing halogen dichroic lamp (12 V, 20 W). During  $P_N$  measurements the leaf temperature was maintained by a Peltier system at ambient temperature ( $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ).

PPFD between 800-2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  was acquired controlling the voltage applied on PLU-002. Below 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , PPFD were attenuated by reducing the voltage on PLU-002 and fitting neutral glass filters (Comar Instruments, Cambridge, UK) between leaf and light source. Two grafted and two non-grafted plants were used to build up  $P_N$ -PPFD curves. From each plant were chosen two sun-leaves completely expanded and healthy on plagiotropic branches in superior third part of the canopy. It was obtained two  $P_N$ -PPFD curves in each treatment (grafted and non-grafted) on each cultivar. Both corresponding  $P_N$ -PPFD curves were merged and adjusted using the Equation I described by Prado and Moraes (1997). The value of PPFD when  $P_N$  achieved 90% of maximum net photosynthesis was named light saturation point ( $L_s$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

$$(I) \quad P_N = P_{N_{\max}} \left(1 - e^{-k(PPFD - I_c)}\right)$$

$P_N$  = net photosynthesis ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $P_{N_{\max}}$  = maximum net photosynthesis ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $e$  = natural logarithmic bases;  $k$  = constant of proportionality; PPFD = photosynthetic photon flux density ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); and  $I_c$  = light compensation point ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

#### **2.4. INTEGRATED VALUE OF NET PHOTOSYNTHESIS FROM DAILY COURSE AND THE POTENTIAL AND ACTUAL NET PHOTOSYNTHESIS ON DAILY BASIS**

$P_N$  values obtained during daily course were integrated using Equation II, which generated the corresponding integrated value of  $P_N$  along the day ( $IP_N$ ) as described by Prado *et al.* (2001), Kikusawa *et al.* (2004) and Ronquim *et al.* (2006):

$$(II) \quad IP_N = \int f(x)d(x)$$

$IP_N$  = integrated  $P_N$ ,  $x$  = time interval in seconds along the day (independent variable);  $f(x)$  = the dependent variable ( $P_N$ ), and  $d(x)$  = derived time interval in seconds

Two integrated net photosynthesis (the net CO<sub>2</sub> assimilation per day) were calculated at each daily course, potential (PDP<sub>N</sub>) and actual (ADP<sub>N</sub>) daily net assimilations. PDP<sub>N</sub> was calculated in two steps. P<sub>Nmax</sub> (from Equation I) and the values of PPFD obtained during the course of the day were initially applied in Equation I for determining the expected net CO<sub>2</sub> assimilation at each time of the day. Equation II was used subsequently to integrate these predictable P<sub>N</sub> values along the day, resulting in integrated potential daily net photosynthesis (PDP<sub>N</sub>). PDP<sub>N</sub> represents the daily net assimilation eventually limited by PPFD along the day. The integrated actual daily net photosynthesis (ADP<sub>N</sub>) was calculated using P<sub>N</sub> measured along the day applied directly in Equation II. It represents the daily net assimilation limited by ambient and internal plant constraints such as high VPD<sub>air</sub> and low Ψ, respectively. Comparing both, PDP<sub>N</sub> and ADP<sub>N</sub>, it was possible to estimate how much grafted and non-grafted plants of each cultivar dropped net CO<sub>2</sub> assimilation as a function of environmental and internal plant constraints along the day (Kikusawa *et al.* 2004, Ronquim *et al.*, 2006).

## **2.5. CONNECTANCE NETWORK, AUTONOMY AND PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS**

It was tested the normality of each mean data set obtained along the daily courses before to use the Pearson correlation coefficient for calculating connectance and autonomy. Jarque-Bera normality test (Zar, 1999) was applied on each variables set. All variables set presented normal distribution. Therefore, it was possible to obtain the Pearson correlation coefficient from any paired parameters along the daily courses, utilizing this coefficient in subsequent connectance and autonomy determinations.

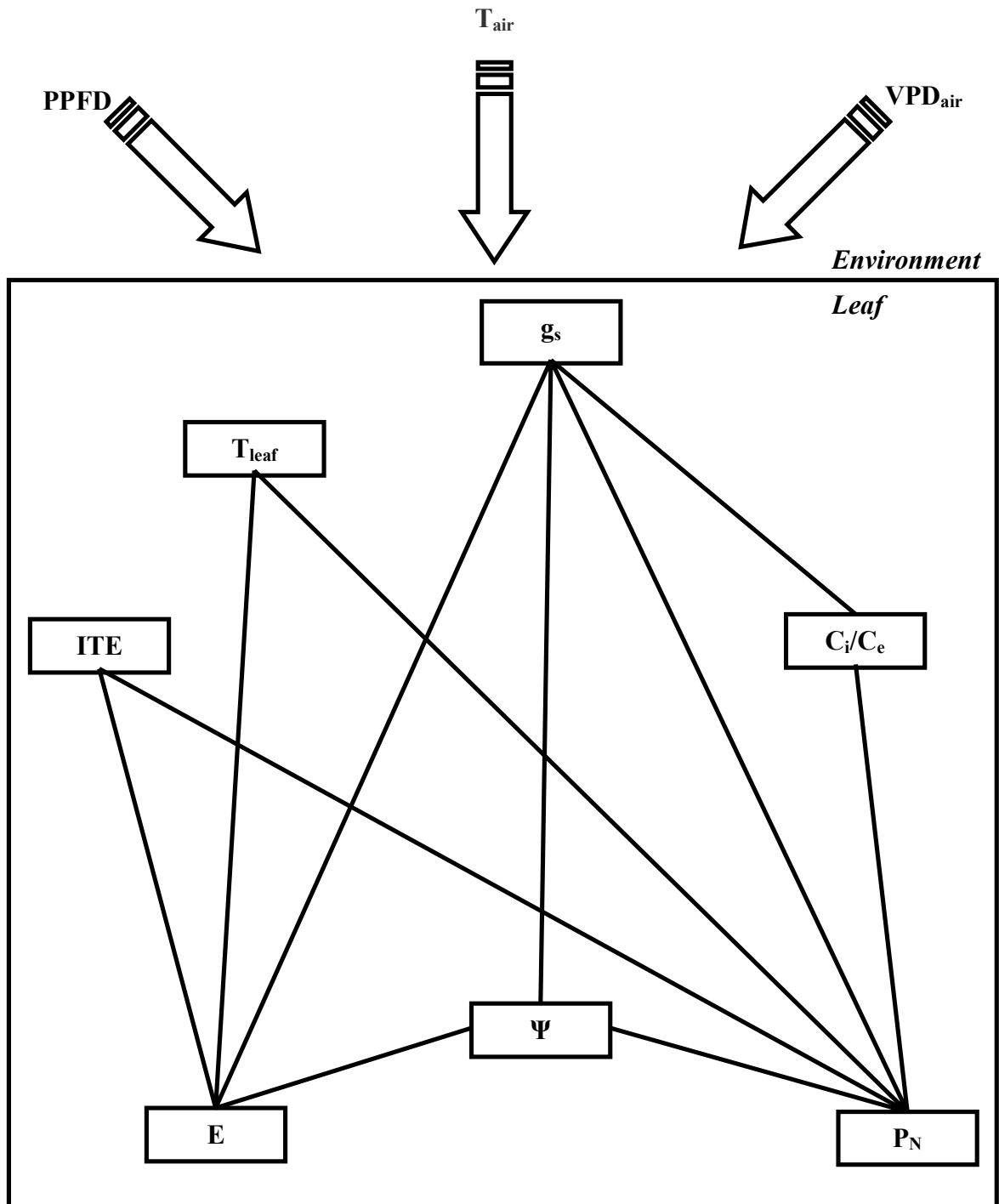
The modulation of leaf photosynthesis network was assessed using the concept of global connectance, C<sub>g</sub> (Amzallag, 2001). The Pearson correlation coefficient (r) obtained from each paired variable in leaf physiological network was used to determine the strength of the relationship (connection) between variables. Subsequently, r-values were normalized by z-transformation, becoming z-values (the connectance values) as indicated by Amzallag (2001):

$$(III) \quad z = 0.5 \ln \left[ \frac{(1+|r|)}{(1-|r|)} \right]$$

Network global connectance (Cg) was represented by the average of z-values (Amzallag, 2001):

$$(IV) \quad Cg = \frac{1}{m} [z(A, X_1) + \dots + z(A, X_m)]$$

Figure 1 shows the topology of proposed leaf photosynthesis network resulting in similar design to that proposed by Prado *et al.* (2004). Above physiological network (Figure 1) there are environmental variables related to the strength of connection between physiological variables along the day. Plant autonomy (At) was obtained through the correlation between leaf physiological parameters (the components of physiological network) and the environmental variables (Souza *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2005). Therefore, At was determined in clear and cloudy days as the average of z-values between P<sub>N</sub>, g<sub>s</sub>, C<sub>i</sub>/C<sub>e</sub>, E, ITE, Ψ, T<sub>leaf</sub> and PPFD, T<sub>air</sub>, and VPD<sub>air</sub>. Thus, lower connectance with environment means higher autonomy degree (Souza *et al.*, 2005).



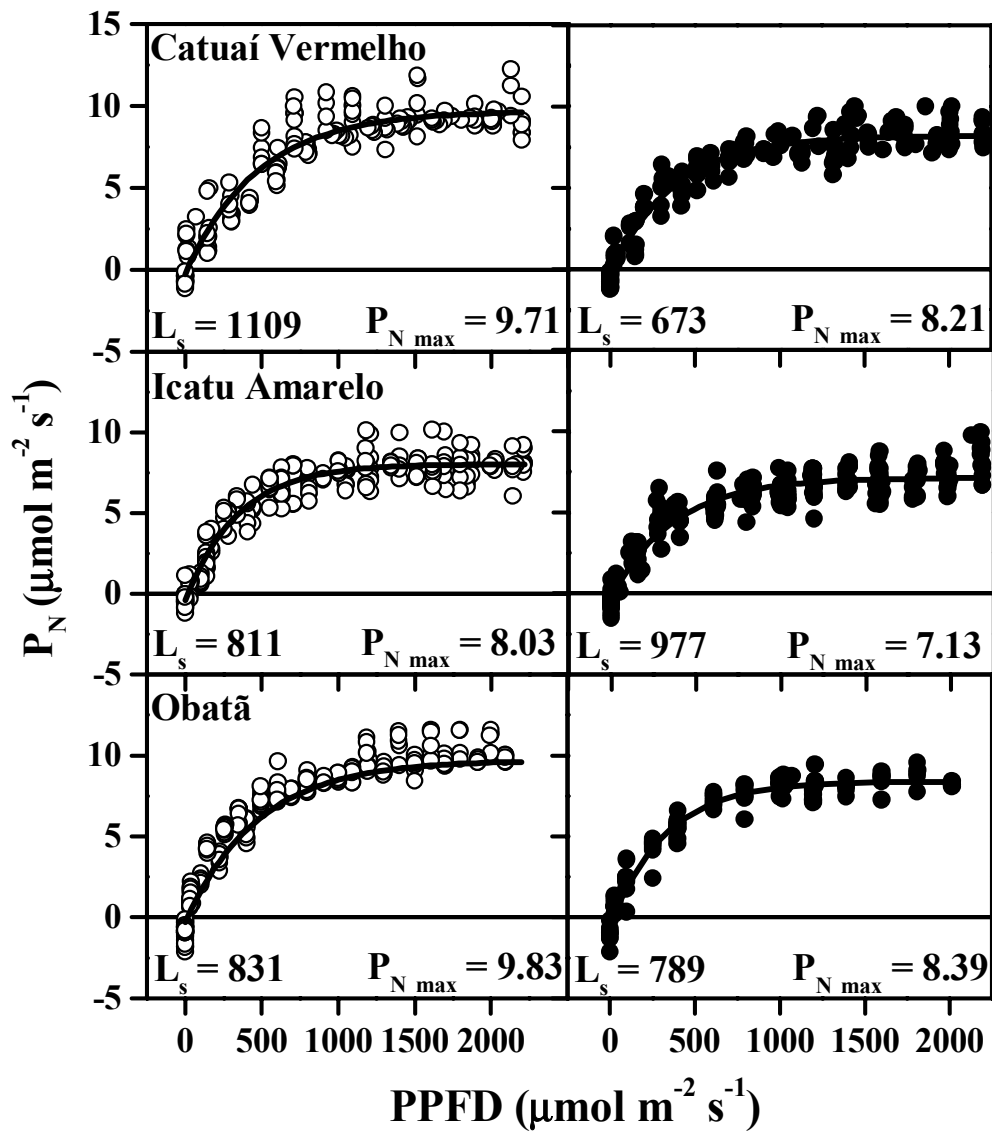
**Figure 1.** Topology of a network representing the interactions of leaf gas exchange and leaf water potential ( $\Psi$ ) variables. Straight lines connecting paired components denote close and reciprocal relationship between physiological variables utilized to determine the network connectance in clear and cloudy days. Each arrow on the top represents one environmental parameter influencing the connection strength between network components. PPFD= photosynthetic photon flux density,  $T_{air}$  = air temperature,  $VPD_{air}$  = air vapor pressure deficit,  $g_s$  = stomatal conductance to water vapor,  $C_i/C_e$  = intercellular ( $C_i$ ) per external ( $C_e$ )  $CO_2$  concentration,  $P_N$  = net photosynthesis,  $E$  = leaf transpiration,  $ITE$  = instantaneous transpiration efficiency,  $T_{leaf}$  = leaf temperature.

The principal component analysis (PCA) was accomplished using PC-ORD software, version 3.12, MJM Software Design (Glendon Beach, Oregon, USA). Each one of two axis of PCA graph was denominated principal component (pc1 or pc2) based on the correlations among analyzed variables. It allowed the analysis of all physiological and meteorological variables in a two-dimensional space guided by two axes (pc1, pc2). The vectors of PCA on quadrants represented the more important physiological or environmental variables determining the distribution of symbols (Manly, 1994).

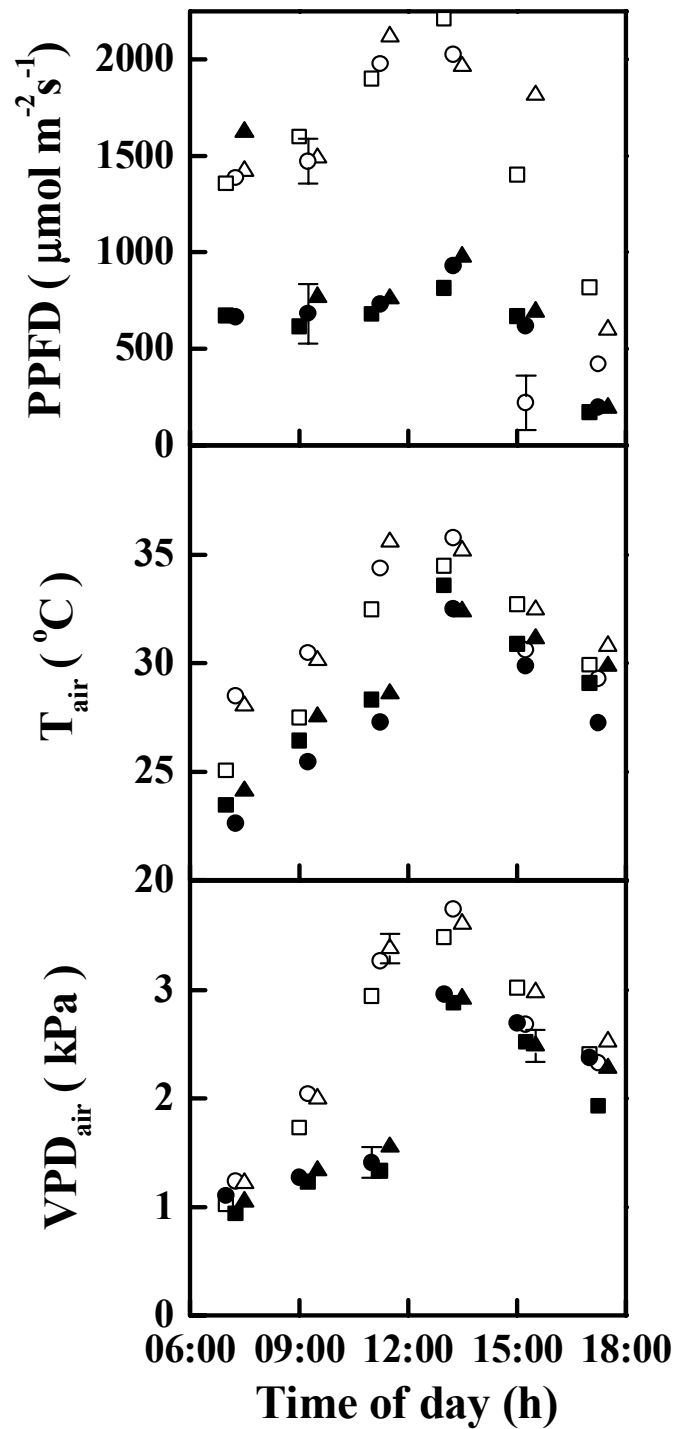
### 3. RESULTS

Figure 2 shows  $P_N$  as a function of PPFD in non-grafted and grafted *C. arabica* cultivars. On average,  $I_s$  was  $865 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , but grafted Catuaí Vermelho and Obatã showed lower  $I_s$  ( $673$  and  $789 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectively) than non-grafted cultivars.  $P_{N\text{max}}$  was somewhat lower in grafted than in non-grafted plants. Diurnal determinations of micrometeorological conditions, leaf gas exchange, and leaf water potential on non-grafted plants were carried out previously (Ronquim *et al.*, 2006). Figure 3 shows the diurnal courses of PPFD,  $T_{\text{air}}$ , and  $\text{VPD}_{\text{air}}$  along clear and cloudy days during growing period (rainy season). Higher values of PPFD,  $T_{\text{air}}$ , and  $\text{VPD}_{\text{air}}$  happened in clear day. These micrometeorological data peaked around 13:00h in clear than in cloudy day. Despite lower PPFD in cloudy than clear day, PPFD from 07:00h to 15:00h were between maximum and minimum  $I_s$  acquired ( $673$ - $1109 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectively).  $T_{\text{air}}$  and  $\text{VPD}_{\text{air}}$  were higher in clear than in cloudy day, especially between 09:00h-15:00h, because of high irradiance loads.



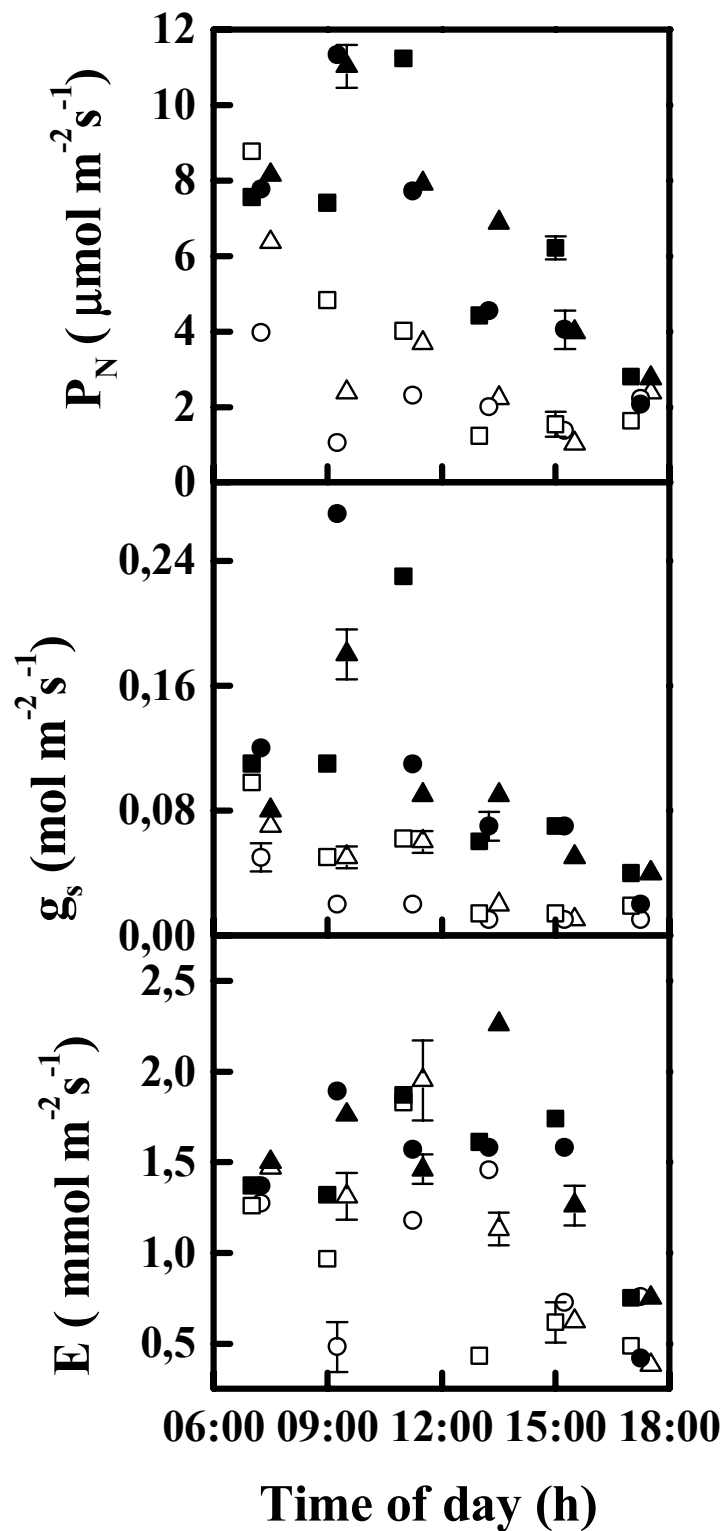


**Figure 2.** Net photosynthesis ( $P_N$ ) as a function of photosynthetic photon flux density (PPFD) on leaves of non-grafted (○) and grafted (●) *Coffea arabica* on *Coffea canephora* during summer (March 2002, rainy season). Two curves were merged at each panel before adjustments. The values of maximum net photosynthesis ( $P_{N \max}$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and light saturation point ( $L_s$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) are shown at the bottom of each panel.

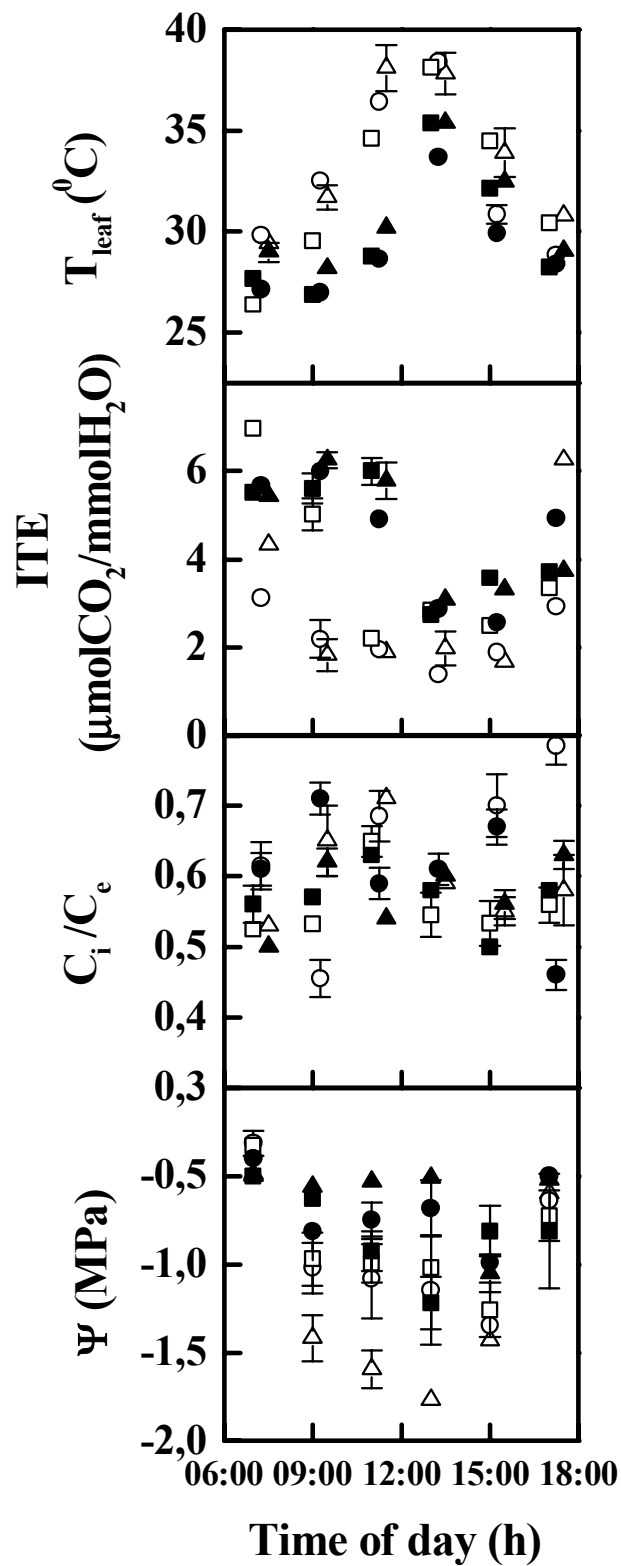


**Figure 3.** Diurnal courses of photosynthetic photon flux density (PPFD), air temperature ( $T_{air}$ ) and air vapor pressure deficit ( $VPD_{air}$ ) on clear (open symbols) and cloudy (solid symbols) days in wet season. Symbol denotes mean and bar represents standard error obtained on *Coffea arabica* cultivars Catuai Vermelho ( $\square, \blacksquare$ ), Icatu Amarelo ( $\circ, \bullet$ ) and Obatã ( $\triangle, \blacktriangle$ ) grafted on *Coffea canephora*.

Figure 4 shows the results of diurnal leaf-atmosphere gas exchange. Despite lower PPFD, the values of  $P_N$ ,  $g_s$  and  $E$  were usually higher during cloudy than clear day in all cultivars. On Figure 5 are shown the mean values of  $T_{leaf}$ , ITE,  $C_i/C_e$ , and  $\Psi$  during clear and cloudy days.  $\Psi$  and ITE were higher along cloudy than clear day (Figure 5) in spite of higher corresponding values of  $E$  and  $g_s$  (Figure 4).  $T_{leaf}$  was similar comparing clear and cloudy days only in the beginning and at the end of the diurnal courses (Figure 5). At noon,  $T_{leaf}$  was 5 to 8°C higher in clear than in cloudy day. Taking in account all cultivars together or each one individually, the mean values of  $C_i/C_e$  (Figure 5) showed similar variation along clear than cloudy day.



**Figure 4.** Leaf-atmosphere gas exchange variables measured on three *Coffea arabica* cultivars growing under field conditions in wet season on clear (open symbols) and on cloudy (solid symbols) days. Symbol denotes mean and bar represents standard error obtained on *Coffea arabica* cultivars Catuai Vermelho ( $\square, \blacksquare$ ), Icatu Amarelo ( $\circ, \bullet$ ) and Obatã ( $\Delta, \blacktriangle$ ) grafted on *Coffea canephora*.  $P_N$  = net photosynthesis,  $g_s$  = stomatal conductance,  $E$  = leaf transpiration.



**Figure 5.** Leaf temperature ( $T_{leaf}$ ), instantaneous transpiration efficiency (ITE), intercellular ( $C_i$ ) per external ( $C_e$ )  $\text{CO}_2$  concentration ( $C_i/C_e$ ), and leaf water potential ( $\Psi$ ) in three *Coffea arabica* cultivars growing under field conditions in wet season during clear (open symbols) and cloudy (solid symbols) days. Symbol denotes mean and bar represents the standard errors obtained on *Coffea arabica* cultivars Catuaí Vermelho ( $\square, \blacksquare$ ), Icatu Amarelo ( $\circ, \bullet$ ), and Obatã ( $\Delta, \blacktriangle$ ) grafted on *Coffea canephora*.

The values of potential ( $PDP_N$ ) and actual ( $ADP_N$ ) daily photosynthesis are shown on Table 1, where are included the results of global connectance ( $C_g$ ) and autonomy ( $A_t$ ) of grafted and non-grafted cultivars during clear and cloudy days.  $ADP_N/PDP_N$  was larger in cloudy day in grafted and non-grafted cultivars. There are similar or higher values of  $ADP_N/PDP_N$  in non-grafted than in grafted cultivars despite day meteorological condition, with exception for Catuaí Vermelho on clear day and Obatã in cloudy day. Irrespective the graft treatment, all cultivars showed higher autonomy (lower  $A_t$  values) in cloudy day. Similar values of  $C_g$  between days were found only in grafted Obatã. Three patterns of behavior were possible to note concerning global connectance and autonomy. In non-grafted Icatu Amarelo, non-grafted Obatã and grafted Catuaí Vermelho,  $C_g$  and  $A_t$  were higher in clear day. In non-grafted Catuaí Vermelho and grafted Icatu Amarelo  $C_g$  was higher but  $A_t$  lower in cloudy day. The third behavior was observed only in grafted Obatã, in which happened similar  $C_g$  between days and lower  $A_t$  in clear day.

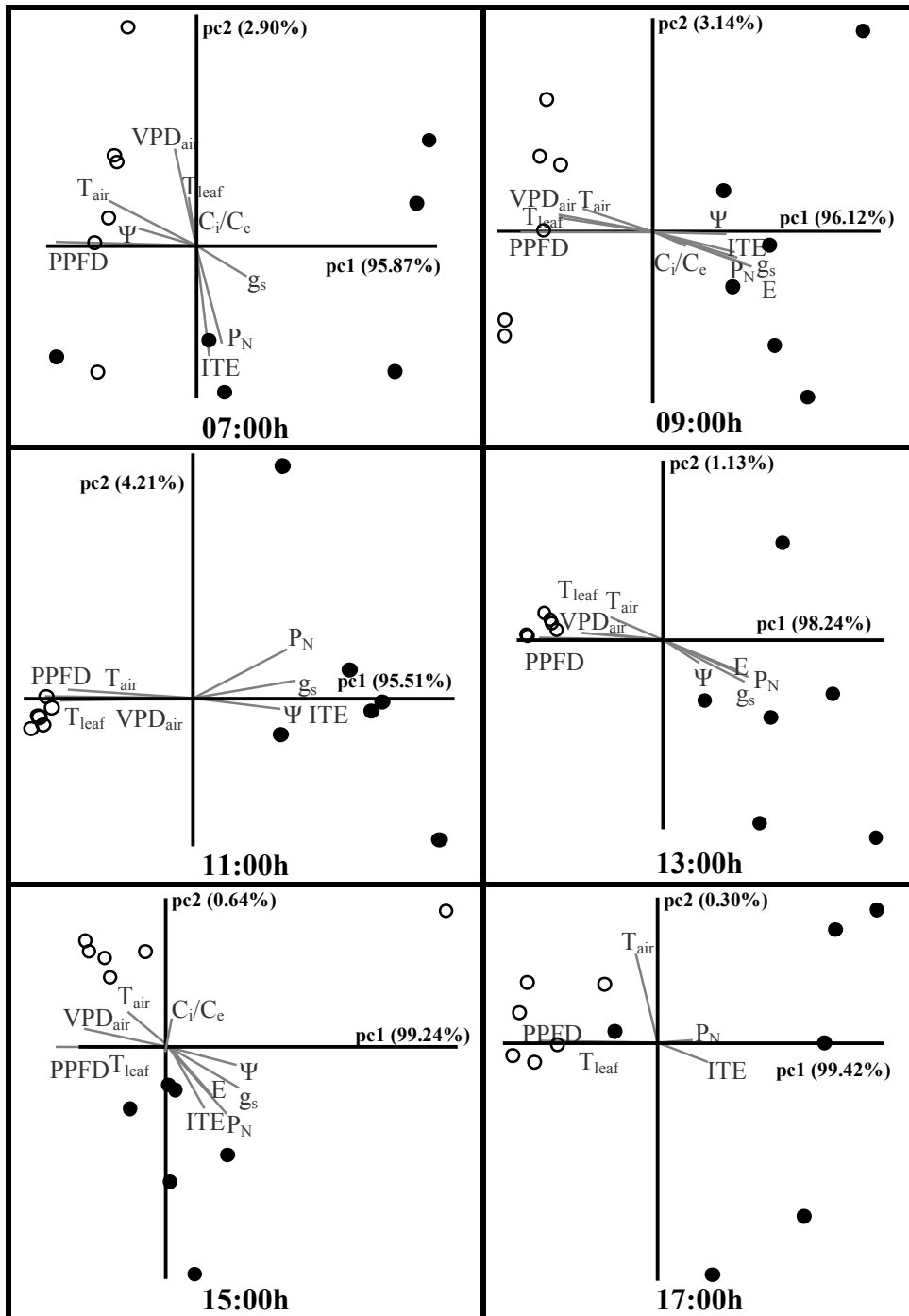
**Table 1.** Values of potential ( $PDP_N$ ) and actual ( $ADP_N$ ) daily net photosynthesis ( $\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ ) of three grafted and non-grafted *Coffea arabica* cultivars (Catuaí Vermelho, Icatu Amarelo and Obatã) growing under field conditions in wet season during clear and cloudy days. Values of global connectance ( $C_g$ ) and autonomy ( $A_t$ ) obtained along daily courses are shown.

	Non-Grafted cultivars					
	Catuaí Vermelho		Icatu Amarelo		Obatã	
	Clear	Cloudy	Clear	Cloudy	Clear	Cloudy
$PDP_N^*$	330	256	268	239	347	287
$ADP_N^*$	100	276	98	246	112	232
$ADP_N/PDP_N^*$	0.30	1.08	0.36	1.03	0.32	0.81
$C_g$	0.59	0.65	1.06	0.49	0.61	0.48
$A_t$	0.93	0.75	0.91	0.68	0.71	0.58
	Grafted cultivars					
$PDP_N$	289	232	249	237	287	247
$ADP_N$	121	248	71	234	99	254
$ADP_N/PDP_N$	0.42	1.07	0.28	0.99	0.34	1.03
$C_g$	0.75	0.58	0.56	0.63	0.50	0.51
$A_t$	0.86	0.69	0.70	0.66	0.75	0.57

\*Obtained by Ronquim *et al.* (2006).

Figure 6 shows the results of principal component analyses (PCA) taking in account all micrometeorological (Figure 3) and physiological (Figures 4 and 5) data obtained along clear and cloudy days. In all PCA panels pc1 axe explains more than 95% of distribution of symbols in quadrants. Vectors representing environmental and physiological parameters are in opposite direction neighboring, respectively, the symbols of clear and cloudy days along the diurnal courses. Therefore, PPFD,  $T_{air}$ ,  $VPD_{air}$ , and  $T_{leaf}$  vectors appeared inclined to or on the symbols representing grafted and non-grafted cultivars along the clear day. Contrastingly,  $P_N$ ,  $E$ ,  $g_s$ ,  $C_i/C_e$ , ITE, and  $\Psi$  physiological vectors trended to incline to symbols representing cultivars along the cloudy day (Figure 6). There is an unmistakable separation between symbols representing distinct days along the diurnal course since early morning until the end of the afternoon, especially around midday. In addition, grouping of symbols of clear day is more pronounced than in cloudy day, mainly under high PPFD at 11:00h and 13:00h.





**Figure 6.** Principal component analysis of leaf gas exchange and leaf water potential ( $\Psi$ ) obtained during daily courses in three *Coffea arabica* cultivars. Each panel represents one time of the day. Clear and cloudy days are represented by open (○) and solid (●) symbols, respectively. Each symbol indicates one cultivar irrespective the treatment (grafted or non-grafted). Vector (grey straight line) represents most important environmental and physiological parameters. PPFD = photosynthetic photon flux density,  $VPD_{air}$  = air vapour pressure deficit,  $T_{air}$  = air temperature,  $T_{leaf}$  = leaf temperature,  $P_N$  = net photosynthesis,  $g_s$  = stomatal conductance,  $E$  = leaf transpiration,  $ITE$  = instantaneous transpiration efficiency,  $C_i/C_e$  = intercellular ( $C_i$ ) per external ( $C_e$ )  $CO_2$  concentration.

#### 4. DISCUSSION

$P_N$  decreasing after midday in clear day may have stomatal causes, since  $g_s$  values are lower in corresponding daytime (Figure 4). Besides, high values of PPFD indicate that low  $P_N$  observed during clear day could be owed to photoinhibition. The potential efficiency of photosystem II of *C. arabica* assessed by the ratio of variable ( $F_v$ ) per maximum ( $F_m$ ) chlorophyll fluorescence was strongly depressed during clear day at noon in wet season, but  $F_v/F_m$  increased under low PPFD in late afternoon (Ronquim *et al.*, 2006). These last authors obtained significant and negative correlation between  $F_v/F_m$ -PPFD or  $F_v/F_m$ -VPD<sub>air</sub> in clear day in field on same cultivars of *C. arabica* studied here. In addition to high PPFD,  $T_{leaf}$  was higher than 30°C in clear day from 12:00h up to 15:00h when  $\Psi$  was low (Figure 5). Therefore,  $P_N$  depression after midday was a consequence of adverse photochemical (low  $F_v/F_m$ ), biophysical (low  $g_s$  and  $\Psi$ ), and thermal (high  $T_{leaf}$ ) leaf circumstances provoked by high PPFD,  $T_{air}$  and VPD<sub>air</sub> in wet growing season. Consequently, irrespective the cultivar or treatment, ADP<sub>N</sub> and ADP<sub>N</sub>/PDP<sub>N</sub> values were lower in clear than in cloudy day (Table 1).

Symbols in PCA representing grafted and non-grafted cultivars (Figure 6) are more grouped along clear day indicating that  $\Psi$  and leaf-atmosphere gas exchange showed less diurnal variation. The vectors of environmental and  $T_{leaf}$  parameters are inclined to symbols of clear day, with great projection on pc1 (especially PPFD-vector) since early morning up to afternoon (Figure 6). Furthermore, the parameters associated with high PPFD,  $T_{air}$ , VPD<sub>air</sub> (meteorological vectors) are in contrast with parameters associated with high  $P_N$ ,  $C_i/C_e$ ,  $g_s$ ,  $E$ ,  $\Psi$ , and ITE (physiological parameters) in most daytimes (Figure 6). It suggests that meteorological conditions are determining the taut grouping configuration along clear day. In addition, high connection degree with environment (low autonomy) found in all cultivars and treatments in clear day (Table 1) indicates high-synchronized leaf physiological response with environment under high PPFD,  $T_{air}$ , and VPD<sub>air</sub> (Figure 3). It implicates in extend leaf

physiological vulnerability, since physiological network parameters showed low variation along the clear day (grouping in Figure 6) but high synchronization with extreme meteorological conditions (high  $A_t$  in Table 1).

If  $A_t$  was high and  $C_g$  was low in clear day (Table 1, in non-grafted Catuaí Vermelho and in grafted Icatu Amarelo) it means that physiological parameters followed closely the ambient fluctuations (high  $A_t$ ) under less influence from related physiological parameters (low  $C_g$ ). In such situation, the impact of meteorological conditions on whole network was considerable, uncoupling physiological parameters. Ultimately, it could disrupt the network topology proposed in Figure 1. On the other hand, if  $C_g$  and  $A_t$  increase simultaneously in clear day (Table 1, non-grafted Icatu Amarelo and Obatã, and grafted Catuaí Vermelho) the disturbance of high PPFD,  $T_{air}$  and  $VPD_{air}$  inside leaf physiological network is propagated quickly and with little attenuation by reason of high  $C_g$ . Reduced values of  $ADP_N/PDP_N$  or  $F_v/F_m$  of *C. arabica* (Table 1 and Ronquim *et al.*, 2006, respectively) could be some consequences of transient impairments in photosynthetic apparatus promoted by increasing of  $A_t$  in clear day. Reduced synchronization with environment in *C. arabica* was possible only along cloudy day, when higher variation of paired physiological variables promoted metabolic adjustments able to mitigate the impact of environment on photosynthesis network. Thus, along cloudy day, similar values of  $ADP_N$  and  $PDP_N$  happened together with higher values of  $g_s$ ,  $E$ ,  $\Psi$  and ITE.

Hence, low  $A_t$  values (higher autonomy) seems the key in *C. arabica*, irrespective the cultivar or treatment, for achieving high  $ADP_N/PDP_N$  ratio. Catuaí Vermelho was the solo cultivar that enlarged  $ADP_N$  (21%) and  $ADP_N/PDP_N$  (40%), comparing grafted with non-grafted treatment in clear day, by increasing  $C_g$  and decreasing  $A_t$  (Table 1). High  $C_g$  and low  $A_t$  resulted in  $ADP_N/PDP_N$  3.6 times greater in cloudy day in non-grafted Catuaí Vermelho and in grafted Icatu Amarelo (Table 1). Low  $C_g$  and  $A_t$  in cloudy day was another pattern of network modulation enabling an increase of  $ADP_N/PDP_N$  about 2.6 times in non-

grafted Icatu Amarelo and Obatã, and in grafted Catuaí Vermelho (Table 1). In third modulation pattern, found only in grafted Obatã, Cg was similar in both days besides low At in cloudy day, resulting in increment of 2.6 times of  $ADP_N/PDP_N$  in cloudy day.

Non-coupling adjustments of Cg and At could be the bases of complex biological systems to ensure stability (Strogatz, 2003; Souza and Buckeridge, 2004; Souza *et al.*, 2005). Cg did not change or changed according to cultivar, graft treatment or day condition. It indicates that the force of connection among leaf physiological parameters could decrease from cloudy to clear day avoiding the breakdown propagation, or it could increase becoming physiological network more responsive to disturbances. This kind of plasticity is important to modulate leaf gas exchange, taking in account the shoot (cultivar) and root (grafted or non-grafted) traits of *C. arabica*. In this species, the relationship between physiological network and environment (At) was more clear and direct than the connectance degree among physiological variables (Cg), because of At was always higher under stressful situation (clear day). Therefore, the micrometeorological parameters and their relationship with leaf physiological parameters in *C. arabica* is the keystone concerning carbon and water balances behaviors in wet growing season.

Ronquim *et al.* (2006) utilized only one leaf physiological variable ( $P_N$ ) to infer that high PPFD,  $T_{air}$ , and  $VPD_{air}$  provoked  $P_N$  midday depression in *C. arabica*. With network connectance and PCA analysis it could be inferred, respectively, that decreasing of  $P_N$  was accompanied by low plant autonomy and low variation of leaf photosynthesis variables in clear day. PCA confirms the strong influence of daily meteorological conditions in all cultivars by means of PPFD,  $T_{air}$  and  $VPD_{air}$  vectors neighboring clear day symbols and because of great size of projection of these vectors on pc1 (especially PPFD) along clear day. Autonomy, connectance and PCA analysis in *C. arabica* were appropriate to discriminate the impact of stress factors and the responses of each cultivar in field, uncovering the physiological network modulation that underlies plant-environmental relationships.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (REFERENCES)

- Amzallag GN (2001). *Data analysis in plant physiology: are we missing the reality?* **Plant Cell and Environment**, 24: 881-890.
- Barabási AL, Oltvai ZN (2004). *Network biology: Understanding the cell's functional organization.* **Nature**, 5: 101-113.
- Carelli MLC, Fahl JI, Trivelin PCO, Voltan RBQ (1999). *Carbon isotope discrimination and gas exchange in coffee species grown under different irradiance regimes.* **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 11(2): 63-68.
- Costa WM, Gonçalves W, Fazuoli LC (1991). *Produção do café Mundo Novo em porta-enxertos de Coffea canephora em área infestada com Meloidogyne incognita raça 1.* **Nematologia Brasileira**, 15: 43-50.
- Edelman GM, Gally JA (2001). *Degeneracy and complexity in biological systems.* **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98: 13763-13768.
- Fahl JI, Carelli MLC, Gallo PB, Costa WM, Novo MCSS (1998). *Enxertia de Coffea arabica sobre progênies de C. canephora e de C. congensis no crescimento, nutrição mineral e produção.* **Bragantia**, 57(2): 297-312.
- Fahl JI, Carelli MLC, Menezes HC, Gallo PB, Trivelin PCO (2001). *Gas exchange, growth, yield and beverage quality of C. arabica cultivars grafted on to C. canephora and C. congensis.* **Experimental Agriculture**, 37: 241-252.
- Kikusawa K, Shirskawa H, Suzuki M, Umeki K (2004). *Mean labor time of a leaf.* **Ecological Research**, 19: 365-374.
- Manly BJB (1994). *Multivariate Statistical Methods.* **Chapman & Hall**, London, UK.
- Nogueira A, Martinez CA, Ferreira LL, Prado CHBA (2004). *Photosynthesis and water use efficiency in twenty tropical tree species of differing succession status in a Brazilian reforestation.* **Photosynthetica**, 42(3): 351-356.
- Prado CHBA, Passos EEM, Moraes JAPV (2001). *Photosynthesis and water relations of six tall genotypes of Cocos nucifera in wet and dry seasons.* **South African Journal of Botany**, 67: 169-176.
- Prado CHBA, Moraes JAPV (1997). *Photosynthetic capacity and specific leaf mass in twenty woody species of Cerrado vegetation under field conditions.* **Photosynthetica**, 33: 103-112.
- Prado CHBA, Wenhui Z, Rojas MHC, Souza GM (2004). *Seasonal leaf gas exchange and water potential in a woody cerrado species community.* **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 16(1): 7-16.
- Ronquim JC, Prado CHBA, Novaes P, Fahl JI, Ronquim CC (2006). *Carbon gain in Coffea arabica L. during clear and cloudy days in wet season.* **Experimental Agriculture**, 22: 147-164.

- Souza GM, Buckeridge MS (2004). *Sistemas complexos: novas formas de ver a Botânica*. **Revista Brasileira de Botânica**, 27(3): 407-419.
- Souza GM, Ribeiro RV, Santos MG, Ribeiro HL, Oliveira RF (2004). *Functional groups of forest succession as dissipative structures: an applied study*. **Brazilian Journal of Biology**, 64: 707-718.
- Souza GM, Ribeiro RV, Oliveira RF, Machado EC (2005). *Network connectance and autonomy analyses of the photosynthetic apparatus in tropical tree species from different successional groups under contrasting irradiance conditions*. **Revista Brasileira de Botânica**, 28(1): 47-59.
- Strogatz S (2003). *SYNC: The emerging science of spontaneous order*. **Theia**, New York, USA.
- Zar JH (1999). *Biostatistical analysis*. **Prentice-Hall**, New Jersey, USA.

## II. EFICIÊNCIA DE CARBOXILAÇÃO, TAXA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS E CAPACIDADE FOTOSSINTÉTICA AFETADOS PELA TEMPERATURA FOLIAR EM PLANTAS JOVENS DE *COFFEA ARABICA*

### RESUMO

O grau de conexão de parâmetros bioquímicos e fotoquímicos da fotossíntese foi avaliado em três cultivares de *Coffea arabica* expostos a temperaturas foliares entre 17 e 32°C por 14 horas. Todos cultivares apresentaram elevadas fotossíntese líquida máxima ( $P_{Nmax}$ ) e eficiência quântica aparente, bem como reduzidos pontos de saturação e compensação luminosa sob temperaturas reduzidas (17-23°C). A respiração no escuro ( $R_d$ ) aumentou com a temperatura, porém sob 32°C ocorreu acentuada redução da  $R_d$ , do ponto de saturação luminosa e da  $P_{Nmax}$ , especialmente no cultivar Ouro Verde. As plantas jovens de *C. arabica* não apresentaram aumento em  $P_{Nmax}$  sob concentração de  $CO_2$  igual a  $1200 \mu mol mol^{-1}$ . Sob elevadas temperaturas (26-32°C) e  $1200 \mu mol mol^{-1}$  de  $CO_2$ , a eficiência de carboxilação e a limitação estomática da fotossíntese diminuíram em contraste com o aumento da limitação mesofílica da fotossíntese. O processo fotossintético foi fortemente inibido em todos os cultivares expostos por 14 horas à temperatura foliar de 32°C sob concentrações de  $CO_2$  iguais a  $355 \mu mol mol^{-1}$  e  $1200 \mu mol mol^{-1}$ . A modulação de uma rede fisiológica construída com parâmetros do metabolismo do carbono e os resultados da análise de componentes principais (PCA) com os mesmos parâmetros permitiu revelar comportamentos contrastantes entre as temperaturas reduzidas (17-23°C) e elevadas (26-32°C), onde os componentes da rede estavam conectados fracamente entre si (menor conectância) e apresentaram menor amplitude de variação (PCA) sob temperatura reduzida.

**Palavras-chave:** análise de componentes principais, biologia sistêmica, conectância da rede, estresse térmico, excesso de elétrons, trocas gasosas foliares.

## 1. INTRODUÇÃO

A temperatura foliar e a disponibilidade de água são dois dos mais importantes fatores que influenciam a assimilação líquida de CO<sub>2</sub> pela planta (Larcher, 2003). A temperatura foliar é o principal fator que afeta os processos bioquímico e fotoquímico de fixação de CO<sub>2</sub> inerentes (Pastenes e Horton, 1996). A temperatura influencia a assimilação líquida de carbono modificando a cinética do ciclo de Calvin (Salvucci e Crafts-Brandner, 2004) e a taxa de transporte na cadeia de elétron (Wise *et al.*, 2004; Salvucci e Crafts-Brandner, 2004). Além disso, a temperatura foliar afeta a condutância estomática ( $g_s$ ) e a transpiração (E) por meio do déficit de pressão de vapor entre folha e atmosfera. Se a temperatura foliar aumenta, por exemplo, de 10 para 30°C, a eficiência de carboxilação ( $\epsilon$ ) diminui nas plantas C3, pois a solubilidade do CO<sub>2</sub> diminui mais que a do O<sub>2</sub> (Šestak *et al.*, 1971). Por outro lado, há pouco ou nenhum dano no fotossistema II (PSII) mesmo quando a fotossíntese se aproxima de zero sob estresse pelo calor (Sharkey, 2005). Portanto, a assimilação líquida de carbono estaria substancialmente reduzida nas plantas C3 submetidas a estresse moderado pelo calor, mas o transporte de elétrons no PSII é mantido quase intacto.

No Brasil, as plantações de *Coffea arabica* estão estabelecidas principalmente em áreas com temperatura média anual entre 18 e 22°C (Barros *et al.*, 1997). Novos cultivares são capazes de crescer em áreas com temperatura entre 24 e 25°C, como na região Nordeste brasileira, com produtividade satisfatória (DaMatta, 2004). Em áreas frias, o resfriamento afeta negativamente *C. arabica* pela diminuição da assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (Bauer *et al.*, 1985, Oliveira *et al.*, 2002). Longos períodos sob temperaturas menores que 12°C prejudicam seriamente o desenvolvimento de plantas jovens de *C. arabica* (DaMatta *et al.*, 1997). No entanto, Carvalho *et al.* (1998) observaram que o cultivar Catuaí Vermelho não mostrou alterações significantes da fotossíntese líquida, transpiração foliar, condutância estomática e capacidade fotoquímica do PSII mesmo sob 8±1°C.



Sob temperaturas acima de 23°C o desenvolvimento e amadurecimento dos frutos de *C. arabica* é acelerado, freqüentemente ocasionando perda de qualidade e, se associado à prolongada estação seca, pode provocar o aborto das flores (Camargo, 1985). Exposição contínua dos cafeeiros a temperaturas em torno de 30°C pode resultar na depressão do crescimento e em anormalidades morfológicas (Franco, 1958). Por outro lado, em regiões com temperatura média anual menor que 17°C, o crescimento é fortemente deprimido (DaMatta e Ramalho, 2006). Portanto, a faixa de temperatura entre 17 e 30°C é conveniente para o estudo do comportamento fisiológico foliar de *C. arabica*.

O aumento da concentração externa de CO<sub>2</sub> (C<sub>e</sub>) geralmente aumenta ou mantém a fotossíntese líquida sob o estresse provocado pelo calor, agindo contra o impacto negativo da temperatura elevada no balanço de carbono (Tezara *et al.*, 2002). Por outro lado, em algumas espécies C<sub>3</sub>, resposta fotossintética significativa ao aumento de C<sub>e</sub> não aconteceu sob estresse. Por exemplo, a concentração intercelular foliar de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) em *Helianthus annuus* sob elevada C<sub>e</sub> mantém a fotossíntese foliar livre de impedimentos estomáticos, mas a fotossíntese líquida máxima (P<sub>Nmax</sub>) não aumenta sob moderada ou severa restrição hídrica (Tezara *et al.*, 2002). Efeitos simultâneos do estresse térmico e da disponibilidade de CO<sub>2</sub> nos processos fotoquímicos e bioquímicos de *C. arabica* ainda não foram estudados.

Uma abordagem para reinterpretar as respostas fisiológicas da planta sob estresse é aquela proposta por Amzallag (2001), mostrando em uma rede o quanto as variáveis fisiológicas estão conectadas umas às outras sob diferentes situações ambientais (Souza *et al.*, 2004, Prado *et al.*, 2004). Redes têm sido consideradas úteis para representar sistemas complexos (Barabási, 2005). As plantas apresentam características de sistemas complexos, tais como fractalidade, não-linearidade e subsistemas sem limite claro entre eles. A fractalidade aparece nas plantas na forma de repetição de formas em vários níveis de organização da planta, tais como as formas dos vasos do centro das raízes até o último traqueíde no mesofilo foliar. A curva da fotossíntese líquida em função da radiação

fotossinteticamente ativa é um exemplo claro da não-linearidade de resposta nas plantas. O limite indefinido entre as maquinarias fotoquímica e bioquímica é outra característica relacionada aos sistemas complexos em plantas. Forte conectância entre os componentes da rede implica que os distúrbios se propagam facilmente através do sistema com pouca atenuação. Em contraste, redes fisiológicas com reduzida conectância entre os componentes tendem a diminuir a propagação dos distúrbios. Conectância fraca em uma rede fisiológica pode acontecer, por exemplo, em espécies ou cultivares menos sensíveis ao estresse.

Considerando todas as variáveis simultaneamente em uma rede, a análise de componentes principais (PCA) pode destacar se essas variáveis estão associadas em comportamentos contrastantes e qual é o grau de variação do conjunto de dados sob condição de estresse. Sendo assim, a conectância da rede e a PCA são análises satisfatórias para revelar, respectivamente, a força de interconexões entre variáveis fisiológicas e o comportamento do conjunto de dados em ambientes variáveis.

Um dos objetivos do presente trabalho foi determinar as respostas da fotossíntese líquida e da taxa de transporte de elétrons em folhas de *C. arabica* em temperaturas foliares reduzidas (17-23°C) e elevadas (26-32°C) em três cultivares (Catuaí Vermelho, Obatã e Ouro Verde). Além disso, foram determinados os pontos de referência de temperatura (temperaturas infra-ótima, ótima e supra-ótima) em folhas de plantas jovens de *C. arabica*, especialmente com relação aos processos bioquímicos (eficiência de carboxilação) e fotoquímicos (taxa de transporte de elétrons) da fotossíntese. Simultaneamente, foi investigado se o aumento transitório da concentração de CO<sub>2</sub> poderia diminuir o impacto do estresse por calor na fotossíntese líquida de *C. arabica*. Utilizando a análise da conectância de redes foi determinada a modulação da rede em temperaturas foliares infra e supra-ótimas de *C. arabica*. Postulamos que ocorrem diferenças significativas de força de conexão dos componentes da rede fisiológica foliar em função das temperaturas que geralmente afetam o cafeeiro em condições de campo, resultando na modulação da rede sob temperaturas foliares reduzidas

(17-23°C) e elevadas (26-32°C). Além disso, é provável uma separação clara entre temperaturas extremas sob a análise de componentes principais (PCA) devido ao forte impacto da temperatura foliar nos processos primários da fotossíntese (Larcher, 2003).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO**

Foram utilizadas mudas de *C. arabica* L. Rubiaceae, com quatro meses de idade crescendo em casa de vegetação em 20 L de oxisolo misturado com esterco animal (4:1) em sacos plásticos pretos. Foi mantida uma planta por recipiente e o solo foi irrigado duas vezes por semana até capacidade de campo. As temperaturas médias noturnas e diurnas na casa de vegetação durante o crescimento foram  $18.0 \pm 3.2^{\circ}\text{C}$  e  $25.0 \pm 3.0^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. O experimento foi realizado de outubro de 2003 a maio de 2004. O solo de cada saco plástico foi fertilizado com 20 g de N:P:K:Zn:B (4,0:14,0:8,0:0,2:0,1) em 16 de julho de 2003. Devido à doença da “ferrugem” nas folhas, todas as mudas foram tratadas com oxiclórido cúprico ( $3 \text{ g L}^{-1}$ ) usando um borrifador manual em 6 de agosto de 2003.

### **2.2. TRATAMENTOS TÉRMICOS EM INCUBADORA E SISTEMA DE ISOLAMENTO TÉRMICO DAS RAÍZES**

Os tratamentos térmicos foram realizados utilizando uma incubadora (1,45 x 0,58 x 0,51 m) modelo NT-708, Nova Técnica, Piracicaba-Brasil. A temperatura do ar dentro da incubadora foi mantida constante em 17, 20, 23, 26, 29 ou  $32^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ). A temperatura do ar foi assumida como sendo igual à da folha, por causa da ausência de iluminação dentro da incubadora durante os tratamentos térmicos.

A temperatura do sistema radicular foi mantida igual à temperatura da casa de vegetação onde cresceram as plantas, por isolamento térmico proporcionado por caixas de poliestireno (0,50 x 0,40 x 0,20 m). Duas mudas por caixa foram mantidas em cada temperatura dentro da incubadora. Os espaços entre os sacos plásticos e as paredes internas da caixa foram preenchidos com flocos de poliestireno. As caixas de poliestireno foram fechadas com uma tampa de poliestireno e envolvidas por uma manta de lã de vidro. A temperatura do solo nos sacos plásticos durante os tratamentos foi de  $24,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ . Os tratamentos térmicos

consistiram em manter ambas mudas durante 14 horas, à noite, dentro da incubadora. Nessas duas mudas a curva de fotossíntese líquida ( $P_N$ ) em função da densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) foi obtida em cada temperatura foliar correspondente como descrito a seguir.

### ***2.3. FOTOSSÍNTESE LÍQUIDA ( $P_N$ ) EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DO FLUXO DE FÓTONS FOTOSSINTÉTICOS (PPFD)***

As curvas  $P_N$ -PPFD foram obtidas das 08:00h às 09:00h, entre dezembro de 2003 e janeiro de 2004. Depois dos tratamentos térmicos ambos indivíduos foram transportados para a sala experimental (4,00 x 1,92 x 1,70 m) onde a temperatura do ar foi mantida similar ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) a da incubadora utilizando-se aquecedor ou condicionador de ar. A fotossíntese líquida foi medida em todas as folhas expandidas em ambas plantas utilizando um analisador de gases por infra-vermelho (IRGA) portátil modelo LCA-4 (ADC, Hoddesdon, UK). A folha que mostrou maior  $P_N$  foi selecionada para a curva  $P_N$ -PPFD. Sendo assim, somente uma curva  $P_N$ -PPFD foi realizada para cada temperatura correspondente em cada cultivar. O LCA-4 foi conectado a uma câmara foliar Parkinson PLCN-4 (ADC) e trabalhou como um sistema aberto durante as determinações de trocas gasosas. O ar de referência foi coletado em área aberta fora da sala experimental e distante de fontes de  $\text{CO}_2$ . O sistema Peltier da PLCN-4 manteve a temperatura foliar constante durante as determinações de trocas gasosas na temperatura correspondente da incubadora. A temperatura foliar foi determinada por um termopar conectado à PLCN-4. A fonte de luz PLU-002 (ADC, Hoddesdon, UK) contendo uma lâmpada dicróica halógena (12 V – 20 W) foi acoplado à PLCN-4 para fornecer o PPFD desejado. Durante as curvas  $P_N$ -PPFD, o déficit de pressão de vapor ( $\text{VPD}_{\text{air}}$ ) foi mantido constante (1 kPa). Portanto, sob 17, 20, 23, 26, 29 e 32 °C, a umidade relativa do ar na PLCN-4 foi ajustada, respectivamente, a 48, 57, 64, 70, 75 e 79% forçando previamente o ar de referência através de uma coluna com  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  hidratado.

Os valores de PPFD entre 800-2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foram obtidos controlando-se a

voltagem aplicada (0-12 V) no PLU-002. Valores de PPFD abaixo de  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foram obtidos por meio de filtros de vidro neutros (Comar Instruments, Cambridge, UK) inseridos entre a fonte de luz e a janela da PLCN-4. A curva  $P_N$ -PPFD foi ajustada utilizando-se a equação de Prado e Moraes (1997):

$$(I) \quad P_N = P_{N_{\max}} \cdot (1 - e^{-k \cdot (PPFD - I_c)})$$

$P_N$  = fotossíntese líquida ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $P_{N_{\max}}$  = fotossíntese líquida máxima ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $e$  = base do logaritmo natural,  $k$  = constante de proporcionalidade, PPFD = densidade do fluxo de fótons fotossintéticos ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), e  $I_c$  = ponto de compensação luminosa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

O valor de PPFD quando  $P_N$  alcançou 90% de  $P_{N_{\max}}$  (Equação I) foi denominado ponto de saturação luminosa ( $I_s$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Prado e Moraes, 1997). A respiração no escuro ( $R_d$ ) foi obtida no final da curva  $P_N$ -PPFD, depois de 5 minutos sob PPFD nulo, quando  $R_d$  mostrou valores constantes.

#### **2.4. EFICIÊNCIA QUÂNTICA APARENTE NA FASE INICIAL, E CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA, TRANSPIRAÇÃO FOLIAR E CONCENTRAÇÃO INTERCELULAR POR EXTERNA DE $\text{CO}_2$ NA FASE DE SATURAÇÃO NAS CURVAS $P_N$ -PPFD**

A eficiência quântica aparente ( $\Phi$ ) foi calculada utilizando-se a primeira derivada da Equação I:

$$(II) \quad \Phi = k \cdot P_{N_{\max}} \cdot (e^{-k \cdot I_c})$$

$\Phi$  = eficiência quântica aparente,  $k$  = constante de proporcionalidade,  $P_{N_{\max}}$  = fotossíntese líquida máxima ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $e$  = base do logaritmo natural e  $I_c$  = ponto de compensação luminosa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

Em cada tratamento térmico, os valores médios de condutância estomática ( $g_s$ ),

transpiração foliar ( $E$ ) e concentração intercelular ( $C_i$ ) por externa ( $C_e$ ) de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_e$ ) foram calculados sob PPFD igual ou superior a  $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  nas curvas  $P_N$ -PPFD. Dessa forma, foi possível obter, em cada curva de  $P_N$ -PPFD, de 33 a 42 valores de  $g_s$ ,  $E$ , ou  $C_i/C_e$  distribuídos entre  $1200$ - $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de PPFD em cada tratamento térmico correspondente.

## **2.5. TAXA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS (ETR) ENTRE OS FOTOSISTEMAS PSII-PSI EM FUNÇÃO DE PPFD**

As medições de ETR-PPFD foram conduzidas entre 08:00h e 10:00h em duas outras plantas diferentes daquelas utilizadas para as curvas  $P_N$ -PPFD. A fluorescência da clorofila foi determinada por meio de um fluorômetro modulado portátil modelo PAM-2000 (Walz, Effeltrich, Germany) conectado a um PC Palm Top HP 200X (HP, Corvallis, USA). As curvas ETR-PPFD foram obtidas utilizando-se o clipe de suporte foliar 2030-B (Walz) conectado ao PAM-2000. O clip 2030-B apresentava um sensor micro-quantum e um termopar para medir os valores de PPFD e a temperatura foliar, respectivamente. Uma lâmpada halógena (20 W, modelo 2050-W, Walz) equipada com filtro de aquecimento e dimmer foi conectada ao 2030-B para proporcionar diferentes intensidades de PPFD. Próximo da área de medida da fluorescência foi aplicado um fluxo intermitentemente de ar frio ( $400 \text{ mL min}^{-1}$ ) em direção à epiderme superior para manter a temperatura foliar constante ( $\pm 1.0^\circ\text{C}$ ) durante a curva de ETR-PPFD.

Assim como foi feito para as curvas de  $P_N$ -PPFD, todas as folhas expandidas foram testadas previamente e a folha com maior valor de ETR foi a escolhida para a curva ETR-PPFD. A folha foi inserida no clip 2030-B e ETR foi determinada para cada 10 unidades de PPFD (entre  $10$ - $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de PPFD) e a cada 100 unidades de PPFD (entre  $100$ - $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de PPFD). Os valores de ETR foram calculados pela rotina do PAM-2000 de acordo com Genty *et al.* (1989). Foi adotado 84% para PPFD absorvido pela folha e 0,5 como fator de partição de PPFD entre os fotossistemas PSII e PSI. O ajuste dos valores nas

curvas de ETR-PPFD foi realizado utilizando-se a Equação I modificada:

$$(III) \quad ETR = ETR_{\max} \cdot (1 - e^{-k(PPFD - I_{ETR})})$$

*ETR* = taxa de transporte de elétrons entre PSII e PSI ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $ETR_{\max}$  = taxa máxima de transporte de elétrons entre PSII e PSI ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $e$  = base do logaritmo natural;  $k$  = constante de proporcionalidade; *PPFD* = densidade do fluxo de fótons fotossintéticos ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); e  $I_{ETR}$  = máxima intensidade de *PPFD* para *ETR* nula ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

A razão entre  $ETR_{\max}$  e  $P_{N\max}$  ( $ETR_{\max}/P_{N\max}$ ) foi plotada em um gráfico  $ETR_{\max}/P_{N\max}$  x temperatura, a fim de detectar o excesso de elétrons no PSII.

## **2.6. FOTOSÍNTESE LÍQUIDA ( $P_N$ ) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INTERCELULAR ( $C_i$ ) DE $CO_2$**

Foram obtidas as curvas  $P_N$ - $C_i$  sob saturação de *PPFD* ( $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) utilizando-se um diluidor de gases modelo GD-602 (ADC, Hoddesdon, UK) conectado a um cilindro contendo  $1500 \mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $CO_2$  (White Martins, Sertãozinho, SP, Brazil). O IRGA-LCA-4, o diluidor GD-602 e o cilindro de  $CO_2$  foram conectados como um sistema semi-aberto como descrito por Monteiro e Prado (2006). O valor do  $VPD_{\text{air}}$  dentro da PLCN-4 foi mantido constante (1 kPa) durante as curvas  $P_N$ - $C_i$ . A umidade relativa do ar foi incrementada, forçando previamente o ar que de referência por uma coluna com  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  hidratado, como nas curvas  $P_N$ -*PPFD*. Todas as folhas expandidas foram medidas sob concentração saturada de  $CO_2$  e aquela com maior valor de  $P_N$  foi a escolhida. As curvas  $P_N$ - $C_i$  foram realizadas na sala experimental depois do tratamento térmico correspondente descrito previamente, usando duas plantas diferentes daquelas utilizadas nas curvas  $P_N$ -*PPFD* ou *ETR*-*PPFD*. A concentração inicial de  $CO_2$  foi em torno de  $1500 \mu\text{mol mol}^{-1}$  e cada diluição resultava em 90% da concentração de  $CO_2$  anterior (Monteiro e Prado, 2006). Os valores de  $C_i$  em cada concentração externa de  $CO_2$  foram calculados pelo IRGA utilizando-se



a equação descrita por Caemmerer e Farquhar (1981).

A Equação I foi utilizada para ajustar as curvas  $P_N-C_i$  alterando o componente PPFD para  $CO_2$  (Monteiro e Prado, 2006). Sendo assim, foi possível obter a capacidade fotossintética ( $P_{N_{maxCO_2}}$ ,  $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ ) e o ponto de compensação ao  $CO_2$  ( $\Gamma_{CO_2}$ ,  $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ ) a partir da Equação I modificada. O valor da concentração de  $CO_2$  quando  $P_N$  atingiu 90% de  $P_{N_{maxCO_2}}$  foi denominada ponto de saturação de  $CO_2$ . A eficiência aparente de carboxilação ( $\epsilon$ ) nas curvas  $P_N-C_i$  foi calculada utilizando-se a primeira derivada da Equação I com o componente  $CO_2$  em vez de PPFD, como descrito por Monteiro e Prado (2006).

## 2.7. LIMITAÇÕES RELATIVAS ESTOMÁTICA ( $L_s$ ) E MESOFÍLICA ( $L_m$ ) DA FOTOSSÍNTESE LÍQUIDA

$L_s$  e  $L_m$  foram calculadas como indicado por Tezara *et al.* (2002):

$$(IV) \quad L_s = 100 \cdot \frac{(P_{N'} - P_N)}{P_{N'}}$$

$L_s$  = limitação estomática da fotossíntese líquida (%),  $P_{N'}$  = fotossíntese líquida quando  $C_i$  foi igual à concentração atmosférica de  $CO_2$  ( $355 \mu mol mol^{-1}$ ) nas curvas  $P_N-C_i$ ,  $P_N$  = fotossíntese líquida na concentração atmosférica de  $CO_2$ .

$$(V) \quad L_m = 100 \cdot \frac{(P_{N(c)} - P_{N(t)})}{P_{N(c)}}$$

$L_m$  = limitação mesofílica da fotossíntese líquida (%),  $P_{N(c)}$  = planta com a maior fotossíntese líquida foliar em  $C_i = 1200 \mu mol mol^{-1}$ , e  $P_{N(t)}$  = fotossíntese líquida foliar de plantas submetidas aos outros tratamentos térmicos em  $C_i = 1200 \mu mol mol^{-1}$

## 2.8. CONECTÂNCIA DA REDE E ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

Foi utilizado o conceito e o cálculo de conectância global ( $C_g$ , Amzallag, 2001; Souza *et al.*, 2004) para avaliar a modulação da rede sob temperaturas reduzidas (17-23°C) e

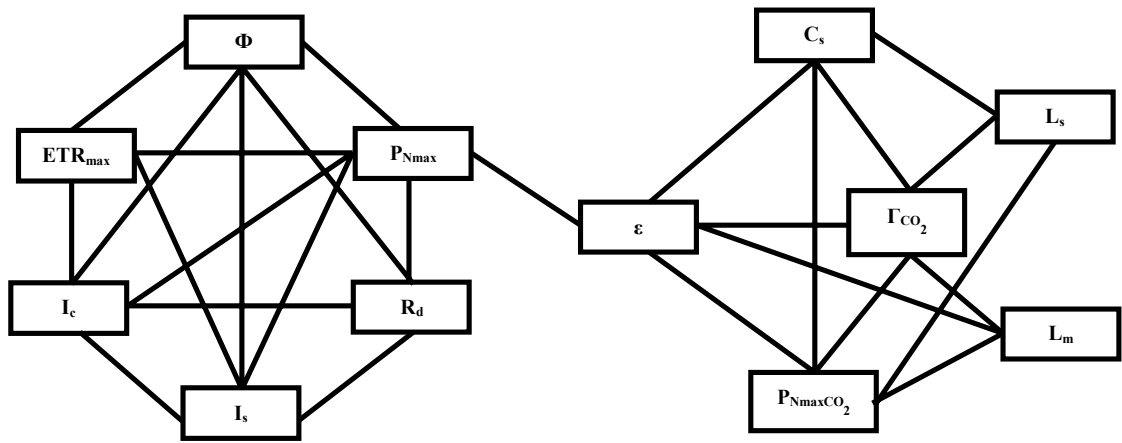
elevadas (26-32°C). Adequadamente, primeiro foi especificado um conjunto de variáveis pareadas de interesse na rede. O coeficiente de correlação ( $r$ , coeficiente de Pearson) entre cada variável pareada foi utilizado para testar a significância da correlação e medir a força da relação (conexão) entre duas variáveis. Para isso, os valores- $r$  foram normalizados pela transformação- $z$ , tornando-se valores- $z$  (o valor da conectância):

$$(VI) \quad z = 0.5 \ln \left[ \frac{(1+|r|)}{(1-|r|)} \right]$$

A conectância global da rede ( $C_g$ ) no conjunto específico de variáveis pareadas foi representada pela média entre os valores- $z$  (Amzallag, 2001):

$$(VII) \quad C_g = \frac{1}{m} [z(A, X_1) + \dots + z(A, X_m)]$$

A Figura 1 mostra a topologia da rede fisiológica construída com variáveis fisiológicas foliares relacionadas à assimilação de carbono. Duas redes menores formaram uma rede maior. Uma rede menor apresenta os parâmetros relacionados às curvas  $P_N$ -PPFD e a outra sub-rede apresenta os parâmetros relacionados às curvas  $P_N$ - $C_i$ . Ambas sub-redes são conectadas via eficiência de carboxilação ( $\epsilon$ , Figura 1). O valor da conectância global ( $C_g$ ) foi calculado na sub-rede relacionada às curvas  $P_N$ -PPFD ( $C_{gPPFD}$ ), na sub-rede relacionada às curvas  $P_N$ - $C_i$  ( $C_{gCO_2}$ ) e na rede como um todo ( $C_{g_w}$ ) nas temperaturas foliares reduzidas (17, 20, 23°C) e elevadas (26, 29, 32°C) para todos os cultivares. Portanto, dois valores de cada,  $C_{g_w}$ ,  $C_{gPPFD}$  e  $C_{gCO_2}$  foram disponibilizados para serem comparados em cada cultivar, nas temperaturas foliares reduzidas (17-23°C) e elevadas (26-32°C).



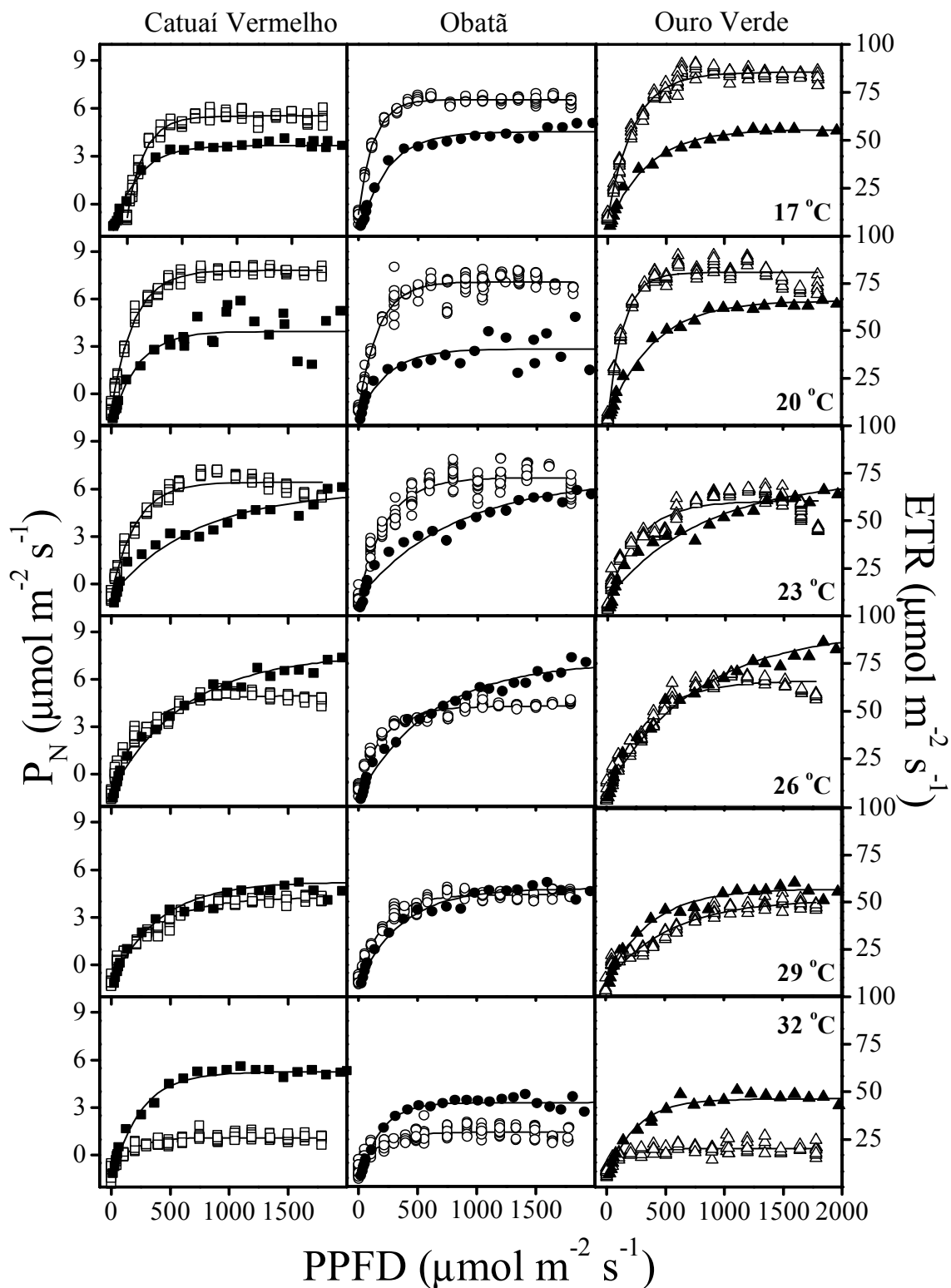
**Figura 1.** Topologia da rede representando interações dos processos fotossintéticos fotoquímicos e bioquímicos. No lado esquerdo estão os parâmetros medidos sob concentração de  $\text{CO}_2$  atmosférica ( $355 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ) obtidos nas curvas  $P_N$ -PPFD e no lado direito os parâmetros medidos sob  $\text{CO}_2$  mudando de  $1500$  a  $10 \mu\text{mol mol}^{-1}$  nas curvas  $P_N$ - $C_i$ . Ambos os lados estão conectados pela eficiência aparente de carboxilação ( $\epsilon$ ). No lado esquerdo:  $\Phi$  = eficiência quântica aparente,  $\text{ETR}_{\text{max}}$  = taxa máxima de transporte de elétrons entre PSII e PSI,  $I_c$  = ponto de compensação luminosa,  $I_s$  = ponto de saturação luminosa,  $R_d$  = respiração no escuro,  $P_{N\text{max}}$  = fotossíntese líquida máxima. No lado direito:  $P_{N\text{maxCO}_2}$  = capacidade fotossintética,  $C_s$  = ponto de saturação de  $\text{CO}_2$ ,  $\Gamma_{\text{CO}_2}$  = ponto de compensação de  $\text{CO}_2$ ,  $L_m$  = limitação mesofílica da fotossíntese,  $L_s$  = limitação estomática da fotossíntese.

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando-se o programa PC-ORD, versão 3.12, MJM Software Design (Gleneden Beach, Oregon, USA). Cada um dos dois eixos do gráfico da PCA foi denominado componente principal (pc1 e pc2) baseado nas correlações entre as variáveis analisadas. Isso permitiu a análise de todas as variáveis fisiológicas em um espaço bidimensional. Vetores na PCA representam as variáveis fisiológicas mais importantes que determinaram a distribuição dos símbolos no espaço bidimensional guiado pelos dois eixos (Manly, 1994).

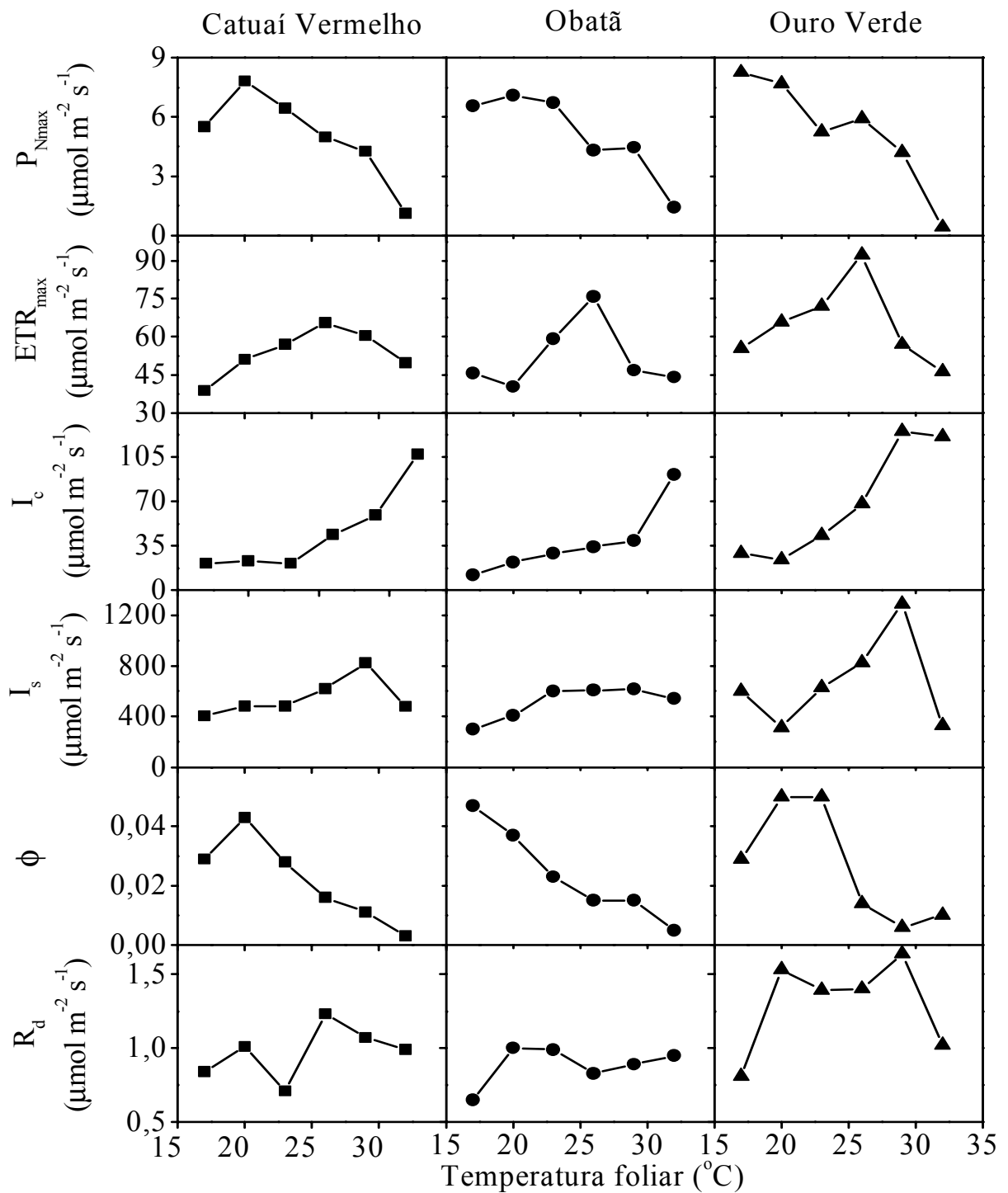
### 3. RESULTADOS

#### **3.1. FOTOSSÍNTESE LÍQUIDA ( $P_N$ ) E TAXA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS (ETR) EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DO FLUXO DE FÓTONS FOTOSSINTÉTICOS (PPFD)**

Nas curvas  $P_N$ -PPFD (Figura 2) o maior valor de  $P_{N_{max}}$  ( $8,3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) foi obtido no cultivar Ouro Verde sob  $17^\circ\text{C}$ . Os cultivares Obatã e Catuaí Vermelho apresentaram elevado valor de  $P_{N_{max}}$ ,  $7,8$  e  $7,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente, sob  $20^\circ\text{C}$  (Figura 2).  $P_{N_{max}}$  diminuiu em temperaturas maiores que  $20^\circ\text{C}$  em todos os cultivares, alcançando valores mínimos ( $1,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) sob  $32^\circ\text{C}$ . A temperatura ótima para  $ETR_{max}$  oscilou de  $23$  a  $29^\circ\text{C}$  em Catuaí Vermelho, e de  $23$  a  $26^\circ\text{C}$  em Obatã e em Ouro Verde (Figura 2). O intervalo de temperatura ótima para  $ETR_{max}$  ( $23$ - $29^\circ\text{C}$ ) foi superior àquele obtido para  $P_{N_{max}}$  ( $17$ - $20^\circ\text{C}$ ) em todos os cultivares (Figuras 2 e 3). A diminuição de  $P_{N_{max}}$  em temperaturas maiores que  $20^\circ\text{C}$  (Figura 3) foi acompanhada por aumento do ponto de compensação luminosa ( $I_c$ ).



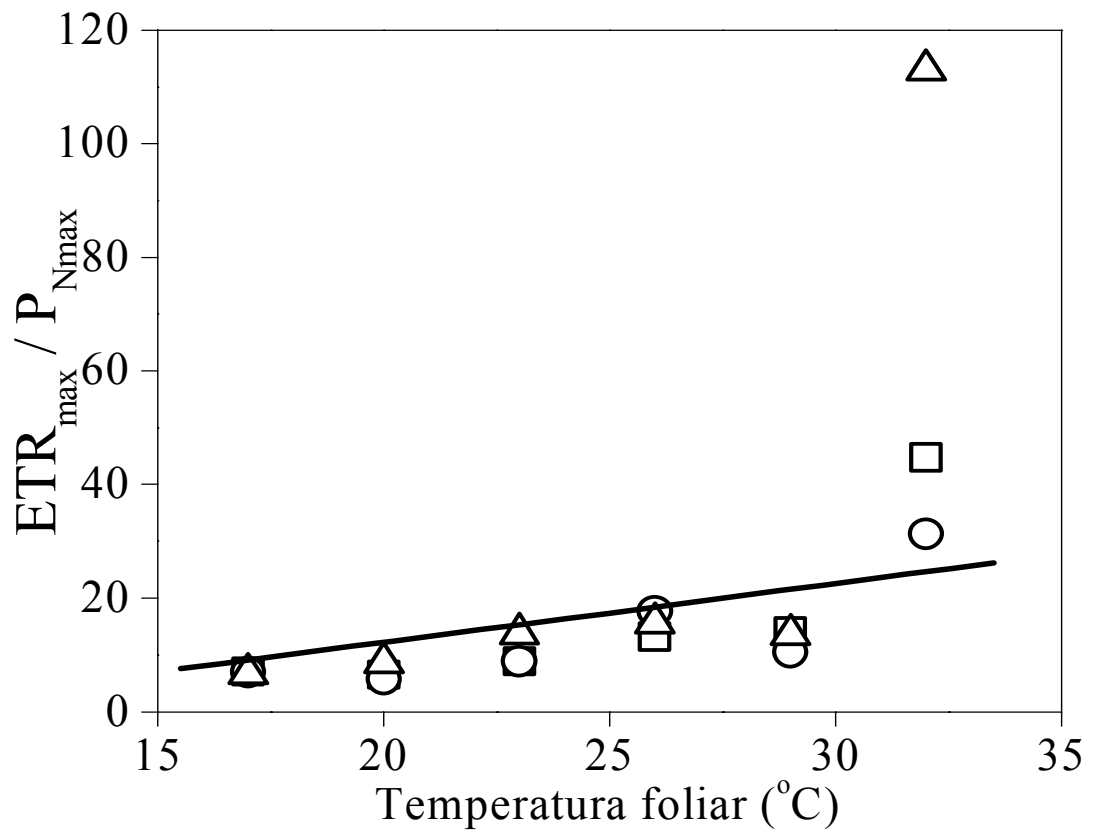
**Figura 2.** Fotossíntese líquida ( $P_N$ , símbolos abertos) e taxa de transporte de elétrons (ETR, símbolos sólidos) em função da densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) sob concentração atmosférica de  $\text{CO}_2$  ( $355 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ) em cultivares de *Coffea arabica* (Catuaí Vermelho  $\square, \blacksquare$ ; Obatã  $\circ, \bullet$ ; e Ouro Verde  $\Delta, \blacktriangle$ ) depois de 14 horas sob 17 (painéis superiores), 20, 23, 26, 29 e 32°C (painéis subseqüentes).



**Figura 3.** Valores de fotossíntese líquida máxima ( $P_{Nmax}$ ), taxa máxima de transporte de elétrons entre PSII e PSI ( $ETR_{max}$ ), ponto de compensação luminosa ( $I_c$ ), ponto de saturação luminosa ( $I_s$ ), eficiência quântica aparente ( $\Phi$ ) e respiração no escuro ( $R_d$ ) de Coffea arabica (cultivares Catuaí Vermelho ■, Obatã ● e Ouro Verde ▲) depois de 14 horas sob 17, 20, 23, 26, 29 e 32°C.

Houve uma tendência de aumento nos valores de  $I_c$  e  $I_s$  de 17 a 29°C em todos os cultivares (Figura 3). Em contraste, a eficiência quântica aparente ( $\Phi$ ) diminuiu com o aumento da temperatura de 20 para 29°C (Figura 3). Houve um gradiente de valores de Catuaí Vermelho para Ouro Verde. Por exemplo, Catuaí Vermelho e Obatã mostraram  $P_{Nmax}$  em uma temperatura maior (20 °C) do que Ouro Verde (17°C). Maiores valores de  $ETR_{max}$  foram em torno de 65 e 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em Catuaí Vermelho e Obatã, respectivamente, mas em Ouro Verde,  $ETR_{max}$  foi de aproximadamente 90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Valores máximos de  $I_c$  e  $I_s$  foram similares entre Catuaí Vermelho e Obatã, mas foram maiores em Ouro Verde (Figura 3). Em adição, o cultivar Ouro Verde mostrou diminuição mais acentuada de  $P_{Nmax}$  e  $ETR_{max}$  sob temperaturas elevadas (26-32°C) e  $ETR$  foi maior em Ouro Verde em qualquer temperatura, com exceção a 32°C (Figuras 3 e 4). O colapso dos aparatos bioquímico e fotoquímico sob 32°C foi mais evidente em Ouro Verde, com  $P_{Nmax}$ ,  $ETR_{max}$ ,  $I_s$  e  $R_d$  diminuindo simultaneamente de 29 a 32°C (Figuras 3 e 4).



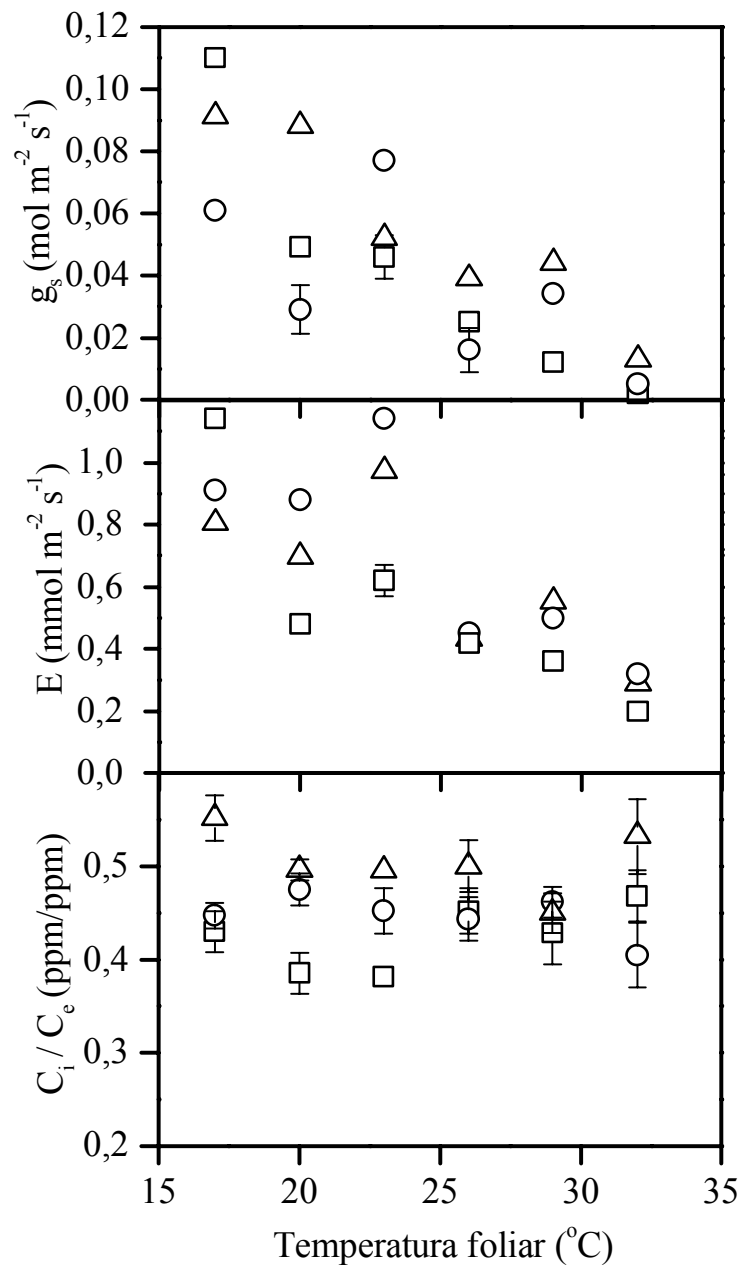


**Figura 4.** Razão entre a taxa máxima de transporte de elétrons entre PSII e PSI ( $ETR_{max}$ ) e a fotossíntese líquida máxima ( $P_{Nmax}$ ) em função da temperatura foliar nos cultivares de *Coffea arabica* Catuai Vermelho ( $\Delta$ ), Obatã ( $\circ$ ) e Ouro Verde ( $\square$ ). Os dados foram coletados depois de 14 horas na incubadora a 17, 20, 23, 26, 29 ou 32°C em folhas de plantas jovens.

O gradiente entre os cultivares Catuaí Vermelho e Ouro Verde também aparece nos valores de  $R_d$ . Há uma tendência de aumento de  $R_d$  com a temperatura, mas no cultivar Ouro Verde esse aumento é maior.

### ***3.2. CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA ( $G_s$ ), TRANSPIRAÇÃO FOLIAR ( $E$ ) E CONCENTRAÇÃO INTERCELULAR ( $C_i$ ) POR EXTERNA ( $C_e$ ) DE $CO_2$ ( $C_i/C_e$ ) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA FOLIAR***

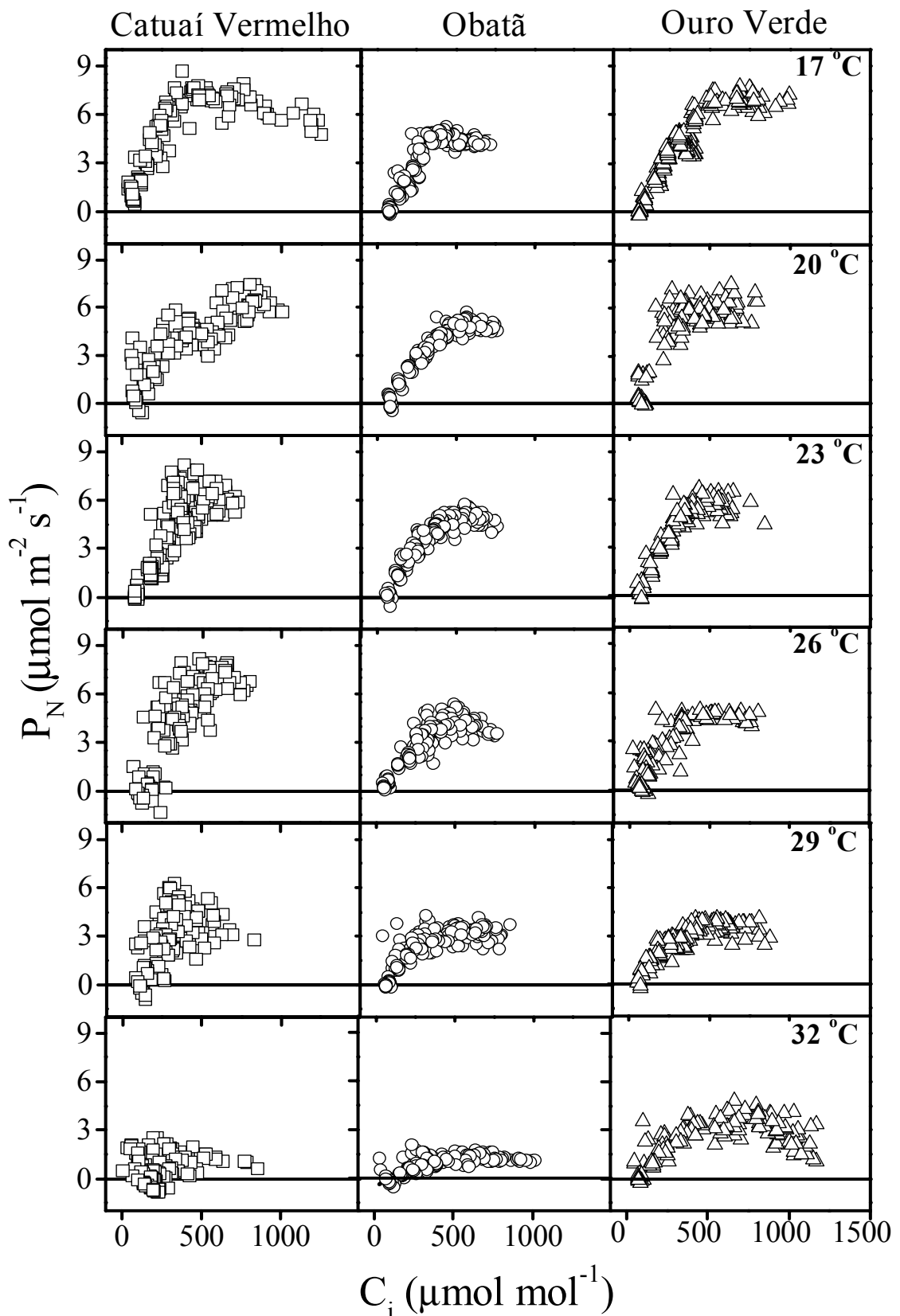
Na Figura 5 estão mostrados os valores médios de  $g_s$ ,  $E$  e  $C_i/C_e$  em função da temperatura foliar nos três cultivares estudados. Considerando todos os cultivares,  $g_s$  e  $E$  diminuíram linearmente com a temperatura, com  $g_s$  próximo de zero e  $E$  em torno de  $0,35 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  sob  $32^\circ\text{C}$ . A maioria dos valores médios de  $C_i/C_e$  em função da temperatura foliar ( $17\text{-}32^\circ\text{C}$ ) oscilaram entre  $0,4$  a  $0,5 \mu\text{mol mol}^{-1}$  (Figura 5).



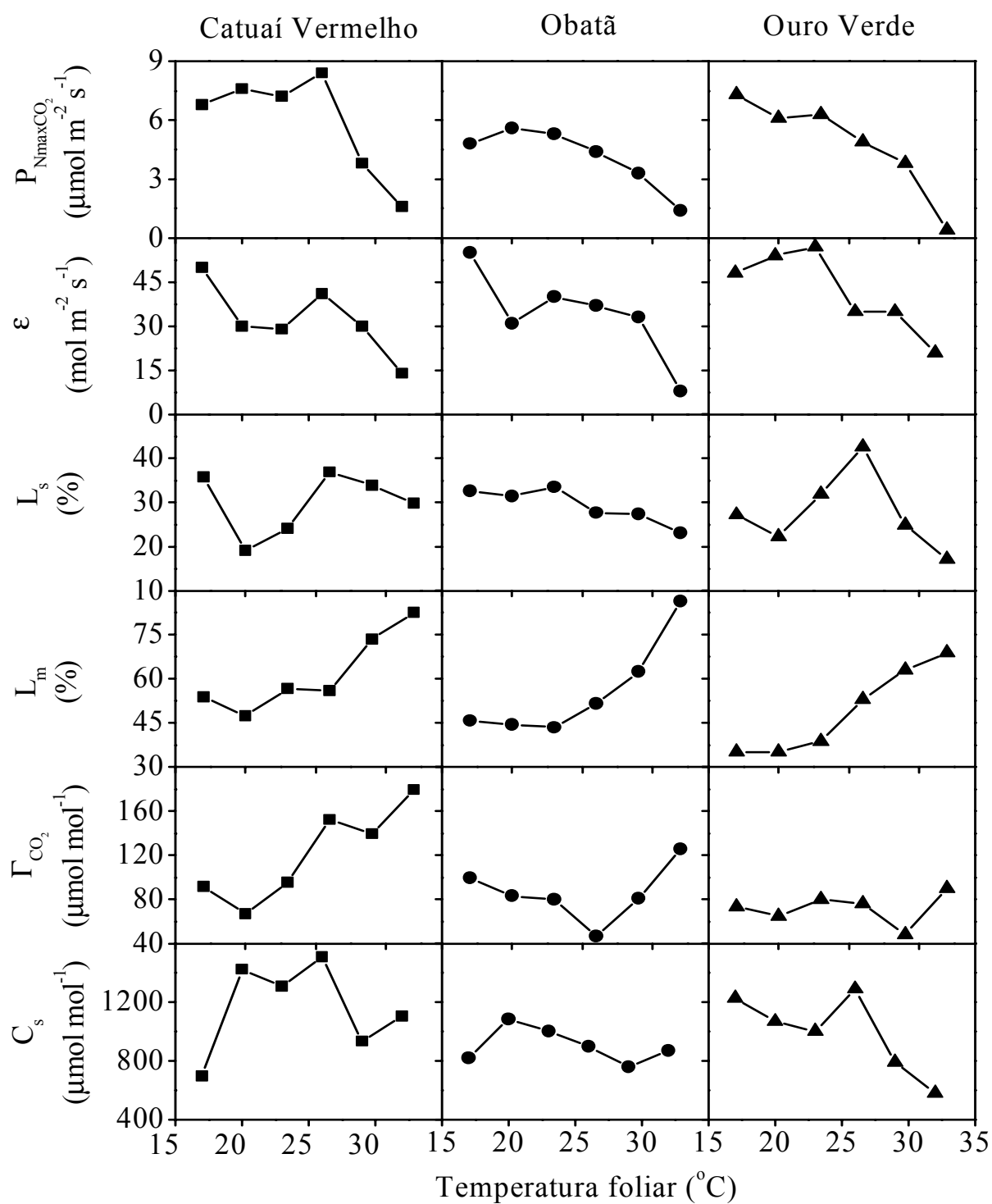
**Figura 5.** Condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração foliar ( $E$ ) e concentrações intercelular ( $C_i$ ) por externa ( $C_e$ ) de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_e$ ) em folhas de *Coffea arabica*, cultivares Catuai Vermelho ( $\square$ ), Obatã ( $\circ$ ) e Ouro Verde ( $\Delta$ ) sob densidade do fluxo de fótons fotossintéticos maiores que  $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e concentração atmosférica de  $\text{CO}_2$  ( $355 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ) em função da temperatura foliar. Cada símbolo representa a média ( $32 < n < 43$ ) e as barras o erro padrão.

### **3.3. FOTOSSÍNTESE LÍQUIDA ( $P_N$ ) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INTERCELULAR DE $CO_2$ ( $C_i$ )**

As curvas de  $P_N$  em função de  $C_i$  sob as temperaturas foliares estudadas estão mostradas na Figura 6. Geralmente, valores máximos de  $C_i$  foram menores em temperaturas mais favoráveis para assimilação de  $CO_2$  (20-26°C) do que em temperaturas foliares extremas (17 e 29-32°C). A capacidade fotossintética ( $P_{N_{maxCO_2}}$ ) diminuiu abruptamente em todos os cultivares em temperaturas maiores que 26°C (Figuras 5 e 6). Não foram obtidos maiores valores de  $P_N$  sob saturação de PPFD e  $CO_2$  ( $P_{N_{maxCO_2}}$ ) em relação aos valores máximos de  $P_N$  ( $P_{N_{max}}$ ) encontrados sob saturação de PPFD (Figura 3). A temperatura ótima para  $P_{N_{max}}$  mudou somente em Catuaí Vermelho, de 20 (Figura 3) para 26°C (Figura 7). Catuaí Vermelho foi capaz de manter valores elevados de  $P_{N_{maxCO_2}}$  sob temperaturas reduzidas (17-23°C) e a 26°C.  $P_{N_{max}}$  e  $P_{N_{maxCO_2}}$  mostraram comportamentos similares em função da temperatura foliar nos cultivares Obatã e Ouro Verde (Figuras 3 e 5). No entanto, Ouro Verde apresentou o maior valor de  $P_{N_{maxCO_2}}$  sob 17°C e o menor  $P_{N_{maxCO_2}}$  a 32°C entre os cultivares estudados (Figura 7).



**Figura 6.** Fotossíntese líquida ( $P_N$ ) sob densidade do fluxo de fótons fotossintéticos saturante ( $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) em função da concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), em folhas de cultivares de *Coffea arabica* (Catuaí Vermelho  $\square$ , Obatã  $\circ$ ; e Ouro Verde  $\Delta$ ) depois de 14 horas sob 17 (painéis superiores), 20, 23, 26, 29 e 32°C (painéis subsequentes).



**Figura 7.** Capacidade fotossintética ( $P_{NmaxCO_2}$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), eficiência aparente de carboxilação ( $\epsilon$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), limitações estomática ( $L_s$ , %) e mesofílica ( $L_m$ , %) da fotossíntese líquida, ponto de compensação de  $\text{CO}_2$  ( $\Gamma_{\text{CO}_2}$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) e ponto de saturação de  $\text{CO}_2$  ( $C_s$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) em folhas de *Coffea arabica*, cultivares Catuaí Vermelho (■), Obatã (●) e Ouro Verde (▲) depois de 14 horas sob 17, 20, 23, 26, 29 e 32°C.

A eficiência de carboxilação ( $\epsilon$ ) apresentou dois picos em Catuaí Vermelho e Obatã (Figura 7), mas em Ouro Verde houve somente um pico dos valores de  $\epsilon$  (a 23°C). O comportamento de  $\epsilon$  ao longo das temperaturas foliares mudou gradualmente de dois picos para uma curva em forma de domo achatado em Ouro Verde (Figura 7). Ouro Verde foi o único cultivar que apresentou aumento dos valores de  $\epsilon$  de 17 para 23°C. Nesse intervalo de temperatura, Ouro Verde apresentou os menores valores de  $L_m$  e  $\Gamma_{CO_2}$ , e valores de  $C_s$  aumentando (Figura 7). Em todos os cultivares,  $L_m$  foi mantido aproximadamente constante sob temperaturas reduzidas (17-23°C), mas aumentou abruptamente sob temperaturas elevadas (26-32°C).

De 17 a 23°C  $L_s$  e  $L_m$  tiveram comportamentos semelhantes em todos os cultivares, mas em temperaturas elevadas (26-32°C)  $L_s$  diminuiu e  $L_m$  aumentou com a temperatura foliar.  $L_s$  mostrou maior variação que  $L_m$  em temperaturas reduzidas em Catuaí Vermelho e em Ouro Verde, mas em temperaturas elevadas  $L_m$  apresentou maior variação que  $L_s$  em Catuaí Vermelho e Obatã. Em contraste, Ouro Verde apresentou uma diminuição acentuada de  $L_s$  mas um aumento gradual de  $L_m$  em temperaturas elevadas. Houve uma tendência de diminuição de  $C_s$  em temperaturas elevadas, mas em Ouro Verde essa diminuição foi mais acentuada que em Catuaí Vermelho e em Obatã. Ouro Verde foi o único cultivar que apresentou decréscimo contínuo nos valores de  $C_s$  entre 17-23°C. Os valores de  $C_s$  em temperaturas favoráveis (17-23°C) para elevada  $P_{N_{max}CO_2}$  variaram de 800 para 1000  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  nos cultivares Obatã e Ouro Verde, mas em Catuaí Vermelho a variação foi maior (entre 700e1500  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ).

### **3.4. CONECTÂNCIA DA REDE E ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS**

A Tabela 1 mostra os valores de  $C_{g_w}$ ,  $C_{g_{PPFD}}$  e  $C_{g_{CO_2}}$  em temperaturas reduzidas (17-23°C) e elevadas (26-32°C).  $C_{g_w}$  foi maior em temperaturas elevadas (26-32°C) para todos os cultivares (Tabela 1). Sob temperaturas reduzidas (17-23°C)  $C_{g_w}$  diminuiu para todos os

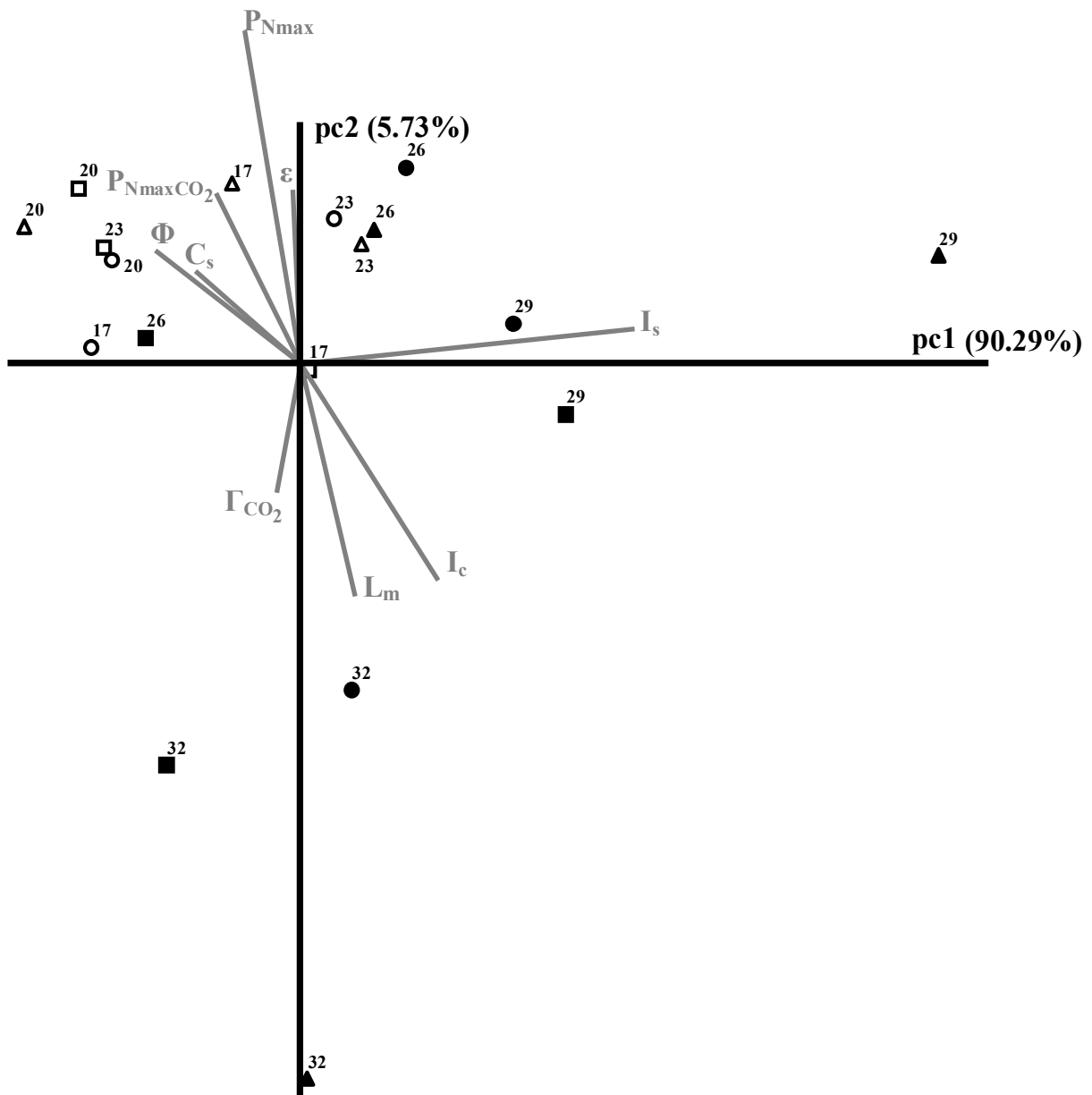
cultivares. A variação de  $C_{g_w}$  em função da temperatura indica uma clara modulação da rede. O cultivar Ouro Verde apresentou o comportamento mais conservativo, com valores de  $C_{g_w}$  similares com relação à variação da temperatura foliar (a diferença entre os valores de  $C_{g_w}$  foi de 0,30, Tabela 1). Catuaí Vermelho foi o cultivar que apresentou maior modulação da rede (a diferença entre os valores de  $C_{g_w}$  foi de 0,73, Tabela 1) e Obatã teve um comportamento intermediário (a diferença entre os valores de  $C_{g_w}$  foi de 0,54, Tabela 1).  $C_{g_{PPFD}}$  para Catuaí Vermelho e Obatã apresentou maior diferença entre as temperaturas reduzidas e elevadas do que  $C_{g_{CO_2}}$ . Por outro lado, em Ouro Verde,  $C_{g_{CO_2}}$  mostrou maior diferença do que  $C_{g_{PPFD}}$  entre temperaturas reduzidas e elevadas (Tabela 1).



**Tabela 1.** Valores de conectância global da rede como um todo ( $C_{g_w}$ ), da sub-rede construída com dados das curvas de  $P_N$ -PPFD ( $C_{g_{PPFD}}$ ), e da sub-rede construída com os dados das curvas de  $P_N$ - $C_i$  ( $C_{g_{CO_2}}$ ) para *Coffea arabica* L. cultivares Catuai Vermelho, Obatã e Ouro Verde, em temperaturas reduzidas (17-23°C) e elevadas (26-32°C). Os números entre parênteses denotam a diferença entre temperaturas reduzidas e elevadas.

	Catuai Vermelho		Obatã		Ouro Verde	
	17-23°C	26-32°C	17-23°C	26-32°C	17-23°C	26-32°C
$C_{g_{PPFD}}$	1,10	2,19 (1,09)	1,22	2,08 (0,86)	0,88	0,98 (0,10)
$C_{g_{CO_2}}$	1,00	1,28 (0,28)	1,52	1,66 (0,14)	1,46	2,00 (0,54)
$C_{g_w}$	1,06	1,79 (0,73)	1,35	1,89 (0,54)	1,14	1,44 (0,30)

A Figura 8 mostra os resultados da PCA considerando todas as variáveis fisiológicas ( $\epsilon$ ,  $\Phi$ ,  $I_s$ ,  $I_c$ ,  $L_m$ ,  $P_{Nmax}$ ,  $P_{NmaxCO_2}$ ,  $\Gamma_{CO_2}$ ,  $C_s$ ) determinadas ao longo de temperaturas distintas nas curvas  $P_N$ -PPFD e  $P_N$ - $C_i$  em todos os cultivares. Foi observado um claro padrão de ordenação entre temperaturas reduzidas e elevadas, indicando comportamentos diferentes em cada faixa de temperatura. Os símbolos representando temperaturas reduzidas (17-23°C) estão agrupados e aqueles representando temperaturas elevadas (29-32°C) estão muito mais dispersos. De fato, os símbolos denotando 26°C estão entre os das temperaturas elevadas e reduzidas. Conseqüentemente, considerando todos os parâmetros em conjunto, houve menor variação no comportamento fisiológico de todos os cultivares sob 17-23°C do que sob 26-32°C. O primeiro componente principal (pc1) responsável por cerca de 90% da variação total destaca um contraste entre variáveis associadas com elevados  $L_m$ ,  $I_c$ ,  $I_s$  e elevados  $\Phi$ ,  $P_{Nmax}$ ,  $P_{NmaxCO_2}$ ,  $C_s$  (Figura 8). pc2 respondeu por cerca de 5% da variação total indicando um contraste entre variáveis associadas à elevada  $\epsilon$  e elevado  $\Gamma_{CO_2}$ .



**Figura 8.** Análise de componentes principais das trocas gasosas foliares obtidas sob temperaturas elevadas (símbolos sólidos) e reduzidas (símbolos abertos) em três cultivares de *Coffea arabica* (Catuaí Vermelho □, ■; Obatã, ○, ●; e Ouro Verde △, ▲). As temperaturas estão indicadas acima de cada símbolo. Os vetores (linhas cinza) representam as principais variáveis fisiológicas influenciando a distribuição dos símbolos.  $P_{Nmax}$  = fotossíntese líquida máxima,  $P_{NmaxCO_2}$  = capacidade fotossintética,  $\epsilon$  = eficiência aparente de carboxilação,  $L_m$  = limitação mesofílica da fotossíntese líquida,  $\Phi$  = eficiência quântica aparente,  $I_s$  = ponto de saturação luminosa,  $I_c$  = ponto de compensação luminosa,  $C_s$  = ponto de saturação de  $CO_2$  e  $\Gamma_{CO_2}$  = ponto de compensação de  $CO_2$ .

#### 4. DISCUSSÃO

A faixa de temperatura obtida para fotossíntese líquida ótima (17-20°C) foi inferior àquela encontrada para espécies arbóreas tropicais (25-30°C; Larcher, 2003). Valores de  $I_c$  obtidos sob 17-20°C estão entre aqueles encontrados em folhas de sol de espécies arbóreas sempre-verdes e decíduas (Larcher, 2003). Em contraste, os valores de  $I_s$  sob 17-20°C foram menores que os estabelecidos para folhas de sol de árvores decíduas e sempre-verdes (Larcher, 2003), mas estão de acordo com aqueles obtidos por Kumar e Tiezen (1980) e por Fahl *et al.* (1994) para folhas de sol de *C. arabica* sob temperatura foliar entre 25-27°C. Os valores de  $R_d$  na faixa de temperatura estudada (17-32°C) estão entre os valores de  $R_d$  para espécies arbóreas decíduas, maiores que aqueles de espécies de floresta tropical, e  $R_d$  em Catuaí Vermelho e Obatã são similares àquelas de espécies arbóreas sempre-verdes (Larcher, 2003).

Os valores de  $R_d$ ,  $I_c$  e  $I_s$  nos cafeeiros estudados se situam entre as espécies decíduas e sempre verdes. Esses valores refletem a própria plasticidade da fenologia foliar do café, ou seja, a capacidade de adaptação potencial que esta planta apresenta para condições ambientais que exigem a perda de folhas (por exemplo, estação seca no interior de São Paulo, variando de intensidade de ano para ano ou a persistência da folhagem onde há irrigação).

A saturação de  $P_N$  a partir de 700  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  obtida sob condições favoráveis (17-23°C) concorda com os valores de plantas  $C_3$  reportados por vários autores (Lambers *et al.* 1998; Taiz e Zeiger 1998; Larcher, 2003). Os valores de  $\Gamma_{\text{CO}_2}$  em temperaturas reduzidas variaram de forma similar às plantas  $C_3$  sob condições favoráveis (Lambers *et al.*, 1998; Taiz e Zeiger, 1998) e foram um pouco acima dos valores obtidos para o cultivar Catuaí sob 20°C e 450  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de PFD (Sondahl *et al.*, 1976). Com relação ao  $\Gamma_{\text{CO}_2}$ , existiu um gradiente decrescente e evidente dos cultivares desde Catuaí Vermelho para Ouro Verde, entre 29-32°C.

Valores máximos de  $P_N$  adquiridos no presente trabalho estão de acordo com aqueles

encontrados na literatura. A faixa entre 7,1-8,3  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para valores máximos de  $P_N$  encontrada é menor que a obtida em espécies lenhosas de cultivo tropicais (Larcher, 2003). Praxedes *et al.* (2006) trabalhando com quatro clones adultos de café robusta (*Coffea canephora* var. kouillou) obtiveram valores máximos similares de  $P_N$  em plantas controle no laboratório. Meinzer *et al.* (1990) e Gómez *et al.* (2005) trabalhando com cultivares de *C. arabica* com 6 meses de idade (como no presente trabalho) em condições de campo também obtiveram valores máximos de  $P_N$  similares aos encontrados nesse estudo. No começo do dia, Ronquim *et al.* (2006) também obteve valores máximos de  $P_N$  similares em um dia claro, para os cultivares Catuaí Vermelho e Obatã. Entretanto, pelo fato de terem trabalhado com plantas adultas de café em campo, no dia nublado (condição mais favorável) o valor máximo de  $P_N$  no começo do dia foi maior do que os obtidos no presente estudo (Ronquim *et al.*, 2006). Konrad *et al.* (2005), encontraram valores máximos de  $P_N$  menores que aqueles obtidos aqui para Catuaí Vermelho e maiores valores máximos de  $P_N$  para Obatã (Figura 2). Provavelmente porque trabalharam com plantas de café mais jovens (3 meses de idade). Portanto, diferenças significativas de idade da planta como 3 e 6 meses e em plantas adultas parece interferir na capacidade fotossintética do cafeeiro, provavelmente em função da capacidade de trocas de massa, energia, e da concentração de enzimas diretamente relacionadas à fotossíntese na folha como a Rubisco.

O aumento de  $\text{ETR}_{\text{max}}$  e a diminuição de  $P_{N\text{max}}$  após 23°C em todos os cultivares indicaram que mais elétrons provenientes do PSII foram guiados para drenos alternativos não-fotoquímicos (Figura 3). Portanto, um evidente excesso de elétrons ocorreu a partir de 23°C, desacoplando os processos fotossintéticos fotoquímico e bioquímico. Os mecanismos induzíveis de dissipação térmica e o ciclo das xantofilas devem estar envolvidos para eliminar o excesso de energia nos complexos coletores de luz que contêm clorofila, especialmente entre 20 e 26°C. Os processos de transporte de elétrons dependentes de oxigênio tais como a produção de espécies reativas ao oxigênio e fotorrespiração não estão excluídos como extintor

de elétrons em excesso (Niyogi, 2000). Entidades químicas altamente reativas como  $O_2^-$ ,  $^1O_2^*$ ,  $H_2O_2$ ,  $^3Chl^*$  e  $-OH$ , formados pelo excesso de elétrons, especialmente entre 20 e 26°C, podem causar danos por meio da peroxidação de lipídeos, degradação de proteínas (D1) e pigmentos (P680), redução do acceptor de ferredoxina no PSI e inativação de enzimas (Asada, 1994; Taiz e Zeiger, 1998; Niyogi, 1999). Algumas conseqüências desses danos são o prejuízo na funcionalidade das membranas, menor habilidade no uso de fótons e aumento na foto-produção de moléculas reativas acima mencionadas (Asada, 1994).

Como conseqüência,  $\Phi$  diminuiu e  $I_c$  e  $I_s$  aumentam quando  $P_{Nmax}$  e  $ETR_{max}$  mostram comportamento oposto ao longo das temperaturas (Figura 3). Provavelmente, a variedade de sistemas de desintoxicação (superóxido dismutase, carotenóides, ascorbato, peroxidase) não foram capazes de realizar a total eliminação dos produtos reativos formados por meio do excesso de elétrons. Por outro lado, o sistema de reparo provavelmente foi ativado contra injúrias provocadas pelo excesso de elétrons a partir de 17°C durante 14 horas de exposição aumentando a respiração no escuro ( $R_d$ ) até 26°C em todos os cultivares. Condições desfavoráveis para  $P_N$  após o aumento de temperatura foram mais pronunciadas no cultivar Ouro Verde, o qual mostrou valor de  $P_{Nmax}$  decrescente desde 17°C, aumento mais acentuado de  $I_c$  e  $I_s$  até 32°C, valores maiores de  $R_d$  entre 17-32°C e valores maiores de  $ETR_{max}$  entre 17-26°C do que os cultivares Catuaí Vermelho e Obatã. O declínio acentuado de  $R_d$  a 32°C indica um forte impacto das temperaturas elevadas no aparato respiratório mitocondrial.

Devido ao comportamento oposto entre  $P_{Nmax}$  e  $ETR_{max}$  em temperaturas reduzidas (17-26°C) e diminuição contínua de  $P_{Nmax}$  a partir de 20°C, a diminuição de  $ETR_{max}$  sob temperaturas elevadas (26-32°C) foi relativamente menor que aquela encontrada para  $P_{Nmax}$ . Entretanto, o excesso de elétrons continuou sob temperaturas elevadas. Sob 32°C, a razão  $ETR_{max}/P_{Nmax}$  foi maior que aquela obtida a 17°C (Figura 4). Em Ouro Verde, o valor de  $P_{Nmax}$  próximo de zero, a diminuição insignificante de  $I_c$ , e a redução abrupta de  $R_d$ ,  $P_{Nmax}$  e  $I_s$  sob temperatura extrema (32°C) indicou que os sistemas de membrana e enzimas se

desorganizaram totalmente. Nos outros cultivares, o aumento de temperatura de 29 a 32°C teve menor impacto que em Ouro Verde, mas  $I_c$  aumentou nitidamente,  $I_s$  diminuiu e  $P_{Nmax}$  apresentou forte redução (Figura 3). O rápido incremento de  $L_m$  (Figura 7) em todos os cultivares em temperaturas elevadas (26-32°C) é evidência inconfundível de que o aparato bioquímico do processo fotossintético estava comprometido.

Sob temperaturas reduzidas,  $P_{Nmax}$  foi quase constante, e, quando  $L_s$  diminuiu,  $L_m$  também diminuiu, portanto,  $C_i/C_e$  permaneceu constante. Os valores de  $P_{Nmax}$  foram limitados por ambas,  $L_s$  e  $L_m$ . Quando a razão  $C_i/C_e$  permanece constante sob aumento de temperatura e concentração atmosférica de  $CO_2$  (Figura 5), existe um ajuste simultâneo das condutâncias estomática e mesofílica (Morison e Lawlor, 1999). Sob temperatura elevada,  $L_m$  aumentou e  $L_s$  diminuiu, mas nessas condições, os valores reduzidos de  $g_s$  diminuiram a entrada de  $CO_2$  na câmara sub-estomática mantendo os valores de  $C_i$  na mesma concentração.

Sem considerar a temperatura foliar, os valores de  $C_i/C_e$  obtidos são menores que o valor de 0,7 geralmente encontrado em plantas  $C_3$  (Caemmerer e Farquhar, 1981; Lambers, 1998). Ademais, os valores máximos de  $g_s$  (em torno de  $0,10 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) poderiam ser considerados reduzidos, pois são similares aos obtidos em plantas lenhosas crescendo no sub-bosque dos trópicos úmidos, e menores que árvores de floresta, espécies lenhosas dos trópicos semi-áridos, espécies lenhosas de folhas largas e espécies esclerófilas ou árvores decíduas e arbustos de região temperada (Larcher, 2003). O valor de  $g_s$  mínimo sob 32°C (em torno de  $0,010 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) é equivalente ao da condutância cuticular de espécies cultivadas ou de muitas árvores (Nobel, 1991; Larcher, 2003). Sob 32°C a transpiração foliar foi muito reduzida ( $0,35 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), cuja porcentagem corresponde a 35% da transpiração máxima (em torno de  $1,0 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , Figure 5). A transpiração máxima obtida também apresenta um valor pequeno quando comparada com árvores da floresta tropical, floresta beblina, palmeiras, folhas adaptadas a luz ou sombra de espécies decíduas da zona temperada ou coníferas sempre-verdes (Larcher, 2003). Por outro lado, valores máximos de  $E$  e  $g_s$  encontrados na

literatura para o cafeeiro corroboram com os resultados obtidos aqui. Praxedes *et al.* (2006), trabalhando com quatro clones adultos de café robusta (*Coffea canephora* var. kouillou), obtiveram valores de  $g_s$  2,5 vezes maior do que os valores de  $g_s$  para *C. arabica* obtidos nesse estudo (Figura 5). Isso ocorre devido a espécie *C. robusta* apresentar transpiração (E) mais elevada que a de *C. arabica* e o sistema radicular de *C. robusta* ser mais desenvolvido. Gómez *et al.* (2005), trabalhando com *C. arabica* de 6 meses de idade, encontraram  $g_s$  e E similares aos valores máximos encontrados aqui (Figura 5). Meinzer *et al.* (1990), também obtiveram valores de E e  $g_s$  similares para cultivares de *C. arabica* com 6 meses de idade em condições de campo. Konrad *et al.* (2005), trabalhando com cultivares de *C. arabica* com 3 meses de idade, obtiveram valor de  $g_s$  menor e valor de E maior para Catuaí Vermelho e valor de  $g_s$  similar e valor de E para Obatã (Figura 5). Isso ocorreu, provavelmente, porque Konrad *et al.* (2005) utilizaram plantas mais jovens em recipientes, resultando em menor intensidade de trocas gasosas. No começo do dia, Ronquim *et al.* (2006) obtiveram valores máximos similares aos obtidos nesse trabalho para  $g_s$  e E em um dia nublado, nos cultivares Catuaí Vermelho e Obatã. Entretanto, no dia claro o valor de  $g_s$  no começo do dia foi menor do que o  $g_s$  obtido nesse estudo (Ronquim *et al.*, 2006).

O comportamento de  $L_m$  pode ser explicado pela atividade da Rubisco. Em temperaturas elevadas (acima de 35°C) a Rubisco é desativada (Sharkey, 2005), sua afinidade pelo  $O_2$  aumenta e, conseqüentemente, a atividade carboxilase da Rubisco diminui. Portanto, sob 32°C por 14 horas de exposição, o efeito negativo do aquecimento foliar sobre  $P_{Nmax}$  resulta na ocorrência de vários fatores agindo em conjunto: diminuição de  $\Phi$ , e  $\epsilon$ , e aumento de  $L_m$ .

Devido às membranas do tilacóide serem especialmente sensíveis ao calor, perturbações na fotossíntese estão entre as primeiras indicações de estresse. A fotossíntese no café é particularmente sensível a temperaturas acima de 20-25°C (Kumar e Tieszen, 1980). Em temperaturas acima de 26°C ocorre um forte efeito térmico sobre  $P_N$ , o qual foi



relacionado ao fechamento estomático e/ou impedimento mesofílico, esse último sendo progressivamente aumentado nessa temperatura (Nunes *et al.*, 1973; Kumar e Tieszen, 1980).

Temperaturas elevadas limitam  $P_N$  alterando a quantidade e a atividade da Rubisco, e modificando a especificidade da enzima em relação ao seu substrato (Jordan e Ögren, 1984). Elevadas concentrações de  $CO_2$  não afetam  $P_{Nmax}$  (Figura 6) indicando que o aumento em  $C_i$  não aumenta os valores de  $\Phi$  e  $\epsilon$  (Morison e Lawlor, 1999; Zhang *et al.* 2003). *Triticum aestivum* apresentou um aumento de somente 10% de  $P_{Nmax}$  sob o dobro da concentração regular de  $C_i$ . Após o aumento de 4°C na temperatura ambiente, *T. aestivum* diminuiu a capacidade fotossintética e a eficiência de carboxilação (Delgado *et al.* 1994). Plantas de *Vigna unguiculata* não apresentaram aumentos na assimilação líquida de carbono ou nenhum benefício direto a partir do suplemento na concentração de  $CO_2$  em interação com a temperatura (Ahmed *et al.* 1993).

A quantidade de Rubisco ativada no cafeeiro pode ser fortemente limitada, mantida sob mínima concentração em relação ao  $CO_2$  disponível para a carboxilação. No cafeeiro provavelmente existe um estoque de Rubisco (Rubisco desativada) como previsto por Warren e Adams (2004) em plantas sempre-verdes. Com a mínima quantidade de Rubisco ativada não há aumento momentâneo de  $P_{Nmax}$  sob aumento transitório de  $CO_2$ . A vantagem desse mecanismo é o aumento do estoque de N na forma de Rubisco, o qual pode ser utilizado na manutenção e defesa, ou para manter  $L_m$  constante sob estresse térmico moderado (e.g. entre 17-26°C). Isso pode estar relacionado ao sucesso da intensa fertilização nitrogenada (no solo ou na copa) nas plantações de café, aumentando a produção de grãos, diminuindo a fotoinibição (Carelli, 2006), mantendo a folhagem durante a estação seca e, por último, aumentando a tolerância aos estresses hídrico e térmico em condições de campo.

De acordo com Warren e Adams (2004), algumas árvores sempre-verdes contêm mais Rubisco do que o necessário para suportar a atividade fotossintética. Isso pode ser uma maneira de acumular nitrogênio sem efeitos tóxicos ou osmóticos diversos na folhagem

sempre-verde. Esse nitrogênio assimilado pode ser utilizado para impedir a herbivoria (i.e. compostos nitrogenados de defesa), para o crescimento e fotossíntese sob condição de estresse. Se a planta é capaz de ativar a Rubisco a tempo, isso poderia melhorar o desempenho da planta sob condições sub-ótimas (Warren e Adams, 2004). A atividade da Rubisco é fortemente correlacionada com  $\epsilon$  (Caemmerer, 2000). É possível notar que Catuaí Vermelho e Obatã apresentam picos de  $\epsilon$  a 17°C (ambos cultivares), 26 (Catuaí Vermelho) e 23°C (Obatã). Provavelmente, depois de 17°C, um reservatório de Rubisco é ativado e  $\epsilon$  apresenta outro aumento até alcançar o segundo pico (Figura 7).

De acordo com os resultados desse trabalho, quando  $C_{g_w}$  apresentou maior variação, os picos de  $\epsilon$  foram mais distantes uns dos outros. Os valores de  $C_{g_w}$  para os cultivares Catuaí Vermelho e Obatã seguiram esse padrão de  $C_{g_w}$  e  $\epsilon$ . Catuaí Vermelho apresentou a maior modulação da rede (valores de  $C_{g_w}$  entre as temperaturas reduzidas e elevadas apresentaram maior variação) e os picos de  $\epsilon$  foram mais distantes um do outro. Obatã apresentou menor modulação da rede que Catuaí Vermelho, e os picos de  $\epsilon$  foram mais próximos. Além disso, os valores de  $C_{g_{PPFD}}$  desses dois cultivares apresentaram maior variação do que  $C_{g_{CO_2}}$ , indicando que a rede com as variáveis obtidas a partir das curvas  $P_N$ -PPFD são mais responsáveis por essa modulação. O cultivar Ouro Verde também seguiu esse padrão de  $C_{g_w}$  e  $\epsilon$ , mas os picos de  $\epsilon$  aconteceram antes, sob 17 e 23°C (Figura 7) e a Rubisco é ativada antecipadamente. Se toda a Rubisco já está ativada entre 17-23°C deveria ser mais difícil modular a rede da Figura 1 sob temperatura mais elevada. Sendo assim, o cultivar Ouro Verde apresentou o comportamento mais conservativo, uma vez que os valores de  $C_{g_w}$  mudaram somente um pouco entre as temperaturas reduzidas ou elevadas. Como  $C_{g_{CO_2}}$  desse cultivar apresentou maior variação que  $C_{g_{PPFD}}$ , a rede com as variáveis obtidas a partir das curvas  $P_N$ - $CO_2$  são mais responsáveis por essa modulação.

Em todos os cultivares, quando toda a Rubisco está na forma ativa, e a temperatura continua a aumentar desde 26°C, o estresse pelo calor pode provocar desativação da Rubisco

novamente (Sharkey, 2005). Nessa condição, a atividade oxigenase da Rubisco aumenta por causa da maior solubilidade do O<sub>2</sub> (Jordan e Ögren, 1984), ou todo o sistema fotossintético entra em colapso diminuindo  $\epsilon$  acentuadamente (e.g. 32°C). Apesar de  $\epsilon$  ser importante para explicar a atividade da Rubisco e outros comportamentos dos cultivares, na PCA (Figura 8), o vetor  $\epsilon$  apresentou projeção insignificante sobre o eixo pc1, permanecendo entre os grupos de temperatura. Isso acontece porque  $\epsilon$  diminui a variação das variáveis e trabalha como o ponto de suporte entre as redes menores da direita e da esquerda da Figura 1, mantendo toda rede trabalhando o mais eficiente possível.

Ainda na PCA (Figura 8), os dois grupos de temperatura indicam e confirmam o gradiente de comportamentos ( $C_{g_w}$ ). Em outras palavras: um menor agrupamento reflete o comportamento dos cultivares na faixa de temperaturas elevadas (26-32°C) onde os cultivares apresentam maior  $C_{g_w}$  (rede mais conectada), com a temperatura de 26°C ocupando uma posição intermediária entre os grupos indicando um comportamento intermediário; e outro grupo reflete os comportamentos dos cultivares na faixa de temperaturas reduzidas (17-23°C) onde os cultivares apresentam reduzida  $C_{g_w}$  (rede menos conectada). Na PCA, os cultivares a 17-23°C aparecem mais agrupados do que os cultivares a 26-32°C. Isso significa que a 17-23°C, os cultivares apresentam menor variação das respostas a mudanças na temperatura. A 26-32°C, quando há estresse térmico, os cultivares apresentam diferentes tipos de respostas fisiológicas ao estresse.

Os cultivares de *C. arabica* apresentam maior fixação de carbono entre 17-23°C, quando a eficiência quântica aparente é maior, a taxa de transporte de elétrons não é excessiva, os valores dos componentes negativos do processo fotossintético são reduzidos e os processos bioquímico e fotoquímico da fotossíntese estão em equilíbrio. As plantas jovens dos cultivares de *C. arabica* estudadas não apresentam aumento da assimilação líquida sob concentração de CO<sub>2</sub> de 1200  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ . O processo fotossintético é extremamente inibido sob temperatura foliar de 32°C com um tempo de exposição de 14 horas em concentrações de

CO<sub>2</sub> de 355 e 1200  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , resultando em uma diminuição da eficiência de carboxilação e um aumento da limitação mesofílica da fotossíntese. Respostas ao estresse térmico apresentaram menor variação em 17 a 23°C. A rede fisiológica apresenta os seus componentes mais fortemente conectados sob temperaturas elevadas (maior valor de C<sub>g,w</sub>).

## II. CARBOXYLATION EFFICIENCY, ELECTRON TRANSPORT RATE AND PHOTOSYNTHETIC CAPACITY AFFECTED BY LEAF TEMPERATURE IN SAPLINGS OF *COFFEA ARABICA*

### ABSTRACT

Connection degree of biochemical and photochemical photosynthetic parameters was evaluated in three *Coffea arabica* cultivars exposed at leaf temperatures from 17 to 32°C for 14 hours. All cultivars presented high maximum net photosynthesis ( $P_{Nmax}$ ) and apparent quantum efficiency as well low light compensation and saturation points between 17-23°C. Respiration in dark ( $R_d$ ) increased with temperature but under 32°C happened sharp decrease of  $R_d$ , light saturation point and  $P_{Nmax}$ , especially in Ouro Verde cultivar. *C. arabica* saplings did not present increase on  $P_{Nmax}$  under 1200  $\mu\text{mol mol}^{-1}$   $\text{CO}_2$  concentration. Under elevated temperatures (26-32°) and 1200  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  of  $\text{CO}_2$ , carboxylation efficiency and stomatal limitation of photosynthesis decreased incessantly in contrast to increasing mesophyll limitation of photosynthesis. Photosynthetic process was extremely inhibited in all cultivars exposed for 14 hours at leaf temperature of 32°C under 355  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  or 1200  $\mu\text{mol mol}^{-1}$   $\text{CO}_2$  concentration. The modulation of a physiological network built with parameters of carbon metabolism and the results from principal component analyses (PCA) with same parameters permitted to reveal contrasting behavior between reduced (17-23°C) and elevated (26-32°C) temperatures, where network components were weaker connected to each other (low connectance) and the amplitude of variation considering all parameters studied was lower (PCA) under reduced than elevated temperatures.

**Key-words:** excess of electrons, leaf gas exchange, network connectance, principal components analysis, system biology, thermal stress

## 1. INTRODUCTION

Leaf temperature and water availability are two of the most important factors influencing plant net CO<sub>2</sub> assimilation (Larcher, 2003). Leaf temperature is a key factor of photosynthesis affecting inherent biochemical and biophysical processes of CO<sub>2</sub> fixation (Pastenes and Horton, 1996). Temperature influences carbon net assimilation by modifying the kinetics of Calvin cycle (Salvucci and Crafts-Brandner, 2004) and the rate of electron transport chain (Wise *et al.*, 2004; Salvucci and Crafts-Brandner, 2004). Besides, leaf temperature influences stomatal conductance ( $g_s$ ) and transpiration (E) through leaf-to-air vapor pressure deficit. If leaf temperature increases, for instance, from 10 to 30°C, carboxylation efficiency ( $\epsilon$ ) drops in C3 plants because of CO<sub>2</sub> decreases more than O<sub>2</sub> solubility (Šestak *et al.*, 1971). On the other hand, there is little or no damage to photosystem II (PSII) even when net photosynthesis is near zero under heat stress (Sharkey, 2005). Thus, net carbon assimilation would be substantially reduced in C3 plants submitted to moderate heat stress, but the electron transport in PSII is maintained almost intact.

In Brazil, *Coffea arabica* plantations are established mainly in areas with mean annual temperature between 18 and 22°C (Barros *et al.*, 1997). New cultivars are able to grow in areas with temperature between 24 and 25°C, as in Brazilian Northeast region, with satisfactory productivity (DaMatta, 2004). On cold areas, chilling affects negatively *C. arabica* by decreasing net CO<sub>2</sub> assimilation (Bauer *et al.*, 1985, Oliveira *et al.*, 2002). Long period under temperature below 12°C impaired intensely the development of young *C. arabica* (DaMatta *et al.*, 1997). However, Carvalho *et al.* (1998) observed that the cultivar Catuaí Vermelho did not show significant alterations of net photosynthesis, leaf transpiration, stomatal conductance and PSII photochemical capacity under 8±1°C.

Under temperatures above 23°C the development and ripening of fruits are accelerated, often leading to loss of quality and, if associated with a prolonged dry season,

may cause abortion of flowers (Camargo, 1985). Continuous exposure of coffee trees to temperatures around 30°C could result in depressed growth and morphological abnormalities (Franco, 1958). On the other hand, in regions with mean annual temperature below 17°C, growth is largely depressed (DaMatta and Ramalho, 2006). Therefore, the range of temperature between 17 and 30°C is suitable for studying significant physiological behavior of *C. arabica*.

Rising external CO<sub>2</sub> concentration (C<sub>e</sub>) usually increases or maintains net photosynthesis under heat stress, counteracting the negative impact of high temperature on carbon balance (Tezara *et al.*, 2002). On the other hand, in some C<sub>3</sub> species, significant photosynthetic response to increasing C<sub>e</sub> did not happen under stress. For example, intercellular leaf CO<sub>2</sub> concentration (C<sub>i</sub>) increases in *Helianthus annuus* under high C<sub>e</sub> keeps leaf photosynthesis free from stomatal impediments, but maximum net photosynthesis (P<sub>Nmax</sub>) did not increase on moderate or severe water restriction (Tezara *et al.*, 2002). Simultaneous effects of thermal stress and CO<sub>2</sub> availability on biochemical and photochemical photosynthetic processes of *C. arabica* were not yet determined.

One approach to reinterpret plant physiological responses under stress is that proposed by Amzallag (2001), showing in a network how much physiological variables are connected to each other under different environmental situations (Souza *et al.*, 2004, Prado *et al.* 2004). Network is being considered useful to represent complex systems (Barabási, 2005). Plants present characteristics of complex systems like fractality, non-linearity, and sub-systems without clear limit among them. Fractality appears in plants as the repetition of forms in several levels of plant organization as the forms of conduits from the center of roots up to the last tracheid in leaf mesophyll. The curve of net photosynthesis as a function photosynthetic active radiation is a clear example of non-linearity in plants. Unclear limit between photochemical and biochemical machineries is another trait related to complex systems in plants. Strong connectance among network components implicates that disturbance

propagates easily throughout the system with little attenuation. Contrastingly, physiological networks with reduced connectance between components tend to diminish disturbance propagation. Slack connectance in a network could happen, for example, in species or cultivars less sensitive to stress.

Considering all variables simultaneously in a network, the principal component analysis (PCA) can highlight if these variables are associated in contrasting behavior and which is the degree of variation of the data set under stress condition. Therefore, network connectance and PCA are suitable analyses for revealing, respectively, the strength of interconnections among plant physiological variables and the behavior of a data set in a changing environment.

One aim of the present work was to determinate the responses of net photosynthesis and electron transport rate in leaves of *C. arabica* at reduced (17-23°C) and elevated (26-32°C) leaf temperatures in three cultivars (Catuaí Vermelho, Obatã, and Ouro Verde). Besides, it was determined the temperature benchmarks (infra-optimum, optimum, and supra-optimum temperatures) on leaf of *C. arabica* saplings, especially regarding biochemical (carboxylation efficiency) and photochemical (electron transport rate) processes of photosynthesis. Simultaneously, it was investigated if increasing transient CO<sub>2</sub> concentration could diminish the impact of heat stress on net photosynthesis of *C. arabica*. Using network connectance analysis it was determined the network modulation on infra-optimum and supra-optimal leaf temperatures in *C. arabica*. It was expected differences of connectance strength of leaf physiological network, resulting in network modulation at reduced (17-23°C) and elevated (26-32°C) leaf temperatures. Besides, a clear separation of extreme temperatures in PCA is probable by reason of strong impact of leaf temperature on net photosynthetic processes (Larcher, 2003).



## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. PLANT MATERIAL AND GROWTH CONDITIONS**

It was utilized four-month-old *Coffea arabica* Rubiaceae growing in greenhouse on 20 L of oxisoil mixed with animal dung (4:1) in black plastic bags. One plant per recipient was maintained and soil was irrigated twice a week until field capacity. Mean night and day temperatures in greenhouse were  $18.0\pm 3.2^{\circ}\text{C}$  and  $25.0\pm 3.0^{\circ}\text{C}$ , respectively. Experiment was carried out from October 2003 to May 2004. The soil was fertilized with 20 g N:P:K:Zn:B (4.0:14.0:8.0:0.2:0.1) in July 16<sup>th</sup> 2003 on each plastic bag. Due to rusty leaf disease, all saplings were treated with cupric oxichloride ( $3\text{ g L}^{-1}$ ) using hand sprinkler in August 6<sup>th</sup> 2003.

### **2.2. THERMAL TREATMENTS IN INCUBATOR AND THERMAL ISOLATION ROOT SYSTEM**

Thermal treatments were carried out utilizing an incubator (1.45 x 0.58 x 0.51 m) model NT-708, Nova Técnica, Piracicaba-Brasil. Air temperature inside incubator was maintained constant at 17, 20, 23, 26, 29, or  $32^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ). Air temperature was assumed having similar value of leaf temperature because of absence of illumination inside incubator during thermal treatments.

Root system temperature was maintained equal to greenhouse temperature by thermal isolation provided by polystyrene boxes (0.50 x 0.40 x 0.20 m). Two saplings per box were maintained in each temperature inside incubator. Spaces between plastic bags and internal box walls were filled with polystyrene flakes. Polystyrene boxes were closed with polystyrene cover and involved by a blanket of glass wool. Soil temperature in plastic bags during treatments was  $24.0\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ . Treatments were accomplished after keeping both saplings during 14 hours at night inside incubator. On these two saplings the curves of net photosynthesis ( $P_N$ ) as a function of photosynthetic photon flux density (PPFD) was obtained at each corresponding leaf temperature.

### 2.3. NET PHOTOSYNTHESIS ( $P_N$ ) AS A FUNCTION OF PHOTOSYNTHETIC PHOTONS FLUX DENSITY (PPFD)

$P_N$ -PPFD curves were obtained from 08:00h to 09:00h, between December 2003 and January 2004. After thermal treatments both individuals were transported to experimental room (4.00 x 1.92 x 1.70 m) where air temperature was kept similar ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) to incubator using heater or air conditioning. Net photosynthesis was measured in all expanded leaves on both plants using a portable infrared gas analyzer (IRGA) model LCA-4 (ADC, Hoddesdon, UK). The leaf that showed the highest  $P_N$  was selected to carry out  $P_N$ -PPFD curve. Therefore, only one  $P_N$ -PPFD curve was accomplished at corresponding temperature in each cultivar. LCA-4 was connected to a Parkinson leaf chamber PLCN-4 (ADC) and worked as an open system during gas exchange determinations. Reference air was collected in open area out of experimental room and distant from  $\text{CO}_2$  sources. Peltier system on PLCN-4 head kept leaf temperature constant during leaf-gas exchange measurements at corresponding incubator temperature. Leaf temperature was determined by a thermocouple connected to PLCN-4. PLU-002 light cannon (ADC, Hoddesdon, UK) containing halogen dichroic lamp (12 V-20 W) was coupled to PLCN-4 for supplying PPFD. During  $P_N$ -PPFD curves, vapor pressure deficit ( $\text{VPD}_{\text{air}}$ ) was maintained constant (1 kPa). Therefore, under 17, 20, 23, 26, 29, and  $32^\circ\text{C}$ , the relative air humidity on PLCN-4 was adjusted, respectively, to 48, 57, 64, 70, 75, and 79% forcing previously the arriving air through a column with wetted  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

PPFD values between  $800\text{-}2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  were obtained controlling the voltage (0-12 V) applied on PLU-002. Values of PPFD below  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  were obtained by means of neutral glass filters (Comar Instruments, Cambridge, UK) inserted between light source and PLCN-4 window. The  $P_N$ -PPFD curve was adjusted using Prado and Moraes (1997) equation:

$$(I) \quad P_N = P_{N_{\text{max}}} \cdot \left(1 - e^{-k(\text{PPFD} - I_c)}\right)$$

$P_N$  = net photosynthesis ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $P_{N_{\text{max}}}$  = maximum net photosynthesis ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $e$  = natural logarithmic basis,  $k$  = constant of proportionality, PPF<sub>D</sub> = photosynthetic photons flux density ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), and  $I_c$  = light compensation point ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

The PPF<sub>D</sub> value when  $P_N$  achieved 90% of  $P_{N_{\text{max}}}$  (Equation I) was named light saturation point ( $I_s$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Prado and Moraes, 1997). Respiration in dark ( $R_d$ ) was obtained at the end of  $P_N$ -PPFD curve, after 5 minutes under null PPF<sub>D</sub>, when  $R_d$  showed constant values.

#### **2.4. APPARENT QUANTUM EFFICIENCY AT INITIAL PHASE, AND STOMATAL CONDUCTANCE, LEAF TRANSPIRATION, AND EXTERNAL PER INTERCELLULAR CO<sub>2</sub> CONCENTRATION AT SATURATION PHASE IN $P_N$ -PPFD CURVES**

Apparent quantum efficiency ( $\Phi$ ) was calculated utilizing the first derivate of Equation I:

$$(II) \quad \Phi = k \cdot P_{N_{\text{max}}} \cdot (e^{-k \cdot I_c})$$

$\Phi$  = apparent quantum efficiency,  $k$  = constant of proportionality,  $P_{N_{\text{max}}}$  = maximum net photosynthesis ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $e$  = natural logarithmic basis, and  $I_c$  = light compensation point ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

In each thermal treatment, mean values of stomatal conductance ( $g_s$ ), leaf transpiration ( $E$ ) and intercellular ( $C_i$ ) per external ( $C_e$ ) CO<sub>2</sub> concentrations were calculated under PPF<sub>D</sub> equal or superior to 1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  on  $P_N$ -PPFD curves. Following this procedure, it was possible to obtain, in each  $P_N$ -PPFD curve, from 33 to 42 values of  $g_s$ ,  $E$ , or  $C_i/C_e$  distributed between 1200-2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of PPF<sub>D</sub> in each corresponding thermal treatment.

#### **2.5. ELECTRON TRANSPORT RATE (ETR) BETWEEN PSII-PSI AS A FUNCTION OF PPF<sub>D</sub>**

ETR-PPFD measurements were conducted between 08:00h and 10:00h on other two

plants different of those used by P<sub>N</sub>-PPFD curves. Chlorophyll fluorescence was determined by means of a portable modulated fluorometer model PAM-2000 (Walz, Effeltrich, Germany) connected to a PC Palm Top HP 200X (HP, Corvallis, USA). ETR-PPFD curves were obtained utilizing the clip leaf support 2030-B (Walz) connected to PAM-2000. 2030-B had a micro-quantum sensor and a thermocouple for measuring PPFD and leaf temperature, respectively. Halogen lamp (20 W, model 2050-W, Walz) equipped with heat filter and dimmer was connected to 2030-B for providing different PPFD intensities. Near the fluorescence measuring area it was applied intermittently a cold air flux (400 mL min<sup>-1</sup>) to the direction of superior epidermis for maintaining leaf temperature constant (±1.0°C) during ETR-PPFD curve.

As done in P<sub>N</sub>-PPFD curves, all expanded leaves were tested previously and that one with highest ETR value was chosen to carry out the ETR-PPFD curve. The leaf was inserted in 2030-B and ETR was determined at each 10 PPFD units (between 10-100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> of PPFD) and at each 100 PPFD units (between 100-2000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> of PPFD). ETR values were calculated by PAM-2000 routine according to Genty *et al.* (1989). It was adopted 84% to PPFD absorbed by leaf and 0.5 as partition factor of PPFD between PSII and PSI. The adjustment of values on ETR-PPFD curves was carried out utilizing the Equation I, modified:

$$(III) \quad ETR = ETR_{max} \cdot (1 - e^{-k(PPFD - I_{ETR})})$$

*ETR* = electron transport rate between PSII and PSI (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); *ETR<sub>max</sub>* = maximum electron transport rate between PSII and PSI (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), *e* = natural logarithmic basis; *k* = constant of porportionality; *PPFD* = photosynthetic photon flux density (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); and *I<sub>ETR</sub>* = maximum PPFD intensity for null ETR (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)

Maximum electron transport rate ( $ETR_{\max}$ ) per maximum net photosynthesis ( $P_{N\max}$ ) ratio ( $ETR_{\max}/P_{N\max}$ ) was plotted on a graph  $ETR_{\max}/P_{N\max} \times$  temperature to detect excess of electrons on PSII.

## **2.6. NET PHOTOSYNTHESIS ( $P_N$ ) AS A FUNCTION OF INTERCELLULAR ( $C_i$ ) $CO_2$ CONCENTRATION**

It was obtained  $P_N$ - $C_i$  curves under PPFD saturation ( $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) utilizing a gas dilutor model GD-602 (ADC, Hoddesdon, UK) connected to a cylinder containing  $1500 \mu\text{mol mol}^{-1}$  of  $CO_2$  (White Martins, Sertãozinho, SP, Brazil). IRGA-LCA-4, GD-602, and the  $CO_2$  cylinder were connected as a half-open system described by Monteiro and Prado (2006).  $VPD_{\text{air}}$  inside PLCN-4 was maintained constant (1 kPa) during  $P_N$ - $C_i$  curves. Air relative humidity was increased forcing previously the arriving air through a column with wetted  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  as done in  $P_N$ -PPFD curves. All expanded leaves were measured under saturated  $CO_2$  concentration and that one with highest  $P_N$  was chosen.  $P_N$ - $C_i$  curves were carried out in experimental room after corresponding thermal treatment described previously using two different plants of those utilized in  $P_N$ -PPFD or  $ETR$ -PPFD curves. The initial  $CO_2$  concentration was about  $1500 \mu\text{mol mol}^{-1}$  and each dilution resulted in 90% of the prior  $CO_2$  concentration (Monteiro and Prado, 2006).  $C_i$  values at each external  $CO_2$  concentration were calculated by IRGA using the equation described by Caemmerer and Farquhar (1981).

Equation I was utilized to adjust  $P_N$ - $C_i$  curves by changing PPFD to  $CO_2$  component (Monteiro and Prado, 2006). Therefore, it was possible to obtain the photosynthetic capacity ( $P_{N\max CO_2}$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and the  $CO_2$  compensation point ( $\Gamma_{CO_2}$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) from modified Equation I. The  $CO_2$  concentration value when  $P_N$  achieved 90% of  $P_{N\max CO_2}$  was named  $CO_2$  saturation point ( $C_s$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Apparent carboxylation efficiency ( $\epsilon$ ) in  $P_N$ - $C_i$  curves was calculated utilizing the first derivate of Equation I with  $CO_2$  instead of PPFD component as described by Monteiro and Prado (2006).

## 2.7. STOMATAL ( $L_s$ ) AND MESOPHYLL ( $L_m$ ) LIMITATIONS OF NET PHOTOSYNTHESIS

$L_s$  and  $L_m$  were calculated as indicated by Tezara *et al.* (2002):

$$(V) \quad L_s = 100 \cdot \frac{(P_N' - P_N)}{P_N'}$$

$L_s$  = stomatal limitation to net photosynthesis (%),  $P_N'$  = net photosynthesis when  $C_i$  was equal to atmospheric  $CO_2$  concentration ( $355 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ) on  $P_N$ - $C_i$  curves,  $P_N$  = net photosynthesis on atmospheric  $CO_2$  concentration

$$(VI) \quad L_m = 100 \cdot \frac{(P_{N(c)} - P_{N(t)})}{P_{N(c)}}$$

$L_m$  = mesophyll limitation to net photosynthesis (%),  $P_{N(c)}$  = plant with the highest leaf net photosynthesis on  $C_i = 1200 \mu\text{mol mol}^{-1}$  "control", and  $P_{N(t)}$  = leaf net photosynthesis of plants submitted to the other thermal treatments on  $C_i = 1200 \mu\text{mol mol}^{-1}$

## 2.8. NETWORK CONNECTANCE AND PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS

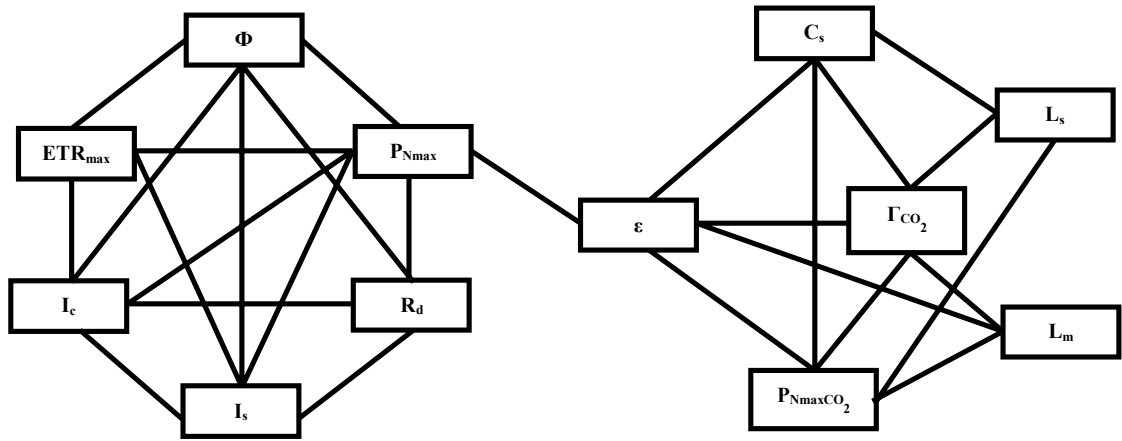
It was used the concept and measurement of global connectance ( $C_g$ , Amzallag, 2001; Souza *et al.*, 2004) for assessing the network modulation under reduced (17-23°C) and elevated (26-32°C) temperatures. Accordingly, it was first specified a collection of paired variables of interest in the network. It was utilized the correlation coefficient ( $r$ , Pearson coefficient) between each paired variable to test the significance of the correlation and to measure the strength of the relationship (connection) between two variables. For that,  $r$ -values were normalized by  $z$ -transformation, becoming  $z$ -values (the connectance value):

$$(VII) \quad z = 0.5 \ln \left[ \frac{(1 + |r|)}{(1 - |r|)} \right]$$

Network global connectance ( $C_g$ ) on specified collection of paired variables was represented by the average of z-values (Amzallag, 2001):

$$(VIII) \quad C_g = \frac{1}{m} [z(A, X_1) + \dots + z(A, X_m)]$$

Figure 1 shows the topology of physiological network built with leaf physiological variables related to carbon assimilation. Two minor networks formed the whole network. One small network has the parameters related to  $P_N$ -PPFD curves and the other the parameters related to  $P_N$ - $C_i$  curves. Both sub-networks are connected via carboxylation efficiency ( $\epsilon$ , Figure 1). Global connectance value ( $C_g$ ) was calculated in sub-network related to  $P_N$ -PPFD curves ( $C_{gPPFD}$ ), to  $P_N$ - $CO_2$  curves ( $C_{gCO_2}$ ) and to the whole network ( $C_{gw}$ ) at reduced (17, 20, 23°C) and elevated (26, 29, 32°C) leaf temperatures in all cultivars. Therefore, two values for each  $C_{gw}$ ,  $C_{gPPFD}$ , and  $C_{gCO_2}$  were available to be compared in each cultivar, at reduced (17-23°C) and at elevated (26-32°C) leaf temperatures.



**Figure 1.** Topology of network representing interactions of photochemical and biochemical photosynthetic processes. On the left side there are the parameters measured under atmospheric  $\text{CO}_2$  concentration ( $355 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ) obtained in  $P_N$ -PPFD curves and on the right side the parameters measured under  $\text{CO}_2$  ranged from  $1500$  to  $10 \mu\text{mol mol}^{-1}$  in  $P_N$ - $C_i$  curves. Both sides are connected by apparent carboxylation efficiency ( $\epsilon$ ). On left side:  $\Phi$  = apparent quantum efficiency,  $\text{ETR}_{\text{max}}$  = maximum electron transport rate between PSII and PSI,  $I_c$  = light compensation point,  $I_s$  = light saturation point,  $R_d$  = dark respiration,  $P_{N\text{max}}$  = maximum net photosynthesis. On right side:  $P_{N\text{maxCO}_2}$  = photosynthetic capacity,  $C_s$  =  $\text{CO}_2$  saturation point,  $\Gamma_{\text{CO}_2}$  =  $\text{CO}_2$  compensation point,  $L_m$  = mesophyll limitation of photosynthesis,  $L_s$  = stomatal limitation of photosynthesis.

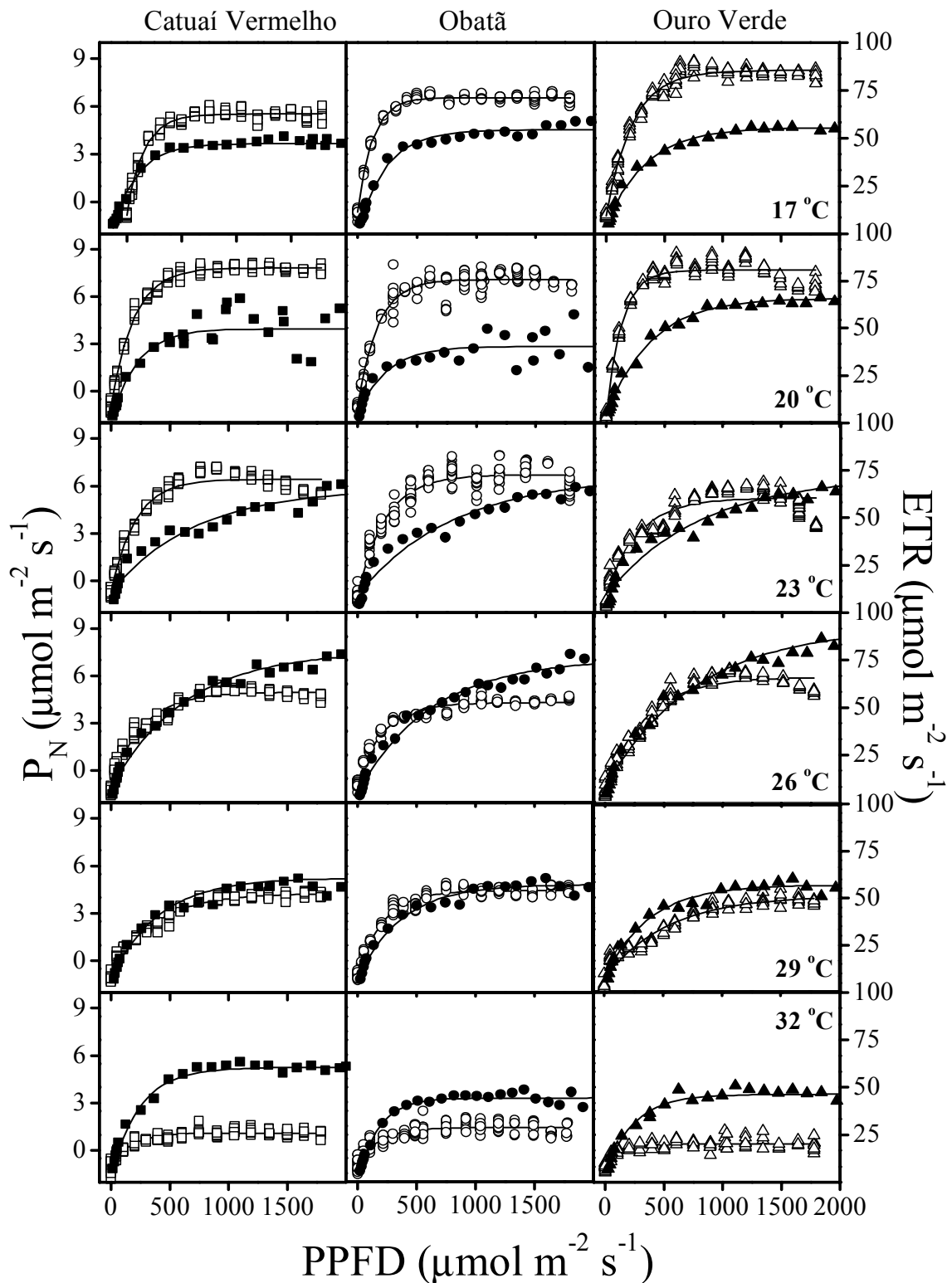


The principal component analysis (PCA) was accomplished using PC-ORD software, version 3.12, MJM Software Design (Glenden Beach, Oregon, USA). Each one of two axis of PCA graph was denominated principal component (pc1 and pc2) based on the correlations among analyzed variables. It allowed the analysis of all physiological variables in a two-dimensional space. Vectors in PCA graph represented the most important physiological variables that determinate the distribution of symbols on two-dimension space guided by the two axes (Manly, 1994).

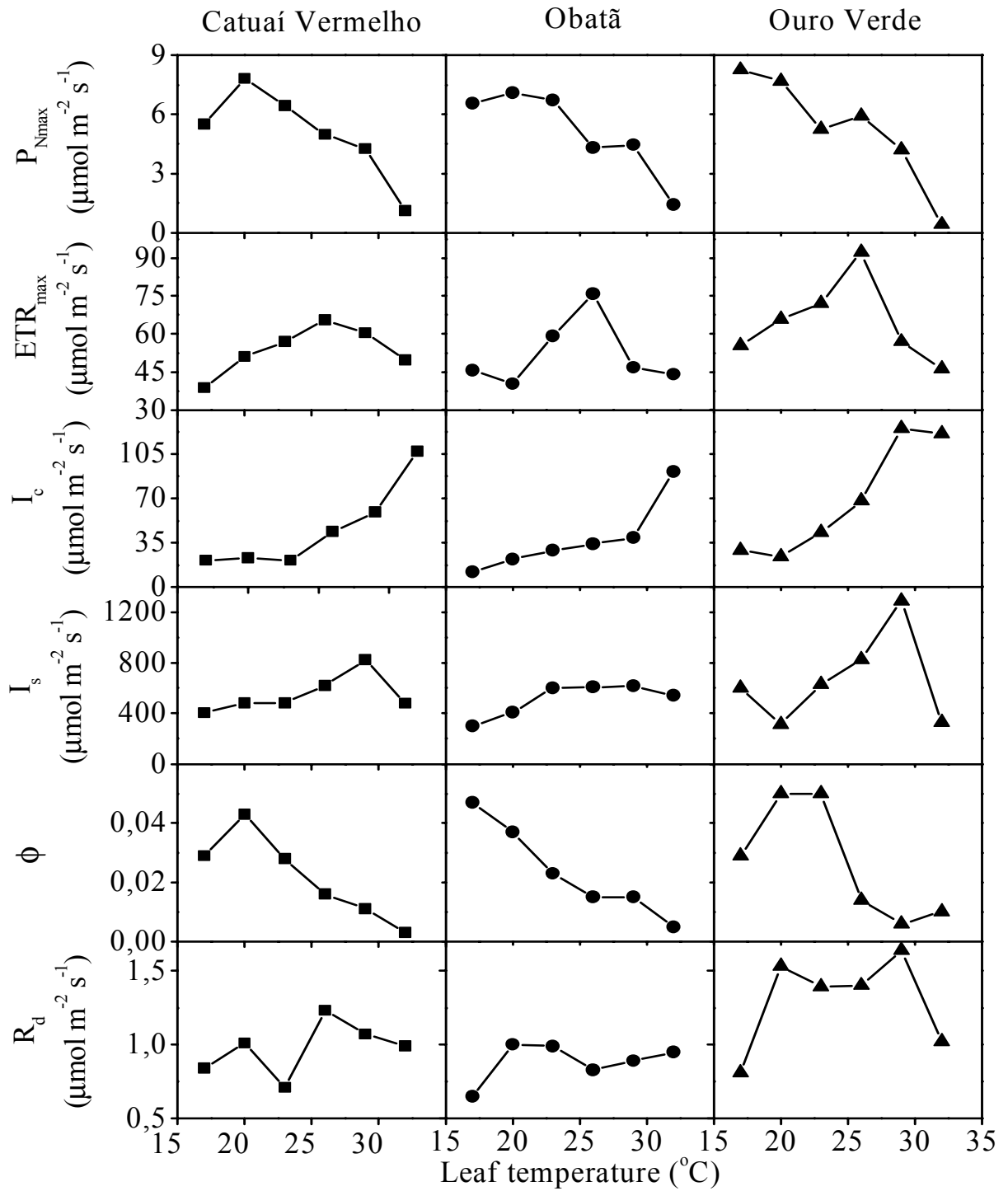
### 3. RESULTS

#### ***3.1. NET PHOTOSYNTHESIS ( $P_N$ ) AND ELECTRON TRANSPORT RATE (ETR) AS A FUNCTION OF PHOTOSYNTHETIC PHOTON FLUX DENSITY (PPFD)***

In  $P_N$ -PPFD curves (Figure 2) the highest  $P_{Nmax}$  ( $8.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) was obtained on cultivar Ouro Verde at  $17^\circ\text{C}$ . Obatã and Catuaí Vermelho cultivars presented high  $P_{Nmax}$ , 7.8 and  $7.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectively, at  $20^\circ\text{C}$  (Figure 2).  $P_{Nmax}$  dropped under temperatures higher than  $20^\circ\text{C}$  in all cultivars, reaching minimum value ( $1.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) at  $32^\circ\text{C}$ .  $ETR_{max}$  optimum temperature ranged from 23 to  $29^\circ\text{C}$  in Catuaí Vermelho, and from 23 to  $26^\circ\text{C}$  in Obatã and in Ouro Verde (Figure 2). Optimum temperature interval for  $ETR_{max}$  ( $23$ - $29^\circ\text{C}$ ) was superior to that obtained for  $P_{Nmax}$  ( $17$ - $20^\circ\text{C}$ ) in all cultivars (Figures 2 and 3).  $P_{Nmax}$  lessening at temperatures higher than  $20^\circ\text{C}$  (Figure 3) was accompanied by rising of light compensation point ( $I_c$ ).

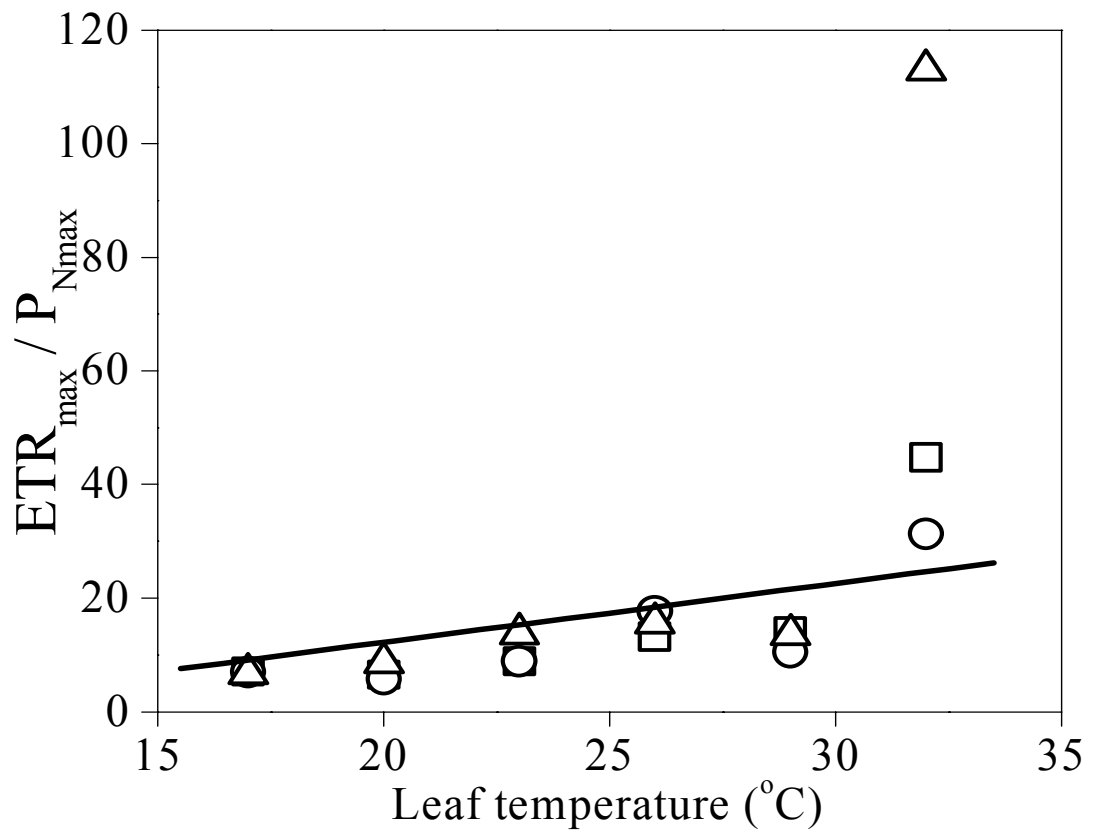


**Figure 2.** Net photosynthesis ( $P_N$ , open symbols) and electron transport rate (ETR, solid symbols) as a function of photosynthetic photon flux density (PPFD) under atmospheric  $\text{CO}_2$  concentration ( $355 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ) in *Coffea arabica* cultivars (Catuaí Vermelho  $\square, \blacksquare$ ; Obatã  $\circ, \bullet$ ; and Ouro Verde  $\Delta, \blacktriangle$ ) after 14 hours under 17 (top panels), 20, 23, 26, 29, and 32°C (subsequent panels).



**Figure 3.** Values of maximum net photosynthesis ( $P_{Nmax}$ ), maximum electron transport rate between PSII and PSI ( $ETR_{max}$ ), light compensation point ( $I_c$ ), light saturation point ( $I_s$ ), apparent quantum efficiency ( $\Phi$ ), and dark respiration ( $R_d$ ) of *Coffea arabica* (cultivars Catuaí Vermelho ■, Obatã ●, and Ouro Verde ▲) after 14 hours under 17, 20, 23, 26, 29, and 32°C.

There was a trend of increasing values of  $I_c$  and  $I_s$  from 17 to 29°C in all cultivars (Figure 3). Contrastingly, apparent quantum efficiency ( $\Phi$ ) dropped with increasing temperature from 20 to 29°C (Figure 3). There was a gradient of values from Catuaí Vermelho to Ouro Verde. For instance, Catuaí Vermelho and Obatã showed  $P_{N_{max}}$  at higher temperature (20 °C) than Ouro Verde (17°C). High values of  $ETR_{max}$  were around 65 and 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in Catuaí Vermelho and Obatã, respectively, but in Ouro Verde  $ETR_{max}$  was about 90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Maximum values of  $I_c$  and  $I_s$  were similar between Catuaí Vermelho and Obatã, but they are higher in Ouro Verde (Figure 3). In addition, Ouro Verde cultivar showed steeper drop of  $P_{N_{max}}$  and  $ETR_{max}$  under elevated temperatures (26-32°C) and  $ETR$  was higher in Ouro Verde at any temperature, with exception at 32°C (Figures 3 and 4). Disruption of biochemical and photochemical apparatus at 32°C was more evident in Ouro Verde, with  $P_{N_{max}}$ ,  $ETR_{max}$ ,  $I_s$ , and  $R_d$  decreasing simultaneously from 29 to 32°C (Figures 3 and 4).

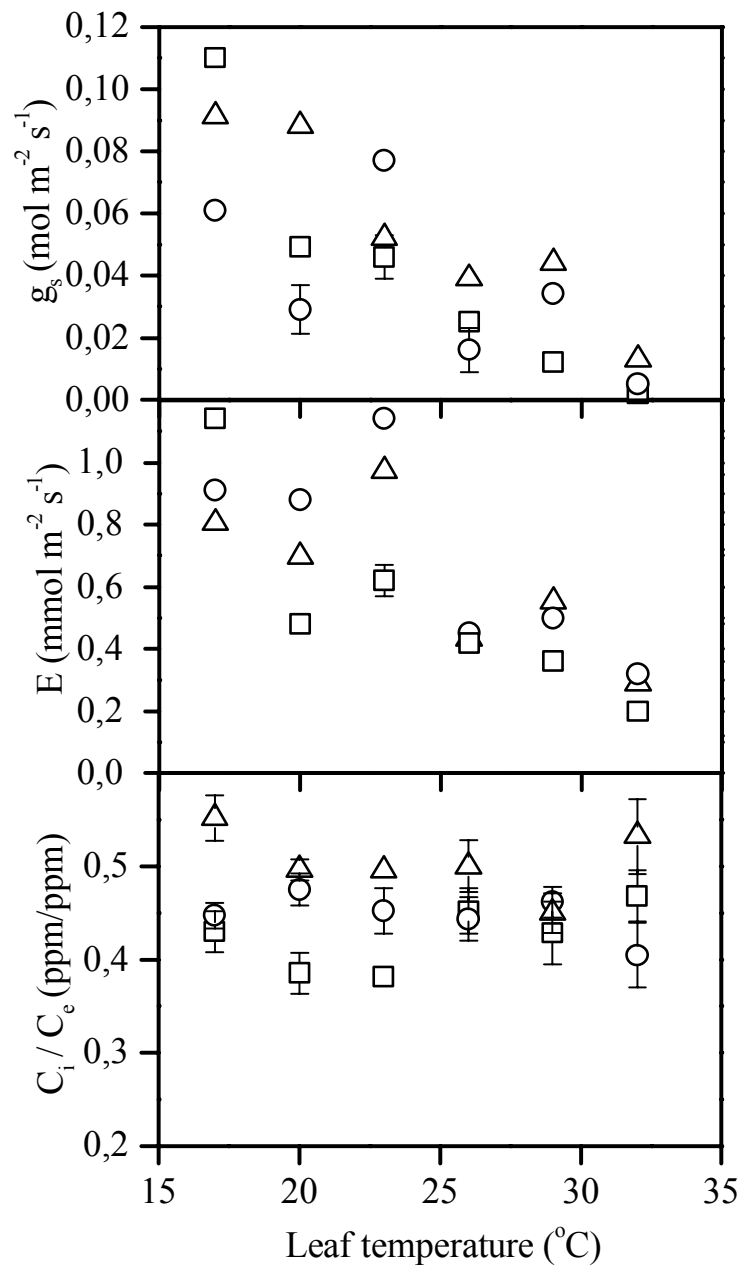


**Figure 4.** Ratio between maximum electron transport rate between PSII and PSI ( $ETR_{max}$ ) and maximum net photosynthesis ( $P_{Nmax}$ ) as a function of leaf temperature in *Coffea arabica* cultivars Catuaí Vermelho ( $\square$ ), Obatã ( $\circ$ ) and Ouro Verde ( $\Delta$ ). Data were collected after 14 hours in incubator at 17, 20, 23, 26, 29, or 32°C on leaves of saplings.

The gradient between Catuaí Vermelho and Ouro Verde cultivars also appears about  $R_d$  values. There is a tendency to increasing  $R_d$  with temperature, but in Ouro Verde cultivar this enhance is higher.

### ***3.2. STOMATAL CONDUCTANCE ( $G_s$ ), LEAF TRANSPIRATION ( $E$ ), AND INTERCELLULAR ( $C_i$ ) PER EXTERNAL ( $C_e$ ) $CO_2$ CONCENTRATION ( $C_i/C_e$ ) AS A FUNCTION OF LEAF TEMPERATURE***

On Figure 5 are shown the mean values of  $g_s$ ,  $E$ , and  $C_i/C_e$  as a function of leaf temperature in three study cultivars. Taking in account all cultivars, both  $g_s$  and  $E$  decreased linearly with temperature, with  $g_s$  near null and  $E$  around  $0.35 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  at  $32^\circ\text{C}$ . Most mean values of  $C_i/C_e$  as a function of leaf temperature ( $17\text{-}32^\circ\text{C}$ ) ranged from 0.4 to  $0.5 \mu\text{mol mol}^{-1}$  (Figure 5).

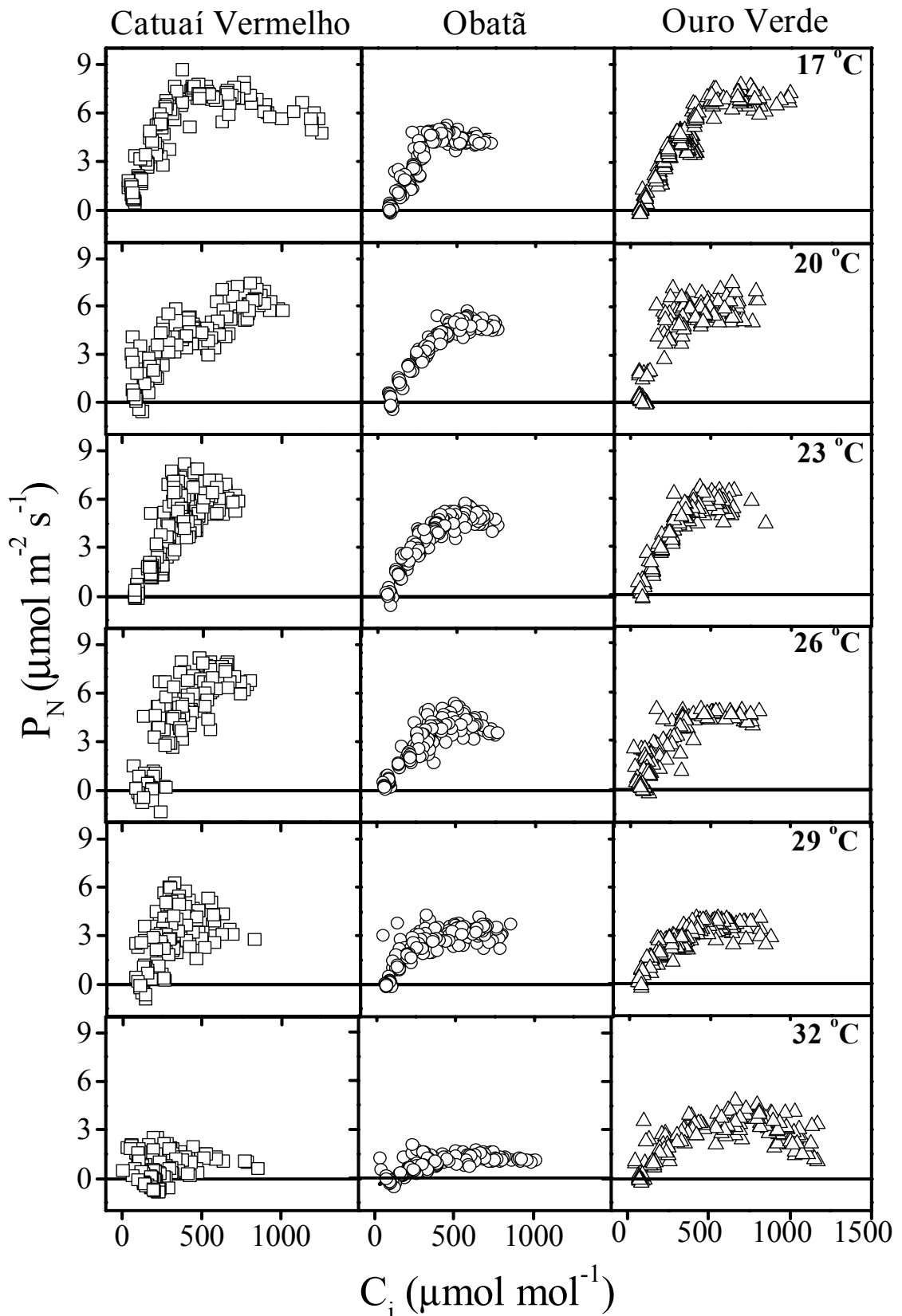


**Figure 5.** Stomatal conductance ( $g_s$ ), leaf transpiration ( $E$ ) and intercellular ( $C_i$ ) per external ( $C_e$ )  $\text{CO}_2$  concentration in leaves of *Coffea arabica*, cultivars Catuai Vermelho □, Obatã ○, and Ouro Verde △ under photosynthetic photon flux density higher than  $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and regular atmospheric  $\text{CO}_2$  concentration ( $355 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ) as a function of leaf temperature. Each symbol represents mean ( $32 < n < 43$ ) and bars the standard error.

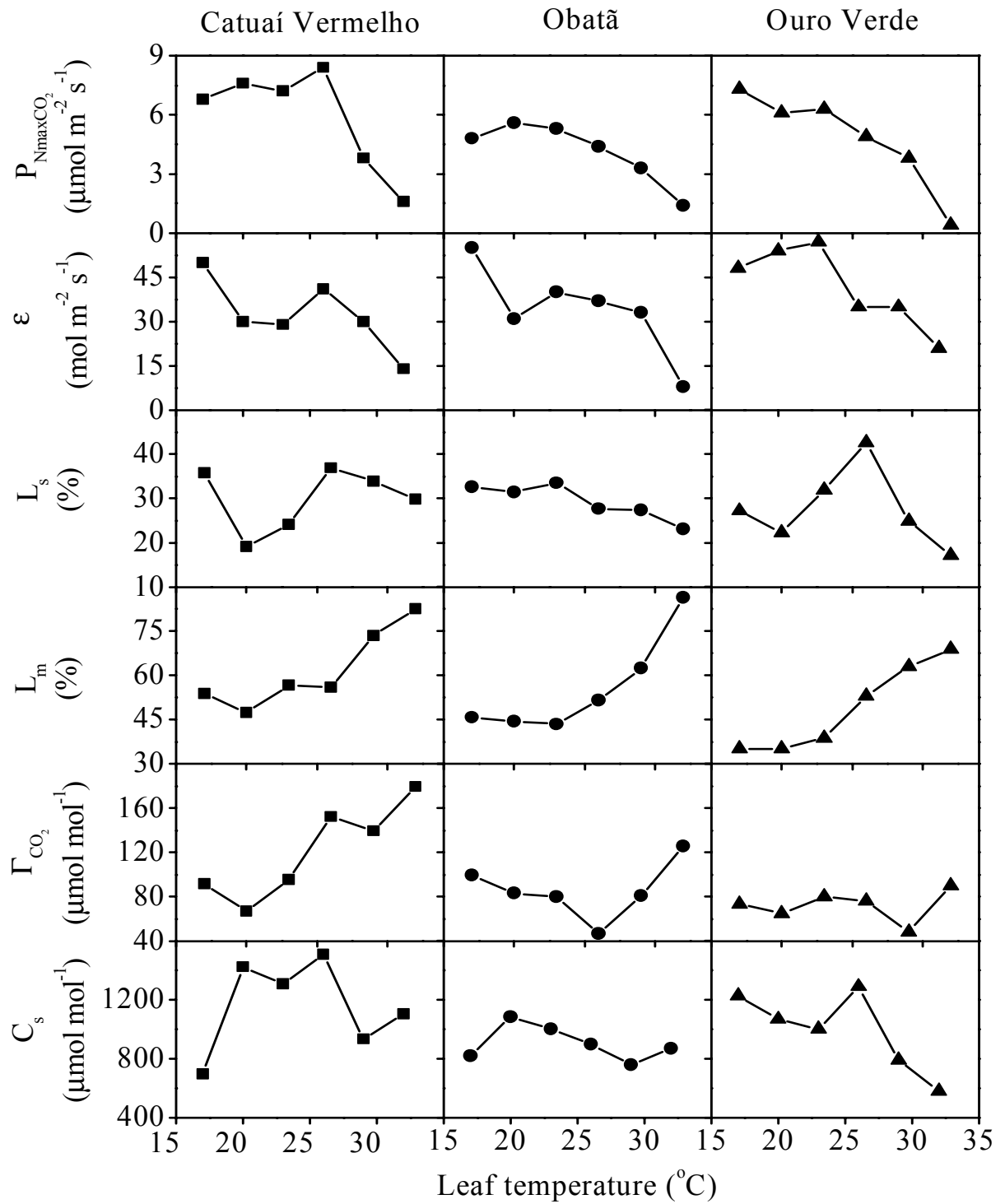


### **3.3. NET PHOTOSYNTHESIS ( $P_N$ ) AS A FUNCTION OF INTERCELLULAR $CO_2$ CONCENTRATION ( $C_i$ )**

Curves of  $P_N$  as a function of  $C_i$  under studied leaf temperatures are shown in Figure 6. Usually, maximum values of  $C_i$  were lower in more favorable temperature for  $CO_2$  assimilation (20-26°C) than in extreme (17 and 29-32°C) leaf temperatures. Photosynthetic capacity ( $P_{N_{maxCO_2}}$ ) decreased steeply in all cultivars under temperatures greater than 26°C (Figures 5 and 6). It was not obtained higher values of  $P_N$  under PPFD and  $CO_2$  saturation ( $P_{N_{maxCO_2}}$ ) in relation to those maximum values of  $P_N$  ( $P_{N_{max}}$ ) found under PPFD saturation (Figure 3). Optimum temperature for  $P_{N_{max}}$  shifted only in Catuaí Vermelho, from 20 (Figure 3) to 26°C (Figure 7). Catuaí Vermelho was able to maintain high values of  $P_{N_{maxCO_2}}$  under reduced (17-23°C) and at 26°C temperatures.  $P_{N_{max}}$  and  $P_{N_{maxCO_2}}$  showed similar behavior as a function of leaf temperature in Obatã and Ouro Verde cultivars (Figures 3 and 5). However, Ouro Verde presented the highest  $P_{N_{maxCO_2}}$  at 17°C and the lowest  $P_{N_{maxCO_2}}$  at 32°C among cultivars (Figure 7).



**Figure 6.** Net photosynthesis ( $P_N$ ) under saturated photosynthetic photon flux density ( $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) as a function of intercellular ( $C_i$ )  $\text{CO}_2$  concentration, on leaves of *Coffea arabica* cultivars (Catuaí Vermelho  $\square, \blacksquare$ ; Obatã  $\circ, \bullet$ ; and Ouro Verde  $\Delta, \blacktriangle$ ) after 14 hours under 17 (top panels), 20, 23, 26, 29, and 32°C (subsequent panels).



**Figure 7.** Photosynthetic capacity ( $P_{NmaxCO_2}$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), apparent carboxylation efficiency ( $\epsilon$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), stomatal ( $L_s$ , %) and mesophyll ( $L_m$ , %) limitations of photosynthesis,  $\text{CO}_2$  compensation point ( $\Gamma_{\text{CO}_2}$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), and  $\text{CO}_2$  saturation point ( $C_s$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) on leaves of *Coffea arabica*, cultivars Catuaí Vermelho (■), Obatã (●), and Ouro Verde (▲) after 14 hours under 17, 20, 23, 26, 29, and 32°C.

Carboxylation efficiency ( $\epsilon$ ) peaked two times in Catuaí Vermelho and Obatã (Figure 7), but in Ouro Verde there was only one peak of  $\epsilon$  (at 23°C). The behavior of  $\epsilon$  along leaf temperatures changed gradually from two peaks to a shaped dome curve in Ouro Verde (Figure 7). Ouro Verde was a unique cultivar that presented increasing values of  $\epsilon$  from 17 to 23°C. In this temperature interval, Ouro Verde had the lowest values of  $L_m$  and  $\Gamma_{CO_2}$ , and increasing values of  $C_s$  (Figure 7). In all cultivars,  $L_m$  was maintained nearly constant under reduced temperatures (17-23°C) but increased steeply under elevated (26-32°C) temperatures.

From 17 to 23°C  $L_s$  and  $L_m$  had similar behavior in all cultivars, but in elevated temperatures (26-32°C)  $L_s$  decreased and  $L_m$  increased with leaf temperature.  $L_s$  showed greater variation than  $L_m$  in reduced temperature in Catuaí Vermelho and Ouro Verde, but in elevated temperature  $L_m$  presented higher variation than  $L_s$  in Catuaí Vermelho and Obatã. Contrastingly, Ouro Verde had a precipitous slope of  $L_s$  but gradual increasing of  $L_m$  in elevated temperatures. There was a trend of  $C_s$  decreasing in elevated temperatures, but in Ouro Verde it was steeper than in Catuaí Vermelho and Obatã. Ouro Verde was the sole cultivar that presented continuous decreasing values of  $C_s$  between 17-23°C.  $C_s$  values at favorable temperatures (17-23°C) for high  $P_{N_{maxCO_2}}$  varied from 800 to 1000  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  in Obatã and Ouro Verde cultivars, but in Catuaí Vermelho the range was broader (700 and 1500  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ).

#### **3.4. NETWORK CONNECTANCE AND PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS**

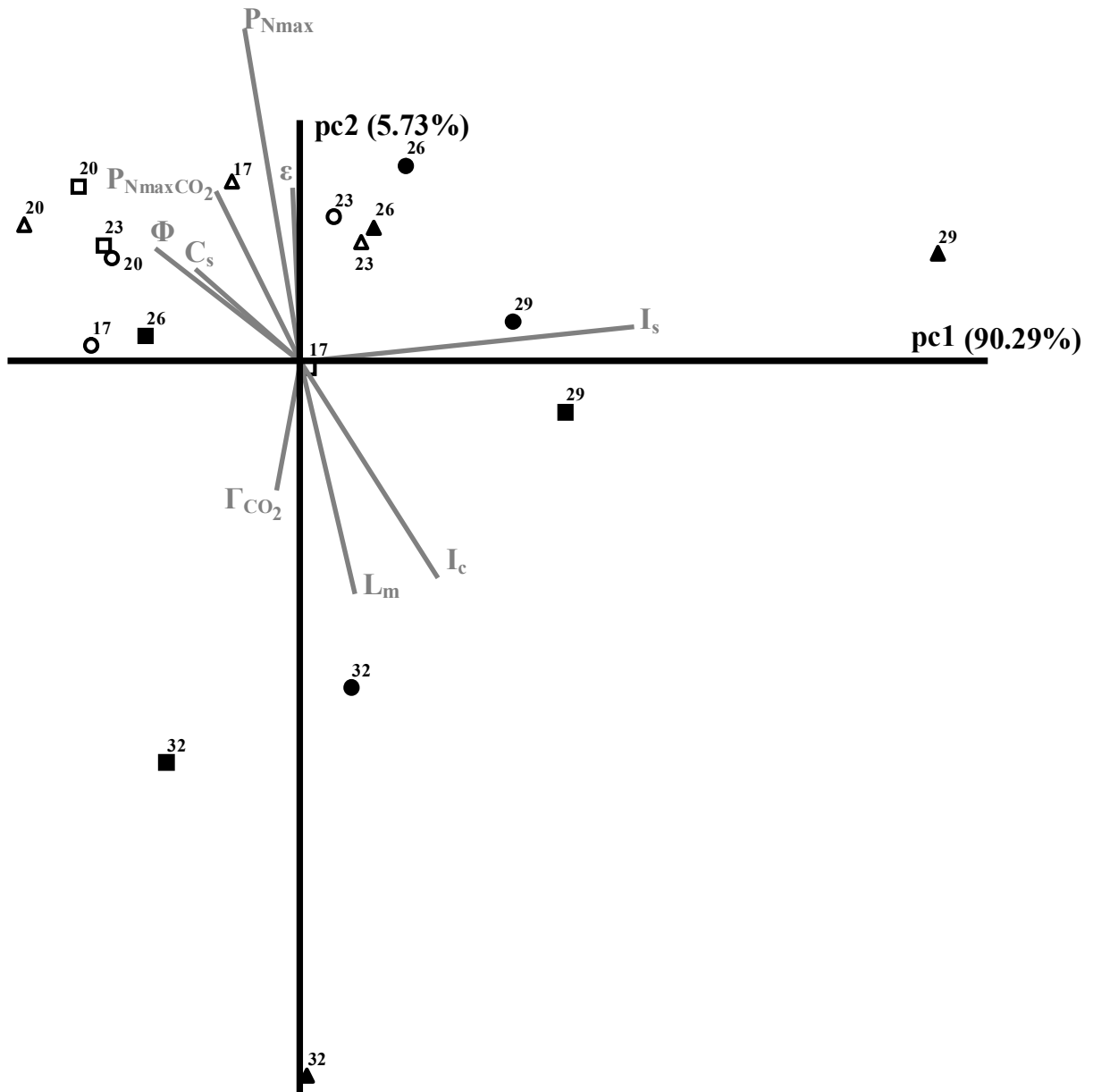
Table 1 shows the values for  $C_{g_w}$ ,  $C_{g_{PPFD}}$ , and  $C_{g_{CO_2}}$  at reduced (17-23°C) and at elevated temperatures (26-32°C).  $C_{g_w}$  was higher in elevated temperatures (26-32°C) for all cultivars (Table 1). Under reduced temperatures (17-23°C)  $C_{g_w}$  dropped for all cultivars.  $C_{g_w}$  variation as a function of temperature indicates a clear network modulation. Ouro Verde cultivar presented the most conservative behavior, showing similar  $C_{g_w}$  values irrespective to leaf temperature variation (difference between  $C_{g_w}$  values was 0.30, Table 1). Catuaí

Vermelho was the cultivar that presented larger network modulation (difference between  $C_{g_w}$  values was 0.73, Table 1) and Obatã had an intermediary behavior (difference between  $C_{g_w}$  values was 0.54, Table 1).  $C_{g_{PPFD}}$  for Catuaí Vermelho and Obatã presented larger difference between reduced and elevated temperatures than  $C_{g_{CO_2}}$ . On the other hand, in Ouro Verde,  $C_{g_{CO_2}}$  showed larger difference than  $C_{g_{PPFD}}$  between reduced and elevated temperatures (Table 1).

**Table 1.** Global connectance values of the whole network ( $C_{g_w}$ ), of sub-network built with data from  $P_N$ -PPFD curves ( $C_{g_{PPFD}}$ ), and sub-network built with data from  $P_N$ - $C_i$  curves ( $C_{g_{CO_2}}$ ) for *Coffea arabica* L. cultivars Catuaí Vermelho, Obatã, and Ouro Verde, at reduced (17-23°C) and elevated (26-32°C) temperatures. Numbers in parenthesis denote the difference between reduced and elevated temperatures.

	Catuaí Vermelho		Obatã		Ouro Verde	
	17-23°C	26-32°C	17-23°C	26-32°C	17-23°C	26-32°C
$C_{g_{PPFD}}$	1.10	2.19 (1.09)	1.22	2.08 (0.86)	0.88	0.98 (0.10)
$C_{g_{CO_2}}$	1.00	1.28 (0.28)	1.52	1.66 (0.14)	1.46	2.00 (0.54)
$C_{g_w}$	1.06	1.79 (0.73)	1.35	1.89 (0.54)	1.14	1.44 (0.30)

Figure 8 shows the results of PCA taking in account all physiological variables ( $\epsilon$ ,  $\Phi$ ,  $I_s$ ,  $I_c$ ,  $L_m$ ,  $P_{Nmax}$ ,  $P_{NmaxCO_2}$ ,  $\Gamma_{CO_2}$ ,  $C_s$ ) determined along distinct temperatures in  $P_N$ -PPFD and  $P_N$ - $C_i$  curves in all cultivars. It was observed an unmistakable ordination pattern between reduced and elevated temperatures, indicating different behaviors in each temperature range. Symbols representing reduced temperatures (17-23°C) are grouped and those representing elevated temperatures (29-32°C) are much more dispersed. Indeed, symbols denoting 26°C are in between elevated and reduced temperatures. Therefore, taking in account all parameters together, there was lower variation in physiological behavior of all cultivars under 17-23°C than under 26-32°C. The first principal component (pc1) accounted for about 90% of the total variation highlighting a contrast between variables associated with high  $L_m$ ,  $I_c$ ,  $I_s$  and high  $\Phi$ ,  $P_{Nmax}$ ,  $P_{NmaxCO_2}$ ,  $C_s$  (Figure 8). pc2 accounted for about 5% of total variation indicating a contrast between variables associated with high  $\epsilon$  and high  $\Gamma_{CO_2}$ .



**Figure 8.** Principal component analyses of leaf gas exchange obtained under elevated (solid symbols) and reduced (open symbols) temperatures in three *Coffea arabica* cultivars (Catuai Vermelho □, ■; Obatã, ○, ●; and Ouro Verde Δ, ▲). Temperatures are indicated above each symbol. Vectors (grey lines) represent main physiological variables influencing symbols distribution.  $P_{Nmax}$  = maximum net photosynthesis,  $P_{NmaxCO_2}$  = photosynthetic capacity,  $\epsilon$  = apparent carboxylation efficiency,  $L_m$  = mesophyll limitation of net photosynthesis,  $\Phi$  = apparent quantum efficiency,  $I_s$  = light saturation point,  $I_c$  = light compensation point,  $C_s$  =  $CO_2$  saturation point, and  $\Gamma_{CO_2}$  =  $CO_2$  compensation point.



#### 4. DISCUSSION

The range of temperature obtained of optimum net photosynthesis (17-20°C) was inferior to that found for tropical trees species (25-30°C, Larcher, 2003). Values of  $I_c$  acquired under 17-20°C are between those found in sun leaves of evergreen and deciduous tree species (Larcher, 2003). Contrastingly, the values of  $I_s$  found under 17-20°C were lower than those established for sun leaves of deciduous and evergreen trees (Larcher, 2003), but they are in agreement with those recorded by Kumar and Tiezen (1980) and by Fahl *et al.* (1994) for sun leaves of *C. arabica* at leaf temperature between 25-27°C.  $R_d$  values at the studied temperature range (17-32°C) are among the  $R_d$  values for deciduous trees species, higher than those of tropical forest species, and  $R_d$  in Catuaí Vermelho and Obatã are similar to those of evergreen tree species (Larcher, 2003).

$R_d$ ,  $I_c$ , and  $I_s$  values of the coffee trees studied here are between deciduous and evergreen species. These values reflect the plasticity of the coffee leaf phenology, in other words, the capacity of potential adaptation that coffee presents to environmental conditions that require loss of leaves (e.g., dry season on interior of São Paulo, varying its intensity along the years, or foliage persistence where there is irrigation).

$P_N$  saturation as of  $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$  of  $\text{CO}_2$  obtained under favorable conditions (17-23°C) agrees with values of  $\text{C}_3$  plants reported by several authors (Lambers *et al.* 1998; Taiz and Zeiger 1998; Larcher, 2003).  $\Gamma_{\text{CO}_2}$  in reduced temperatures varied like  $\text{C}_3$  plants under favorable conditions (Lambers *et al.*, 1998; Taiz and Zeiger, 1998) and where above to that obtained for Catuaí cultivar under 20°C and  $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of PPFD (Sondahl *et al.*, 1976). Regarding to  $\Gamma_{\text{CO}_2}$ , there was a clear decreasing gradient from Catuaí Vermelho to Ouro Verde cultivars between 29-32°C.

Maximum values of  $P_N$  acquired in the present work are in agreement with those found in literature. The range from 7.1 to  $8.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for maximum values of  $P_N$  found is

lower than that obtained in tropical woody crop plants (Larcher, 2003). Praxedes *et al.* (2006) working with four adult clones of robusta coffee (*Coffea canephora* var. kouillou) obtained similar maximum values of  $P_N$  in control plants in laboratory. Meinzer *et al.* (1990) and Gómez *et al.* (2005) working with 6-months-old *C. arabica* cultivars (as in the present work) in field conditions also obtained maximum values of  $P_N$  similar to those found in this work. At the beginning of the day, Ronquim *et al.* (2006) also acquired similar maximum values for  $P_N$  in a clear day, for Catuaí Vermelho and Obatã cultivars. However, because they worked with adult coffee plants in field, on cloudy day (most favorable condition) the maximum value of  $P_N$  at the beginning of the day was higher than that obtained on the present study (Ronquim *et al.*, 2006). Konrad *et al.* (2005), found lower maximum values of  $P_N$  than those obtained here for Catuaí and higher maximum values of  $P_N$  for Obatã (Figure 2). Probably because they work with younger coffee plants (3-month-old) in a controlled situation (plants in containers) their results differ from ours.

Increasing  $ETR_{max}$  and decreasing  $P_{Nmax}$  between 20-26°C in all cultivars indicate that electrons from PSII were driven to non-photochemical quenching (Figure 3). Therefore, a clear excess of electron happened since 23°C uncoupling photochemical from biochemical photosynthetic processes. Thermal dissipation and inducible xanthophyll cycle mechanisms should be involved for eliminating excess of energy in the chlorophyll-containing light harvesting complexes, especially between 20-26°C. Oxygen-dependent electron-transport processes such as the production of reactive oxygen species and photorespiration are not excluded as quencher of electrons in excess (Niyogi, 2000). Highly reactive chemical entities like  $O_2^-$ ,  $^1O_2^*$ ,  $H_2O_2$ ,  $^3Chl^*$ , and  $-OH$ , formed by excess of electrons, especially between 20-26°C, may cause damage by means of lipid peroxidation, protein (D1) and pigment (P680) degradation, reduction of ferredoxin acceptor in PSI, and enzyme inactivation (Asada, 1994; Taiz and Zeiger, 1998; Niyogi, 1999). Some consequences of these damages are the impaired membrane functionality, lower ability of photon-use, and enhanced photoproduction of

reactive molecules aforementioned (Asada, 1994).

As a consequence,  $\Phi$  decreased and  $I_c$  and  $I_s$  increased right when  $P_{N_{max}}$  and  $ETR_{max}$  showed opposite behavior along temperatures (Figure 3). Likely, a variety of scavenging systems (superoxide dismutase, carotenoids, ascorbate, peroxidase) were not able to eliminate the reactive products formed by means of excess of electrons. Repair system probably was activated against injuries provoked by excess of electrons as of 17°C for 14 hours of exposition increasing dark respiration ( $R_d$ ) up to 26°C in all cultivars. Unfavorable conditions for  $P_N$  by increasing temperatures were more pronounced in Ouro Verde cultivar, which showed  $P_{N_{max}}$  decreasing since 17°C, steeper increasing of  $I_c$  and  $I_s$  up to 32°C, higher values of  $R_d$  between 17-32°C, and higher values of  $ETR_{max}$  between 17-26°C than Catuaí Vermelho and Obatã cultivars. Accentuate decrease of  $R_d$  at 32°C indicates a strong impact of high temperatures on mitochondrial respiration apparatus.

Because of opposite behavior between  $P_{N_{max}}$  and  $ETR_{max}$  under reduced temperature (17-26°C) and continuous decreasing of  $P_{N_{max}}$  as of 20°C, the decreasing of  $ETR_{max}$  under elevated temperatures (26-32°C) was relatively lower than that found about  $P_{N_{max}}$ . Therefore, the excess of electrons continued under elevated temperatures. Under 32°C, the ratio  $ETR_{max}/P_{N_{max}}$  was greater than that obtained at 17°C (Figure 4). In Ouro Verde,  $P_{N_{max}}$  near zero, slight decreasing of  $I_c$ , and abrupt drop of  $R_d$ ,  $P_{N_{max}}$  and  $I_s$  under extreme temperature (32°C) indicated that membrane and enzyme systems were going to total disruption. In other cultivars, the increasing of temperature from 29 to 32°C had lower impact than in Ouro Verde, but  $I_c$  increased sharply,  $I_s$  decreased and  $P_{N_{max}}$  presented strong lessening (Figure 3). Quick increment of  $L_m$  (Figure 7) in all cultivars at elevated temperature (26-32°C) is unmistakable evidence that biochemical apparatus of photosynthetic process was committed.

At reduced temperatures,  $P_{N_{max}}$  was almost constant, and when  $L_s$  dropped,  $L_m$  dropped too, so  $C_i/C_e$  remains constant.  $P_{N_{max}}$  was limited by both  $L_s$  and  $L_m$ . When  $C_i/C_e$  ratio stays constant with increase in temperature and atmospheric  $CO_2$  concentration (Figure

5), there is a simultaneous adjustment of stomatal and mesophyll conductances (Morison and Lawlor, 1999). Under elevated temperature  $L_m$  increased and  $L_s$  dropped, but at these conditions,  $g_s$  was too low counterbalance the  $CO_2$  incoming in sub-stomatal chamber maintaining  $C_i$  at same concentration.

Irrespective leaf temperature, the  $C_i/C_e$  values obtained are lower than that 0.7 usually found in  $C_3$  plants (Caemmerer and Farquhar, 1981; Lambers, 1998). Besides, maximum values of  $g_s$  (around  $0.10 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) could be considered low because of they are similar to that obtained in woody plants of humid tropics in understorey, and lower than forest trees, woody species of semiarid tropics, woody evergreen broadleaved and sclerophyllous species or deciduous trees and shrubs of the temperate zone (Larcher, 2003). Minimum  $g_s$  on  $32^\circ\text{C}$  (around  $0.010 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) is low as maximum cuticular conductance of crops or many trees (Nobel, 1991; Larcher, 2003). On  $32^\circ\text{C}$  leaf transpiration was very low ( $0.35 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), which percentage corresponds to 35% of maximum transpiration (around  $1.0 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , Figure 5). Maximum transpiration obtained was also low in comparison to trees of rainforest, cloud forest, palms, shade or light adapted leaves of deciduous in temperate zone, or evergreen coniferous (Larcher, 2003). Maximum values of  $E$  and  $g_s$  founded on literature corroborates with the results obtained here. Praxedes *et al.* (2006), working with four adult clones of robusta coffee (*Coffea canephora* var. kouillou), obtained  $g_s$  values 2.5 times higher than  $g_s$  values for *C. arabica* obtained on this study (Figure 5). This happened because robusta coffee presents transpiration ( $E$ ) more elevated than *C. arabica* and its root system is more developed. Gómez *et al.* (2005), working with 6-months-old *C. arabica*, founded  $g_s$  and  $E$  values similar to those maximum values founded here (Figure 5). Meinzer *et al.* (1990), also obtained similar  $E$  and  $g_s$  values for 6-months-old *C. arabica* cultivars in field conditions. Konrad *et al.* (2005), working with 3-month-old *C. arabica* cultivars, obtained lower  $g_s$  value and higher  $E$  value for Catuaí Vermelho and similar  $g_s$  value and higher  $E$  value for Obatã (Figure 5). This happened because Konrad *et al.* (2005) used younger plants in a controlled

situation (plants in containers), resulting in less gas exchanges. At the beginning of the day, Ronquim *et al.* (2006) obtained similar values for  $g_s$  and  $E$  in a cloudy day, for Catuaí Vermelho and Obatã cultivars. However, on clear day the value of  $g_s$  at the beginning of the day was lower than  $g_s$  obtained on this study and the leaf transpiration was similar to  $E$  obtained here (Ronquim *et al.*, 2006).

$L_m$  behavior also can be explained by Rubisco activity. At high temperatures (above 35°C) Rubisco deactivates (Sharkey, 2005), because its affinity to  $O_2$  increases and, consequently, Rubisco carboxylase activity decreases. Thus, at 32°C for 14 hours of exposition, negative effect of leaf heating on  $P_{Nmax}$  results in occurrence of several factors acting together, decreasing of  $\Phi$ ,  $\epsilon$ , and increase on  $L_m$ .

Because thylakoid membranes are especially sensitive to heat, disturbances in photosynthesis are among the first indicators of stress. Coffee photosynthesis is particularly sensitive to temperatures above 20-25°C (Kumar and Tieszen, 1980). At temperatures above 26°C there is a strong thermal effect on  $P_N$ , which was related to stomatal closure and/or mesophyll impairments, the latter being progressively increased at this temperature (Nunes *et al.*, 1973; Kumar and Tieszen, 1980).

High temperatures limit  $P_N$  altering the amount and activity of Rubisco, and modifying enzyme specificity in relation to its substrate (Jordan and Ögren, 1984). High  $CO_2$  concentrations did not affect  $P_{Nmax}$  (Figure 6) indicating that increase on  $C_i$  does not increase  $\Phi$  and  $\epsilon$  values (Morison and Lawlor, 1999; Zhang *et al.* 2003). *Triticum aestivum* present only 10% of  $P_{Nmax}$  augment at the double regular  $C_i$ . After the rise of 4°C on ambient temperature *T. aestivum* dropped photosynthetic capacity and the carboxylation efficiency (Delgado *et al.* 1994). Besides, *Vigna unguiculata* did not present increments on net carbon assimilation or any other direct benefit from  $CO_2$  concentration supplement and its interaction with temperature (Ahmed *et al.* 1993).

The amount of activated Rubisco on coffee tree may be strongly limited, kept under

minimal concentration in relation to available CO<sub>2</sub> to carboxylation. On coffee tree probably exists Rubisco storage (inactivated Rubisco) as predicted by Warren and Adams (2004) in evergreen plants. With minimal of activated Rubisco amount there is not momentary increase of P<sub>Nmax</sub> under transient CO<sub>2</sub> increasing. The advantage of this mechanism is enlarging N storage on Rubisco form, which could be used in maintenance and defense, or keeping L<sub>m</sub> constant under moderate thermal stress (17-26°C). This should be related to success of heavy nitrogen fertilization (on soil or on canopy) in coffee plantation, increasing grain production, decreasing photoinhibition (Carelli, 2006), holding the foliage during dry season and ultimately increasing the tolerance to water and thermal stresses.

According to Warren and Adams (2004), some evergreen trees contain more Rubisco than required to support photosynthesis activity. It would be a manner to accumulate nitrogen without adverse osmotic or toxic effects in evergreen foliage. This assimilated nitrogen could be utilized for herbivore deterrence (e.g. nitrogen compounds of defense), growth, and photosynthesis under stress condition. If plant is able to activate Rubisco on time, it counterbalances sub optimal conditions (Warren and Adams, 2004). Rubisco activity is strongly correlated to  $\epsilon$  (Caemmerer, 2000). It is possible to note that Catuaí Vermelho and Obatã presented picks of  $\epsilon$  at 17°C (both cultivars), 26 (Catuaí Vermelho) and 23°C (Obatã). Probably, after 17°C, a pool of Rubisco is activated and  $\epsilon$  presents another increase until reach the second pick (Figure 7).

According to the results of the present study, when C<sub>g\_w</sub> varied broadly the picks of  $\epsilon$  were more distant each other. C<sub>g\_w</sub> values for Catuaí Vermelho and Obatã cultivars follow this pattern of C<sub>g\_w</sub> and  $\epsilon$ : Catuaí Vermelho presented the highest modulation of network (C<sub>g\_w</sub> values between reduced and elevated temperatures presented more variation) and the picks of  $\epsilon$  were more distant each other; Obatã presented low network modulation than Catuaí Vermelho, and the picks of  $\epsilon$  were more close. Also, C<sub>g<sub>PPFD</sub></sub> of these two cultivars presented more variation than C<sub>g<sub>CO<sub>2</sub></sub></sub>, indicating that the network with variables obtained from P<sub>N</sub>-PPFD

curves is more responsible for this modulation. Ouro Verde cultivar also followed this pattern of  $C_{g_w}$  and  $\epsilon$ , but peaks of  $\epsilon$  took place earlier, at 17 and 23°C (Figure 7) and Rubisco is early activated. If all Rubisco are activated between 17-23°C it should be more difficult to modulate the network depicted on Figure 1 under higher temperature. Being like this, Ouro Verde cultivar presented the most conservative behavior, since  $C_{g_w}$  values changed just a little between reduced and elevated temperatures. As  $C_{g_{CO_2}}$  of this cultivar presented more variation than  $C_{g_{PPFD}}$ , the network with variables obtained from  $P_N-CO_2$  curves is more responsible for this modulation.

In all cultivars, when all Rubisco is on activate form, and temperature continues to increase since 26°C, the heat stress could provoke deactivation of Rubisco again (Sharkey, 2005). Under this condition, Rubisco oxygenase activity increase by reason of higher  $O_2$  solubility (Jordan and Ögren, 1984), or whole leaf system breaks down decreasing  $\epsilon$  steeper. In spite of  $\epsilon$  been so important to explain Rubisco activity and other behaviors of the cultivars, in PCA (Figure 8),  $\epsilon$ -vector had insignificant projection on pc1 and stays between the temperature groups. It happens because  $\epsilon$  decreases variation of variables and works as the support point between the left and the right smaller networks of Figure 1, keeping the whole leaf network working as efficient as possible.

Yet in PCA (Figure 8), the two groups of temperature indicate and confirm the gradient of behaviors ( $C_{g_w}$ ). In other words: one group reflects the cultivars behaviors at elevated temperature range (26-32°C) where cultivars presented high  $C_{g_w}$  (network more connected), with the temperature of 26°C occupying an intermediary position between the groups indicating an intermediary behavior; and another group reflects the cultivars behaviors at reduced temperature range (17-23°C) where cultivars presented reduced  $C_{g_w}$  (network less connected). On PCA, the cultivars at 17-23°C appears more grouped than the cultivars at 26-32°C. It means that at 17-23°C, the cultivars presented less variation of responses to temperature changes. At 26-32°C, when there is thermal stress, the cultivars presented

different kinds of physiological responses to stress.

*C. arabica* cultivars present higher carbon fixation between 17-23°C, when apparent quantum efficiency is higher, electron transport rate is not excessive, negative components values of photosynthetic process are reduced, and biochemical and photochemical processes are in equilibrium. Saplings of *C. arabica* cultivars studied did not present increase of net assimilation under 1200  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  CO<sub>2</sub> concentration. Photosynthetic process is inhibited at leaf temperature of 32°C with exposition period of 14 hours in 355 or 1200  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  CO<sub>2</sub> concentrations, resulting in decrease of carboxylation efficiency and increase of mesophyll limitation to photosynthesis. Responses to temperature stress presented less variation in 17 to 23°C. Physiological network is tightly adjusted at elevated temperatures (higher C<sub>g,w</sub>).



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (REFERENCES)

- Ahmed FE, Hall AE, Madore MA (1993). *Interactive effect of high temperature and elevated carbon dioxide concentration on cowpea [Vigna unguiculata (L.) Walp.]*. **Plant, Cell and Environment**, 16: 835-842.
- Amzallag GN (2001). *Data analysis in plant physiology: are we missing the reality?* **Plant Cell and Environment**, 24: 881-890.
- Asada K (1994). Mechanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress. In: Baker NR and Bowyer JR (eds.). *Photoinhibition of photosynthesis – From molecular mechanisms to the field*. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, England. 129-142.
- Barabási AL (2005). *Network Theory – the emergence of the creative enterprise*. **Science**, 308: 639-64.
- Barros RS, Mota JW, DaMatta F, Maestri M (1997). *Decline of vegetative growth in Coffea arabica L. in relation to leaf temperature, water potential and stomatal conductance*. **Field Crop Research**, 54: 65-72.
- Bauer H, Wierer R, Hatheway WH, Larcher W (1985). *Photosynthesis of Coffea arabica after chilling*. **Physiologia Plantarum**, 64: 449-454.
- Caemmerer S, Farquhar, GD (1981). *Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves*. **Planta**, 153: 376-387.
- Caemmerer S. 2000. *Biochemical models of leaf photosynthesis*. CSIRO Publishing, Victoria, Australia. 165pp.
- Camargo AP (1985). *O clima e a cafeicultura no Brasil*. **Informe Agropecuário**, 11: 13-26.
- Carelli MLC (2006). Metabolismo do nitrogênio no cafeeiro. In: Prado CHBA, Casali CA. *Fisiologia Vegetal*. **Manole**, Barueri, São Paulo. 379-396.
- Carvalho LM, Silva EAM, Mosquin PR, Azevedo AA, Cecon PR (1998). *Alterações morfológicas em cafeeiros submetidos a baixas temperaturas*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 10: 131-136.
- DaMatta FM, Maestri M, Mosquin PR, Barros RS (1997). *Photosynthesis in coffee (Coffea arabica and C. canephora) as affected by winter and summer conditions*. **Plant Science**, 128: 43-50.
- DaMatta FM (2004). *Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review*. **Field Crops Research**, 86: 99-114.
- DaMatta FM, Ramalho JDC (2006). *Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 18: 55-81.
- Delgado E, Mitchell RAC, Parry MAJ, Driscoll SP, Mitchell VJ, Lawlor DW (1994).

- Interacting effects of CO<sub>2</sub> concentration, temperature and nitrogen supply on the photosynthesis and composition of winter wheat leaves.* **Plant, Cell and Environment**, 17: 1205-1213.
- Fahl JI, Carelli MLC, Veja J, Magalhães AC (1994). *Nitrogen and irradiance levels affecting net photosynthesis and growth of young coffee plants (Coffea arabica L.).* **Journal of Agriculture Science**, 69: 161-169.
- Franco CM (1958). *Influence of temperature on growth of coffee plant.* **IBEC Research Institute**, New York. Bulletin No. 16.
- Genty B, Briantais JV, Baker NR (1989). *The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence.* **Biochimica Biophysica Acta**, 990: 87-92.
- Gómez, LF, López, JC, Riaño, NM, López, Y, and Montoya, EC (2005). *Diurnal changes in leaf gas exchange and validation of a mathematical model for coffee (Coffea arabica L.) canopy photosynthesis.* **Photosynthetica**, 43(4): 575-582.
- Jordan DB, Ögren WL (1984). *The CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase.* **Planta**, 161: 308-313.
- Konrad MLF, Silva JAB, Furlani PR, Machado EC (2005). *Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio.* **Bragantia**, 64(3): 339-347.
- Kumar D, Tieszen LL (1980). *Photosynthesis in Coffea arabica L.: Effects of light and temperature.* **Experimental Agriculture**, 16: 13-19.
- Lambers H, Chapin II FS, Pons TL (1998). *Plant Physiological Ecology*, **Springer-Verlag**, New York.
- Larcher W. (2003). *Ecofisiologia Vegetal.* **Editora RiMa**, São Carlos, São Paulo.
- Meinzer FC, Grantz DA, Goldstein G, Saliendra NZ (1990). *Leaf water relations and maintenance of gas exchange in coffee cultivars grown in drying soil.* **Plant Physiology**, 94: 1781-1787.
- Monteiro JAF, Prado CHBA (2006). *Apparent carboxylation efficiency and relative stomatal and mesophyll limitations of photosynthesis in an evergreen cerrado species during water stress.* **Photosynthetica**, 44: 39-45.
- Morison JIL, Lawlor DW (1999). *Interactions between increasing CO<sub>2</sub> concentration and temperature on plant growth.* **Plant, Cell and Environment**, 22: 659-682.
- Niyogi KK (1999). *Photoprotection revisited: Genetics and molecular approaches.* **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 50: 333-359.
- Niyogi KK (2000). *Safety valves for photosynthesis.* **Current Opinion in Plant Biology** 3: 455-460.

- Nunes MA, Brumby D, Davies DD (1973). *Estudo comparativo do metabolismo fotossintético em folhas de cafeeiro, beterraba e cana-de-açúcar*. **Série Estudos Agronômicos**, Garcia de Orta, 1: 1-14.
- Oliveira JG, Alves PLCA, Magalhães AC (2002). *The effect of chilling on the photosynthetic activity in coffee (Coffea arabica L.) seedlings. The protective action of chloroplastid pigments*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 14: 95-104.
- Pastenes C, Horton P (1996). *Effect of high temperature on photosynthesis in beans*. **Plant Physiology**, 112: 1253-1260.
- Prado CHBA, Moraes JAPV (1997). *Photosynthetic capacity and specific leaf mass in twenty woody species of cerrado vegetation under field conditions*. **Photosynthetica**, 33: 103-112.
- Prado CHBA, Wenhui Z, Rojas MHC, Souza GM (2004). *Seasonal leaf gas exchange and water potencial in a woody cerrado species community*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 16(1): 7-16.
- Praxedes SC, DaMatta FM, Loureiro ME, Ferrão MAG, Cordeiro AT (2006). *Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (Coffea canephora Pierre var. kouillou) leaves*. **Environmental and Experimental Botany**, 56: 263–273.
- Salvucci ME, Crafts-Brandner S (2004). *Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis*. **Physiologia Plantarum** 120: 179-186.
- Sharkey TD (2005). *Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, Rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance providede by isoprene*. **Plant, Cell and Environment**, 28: 269-277.
- Sondahl MRI, Crocomo OJ, Sodek L (1976), *Measurement of <sup>14</sup>C incorporation by illuminated intact leaves of coffee plants from gas mixtures containing <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>*. **Journal of Experimental Botany**, 27: 1187-1195.
- Souza GM, Aidar ST, Oliveira RF (2004). *Developmental stability and network connectance in common bean genotypes under water deficit*. **Israel Journal of Plant Sciences**, 52: 205-212.
- Taiz L, Zeiger E (1998). *Plant Physiology*. **Sinauer Associates**, Sunderland.
- Tezara W, Mitchell V, Driscoli SP, Lawlor DW (2002). *Effects of water deficit and its interaction with CO<sub>2</sub> supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower*. **Journal of Experimental Botany**, 53: 1781-1791.
- Warren CR, Adams MA (2004). *Evergreen trees do not maximize instantaneous photosynthesis*. **Trends in Plant Science**, 9(6): 270-274.
- Wise RR, Olson AJ, Schrader SM, Sharkey TD (2004). *Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature*. **Plant, Cell and Environment**, 27: 717-724.

## CONCLUSÕES

A conectância global da rede não mudou ou mudou de acordo com o cultivar, tratamento de enxertia, condições diárias ou temperatura. Isso indica que a força de conexão entre as variáveis fisiológicas foliares pode diminuir do dia nublado para o claro e de temperaturas reduzidas para elevadas, impedindo a propagação do colapso na rede, ou pode aumentar tornando a rede fisiológica mais responsiva.

No primeiro estudo, esse tipo de plasticidade é importante para modular as trocas gasosas foliares, levando em conta a parte aérea (cultivar) e a raiz (enxertia ou não) de *C. arabica*. A análise de conectância da rede e a PCA indicaram, respectivamente, que a diminuição da fotossíntese líquida foi acompanhada por baixa autonomia da planta e baixa variação nas variáveis fisiológicas medidas no dia claro. Nessa espécie, a relação entre a rede fisiológica e o ambiente (através da autonomia) foi mais clara e direta que o grau de conectância entre as variáveis fisiológicas. Portanto, as variáveis meteorológicas e sua relação com as variáveis fisiológicas foliares no cultivares de *C. arabica* são a peça-chave que guia o balanço hídrico e de carbono na estação de crescimento úmida.

No segundo estudo, os cultivares de *C. arabica* apresentaram maior fixação de carbono entre 17 e 23°C, quando a eficiência quântica aparente é maior, a taxa de transporte de elétrons não é excessiva, os componentes de valor negativo do processo fotossintético são reduzidos e os processos bioquímicos e fotoquímicos estão em equilíbrio. Os cultivares jovens de *C. arabica* estudados são extremamente inibidos em temperaturas foliares de 32°C em concentrações de CO<sub>2</sub> de 355 ou 1200  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , resultando na diminuição da eficiência de carboxilação e no aumento da limitação mesofílica da fotossíntese. A PCA mostrou que, nas temperaturas reduzidas (17-23°) mesmo próximas à temperatura ótima (em torno de 25°C), os cultivares se comportaram de forma semelhante. No entanto, quando as temperaturas estão elevadas, os cultivares exibem comportamentos diferentes para se adaptarem ao estresse

térmico. A rede da fotossíntese está ajustada fortemente nas temperaturas elevadas. Os cultivares tentam ajustar suas redes e, de diferentes maneiras, buscam respostas para superar a situação de estresse térmico nas temperaturas elevadas.

Quando enxertado, Catuaí Vermelho apresenta ajustes finos na sua rede da fotossíntese em relação às mudanças ambientais, resultando em um aumento na sua taxa diária fotossíntese líquida no dia claro. Esse cultivar apresenta um comportamento fisiológico mais harmônico, com uma rede que modula permitindo dois momentos distintos para a ativação da Rubisco. Esse cultivar é beneficiado pela ativação do segundo reservatório de Rubisco em temperaturas maiores, apresentando respostas mais regulares nessas temperaturas.

Obatã modifica seu comportamento com a enxertia, apresentando um comportamento mais conservativo com uma rede mais estática com relação às mudanças ambientais. O ambiente influencia negativamente esse cultivar no dia claro, reduzindo sua taxa diária de fotossíntese líquida. O comportamento fisiológico desse cultivar é intermediário entre Catuaí Vermelho e Ouro Verde, como revelado pelo estudo realizado com diferentes temperaturas.

Ouro Verde apresenta um comportamento fisiológico mais instável. Todos os reservatórios de Rubisco são ativados em temperaturas reduzidas tornando mais difícil de modular sua rede sob temperaturas mais elevadas. Isso resulta em maior variação das respostas fisiológicas em temperaturas elevadas, tentando alcançar maior tolerância a essa condição estressante.

Icatu Amarelo foi prejudicado com a enxertia, com uma rede que não varia seu comportamento, resultando em menos tolerância a condições ambientais estressantes (dia claro).

A análise de redes e a PCA em *C. arabica* foram apropriadas para discriminar o impacto de fatores de estresse e as respostas de cada cultivar a mudanças ambientais, revelando a modulação da rede que está por trás das relações entre planta e ambiente.

## CONCLUSIONS

Global network connectance did not change or changed according to cultivar, graft treatment, day condition or temperature. It indicates that the force of connection among leaf physiological variables could decrease from cloudy to clear day and from reduced to elevated temperatures avoiding break down propagation, or it could increase becoming physiological network more responsive.

In the first study, this kind of plasticity is important to modulate leaf gas exchange, taking in account the shoot (cultivar) and root (grafted or non-grafted) traits of *C. arabica*. Network connectance analysis and PCA indicated, respectively, that decreasing of net photosynthesis was accompanied by low plant autonomy and low variation of leaf physiological measurements in clear day. In this species, the relationship between physiological network and environment (by means of autonomy) was more clear and direct in network modulation than the connectance degree among physiological variables. Therefore, the meteorological variables and their relationship with leaf physiological variables in *C. arabica* cultivars is the keystone driving carbon and water balances in wet growing season.

In the second study, *C. arabica* cultivars present large carbon fixation between 17 and 23 °C, when apparent quantum efficiency is higher, electron transport rate is not excessive, negative components values of photosynthetic process are reduced, and biochemical and photochemical processes are in equilibrium. Saplings of *C. arabica* cultivars studied did not present increase of net assimilation under saturated CO<sub>2</sub> concentration. Photosynthetic process is extremely inhibited at leaf temperature of 32°C in 355 or 1200 μmol mol<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> concentrations, resulting in decrease of carboxylation efficiency and increase of mesophyll limitation to photosynthesis. PCA showed that at reduced temperatures (17-23°C) even close of optimum temperature (around 25 °C), the cultivars behave in a similar way. However, when temperatures are elevated, cultivars exhibit different behaviors for adaptation

to thermal stress. Photosynthesis network is tightly adjusted at elevated temperatures. Cultivars try to adjust the network and, in different ways, aim responses to overcome thermal stress situation on elevated temperatures.

When grafted, Catuaí Vermelho presents fine adjustments of its photosynthesis network in relation to environmental changes resulting in increase of its daily net photosynthesis in clear day. This cultivar presents more harmonic physiological behavior, with a network that modulates permitting two distinct moments for Rubisco activation. This cultivar is benefited by activation of the second pool of Rubisco in higher temperatures, presenting more regular responses at these temperatures.

Obatã modifies its behavior with grafting, presenting more conservative behavior with a more static network in regard to environmental changes. The environment influences negatively this cultivar in clear day, reducing its daily net photosynthesis. The physiological behavior of this cultivar is intermediary between Catuaí Vermelho and Ouro Verde, as revealed by the study at different temperatures.

Ouro Verde presents more instable physiological behavior. All pools of Rubisco is activate in reduced temperatures becoming more difficult to modulate its network under higher temperatures. This results in more variation of physiological responses to elevated temperatures, trying to reach higher tolerance to this stressful condition.

Icatu Amarelo was prejudiced by grafting treatment, with a network that does not variate its behavior resulting in less tolerance to stressful environmental conditions (clear day).

Network analysis and PCA in *C. arabica* were appropriate to discriminate the impact of stress factors and the responses of each cultivar to environmental changes, uncovering the network modulation that underlies physiological plant-environmental relationships.