



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

**THAÍS ARAUJO DOS SANTOS**

**Fluorescência da clorofila *a* como indicador de tolerância ao  
calor e à seca em *Jatropha curcas* L.**

VITÓRIA – ES

2020

THAÍS ARAUJO DOS SANTOS

**Fluorescência da clorofila *a* como indicador de tolerância ao calor e à seca em *Jatropha curcas* L.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Diolina Moura Silva

Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Camilla Zanetti Gallon

VITÓRIA - ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

D722f Dos Santos, Thaís Araujo, 1989-  
Fluorescência da clorofila a como indicador de tolerância ao  
calor e à seca em *Jatropha curcas* L. / Thaís Araujo Dos Santos. -  
2020.  
97 f. : il.

Orientadora: Diolina Moura Silva.  
Coorientadora: Camilla Zanotti Gallon.  
Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e  
Naturais.

1. Fotossíntese. 2. Fotoquímica. 3. Fisiologia vegetal. 4.  
Calor. 5. Seca. 6. Estresse. I. Silva, Diolina Moura. II. Gallon,  
Camilla Zanotti. III. Universidade Federal do Espírito Santo.  
Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

---

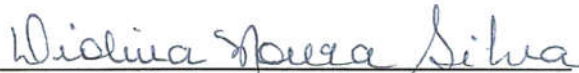
**Fluorescência da clorofila a como indicador de tolerância ao calor  
e à seca em *Jatropha curcas* L.**

**THAÍS ARAUJO DOS SANTOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 14 de fevereiro de 2020.

**Comissão Examinadora:**




**Profa. Dra. Diolinda Moura Silva (UFES)**  
Orientadora e Presidente da Comissão



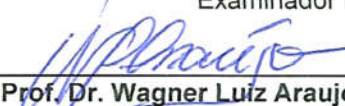
**Prof. Dr. Pedro Corrêa Damasceno Junior (UFRRJ/PPGBV)**  
Examinador Interno



**Prof. Dr. José Aires Ventura (UFES)**  
Examinador Interno



**Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos (UFES/PPGBiotec)**  
Examinador Externo



**Prof. Dr. Wagner Luiz Araujo (UFV)**  
Examinador Externo

*Aos meus pais, Henrique e Eliana, pelo exemplo de vida e confiança...  
Às minhas irmãs, Thatiany e Elisângela, pelo incentivo...  
Aos meus sobrinhos, Arthur e Yandra, meus amores...  
Ao meu noivo, Deovani, por todo carinho e apoio...*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal agradeço pela oportunidade de cursar o Doutorado. Estendo esse agradecimento às agências de fomento FAPES e CAPES, por todo auxílio financeiro durante o desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço também ao IFES, *campus* Itapina, pelas estacas de *J. curcas* L. utilizadas nessa pesquisa.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Diolina Moura Silva, pela confiança e dedicação com que desempenha seu papel incentivando, auxiliando e proporcionando o melhor ambiente possível para o desenvolvimento dessa e de outras pesquisas dentro do Núcleo de Estudos da Fotossíntese. Da mesma forma agradeço muito a colaboração da Dr<sup>ª</sup>. Camilla Zanotti Gallon.

Pela colaboração no estudo das HSPs agradeço ao Prof. Dr. Alexandre M. C. Santos e, principalmente, ao doutorando Evaldo Vitor Pereira, pela ajuda e paciência nas análises e processamento das amostras. Da mesma forma, agradeço às técnicas do Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM) que estavam sempre prontas a auxiliar no que fosse preciso.

Aos ilustres membros da banca agradeço por se disponibilizarem a contribuir para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A todos os colegas do Núcleo de Estudos da Fotossíntese, pela ajuda com os experimentos, coleta de dados e companheirismo quando o desespero batia e o caminho parecia obscuro. Vocês foram imprescindíveis no andamento deste trabalho.

Aos meus pais, Henrique e Eliana, muito obrigada pelo amor, confiança, apoio e incentivo durante toda a minha caminhada acadêmica. Sem vocês certamente o caminho teria sido muito mais difícil. Agradeço também as minhas irmãs, Thatiany e Elisângela, por todo apoio e encorajamento. Família, vocês sempre foram luz na minha vida. Obrigada por tudo!

Ao meu noivo, Deovani, agradeço pelo carinho, apoio e por sempre mostrar que o caminho não é tão tortuoso quanto parece, basta mudar o ângulo com que vemos cada situação. A todos os demais familiares e amigos, agradeço pela compreensão nos momentos de ausência. E o mais importante, agradeço a Deus porque sem Ele o caminho nem se quer teria iniciado.

*“Cada um de nós compõe a sua história  
Cada ser em si  
Carrega o dom de ser capaz  
E ser feliz”*

*Trecho da música “Tocando em frente”,  
Almir Sater e Renato Teixeira*

## RESUMO

*Jatropha curcas* L. (pinhão manso) é uma espécie da família Euphorbiaceae, originária do continente americano, cujo cultivo foi disseminado nos últimos anos em diversas regiões do globo, predominantemente em regiões tropicais, devido a qualidade do óleo produzido por suas sementes. A espécie é também empregada na recuperação de áreas degradadas, como fitorremediadora e na farmacologia. *J. curcas* é uma espécie que possui adaptabilidade a vários ambientes. Sabendo-se que o estresse hídrico e as altas temperaturas podem levar a alterações bioquímicas e fisiológicas que variam desde o rendimento fotossintético até o acúmulo de solutos e que a tolerância das plantas pode ser atribuída ao grau de adaptação às condições ambientais nos locais de cultivo esse trabalho objetivou diferenciar genótipos de *J. curcas* quanto ao grau de sensibilidade ao calor e a interferência da seca à sensibilidade ao calor. Diferenças claras foram observadas no parâmetro PIABS e seus componentes (RC/ABS,  $\phi P0$  e  $\Psi E0$ ), portanto, podemos considerar que as categorias de resposta térmica das plantas de genótipos de pinhão manso foram claramente diferenciadas: NEF12 sensível, NEF05 e NEF16 tolerante. As diminuições relativas de PIABS e PI<sub>TOTAL</sub> foram variáveis para os genótipos cultivados em alta temperatura e testados sob déficit hídrico, permitindo a seleção dos genótipos de acordo com a sensibilidade demonstrada: menos sensível (NEF07) e sensível (NEF05). A atividade enzimática da CAT e APX, carboidratos, pigmentos e acúmulo de prolina demonstraram que os genótipos possuem respostas diferentes frente ao mesmo estresse.

**Palavras-chave:** fluorescência da clorofila, estresse abiótico, pigmentos, enzimas, prolina



## ABSTRACT

*Jatropha curcas* L. (physic nut) is a species of the Euphorbiaceae family, originally from the American continent, whose cultivation has been disseminated in recent years in several regions of the globe, predominantly in tropical regions, due to the quality of the oil produced by its seeds. The species is also used in the recovery of degraded areas, as phytoremediation and in pharmacology. *J. curcas* is a species that has adaptability to various environments. Knowing that water stress and high temperatures can lead to biochemical and physiological changes that vary from photosynthetic yield to the accumulation of solutes and that the tolerance of plants can be attributed to the degree of adaptation to environmental conditions in cultivation sites. This work aimed to differentiate genotypes of *J. curcas* regarding the degree of sensitivity to heat and the interference of drought with sensitivity to heat. Clear differences were observed in the  $PI_{ABS}$  parameter and its components ( $RC/ABS$ ,  $\phi P_0$  and  $\Psi E_0$ ), therefore, we can consider that the thermal response categories of physic nut plants were clearly differentiated: sensitive NEF12, NEF05 and NEF16 tolerant. The relative decreases of  $PI_{ABS}$  and  $PI_{TOTAL}$  were variable for genotypes grown at high temperature and tested under water deficit, allowing the selection of genotypes according to the demonstrated sensitivity: less sensitive (NEF07) and sensitive (NEF05). The enzymatic activity of CAT and APX, carbohydrates, pigments and proline accumulation demonstrated that the genotypes have different responses to the same stress.

**Keywords:** chlorophyll fluorescence, abiotic stress, pigments, enzymes, proline

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Micrografia da estrutura interna de um cloroplasto.....	24
Figura 2: Esquema da disposição dos componentes da CTE fotossintética.....	25
Figura 3: Estrutura do aminoácido prolina e do carboidrato sacarose.....	27
Figura 4: Esquema da cadeia de transporte de elétrons fotossintética....	29
Figura 5: Plantas de <i>J. curcas</i> L. cultivadas no campo experimental do Instituto Federal do Espírito Santo.....	31
Figura 6: Planta de pinhão manso aos cinco meses de idade obtida por estaquia.....	32
Figura 7: Estacas de pinhão manso em vasos de 12 L.....	33
Figura 8: Esquema do experimento de calor realizado neste trabalho.....	34
Figura 9: Plantas de <i>J. curcas</i> em estufa de secagem elétrica após 1h de estresse térmico.....	34
Figura 10: Esquema do experimento de déficit hídrico realizado.....	35
Figura 11: Valores médios de temperatura, umidade relativa e RFA.....	36
Figura 12: O índice de sensibilidade ao calor.....	43
Figura 13: Intensidade da fluorescência da clorofila <i>a</i> em plantas de pinhão manso.....	45
Figura 14: Respostas das bandas K e L em plantas de três genótipos de pinhão manso.....	48
Figura 15: Bandas G em plantas de três genótipos de pinhão manso ao tratamento térmico.....	49
Figura 16: Índice de desempenho do fotossistema II.....	50
Figura 17: Efeito do tratamento térmico em alguns parâmetros do teste JIP.....	52
Figura 18: Plantas dos genótipos NEF05, NEF12 e NEF16 de <i>J. curcas</i> cinco dias após o tratamento.....	53
Figura 19: Teor de prolina em plantas.....	54
Figura 20: Efeito do estresse térmico no teor de açúcares.....	56
Figura 21: Efeito do estresse térmico na atividade das enzimas.....	61
Figura 22: Potencial hídrico foliar.....	68
Figura 23: Teor de água foliar em seis genótipos de <i>J. curcas</i> .....	69
Figura 24: Cinética da fluorescência transiente da clorofila <i>a</i> relativa entre os passos O-P.....	73
Figura 25: Cinética da fluorescência variável relativa evidenciando o aparecimento das bandas Le K.....	74

Figura 26: Fluorescência da clorofila <i>a</i> em diferentes genótipos de <i>J. curcas</i> submetidos ao déficit hídrico.....	75
Figura 27 - Índices de desempenho $PI_{ABS}$ e $PI_{TOTAL}$ relativos.....	76
Figura 28: Índice de sensibilidade ao calor.....	77
Figura 29: Conteúdo de prolina em plantas de seis genótipos.....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Enzimas antioxidantes e suas respectivas reações.....	28
Tabela 2 - Genótipos de <i>J. curcas</i> L. utilizados neste trabalho.....	33
Tabela 3: Descrição dos parâmetros do teste JIP.....	96
Tabela 4: ANOVA dos parâmetros da fluorescência transiente da clorofila <i>a</i> .....	47
Tabela 5: Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila <i>a</i> .....	47
Tabela 6: ANOVA dos parâmetros bioquímicos.....	54
Tabela 7: Teor de pigmentos fotossintéticos e antocianinas.....	59
Tabela 8: ANOVA do potencial hídrico foliar.....	69
Tabela 9: ANOVA do teor de água foliar.....	70
Tabela 12: ANOVA dos teores de pigmentos clorofilas, carotenoides e antocianinas totais.....	78
Tabela 13: teores de pigmentos clorofilas, carotenoides e antocianinas totais.....	78
Tabela 14: ANOVA do conteúdo de prolina e atividade das enzimas catalase e peroxidase do ascorbato.....	81
Tabela 15: Conteúdo de prolina e atividade das enzimas catalase e peroxidase do ascorbato.....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>NEF</b>	Núcleo de Estudos da Fotossíntese
<b>Chl</b>	Clorofila
<b>ISC</b>	Índice de sensibilidade ao calor
<b>RFA</b>	Radiação fotossinteticamente ativa
<b>DSR</b>	Dias sem rega
<b>PI</b>	Índice de performance
<b>CEO</b>	Centro de evolução de oxigênio
<b>ERO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FSI</b>	Fotossistema I
<b>FSII</b>	Fotossistema II
<b>CTE</b>	Cadeia de transporte de elétrons
<b>RuBisCO</b>	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase
<b>RuBP</b>	Ribulose 1,5-bisfosfato
<b>RC</b>	Centro de reação
<b>CS</b>	Secção transversal
<b>CAT</b>	Catalase
<b>ABS</b>	Absorção
<b>APX</b>	Ascorbato peroxidase
<b>Chl</b>	Clorofila
<b>CAR</b>	Carotenoide
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>FEC</b>	Fluxo de elétrons cíclicos
<b>DI</b>	Dissipação
<b>F<sub>0</sub></b>	Fluorescência inicial
<b>F<sub>M</sub></b>	Fluorescência máxima
<b>F<sub>V</sub></b>	Fluorescência variável
<b>MF</b>	Massa fresca
<b>PNPB</b>	Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel
<b>Pheo</b>	Feofitina
<b>Q<sub>A</sub></b>	Quinona A
<b>Q<sub>B</sub></b>	Quinona B

<b>Incaper</b>	Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural
<b><math>\Psi_{WF}</math></b>	Potencial hídrico foliar
<b>TR</b>	Captura de elétrons
<b>ET</b>	Transporte de elétrons
<b>IFT</b>	Instituto Fazenda Tamanduá
<b>IFES</b>	Instituto Federal do Espírito Santo
<b>PC</b>	Plastocianina
<b>CCL</b>	Complexo coletor de luz
<b>NADP</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>DAP</b>	Dias após o plantio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 HIPÓTESES</b> .....	22
<b>3 OBJETIVO GERAL</b> .....	22
<b>4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	22
<b>5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	23
5.1 Estresse térmico.....	23
5.2 Estresse hídrico.....	24
5.3 Ajuste osmótico.....	25
5.4 Atividade antioxidante.....	26
5.5 Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	27
5.6 A espécie <i>Jatropha curcas</i> L.....	29
<b>6 MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	31
6.1 Material vegetal e condições de cultivo.....	32
6.2 Experimento 1 – Tratamento de choque de calor.....	33
6.3 Experimento 2 – Tratamento de restrição hídrica em plantas cultivadas sob alta temperatura.....	34
6.4 Fluorescência transiente da clorofila <i>a</i> .....	36
6.5 Índice de Sensibilidade ao Calor (ISC).....	37
6.6 Potencial hídrico da folha ( $\Psi_{WF}$ ).....	37
6.7 Extrato etanólico para determinação de pigmentos fotossintéticos, antocianinas e carboidratos solúveis.....	38
6.8 Conteúdo de pigmentos fotossintéticos.....	38
6.9 Conteúdo de antocianinas.....	38
6.10 Carboidratos solúveis totais, sacarose e açúcares redutores.....	39
6.11 Extração de proteínas para análise de enzimas.....	39
6.12 Atividade da enzima Catalase.....	40
6.13 Cinética da enzima ascorbato peroxidase.....	40
6.14 Conteúdo de prolina.....	40
6.15 Análise estatística.....	41
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	42
7.1 EXPERIMENTO 1 - TRATAMENTO DE CHOQUE TÉRMICO.....	42
7.1.2 Fluorescência transiente da clorofila <i>a</i> e Índice de sensibilidade ao calor.....	42
7.1.3 Conteúdo de prolina.....	52

7.1.4	Conteúdo de açúcares.....	54
7.1.5	Conteúdo de pigmentos fotossintéticos e antocianinas.....	56
7.1.6	Atividade enzimática.....	59
7.2	EXPERIMENTO 2 - TRATAMENTO DE RESTRIÇÃO HÍDRICA EM PLANTAS CULTIVADAS SOB ALTA TEMPERATURA.....	67
7.2.1	Potencial hídrico foliar ( $\Psi_{wF}$ ) e teor de água.....	67
7.2.2	Fluorescência da clorofila a e teste JIP.....	69
7.2.3	Teor de pigmentos fotossintéticos e antocianinas.....	77
7.2.4	Prolina.....	79
7.2.5	Atividade enzimática.....	80
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>96</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Várias condições ambientais podem comprometer o desenvolvimento dos vegetais, principalmente nas regiões tropicais, onde fatores como estresse hídrico, excesso de radiação e altas temperaturas podem limitar a fotossíntese e gerar danos a produtividade nas lavouras (CELOVANE et al., 2018; DINIS et al., 2017; SILVA et al., 2019).

O estresse hídrico, juntamente com altas temperaturas, pode levar a alterações bioquímicas e fisiológicas que variam do rendimento fotossintético ao acúmulo de solutos, limitando também a produtividade das plantas (SANTOS et al., 2013; SILVA et al., 2019). Os efeitos desses fatores e sua interação, tem sido fonte de muitos estudos que visam propor meios de minimizar seus impactos e evidenciar genótipos menos sensíveis as condições adversas (FAHAD et al., 2017; JAIN et al., 2018; KALAJI et al., 2018; PAGANOVA et al., 2017).

Sob déficit hídrico, as plantas tem como um dos primeiros efeitos a indução do fechamento estomático, o que leva a diminuição da assimilação de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e redução da atividade da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO) e da regeneração da ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) (LIMA NETO et al., 2017; ZIVCAK et al., 2013). Como o Ciclo de Calvin-Benson é a principal via de consumo das moléculas de ATP e NADPH nos cloroplastos, sua disfunção causa um desequilíbrio geral no processo fotossintético, comprometendo a relação  $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$  e a produção de ATP, criando um excesso de energia nos tilacóides. Esse desequilíbrio aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), que podem ser propagadas do cloroplasto para outros locais, sinalizando respostas metabólicas ou causando danos às estruturas celulares, dependendo da intensidade do estresse (ZIVCAK et al., 2013).

Sob estresse térmico, a cadeia fotossintética de transporte de elétrons deixa de usar eficientemente a energia luminosa para produzir ATP e o NADPH, levando à inibição do transporte linear de elétrons, aumento do fluxo de elétrons cíclicos, aumento da fotorrespiração, diminuição do rendimento das reações de carboxilação e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), convergindo para a redução da eficiência fotossintética (JAIN; SINGH; PANDEY; RAMYA; SINGH; PRABHU, 2018; TAN et al., 2020). O metabolismo dos carboidratos é afetado pelo estresse térmico, principalmente porque altera a afinidade da enzima ribulose-1, 5-

bifosfato carboxilase/ oxigenase (RuBisCO) ao CO<sub>2</sub>, favorecendo a fotorrespiração. Alguns estudos indicam que o conteúdo de carboidratos pode diferir entre plantas da mesma espécie, acusando características de cada genótipo (ZHOU et al., 2017).

Por serem seres sésseis, as plantas desenvolveram várias estratégias fisiológicas e bioquímicas para tolerância e escape de várias situações de estresse biótico e abiótico. Várias dessas estratégias estão relacionadas à produção de metabólitos. A prolina, por exemplo, é um aminoácido com função osmorregulatória e osmoprotetora para estruturas celulares e que serve como fonte de carboidratos em situações pós-estresse. Em situações de estresse térmico, o aumento desse aminoácido pode contribuir para uma menor sensibilidade ao calor (GOSAVI et al., 2014).

Além disso, a expressão de enzimas antioxidantes também pode aumentar durante períodos críticos de alta temperatura e restrição hídrica. Se o estresse continuar por muito tempo, a expressão desses metabólitos começará a diminuir, levando a planta a estresse oxidativo severo, podendo chegar à morte (HASANUZZAMAN et al., 2013).

Tendo em vista todos os prejuízos metabólicos que podem ser causados por condições ambientais, em diversos trabalhos os autores documentaram a importância do estudo da fluorescência da clorofila *a* na distinção da sensibilidade de genótipos frente aos estresses (CHEN ET AL., 2016; KALAJI ET AL., 2018; LIMA NETO et al., 2015; MAES et al., 2009; DALBERTO et al., 2017). Segundo Zhou et al. (2019), Kalaji et al. (2018) e Martins et al. (2017) ao trabalhar com tomate, cevada e crame, respectivamente, foi possível observar que a cinética das curvas de indução de fluorescência da Chl *a* (OJIP) forneceram informações detalhadas sobre as diferenças existentes entre os genótipos, principalmente ao analisarem o FSII.

Esses trabalhos são importantes pois visam agregar informações sobre os fenótipos de plantas da mesma espécie. A tolerância das plantas a condições estressantes pode ser atribuída ao grau de adaptação dessas plantas as condições ambientais dos locais de cultivo. Cultivares e genótipos introduzidos em determinada região, muitas vezes não se adaptam às novas condições ambientais e podem tornar-se mais sensíveis a fatores abióticos no novo ambiente do que uma planta, da mesma espécie, nativa daquele meio (HWA E YANG, 2008).

Com foco nessa possibilidade de distinção de genótipos a partir de dados fotossintéticos, vários pesquisadores tem tentado diferenciar genótipos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), a fim de agregar informações para registro de possíveis cultivares, uma vez que essa espécie ainda está em fase de domesticação, mas tem se mostrado como uma alternativa para uso no Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) (DOMICIANO et al., 2018; MATOS et al., 2014).

O pinhão manso é uma espécie da família Euphorbiaceae, originária do continente Americano, cujo cultivo vem sendo disseminado em diversas regiões do globo, predominantemente em regiões tropicais (ANDRADE, 2007). É um arbusto de crescimento rápido, caducifólio, que pode atingir mais de 5 m de altura. Esta espécie desenvolve-se sob condições climáticas diversas, sendo favorecida em regiões tropicais onde a precipitação anual esteja acima de 944 mm/ano (FINI et al., 2013) e a temperatura entre 18°C e 28,5°C (DALLACORT et al., 2010). Sua adoção como uma cultura potencial para atender ao PNPB, deve-se, principalmente, ao potencial de rendimento de óleo, por ser uma espécie não alimentar e seu manejo ser compatível com o perfil da agricultura familiar (LAVIOLA et al., 2018; LAVIOLA et al., 2011; SANTOS et al., 2013).

Devido à rusticidade, adaptabilidade a vários ambientes e a qualidade do óleo, esta planta, além de ter potencial como fonte de biodiesel, também pode ser empregada na recuperação de áreas degradadas (ANDRADE, 2007). Porém, os genótipos utilizados nos plantios são geneticamente desconhecidos, não existindo ainda cultivares melhoradas, sobre as quais se tenha informações e garantias do potencial de produção nas diversas regiões produtoras (LAVIOLA et al., 2011; ALVES et al., 2019).

A *J. curcas*, família Euphorbiaceae, é uma espécie oleaginosa bastante visada para recuperação de áreas degradadas e como matéria-prima para a produção de tintas, sabão, lâmpadas e óleos lubrificantes e biodiesel (KUMAR; SHARMA, 2008). Além disso, diferentes partes destas plantas contêm uma variedade de metabólitos e compostos bioativos importantes, chamando a atenção de pesquisadores da área farmacológica e cosmética (LEÓN-VILLANUEVA et al., 2018). No entanto, o teor de óleo e outros componentes químicos variam consideravelmente entre os diferentes acessos (DOMICIANO et al., 2018; DRUMOND et al., 2010).

No Brasil, o pinhão manso ganhou destaque como espécie rústica e fortemente tolerante ao déficit hídrico, tendo suas adaptações fisiológicas estudadas em duas regiões do Brasil, com climas diferentes: um clima tropical semi-árido (Agreste) e tropical semi-úmido sujeito a estresse hídrico (Santos et al., 2013). Segundo os autores, *J. curcas* exibe fotoinibição dinâmica, mesmo na estação seca, e as plantas apresentam fotoinibição crônica apenas sob condições de déficit hídrico severo.

Um estudo realizado pelo *Núcleo de Estudos da Fotossíntese* (NEF) também avaliou plantas de pinhão manso cultivadas em duas zonas agroclimáticas no estado do Espírito Santo, uma costeira com solo arenoso (Pontal do Ipiranga), e outra no interior do estado com solo mais argiloso (Itarana) (Silva et al., 2019). Os resultados do teste JIP permitiram concluir que a eficiência do fotossistema II ( $\Phi P_0$ ) e fotossistema I ( $\Phi R_0$ ) decresceu de janeiro a março e voltou a apresentar recuperação a partir de abril, o que demonstrou a influência negativa do solo que retém pouca água em comparação ao outro. Ao analisar o índice de desempenho da eficiência do transporte de elétrons na cadeia de transporte fotossintética ( $PI_{ABS}$  e  $PI_{TOTAL}$ ), a mesma tendência foi observada na região costeira.

Em outro estudo desenvolvido pelo NEF, os pesquisadores conseguiram diferenciar os acessos de pinhão manso (dados ainda não publicados) quanto a sensibilidade ao calor utilizando o índice de sensibilidade ao calor (HSI), desenvolvido por (CHEN et al., 2016). Este índice correlaciona o logaritmo do índice de desempenho ( $\log PI_{ABS}$ ), ou seja, a força motriz total para a fotossíntese e a fluorescência variável relativa na etapa K ( $V_K$ ) (STRASSER et al., 2010; STRASSER; TSIMILLI-MICHAEL; SRIVASTAVA, 2004). A partir deste índice conseguiram identificar que os acessos NEF05 e NEF16 são menos sensíveis ao calor do que os acessos NEF07 e NEF13.

Esses estudos e a elucidação dessas variações são de extrema importância para pesquisas em melhoramento vegetal visando à exploração econômica, principalmente em termos bioenergéticos (LAVIOLA, Bruno Galveas et al., 2018; LAVIOLA, Bruno Galveas et al., 2017), uma vez que no Brasil o pinhão manso tem sido considerado uma cultura promissora para a exploração do óleo pelo Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel por causa do seu potencial de rendimento de óleo, além de ser uma espécie não alimentar e o manejo ser

compatível com o perfil da agricultura familiar (DOMICIANO et al., 2018; LAVIOLA, Bruno Galvêas et al., 2011).

Sendo assim, com base nessas informações, viu-se a necessidade de avaliar os genótipos de pinhão manso de forma rápida e eficiente. O presente estudo teve como objetivo avaliar se o índice de sensibilidade ao calor (ISC) calculado em plantas cultivadas a pleno sol pode realmente demonstrar diferenças fisiológicas em genótipos de pinhão manso, ou seja, verificar se os dados de ISC correspondem a uma diferença real entre genótipos. Além disso, buscamos ainda verificar a interferência da restrição hídrica sobre a sensibilidade ao calor, bem como as alterações no metabolismo antioxidante e no acúmulo de prolina nos genótipos estudados.

## 2 HIPÓTESES

- a) O índice de sensibilidade ao calor (ISC) calculado em plantas cultivadas a pleno sol, pode ser usado para demonstrar diferenças fisiológicas entre genótipos de pinhão manso.
- b) Diferentes genótipos de pinhão manso quando submetidos a altas temperaturas e ao estresse hídrico terão respostas diferentes dependendo do grau de tolerância a esses estresses, então seria possível distingui-los.

## 3 OBJETIVO GERAL

Identificar genótipos de *Jatropha curcas* L. tolerantes ao estresse térmico e ao estresse simultâneo de déficit hídrico e altas temperaturas.

## 4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a efetividade do uso do Índice de Sensibilidade ao Calor (ISC) em genótipos de *J. curcas* submetidos ao estresse térmico.
- b) Determinar o genótipo de *J. curcas* mais tolerante ao estresse térmico;
- c) Quantificar os teores de pigmentos foliares (clorofilas, carotenoides e antocianinas) de seis genótipos de *J. curcas* submetidos a estresse térmico e estresse hídrico simultaneamente;
- d) Avaliar os danos na cadeia de transporte de elétrons provocados pelo estresse térmico e estresse hídrico simultâneos, em folhas de seis genótipos de *J. curcas*;
- e) Determinar os teores de açúcares solúveis, sacarose e açúcares redutores em folhas de seis genótipos de *J. curcas* submetidas a estresse térmico e estresse hídrico simultâneos;
- f) Avaliar a atividade das enzimas catalase e peroxidase do ascorbato em folhas de seis genótipos de *J. curcas* submetidos a estresse térmico e estresse hídrico simultâneos;
- g) Determinar o genótipo de *J. curcas* mais tolerante ao estresse térmico e
- h) déficit hídrico, simultâneos.

## 5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 5.1 Estresse Térmico

De acordo com Wang et al., 2017), o estresse térmico afeta a fotossíntese em aspectos fisiológicos, bioquímicos e moleculares, como a desnaturação de proteínas e lipídios na membrana do tilacóide e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), Figuras 1 e 2.

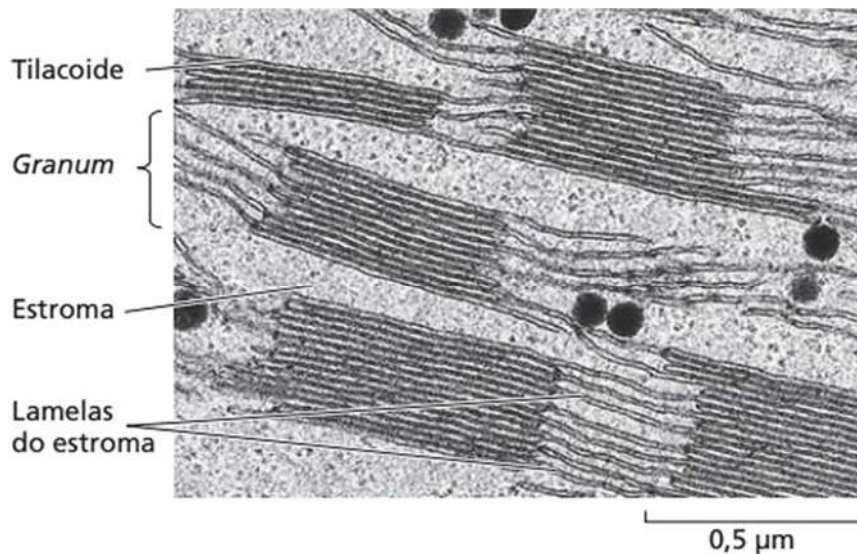


Figura 1: Micrografia da estrutura interna de um cloroplasto, expondo os tilacóides, *granum*, estroma e suas lamelas. Adaptado de Taiz et al., 2017.

Sob estresse térmico, a cadeia de transporte de elétrons (CTE) fotossintética não consegue utilizar eficientemente a energia luminosa, comprometendo a produção de NADPH, levando à inibição do transporte linear de elétrons, aumento do fluxo cíclico de elétrons, aumento da fotorrespiração e diminuição da produção do estágio bioquímico (reações de carboxilação) convergindo para a redução da eficiência fotossintética (JAIN; SINGH; PANDEY; RAMYA; SINGH; PRABHU, 2018; TAN et al., 2020).

O processo fotossintético, especialmente o estágio fotoquímico, é afetado negativamente devido à maior sensibilidade do fotossistema II (FSII), que é constantemente remodelado para mitigar mudanças ambientais e manter a homeostase do sistema. Em alta temperatura, alterações nas interações entre lipídios e proteínas da membrana dos tilacóides ocorrem devido ao aumento da fluidez lipídica (OUKARROUM et al., 2013). Esses eventos levam à dissociação do

complexo coletor de luz (CCL; antena) e, finalmente, à perda do empilhamento das membranas, Figura 2 (OUKARROUM et al, 2013). Outro fator que contribui para a desestabilização da CTE fotossintética é a perda de conformação do cluster de manganês, que altera a estrutura e a função do FSII.

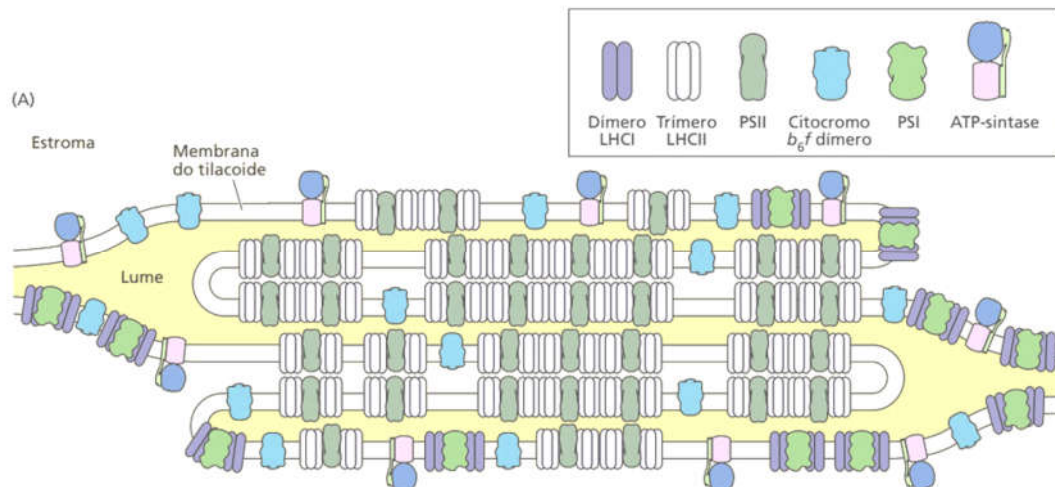


Figura 2: Esquema da disposição dos componentes da cadeia de transportes de elétrons fotossintética. Adaptado de TAIZ et al. (2017).

Além disso, as reações de carboxilação são afetadas pelo calor, principalmente, porque ele altera a afinidade da enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) ao  $\text{CO}_2$ , aumentando a atividade oxigenase, afinidade pelo  $\text{O}_2$ , favorecendo a fotorrespiração. Esse processo é um importante meio de dissipação de energia e consumo de ATP e NADPH, uma vez que evita o acúmulo dessas moléculas, protegendo o aparato fotossintético de possíveis danos oxidativos. Segundo Oukarroum et al. (2016) temperaturas elevadas, entre 35 e 45°C são capazes de induzir a total inibição do processo de fixação de carbono e a capacidade de fotofosforilação no FSII, porém o FSI tem sido relatado como resistente ao calor (CHEN et al., 2016). No entanto, tanto a resposta quanto a suscetibilidade das plantas ao estresse por calor, podem variar entre os genótipos e os estágios de desenvolvimento, segundo Zhou et al. (2017).

## 5.2 Estresse hídrico

Sabe-se que um dos primeiros efeitos diretos do déficit hídrico nas plantas é a indução do fechamento estomático, o que leva a diminuição da assimilação de



dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e redução da atividade da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO) e da regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) (LIMA NETO et al., 2017; ZIVCAK et al., 2013). Como o ciclo de Calvin-Benson é a principal via de consumo das moléculas de ATP e NADPH nos cloroplastos, sua disfunção causa um desequilíbrio geral no processo fotossintético, comprometendo a relação NADP<sup>+</sup> / NADPH e a produção de ATP, criando um excesso de energia nos tilacóides. Esse desequilíbrio aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nessa organela que podem ser propagadas para outros locais sinalizando respostas metabólicas ou causando danos às estruturas celulares, dependendo da intensidade do estresse (ZIVCAK et al., 2013).

### *5.3 Ajuste osmótico*

O ajuste osmótico consiste em um mecanismo fisiológico estabelecido pelo acúmulo de solutos compatíveis, como a prolina, a trealose e a sacarose no vacúolo ou no citoplasma (BENITEZ et al., 2016), o que contribui para a manutenção do balanço hídrico e a preservação da integridade de proteínas, enzimas e membranas celulares sob condições de estresse. Os açúcares, por exemplo, em situações adversas podem ter sua concentração aumentada, auxiliando na manutenção da turgescência celular. Alguns estudos indicam que o conteúdo de carboidratos pode diferir entre plantas da mesma espécie, acusando características de cada genótipo (ZHOU et al., 2017).

A prolina (Figura 3), um aminoácido com função osmorregulatória e osmoprotetora para estruturas celulares, pode ainda servir como fonte de energia em situações pós-estresse (YUE et al., 2019). Em situações de estresse térmico, o aumento desse aminoácido pode contribuir para uma menor sensibilidade ao calor (GOSAVI et al., 2014). Muitos autores tem associado esse aminoácido ao desempenho de funções fundamentais na regulação da integridade de membranas e proteínas, auxiliando na desintoxicação por EROs, participando da transdução de sinal e até servindo como fonte de energia (BENITEZ et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2013; YUE et al., 2019).

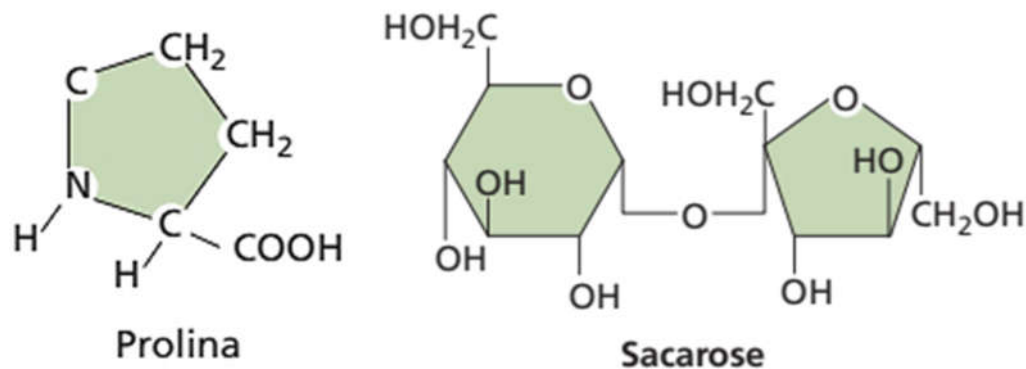


Figura 3: Estrutura do aminoácido prolina ( $C_5H_9NO_2$ ) e do carboidrato sacarose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ). Adaptado de Taiz et al. (2017).

#### 5.4 Atividade antioxidante

As plantas desenvolveram mecanismos antioxidantes eficazes que dependem de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos capazes de remover espécies reativas de oxigênio tais como oxigênio singleto, superóxido, hidroxila e peróxido de hidrogênio, que embora possam servir de sinalizadores de vias metabólicas em baixas concentrações, tornam-se tóxicas quando acumuladas durante situações estressantes.

Muitos trabalhos ao longo dos anos usam a atividade das enzimas CAT, SOD, APX, por exemplo, e o conteúdo de pigmentos como os carotenoides (via não enzimática), para aferir danos oxidativos nas plantas submetidas a diversos tipos de fatores estressantes. Durante o estresse térmico, por exemplo, a atividade das enzimas antioxidantes geralmente aumenta até uma temperatura específica, caso o estresse persista além dessa temperatura, sua expressão e atividade começam a cair (HASANUZZAMAN et al., 2013). Entre as enzimas antioxidantes, pode-se citar a peroxidase do ascorbato (APX), encontrada em cloroplastos, peroxissomos, mitocôndrias, citosol e apoplasto. Esta enzima catalisa a neutralização do peróxido de hidrogênio, por meio do consumo de ácido ascórbico como um agente redutor (Tabela 1). Outra enzima importante, a catalase (CAT) é a responsável pela desintoxicação do peróxido de hidrogênio (Tabela 1), resultando em água e oxigênio, nos peroxissomos (TAIZ et al., 2017).

Tabela 1: Enzimas antioxidantes e suas respectivas reações de neutralização de espécies reativas de oxigênio.

Enzima	Reação
Ascorbato peroxidase (APX)	$2L\text{-ascorbato} + H_2O_2 + 2H^+ \rightarrow 2 \text{ monodesidroascorbato} + 2H_2O$
Catalase (CAT)	$2 H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

Porém, esses processos possuem um alto consumo energético para produção de antioxidantes, pigmentos e proteínas/enzimas (LIMA NETO et al., 2017). Outra via alternativa para evitar o excesso de EROs e dissipar o excesso de energia seria através do próprio aparato fotossintético por extinção não fotoquímica (calor), fluxo cíclico de elétrons (FCE) e drenos de elétrons alternativos, como a fotorrespiração (LIMA NETO et al., 2017).

### 5.5 Fluorescência da clorofila a

Em organismos que realizam a fotossíntese, a energia luminosa é absorvida pelos complexos coletores de luz, chamados de complexos antena, que formam uma complexa rede de pigmentos incorporados a proteínas (fotossistema). Dentro do fotossistema II (FSII), a energia de excitação do complexo antena é eficientemente transferido de um centro de reação ativo (CR; ou seja, com quinona A (Q<sub>A</sub>) oxidada), onde tem início a fase fotoquímica, levando a hidrólise da água, e redução de plastoquinonas (PQ-pool). Uma pequena parte da energia de excitação desse sistema é dissipada na forma de fluorescência e calor (STIRBET e GOVINDJEE, 2011).

Todos os componentes a cadeia de elétrons fotossintéticos (Figura 4), e particularmente os fotossistemas II (FSII), são muito sensíveis aos estresses bióticos e abióticos, e sofrem contínuas mudanças estruturais e conformacionais, para manter a sua função em patamares ótimos em um ambiente em constante alteração (YUSUF et al., 2010; ZHANG et al., 2010).

Tendo em vista todos os prejuízos metabólicos que podem ser causados por condições ambientais, em diversos trabalhos os autores documentaram a importância do estudo da fluorescência da clorofila a na distinção da sensibilidade de genótipos frente aos estresses (Chen et al., 2016; Kalaji et al., 2018; Lima Neto et al., 2015; Maes et al., 2009; Dalberto et al., 2017). Segundo Zhou et al. (2019), Kalaji et al. (2018) e Martins et al. (2017) ao trabalhar com tomate, cevada e crambe, respectivamente, foi possível observar que a cinética das curvas de

indução de fluorescência da Chl a (OJIP) forneceram informações detalhadas sobre as diferenças existentes entre os genótipos, principalmente ao analisarem o FSII.

A análise da fluorescência da clorofila foi popularizada como um método para detectar o estresse ambiental nas plantas, incluindo o estresse térmico (CHEN et al., 2016; JAIN et al., 2018; OUKARROUM et al., 2016). Essa técnica está relacionada principalmente às funções e atividades dos fotossistemas, frequentemente alterados sob condições de estresse ambiental (CHEN et al., 2016; MATHUR e JAJOO, 2014; SILVA et al., 2017). Com o auxílio do "teste JIP" (STRASSER et al., 2010; STRASSER et al. 2004) foi possível obter mais informações sobre as condições da cadeia de transporte de elétrons (Figura 4) fotossintéticos sob tipos específicos de estresse, uma vez que permitiu aos pesquisadores distinguirem o efeito do estresse em fenômenos particulares envolvidos na absorção de luz e sua conversão em energia bioquímica (KALAJI et al., 2018).

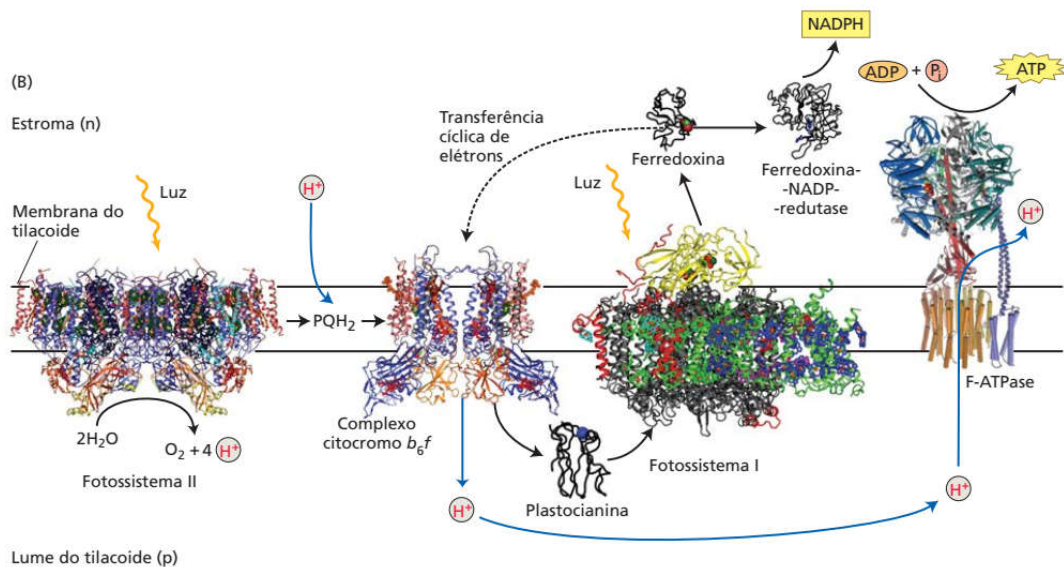


Figura 4 – Esquema da cadeia de transporte de elétrons fotossintética. Adaptado de Taiz et al. (2017).

Uma das aplicações mais recentes da técnica da fluorescência transiente da clorofila a é o índice de sensibilidade ao calor (ISC), um valor absoluto da inclinação da reta que relaciona a força motriz total para a fotossíntese ( $\text{Log}P_{IABS}$ ) (STIRBET e GOVINDJEE, 2011) e a fluorescência relativa no ponto K ( $V_K$ ) é o que quantifica a tolerância das plantas a altas temperaturas, ou seja, na equação linear ( $ax + b$ ),

o valor absoluto de "a" é o ISC. Quanto menor esse valor, maior a tolerância das plantas ao estresse térmico (CHEN et al., 2016).

### 5.6 A espécie *Jatropha curcas* L.

A *Jatropha curcas* L. (pinhão manso) é uma espécie da família Euphorbiaceae, originária do continente Americano, cujo cultivo vem sendo disseminado em diversas regiões do globo, predominantemente em regiões tropicais (ANDRADE, 2007). Apresenta-se como um arbusto de crescimento rápido, caducifólio, que pode atingir mais de 5 m de altura (Figura 5A e 5B). Possui floração monóica, ou seja, suas inflorescências possuem flores masculinas e femininas (Figura 5B), e ocasionalmente flores hermafroditas também podem ser observadas. As flores são pediceladas, e dispostas em círculos concêntricos, com uma única flor feminina em posição central, circundada pelas masculinas (LUCENA et al., 2014). Os frutos são do tipo cápsula ovóide, com 1,5 a 3,0 cm de diâmetro, trilobular, contendo uma semente por lóculo (Figuras 5C e 5D). As sementes medem de 1,5 a 2,0 cm de comprimento e 1,0 a 1,3 cm de largura, representando entre 53% a 79% do peso do fruto e apresentam teor de óleo variando entre 33% e 38 % (PERBONI et al., 2015).

Durante anos, pesquisadores em fisiologia e biotecnologia de plantas vêm buscando estratégias para selecionar genótipos de pinhão manso (Figura 5) mais tolerantes ao estresse ambiental, permitindo adaptação com bons ganhos produtivos. O óleo de *J. curcas* é utilizado há anos como matéria-prima para a produção de tintas e sabão, bem como para lâmpadas e óleos lubrificantes (KUMAR E SHARMA, 2008). Além disso, diferentes partes das plantas desta espécie contêm uma variedade de metabólitos e compostos bioativos importantes, o que chamou muita atenção para a pesquisa como planta medicinal (LEÓN-VILLANUEVA et al., 2018).

No entanto, devido ao fato de a espécie ainda não ter genótipos com características bem definidas, os caracteres morfológicos, as características fisiológicas, o teor de óleo e outros componentes químicos variam consideravelmente (DOMICIANO et al., 2018; DRUMOND et al., 2010). A elucidação dessas variações é de extrema importância para pesquisas em

melhoramento de plantas, visando à exploração econômica dessa espécie (LAVIOLA et al., 2017).

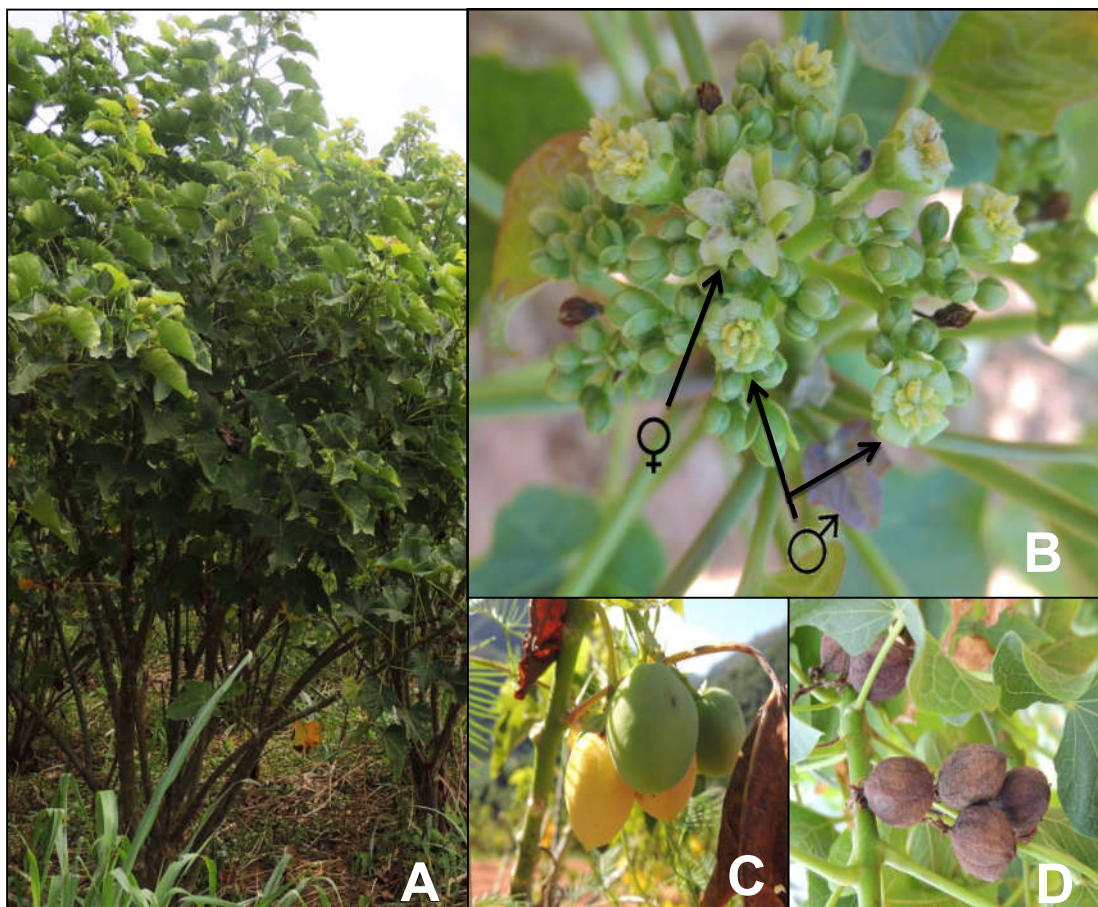


Figura 5: Plantas de *Jatropha curcas* L. cultivadas no campo experimental do Instituto Federal do Espírito Santo, *campus* Itapina. A – Vista geral da planta; B – Inflorescência; C – Frutos verdes e amarelos; D – Frutos marrons, secos. Fonte: arquivo pessoal.

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Material vegetal e condições de cultivo

Para o Experimento 1 (tratamento de choque térmico), estacas de três genótipos de *J. curcas* (Tabela 2) foram obtidas em agosto de 2016 no campo experimental do Instituto de Pesquisas do Espírito Santo (IFES, *campus* Itapina, ES/Brasil) (19°32'22"S, 40°37'50"W) e plantadas em vasos de 12 L de plástico contendo uma mistura de solo e areia (2: 1) com 1 planta por vaso em seis repetições (cada planta era uma repetição). Todas as plantas foram irrigadas com auxílio de um sistema de gotejamento automatizado, com vazão de 4 L/h, duas vezes ao dia (às 05:30 e 18:00h), durante 5 min, o que equivale dizer que as plantas receberam, aproximadamente, 400mL de água no início da manhã e tarde. Além disso, o solo foi adubado com solução nutritiva (HOAGLAND; ARNON, 1950), ½ força, 50mL a cada 15 dias, durante os primeiros dois meses de plantio. As plantas foram cultivadas na área experimental da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES, Vitória, ES/Brasil) (20°16'S, 40°18'W) em pleno sol no verão. Plantas saudáveis com 5 meses de idade foram usadas para promover os experimentos (Figura 6).



Figura 6: Planta de pinhão manso aos 5 meses de idade obtida por estaquia. Em destaque, bico de irrigação automatizada. Fonte: Arquivo pessoal.

Para o Experimento 2 (tratamento de déficit hídrico), realizado em janeiro de 2018, as plantas dos genótipos (Tabela 2) foram obtidas no mesmo local descrito anteriormente. As plantas foram colocadas em vasos plásticos de 12 L contendo uma mistura de solo e areia (2: 1) com 3 estacas por vaso (Figura 7A).

Após 30 dias do plantio foi realizado o desbaste, restando apenas uma planta por vaso, sendo 10 plantas por genótipo, ou seja, 10 repetições por genótipo (cada planta representava uma repetição), totalizando 60 plantas. As plantas recebiam manualmente 400mL de água duas vezes ao dia, às 08h00min e 18h00min. A nutrição das plantas seguiu como já descrito para o experimento 1.

As plantas foram cultivadas na mesma área experimental a pleno sol por dois meses até que as estacas rebrotassem (Figura 7B). Após esse período, foram cultivadas em estufa agrícola com temperaturas máximas em torno de 45°C (Figura 11B). Os vasos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado (Figura 7C).



Figura 7 - Estacas de pinhão manso em vasos de 12 L (A); plantas de pinhão manso aos 60 DAP das estacas (B); e plantas de pinhão manso aos 150 DAP e 90 dias de cultivo em estufa agrícola (C). As setas vermelha e azul indicam planta sob déficit hídrico e condição controle, respectivamente. Fonte: acervo pessoal.

Tabela 2 - Genótipos de *Jatropha curcas* L. utilizados neste trabalho.

Código	Código de origem	Instituição de origem	Local de origem
NEF05	PRT	Instituto Fazenda Tamanduá	PB
NEF07	INC01	Incaper	ES
NEF10	JFT	Instituto Fazenda Tamanduá	PB
NEF12	IFT02	Instituto Fazenda Tamanduá	PB
NEF13	IFT03	Instituto Fazenda Tamanduá	PB
NEF14	IFT04	Instituto Fazenda Tamanduá	PB
NEF16	IFT06	Instituto Fazenda Tamanduá	PB

Fonte: Adaptado de (MEIRELES et al., 2017).



## 6.2 Experimento 1 - Tratamento de choque de calor

Três grupos de seis plantas de cada genótipo foram colocados em uma estufa elétrica (modelo LUCA-80/1000) e permaneceram por uma hora nas temperaturas de 36, 45 e 56°C, sendo cada grupo submetido a uma temperatura. Um outro grupo de cinco plantas de cada genótipo foi mantido a 28°C e designado como controle. Todo o experimento foi realizado no escuro para que os fotossistemas estivessem totalmente oxidados ao término da exposição ao calor, possibilitando que os dados de fluorescência da clorofila *a* fossem aferidos 10 min após a aplicação do estresse.

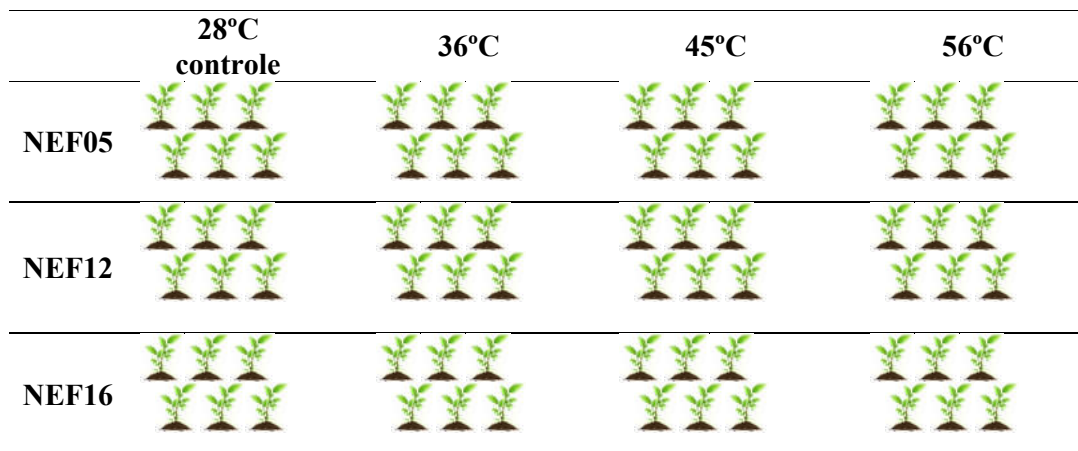


Figura 8: Esquema do experimento de choque térmico realizado neste trabalho.



Figura 9: Plantas de *J. curcas* em estufa de secagem elétrica após 1h de estresse térmico nas temperaturas de 36, 45 e 56°C (A). Detalhe da planta com grampos para medir a fluorescência da clorofila *a* (B). Fonte: Arquivo pessoal.

### 6.3 Experimento 2 – Restrição hídrica em plantas cultivadas sob alta temperatura

Dez plantas de cada genótipo foram cultivadas em estufa agrícola por 90 dias sob temperatura máxima em torno de 45°C. Após esse período, cinco plantas de cada genótipo foram selecionadas ao acaso e submetidas ao tratamento de restrição hídrica por 10 dias, enquanto as outras cinco foram mantidas como controle. Para evitar a entrada de água, os vasos das plantas selecionadas para o tratamento de déficit hídrico foram cobertos com sacos plásticos brancos vedados na parte superior junto ao caule com filme para vedação, a aproximadamente 5 cm do solo, enquanto a parte inferior foi aberta para manter a ventilação adequada (Figura 7C).

Após 10 dias de suspensão da rega (DSR), foram realizadas as medições da fluorescência da clorofila *a*, potencial hídrico e amostras de tecido foliar foram coletadas e imediatamente congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer sob temperatura de -80°C para análises bioquímicas posteriores. Os mesmos procedimentos foram realizados depois de 10 dias de reidratação.

Durante o período de cultivo dentro da estufa foram aferidas a radiação fotossinteticamente ativa (RFA,  $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), temperatura (°C) e umidade relativa (%) por meio de sensores LI-190SA (Li-Cor, Lincoln, NE) e sonda modelo HMP-155 da Vaisala® registrados em datalogger (LI-1400 AS, Li-Cor, US), Figura 11A. As temperaturas máximas, mínimas e amplitude térmica dentro da estufa durante o período de 10 dias de déficit hídrico foram aferidos com um termohigrômetro digital modelo TH-01 da Impac (Figura 11B).

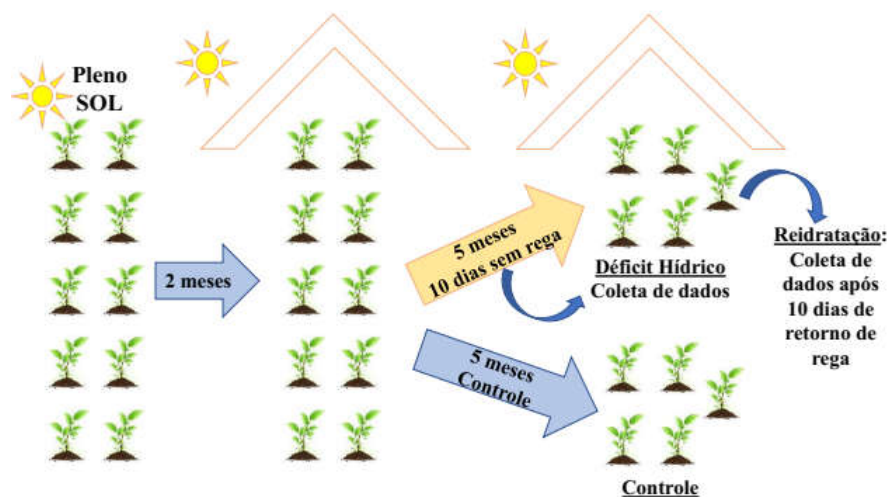


Figura 10: Esquema do experimento de restrição hídrica em plantas cultivadas sob alta temperatura ( $\pm 45^\circ\text{C}$ ) em estufa agrícola.

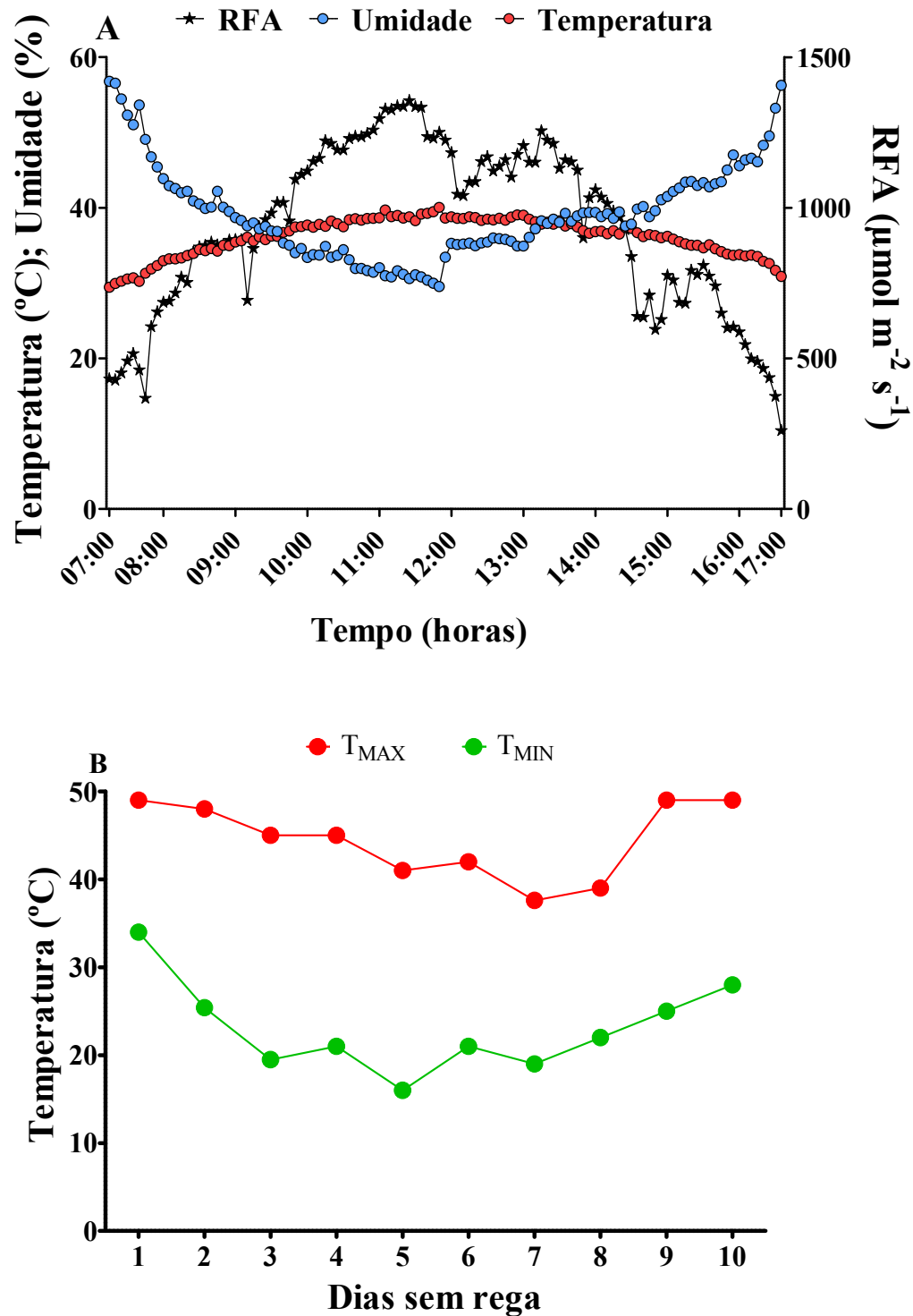


Figura 11 – Valores médios de temperatura (°C), umidade relativa (%) e RFA ( $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) no interior da estufa agr\u00edcola onde plantas de *J. curcas* foram cultivadas por 90 dias (A). Temperatura m\u00e1xima, m\u00ednima e amplitude t\u00e9rmica (°C) dentro da estufa durante os 10 dias em que as plantas foram submetidas a d\u00e9ficit h\u00eddrico (B).

#### 6.4 Fluorescência transiente da clorofila a

Após 10 min do tratamento térmico realizado no escuro, foram realizadas as medições em 6 plantas de cada genótipo. A cinética do aumento da fluorescência transiente da clorofila foi aferida em folhas jovens totalmente expandidas com um fluorômetro portátil, modelo Handy-PEA (Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, Reino Unido) como descrito por Chen et al. (2016). Como todo o experimento foi realizado no escuro por mais de 40 minutos, admitiu-se que o sistema de coleta de luz das folhas estava totalmente receptivo, ou seja, os centros de reação estavam completamente oxidados (CHEN et al., 2016; KALAJI et al., 2018). A cinética da fluorescência de Chl *a* foi estimada após as folhas serem submetidas a um pulso de luz vermelha saturante ( $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). As intensidades de fluorescência foram registradas entre 20  $\mu\text{s}$  e 1s, sendo obtidas as seguintes etapas: O ( $F_0$ , fluorescência inicial em 20  $\mu\text{s}$ ), L (150  $\mu\text{s}$ ), K (300  $\mu\text{s}$ ), J (2 ms), I (30 ms) e P ( $F_M$ , fluorescência máxima em  $\sim 300$  ms). Para uma avaliação detalhada das fases O-K e O-J, fez-se a normalização das curvas transientes como a fluorescência relativa variável da seguinte forma:  $W_{OK} = (F_T - F_0) / (F_K - F_0)$ ,  $W_{OJ} = (F_T - F_0) / (F_J - F_0)$ , respectivamente. As diferenças cinéticas foram calculadas a partir da variável fluorescência relativa, subtraindo-se o transiente das plantas sob estresse e controle:  $\Delta W_{OK} = [W_{OK}(\text{estresse}) - W_{OK}(\text{controle})]$ ,  $\Delta W_{OJ} = [W_{OJ}(\text{estresse}) - W_{OJ}(\text{controle})]$ , revelando a presença das bandas L e K, respectivamente. A partir das intensidades de fluorescência, os parâmetros estabelecidos pelo teste JIP (CHEN et al., 2016; OUKARROUM et al., 2016; STRASSER et al., 2010) foram calculados e estão apresentados na Tabela 3 (Apêndices).

Para o experimento 2, foi adicionado o decréscimo relativo de  $PI_{ABS}$  e  $PI_{TOTAL}$  dos genótipos testados, foram calculados como  $PI_{RELATIVO} = PI_{CONTROLE} / PI_{TRATAMENTO}$ , e utilizado como uma medida específica para as inibições induzidas pelo tratamento de déficit hídrico (JEDMOWSKI; BAYRAMOV; BRÜGGEMANN, 2014).

Logo após a coleta de dados da fluorescência transiente, três folhas foram retiradas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a temperatura de  $-80^\circ\text{C}$  para a realização das análises bioquímicas.

As plantas submetidas ao tratamento térmico de  $36^\circ\text{C}$  não foram amostadas para as análises bioquímicas levando-se em conta que o pinhão manso é uma

espécie bem adaptada a regiões quentes, onde temperaturas de 36°C são facilmente atingidas.

Todas as análises foram realizadas no Núcleo de Estudos da Fotossíntese, laboratório coordenado pela Profa. Dr<sup>a</sup>. Diolina Moura Silva, localizado na Universidade Federal do Espírito Santo, *campus* de Goiabeiras, Vitória/ES, prédio da Botânica/Departamento de Ciências Biológicas.

### 6.5 Índice de Sensibilidade ao Calor (ISC)

O Índice de sensibilidade ao calor (CHEN et al., 2016; OUKARROUM et al., 2016) corresponde aos valores absolutos de “a” na equação linear ( $ax + b$ ) originados da relação entre a força motriz do índice de desempenho (LogPIABS) e a fluorescência variável relativa no passo K ( $V_K$ ) (STRASSER et al., 2010; STRASSER et al., 2004). Neste trabalho, esses dois parâmetros foram calculados previamente com dados de plantas dos mesmos genótipos expostas a temperatura ambiente durante o verão de 2015 ( $T_{max} = 40^\circ\text{C}$  e  $T_{min} = 23^\circ\text{C}$ ) verificada com termômetro de temperaturas máximas e mínimas (Incoterm 5201.03.0.00), utilizando-se 10 repetições por genótipo. Tais plantas foram obtidas e cultivadas seguindo o mesmo protocolo que as plantas do atual trabalho.

### 6.6 Potencial hídrico da folha ( $\Psi_{wF}$ ) – Apenas para Experimento 2

Os potenciais hídricos foliares ( $\Psi_{wF}$ ) foram medidos aos 10 dias de déficit hídrico e após 10 dias de reidratação sendo coletada 1 folha de cada repetição dos genótipos (5 plantas de cada tratamento) nos períodos de antemanhã (04:00 – 05:00 h) e ao meio-dia (12:00 – 13:00 h) com uso de uma câmara de pressão do tipo Scholander (modelo 1000, PMS Instruments, Albany, NY, EUA) (SCHOLANDER et al., 1965). Os resultados foram expressos em mega Pascal (MPa) (LIMA NETO, Milton Costa et al., 2015; MENEZES-SILVA et al., 2017). Quando necessário, o excesso de látex extravasado pelo pecíolo no momento da retirada da folha era removido com papel toalha (FALQUETO et al., 2017; MAES et al., 2009).

Também foi aferido o grau de hidratação dos tecidos foliares (teor de água), determinado de acordo com a fórmula  $[(MF-MS) / MF] * 100$ , onde: MF significa

massa fresca e MS, massa seca. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

#### *6.7 Extrato etanólico para determinação de pigmentos fotossintéticos, antocianinas e carboidratos solúveis*

O extrato para determinar o conteúdo de pigmentos fotossintéticos, antocianinas e carboidratos solúveis foi preparado a partir de 180 mg de folhas frescas e macerado com 15 mL de etanol 95%, a 8°C. O extrato foi mantido no escuro (8°C, 48h) com agitação esporádica. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 1450 x g por 20 min e o sobrenadante coletado para análise.

#### *6.8 Conteúdo de pigmentos fotossintéticos*

Clorofilas (chl) e carotenoides (car) foram quantificados a partir da leitura do extrato etanólico no espectrofotômetro (Genesys 150 Uv-Vis - Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EUA) nos comprimentos de onda de 470, 648 e 664 nm. As concentrações de pigmento foram determinadas de acordo com (LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001):

$$\text{Clorofila a} = 13,36 * A_{664} - 5,19 * A_{648};$$

$$\text{Clorofila b} = 27,43 * A_{648} - 8,12 * A_{664};$$

$$\text{Clorofila total} = \text{Clorofila a} + \text{clorofila b};$$

$$\text{Carotenóides} = (1000 * A_{470} - 2,13 * \text{clorofila a} - 97,64 * \text{clorofila b}) / 209.$$

Onde:

A470 = absorvância a 470 nm;

A664 = absorvância a 664 nm;

A648 = absorvância a 648 nm.

Os valores foram expressos em mg por grama de massa fresca (mg g<sup>-1</sup> MF).

#### *6.9 Conteúdo de antocianinas*

O teor de antocianina foliar foi avaliado de acordo com o método de Beggs e Wellmann (1994), com modificações. O extrato etanólico foi misturado com ácido clorídrico (HCl) na proporção 100: 1 e mantido no escuro a 8°C por 48h com agitação esporádica. As leituras foram medidas a 535 nm em um espectrofotômetro (Genesys 150 Uv-Vis - Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts,

EUA). O teor de antocianina foi expresso como absorvância a 535 nm por grama de massa fresca ( $A_{535} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ).

#### *6.10 Carboidratos solúveis totais, sacarose e açúcares redutores*

A quantificação dos carboidratos solúveis totais seguiu o método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) usando uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de extrato etanólico, 450  $\mu\text{L}$  de água destilada, 500  $\mu\text{L}$  de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico. As leituras de absorvância foram feitas em um espectrofotômetro (Genesys 150 Uv-Vis - Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EUA) a 490 nm. Foi realizada uma curva de calibração utilizando glicose como padrão (de 0 a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de glicose;  $R^2 = 0,997$ ), sendo os resultados expressos em miligramas de glicose por grama de massa fresca ( $\text{mg de glicose g}^{-1} \text{ MF}$ ).

O conteúdo de sacarose foi baseado no método da antrona, conforme descrito por Riazi et al. (1985), que degrada a redução de carboidratos pela ação do hidróxido de potássio (KOH). Em um tubo de ensaio foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de extrato etanólico, 200  $\mu\text{L}$  de água destilada, 150  $\mu\text{L}$  de solução de KOH 5,4 N e colocado por 10 minutos a 97°C. Posteriormente, 3,5 mL de solução de antrona foi adicionado ao tubo, que permaneceram por mais 5 minutos a 97°C. Após o resfriamento, as amostras foram lidas a 620 nm em um espectrofotômetro (Genesys 150 UV-Vis - Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EUA). Um padrão de sacarose foi utilizado para a curva de calibração (de 0 a 50  $\mu\text{g}$  sacarose  $\text{mL}^{-1}$ ;  $R^2 = 0,974$ ). Os resultados da concentração de sacarose foram expressos em miligramas de sacarose por grama de massa fresca ( $\text{mg de sacarose g}^{-1} \text{ MF}$ ).

A estimativa do teor de carboidratos redutores em cada amostra foi realizada de acordo com Chaves Filho e Stacciarini-Seraphin (2001), subtraindo os valores de carboidratos solúveis totais daqueles obtidos para a sacarose. Os resultados foram expressos em miligramas por grama de massa fresca ( $\text{mg açúcares redutores g}^{-1} \text{ MF}$ ).

#### *6.11 Extração de proteínas para análise de enzimas*

Para a extração proteica, 200 mg de tecido foliar foram moídos em nitrogênio líquido e homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0,1  $\text{mol.L}^{-1}$ , pH 6,8),

EDTA dissódico (EDTA-Na<sub>2</sub>; 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>), ácido ascórbico 10 mmol.L<sup>-1</sup> e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v). Os extratos homogeneizados foram centrifugados a 12000 x g por 10 min a 4°C duas vezes. O sobrenadante resultante foi utilizado para as análises da cinética das enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX).

#### 6.12 Cinética da enzima Catalase (CAT)

A cinética da enzima CAT foi determinada pela adição de 20 µL de extrato enzimático a 2,9 mL de meio de reação contendo tampão fosfato de sódio (50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0) e peróxido de hidrogênio (10 mmol.L<sup>-1</sup>) (AEBI, 1984). As amostras foram lidas a 240 nm em um espectrofotômetro (Genesys 150 UV-Vis - Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EUA). A diminuição da absorbância foi monitorada por 3 min a 28°C. A atividade enzimática foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de 36 mol.L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e expresso em µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF.

#### 6.13 Cinética da enzima ascorbato peroxidase (APx)

A atividade da enzima ascorbato peroxidase foi baseada no método descrito por Nakano e Asada (1981). Uma alíquota de 20 µL do extrato enzimático foi misturada com 2,9 mL de meio de reação consistindo em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0), EDTA dissódico (EDTA-Na<sub>2</sub>) 0,1 mmol.L<sup>-1</sup> e ácido ascórbico 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>. A reação foi iniciada com a adição de 0,2 mmol.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o decaimento de absorbância a 290 nm foi monitorado em um espectrofotômetro (Genesys 150 UV-Vis - Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EUA) por 3 min a 28°C. A atividade da APX foi calculada com base no coeficiente de extinção molar de 2,8 mmol.L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e a atividade foi expressa como µmol ascorbato min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF.

#### 6.14 Conteúdo de prolina

O conteúdo de prolina foi analisado nos tecidos foliares pelo método da ninhidrina ácida (BATES et al., 1973). Aproximadamente 500 mg de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido e homogeneizados em 10 mL de ácido sulfossalicílico a 3% (p/v). Após a maceração, o conteúdo foi colocado em um tubo



do tipo falcon para processo de centrifugação (2600 x g) por 10 min. Em um tubo de ensaio com tampa foram adicionados 2 mL de extrato sobrenadante, 2 mL de ácido ninidrina (1,25 g ninidrina, 30 mL de ácido acético glacial, 20 mL de ácido fosfórico) e 2 mL de ácido acético glacial. As amostras foram incubadas a 97°C durante 1 h e a reação foi então parada com uso de banho de gelo por 5 min. Após o banho de gelo, 4 mL de tolueno foram adicionados ao tubo de ensaio e a mistura foi agitada por 20 s com a ajuda de um agitador de vórtice para extração completa da prolina. Após repouso de 1 minuto para a separação completa da fase, aspirou-se 3 mL da fração menos densa (cromóforo) com uma pipeta de vidro para leitura no espectrofotômetro a 520 nm (Genesys 150 Uv-Vis - Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EUA), utilizando o tolueno como branco. Foi feita uma curva padrão de prolina para comparar as absorvâncias (0 a 30 mg mL<sup>-1</sup>; R<sup>2</sup> = 0,993). A análise foi realizada em triplicatas com os resultados expressos em micromol de prolina por grama de massa fresca (µmol prolina g<sup>-1</sup> MF).

#### 6.15 Análise estatística

Experimento 1 - O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 4, com seis unidades experimentais por tratamento (n = 6). Os genótipos de *J. curcas* dispõem de três níveis (NEF05, NEF12, NEF16), enquanto o tratamento de temperatura dispõe de quatro níveis (28, 36, 45 e 56°C).

Experimento 2 - O experimento foi analisado em esquema fatorial 6 x 3, com cinco unidades experimentais por tratamento (n=5). Os genótipos de *J. curcas* dispõem de seis níveis (NEF05, NEF07, NEF10, NEF13, NEF14 e NEF16), enquanto o tratamento de déficit hídrico dispõe de dois níveis (controle, déficit hídrico e reidratação).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando o teste F foi significativo, foi realizada uma comparação de médias pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. A interação entre os níveis também foi avaliada. O software utilizado para ANOVA e teste de médias foi o InfoStat/Free versão estudantil 2017d e para a elaboração dos gráficos o software GraphPad Prism versão 5.03.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 EXPERIMENTO 1: TRATAMENTO DE CHOQUE TÉRMICO

#### 7.1.2 Fluorescência transiente da clorofila a e Índice de sensibilidade ao calor

O índice de sensibilidade ao calor mostrou que os genótipos NEF05, NEF12 e NEF16 apresentaram valores de 2,7262, 3,2046 e 2,8909, respectivamente (Figura 12). Esse resultado mostrou que, nos casos de estresse térmico, as plantas de genótipo NEF05 e NEF16 foram menos afetadas que as plantas NEF12. Ao interpretar esse índice, pode-se dizer que quanto maior o valor do ISC, maior a sensibilidade das plantas ao calor. Assim, as adesões poderiam ser classificadas em: tolerantes (NEF05 e NEF16) e sensíveis (NEF12).

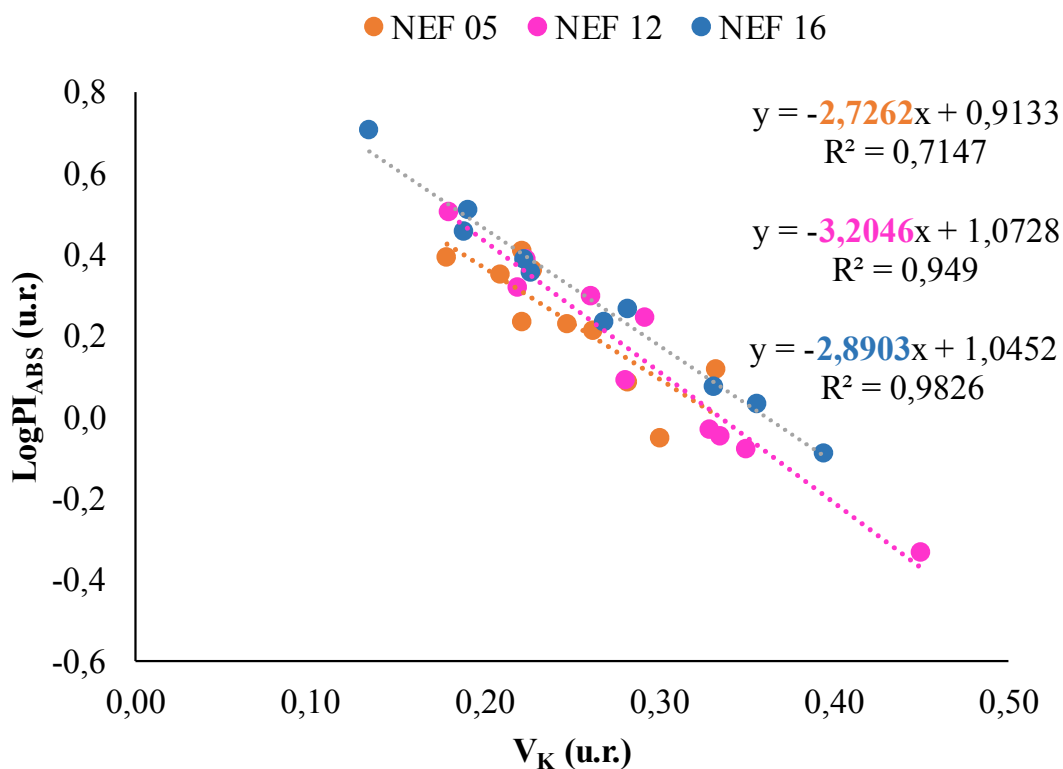


Figura 12: O índice de sensibilidade ao calor (ISC; valor absoluto de a na equação da linha  $(ax + b)$ ) de três genótipos de pinhão manso. O ISC foi calculado com base nos parâmetros do teste JIP:  $\text{LogPI}_{\text{ABS}}$  e  $V_K$ . Cada valor foi obtido a partir de 10 repetições.

A vitalidade da planta foi monitorada medindo-se o aumento da cinética de fluorescência da clorofila *in vivo* nos três genótipos de *J. curcas* analisados e as diferenças cinéticas das curvas OKLJIP. O aumento na cinética de fluorescência das plantas controle dos três genótipos apresentou uma forma típica na curva O-J-

I-P. O aumento na cinética de fluorescência nas plantas expostas a 36°C não diferiu dos respectivos controles (Figura 13).

Para plantas do genótipo NEF12 tratadas termicamente, o rápido aumento da fluorescência de indução perdeu completamente o transiente polifásico OJIP e se tornou uma linha reta a 45°C (Figura 13C). No entanto, o aumento da fluorescência das plantas NEF05 e NEF16 ainda manteve a curva polifásica de OJIP a 45°C. Nas plantas NEF05 e NEF16 foram observadas na curva de aumento de fluorescência OJIP de ambas as plantas que o transiente polifásico estava tendendo a uma linha reta a 56°C (Figura 13A e 13E). Isto significa que a esta temperatura a atividade fotossintética foi completamente inibida pelo tratamento térmico. Claramente, a resposta ao estresse térmico entre os genótipos de *J. curcas* foi bem diferente.

Ao normalizar a curva OJIP ( $V_T = (F_T - F_0)/(F_M - F_0)$ ), foi obtida a diferença cinética da fluorescência transitória ( $\Delta V_T = V_T (\text{tratamento}) - V_T (\text{controle})$ ), que permitiu analisar as diferenças em cada curva. Assim, foi possível observar o aparecimento de uma banda K nas plantas do genótipo NEF12 a temperaturas de 45 e 56°C (Figura 13D), e nas plantas de genótipo NEF05 e NEF16 apenas na temperatura de 56°C (Figura 13B - 13F). As plantas dos dois últimos genótipos mantiveram um comportamento cinético muito semelhante às plantas controle nas temperaturas 36 e 45°C.

Através do  $\Delta V_T$  foi possível analisar os transientes entre os passos O-J, O-L, O-K, J-I e I-P. Dentre essas etapas, apenas o genótipo NEF16 apresentou curva positiva quando a temperatura foi de 56°C (Figura 13F). As plantas dos genótipos NEF05 e NEF12 apresentaram curvas até o passo J, onde foi possível observar a presença da banda K (Figuras 13B e 13D).

A curva de indução de fluorescência Chl *a* foi normalizada a partir do passo O (20 ms) e do passo J (2 ms) pela equação  $W_{OJ} = (F_T - F_0) / (F_J - F_0)$ . A diferença cinética entre essas curvas ( $\Delta W_{OJ} = W_{OJ} (\text{tratamento}) - W_{OJ} (\text{controle})$ ) foi mostrada na Figura 14A-14C, evidenciando o aparecimento da banda K em 0,3 ms. Nas instalações de genótipo NEF12, a banda K apareceu na temperatura de 45 e 56°C (Figura 14B), enquanto nas plantas dos genótipos NEF05 e NEF16 ocorreu apenas na temperatura de 56°C, com valores significativamente maiores do que o genótipo intermediário.

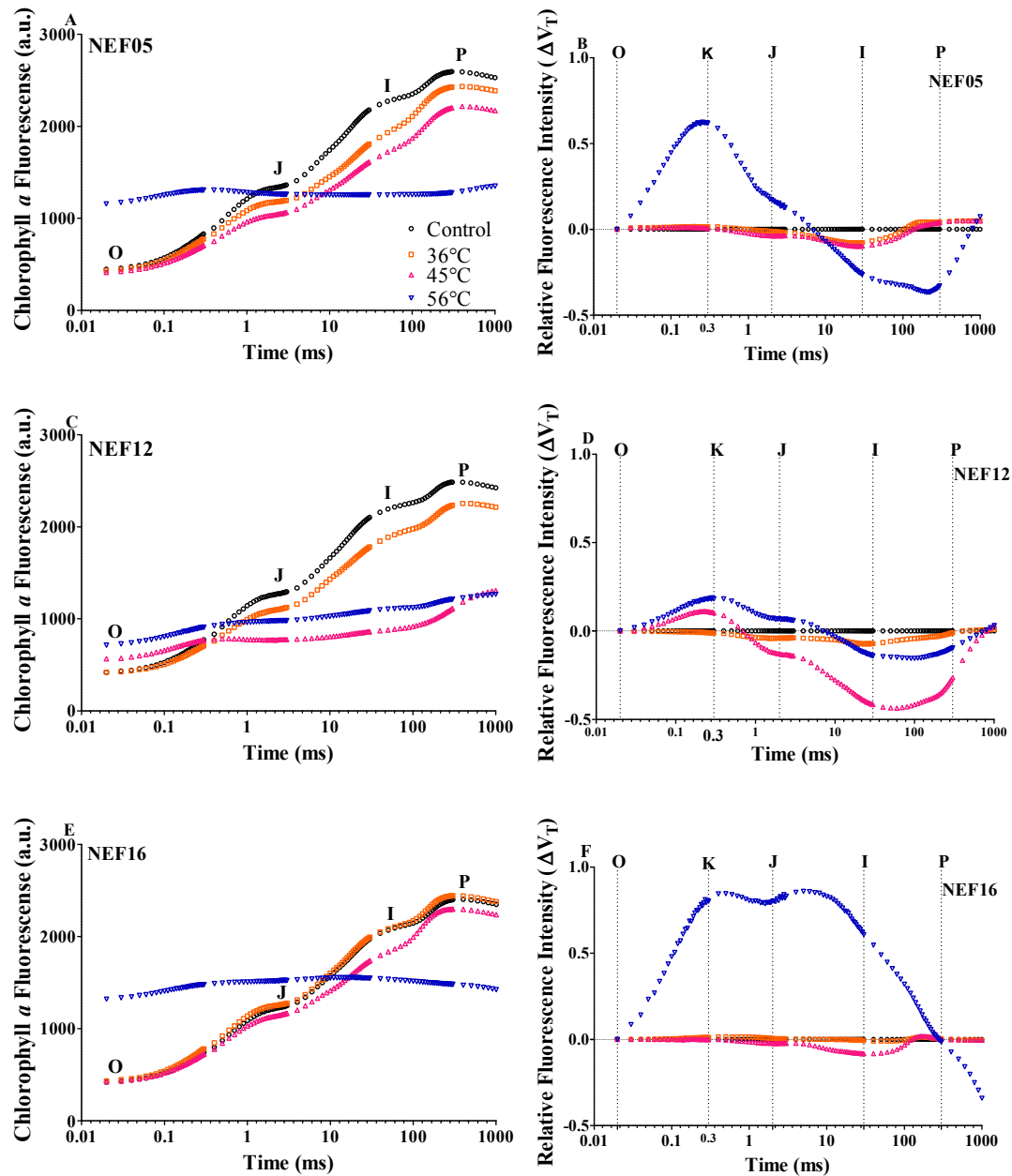


Figura 13: Intensidade da fluorescência da clorofila *a* em plantas de pinhão manso submetidas a temperaturas de 28°C (controle), 36°C, 45°C e 56°C. Cada valor é a média de 2 medições independentes, com 6 repetições para cada genótipo em cada temperatura.

Explorando ainda mais esta fase inicial da curva de indução, os dados entre o passo O e o passo K foram normalizados pela equação  $W_{OK} = (F_T - F_O) / (F_K - F_O)$ . A diferença cinética entre esses pontos evidenciou uma banda L em todas as plantas estudadas, em aproximadamente 150  $\mu$ s (Figura 14). Novamente, as plantas dos genótipos NEF12 apresentaram bandas quando submetidas a temperaturas de 45 e 56°C, confirmando que, para esse genótipo, essas temperaturas são muito

estressantes (Figura 14E). As plantas NEF05 e NEF16 apresentaram a banda L apenas a 56°C (Figura 14D e 14F).

A diferença cinética entre as curvas de fluorescência nos passos I-P ( $\Delta W_{IP} = W_{IP}(\text{tratamento}) - W_{IP}(\text{controle})$ ) foi mostrada na Figura 16, exibindo a aparência da banda G em aproximadamente 100 ms. No NEF05, a banda G positiva apareceu naquelas submetidas a temperaturas de 36 e 45°C (Figura 15A), enquanto as plantas submetidas a 56°C apresentaram curvas negativas, o que significa um bom uso de energia nas reações de oxirredução de o FSI. Nas plantas de genótipo ao NEF12, foram observadas curvas negativas em todos os tratamentos, o que indica que o FSI dessas plantas não foi afetado pelos tratamentos (Figura 15B). No genótipo ao NEF16, foram observadas curvas positivas em todos os tratamentos, o que mostra que nessas plantas o PSI foi afetado negativamente (Figura 15C).

O teste JIP apresenta-se como uma série de parâmetros capazes de expressar o passo-a-passo de cada etapa das curvas OJIP. Sendo assim, o teste foi utilizado para expor as principais diferenças fotoquímicas entre os genótipos de *J. curcas* quanto a sensibilidade ao calor das plantas expostas a altas temperaturas.

Todos os parâmetros mostraram p-valor significativo ao nível de 1% de probabilidade para a interação genótipo x temperatura, exceto a fluorescência variável no passo K ( $V_K$ ) que apresentou significância de 5% e o parâmetro que descreve a probabilidade de um éxciton capturado mover um elétron na cadeia de transporte de elétrons de  $Q_A^-$  para  $Q_B$  ( $\Psi E_0$ ) que não foi significativo (p-valor = 0,1982), Tabela 4.

Um dos parâmetros de suma importância do teste JIP, o índice de desempenho do FSII ( $PI_{ABS}$ ), mostrado na Figura 16, foi utilizado como indicador de vitalidade das plantas (CHEN et al., 2016). O  $PI_{ABS}$  diminuiu rapidamente quando as plantas NEF12 foram tratadas a uma temperatura de 45°C, no entanto, as plantas tolerantes NEF05 e NEF16 mostraram uma rápida diminuição na média de  $PI_{ABS}$  apenas quando tratadas à temperatura de 56°C. A partir dos dados da Figura 16 na posição de 45°C, o valor da média de  $PI_{ABS}$  das plantas NEF05, NEF12 e NEF16 foi de cerca de 4,07, 0,63 e 4,09, respectivamente, enquanto as plantas de controle (28°C) foram de 4,0.

Tabela 4: ANOVA dos parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a* em plantas dos genótipos NEF05, NEF12 e NEF16 de *J. curcas* após tratamento de estresse térmico sob as temperaturas de 28, 36, 45 e 56°C.

Fonte de Variação	p-valor											
	GL	F <sub>0</sub>	F <sub>M</sub>	CEO	RC/ABS	φP <sub>0</sub>	φD <sub>0</sub>	PI <sub>ABS</sub>	ΨE <sub>0</sub>	δR <sub>0</sub>	LogPI <sub>ABS</sub>	V <sub>K</sub>
Tratamento	11	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0081
Genótipo	2	0,0051	<0,0001	0,0002	<0,0001	0,0140	0,0140	<0,0001	0,0899	0,0019	0,1445	0,1045
Temperatura	3	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,0304
Genótipo*Temperatura	6	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,1982	<0,0001	0,0033	0,0341
Resíduo	60											
Total	71											
CV (%)		20,87	9,71	24,60	11,23	10,01	18,29	23,71	20,63	38,86	257,79	307,39

Tabela 5: Parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a* analisados em plantas dos genótipos NEF05, NEF12 e NEF16 de *J. curcas* após tratamento de estresse térmico sob as temperaturas de 28 (controle), 36, 45 e 56°C.

Variáveis	NEF05				NEF12				NEF16			
	28°C	36°C	45°C	56°C	28°C	36°C	45°C	56°C	28°C	36°C	45°C	56°C
F <sub>0</sub>	436,2 <sup>Dbb</sup>	439,2 <sup>Dbb</sup>	416,5 <sup>Dbb</sup>	799,5 <sup>Cbc</sup>	422,2 <sup>Dbb</sup>	421,0 <sup>Dbb</sup>	561,8 <sup>Dbb</sup>	1097,5 <sup>Bbc</sup>	423,3 <sup>Dab</sup>	429,3 <sup>Dab</sup>	416,7 <sup>Dbb</sup>	1427,3 <sup>Aaa</sup>
F <sub>M</sub>	2558,8 <sup>Aaa</sup>	2436,2 <sup>Aaa</sup>	2217,5 <sup>Bab</sup>	1360,0 <sup>Dac</sup>	2490,5 <sup>Aba</sup>	2246,3 <sup>Bba</sup>	1294,3 <sup>Dbb</sup>	1089,8 <sup>Dbc</sup>	2405,7 <sup>Aaa</sup>	2416,5 <sup>Aaa</sup>	2296,5 <sup>Bab</sup>	1789,5 <sup>Cac</sup>
CEO	1,00 <sup>Aaa</sup>	0,89 <sup>Aaa</sup>	0,87 <sup>Aab</sup>	-0,12 <sup>Cac</sup>	1,00 <sup>Aba</sup>	0,88 <sup>Aba</sup>	0,06 <sup>Bbb</sup>	0,24 <sup>Bbc</sup>	1,00 <sup>Aaa</sup>	0,97 <sup>Aaa</sup>	0,94 <sup>Aab</sup>	0,09 <sup>Bac</sup>
RC/ABS	0,53 <sup>Aba</sup>	0,50 <sup>Abb</sup>	0,49 <sup>Abc</sup>	0,04 <sup>Cbd</sup>	0,056 <sup>Aca</sup>	0,52 <sup>Acb</sup>	0,17 <sup>Bcc</sup>	0,07 <sup>Ccd</sup>	0,58 <sup>Aaa</sup>	0,54 <sup>Aab</sup>	0,54 <sup>Aac</sup>	0,08 <sup>Cad</sup>
φP <sub>0</sub>	0,83 <sup>Aaa</sup>	0,82 <sup>Aaa</sup>	0,82 <sup>Aab</sup>	0,19 <sup>Cac</sup>	0,83 <sup>Aba</sup>	0,81 <sup>Aba</sup>	0,55 <sup>Bbb</sup>	0,26 <sup>Cbc</sup>	0,82 <sup>Aaa</sup>	0,82 <sup>Aaa</sup>	0,82 <sup>Aab</sup>	0,18 <sup>Cac</sup>
φD <sub>0</sub>	0,17 <sup>Cbc</sup>	0,18 <sup>Cbc</sup>	0,18 <sup>Cbb</sup>	0,81 <sup>Aba</sup>	0,17 <sup>Cac</sup>	0,19 <sup>Cac</sup>	0,45 <sup>Bab</sup>	0,74 <sup>Aaa</sup>	0,18 <sup>Cbc</sup>	0,18 <sup>Cbc</sup>	0,18 <sup>Cbb</sup>	0,82 <sup>Aba</sup>
PI <sub>ABS</sub>	3,73 <sup>Aaa</sup>	3,98 <sup>Aaa</sup>	4,07 <sup>Aab</sup>	0,26 <sup>Bac</sup>	4,01 <sup>Aba</sup>	3,94 <sup>Aba</sup>	0,63 <sup>Bbb</sup>	0,03 <sup>Bbc</sup>	4,23 <sup>Aaa</sup>	3,67 <sup>Aaa</sup>	4,09 <sup>Aab</sup>	0,01 <sup>Bac</sup>
ΨE <sub>0</sub>	0,59 <sup>Aaa</sup>	0,63 <sup>Aaa</sup>	0,65 <sup>Aaa</sup>	0,47 <sup>Aab</sup>	0,59 <sup>Aaa</sup>	0,63 <sup>Aaa</sup>	0,68 <sup>Aaa</sup>	0,34 <sup>Bab</sup>	0,60 <sup>Aaa</sup>	0,59 <sup>Aaa</sup>	0,63 <sup>Aaa</sup>	0,24 <sup>Bab</sup>
δR <sub>0</sub>	0,34 <sup>Cab</sup>	0,50 <sup>Cab</sup>	0,50 <sup>Caa</sup>	0,95 <sup>Aaa</sup>	0,32 <sup>Cbb</sup>	0,40 <sup>Cbb</sup>	0,75 <sup>Bba</sup>	0,50 <sup>Cba</sup>	0,36 <sup>Cbb</sup>	0,39 <sup>Cbb</sup>	0,48 <sup>Cba</sup>	0,33 <sup>Cba</sup>

\*Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0.05$ ). Letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0.05$ ). Letras maiúsculas comparam a interação entre os genótipos e as temperaturas; as letras minúsculas comparam diferenças entre os genótipos e as letras em itálico comparam as diferenças entre as temperaturas.

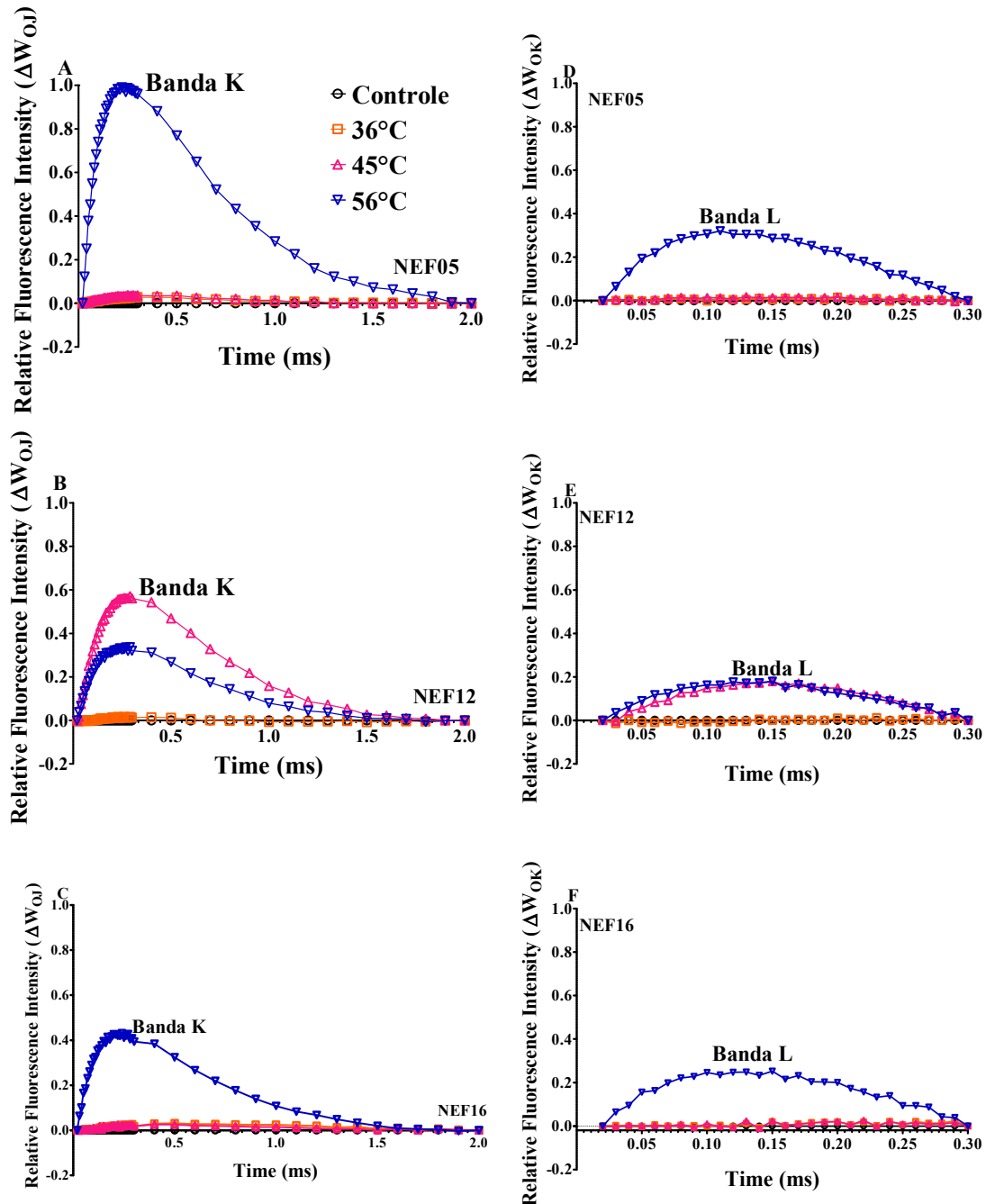


Figura 14: Respostas das bandas K e L das plantas de três genótipos de pinhão manso ao tratamento térmico. A-C - Diferenças cinéticas da fluorescência variável entre O-J ( $\Delta W_{OJ} = \Delta W_{OJ}(\text{tratamento}) - (\Delta W_{OJ}(\text{controle}))$ ); DF - Diferenças cinéticas da fluorescência da variável relativa entre as etapas OK, mostrando a aparência da banda L ( $\Delta W_{OK} = (\Delta W_{OK}(\text{tratamento})) - (\Delta W_{OK}(\text{controle}))$ ). As médias de 2 medições independentes com 6 repetições para cada genótipo em cada temperatura

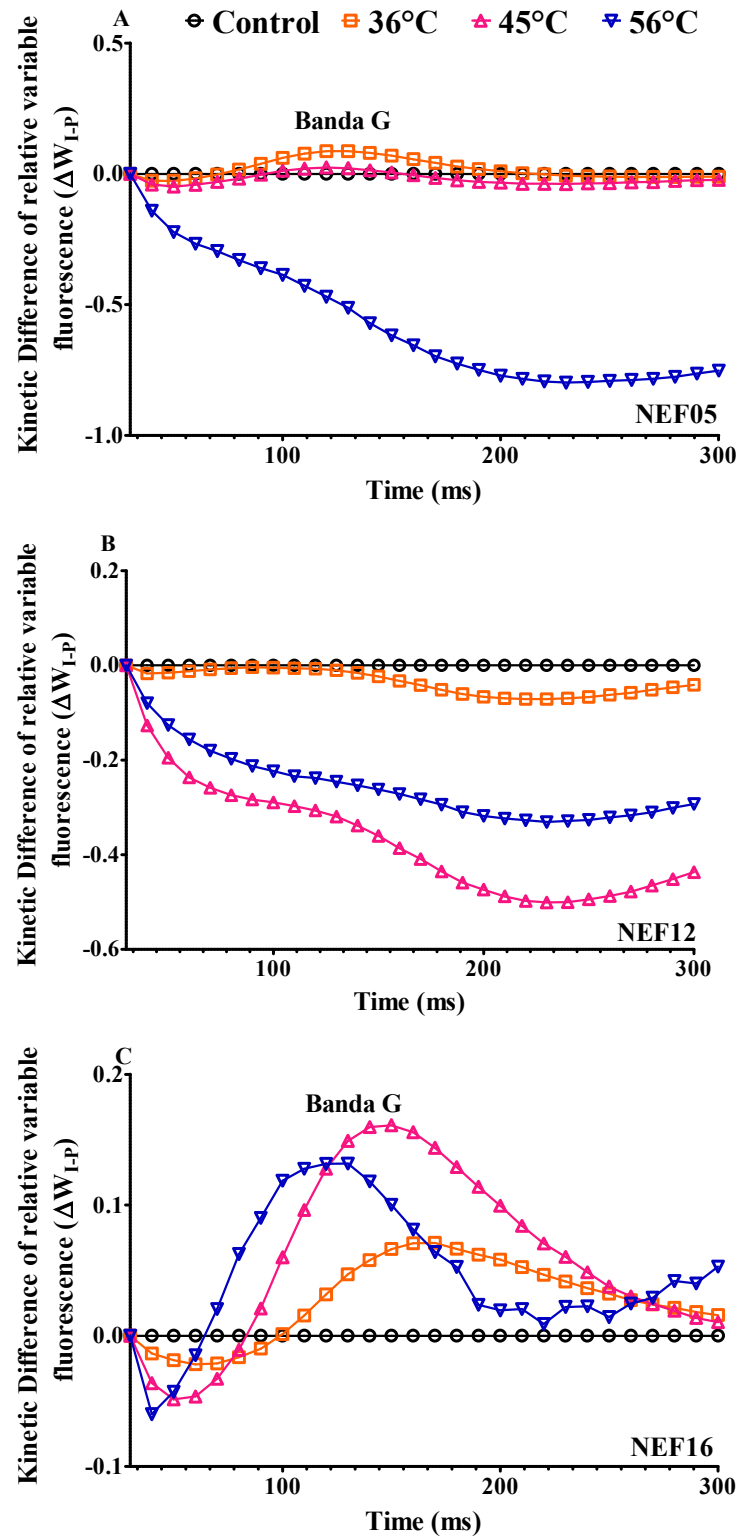


Figura 15: Bandas G em plantas de três genótipos de pinhão manso ao tratamento térmico. A-C - Diferenças cinéticas da fluorescência variável relativa entre I-P ( $\Delta W_{IP} = \Delta W_{IP(\text{tratamento})} - (\Delta W_{IP(\text{controle})}$ ). As médias são referentes a 2 medições independentes com 6 repetições para cada genótipo em cada temperatura.



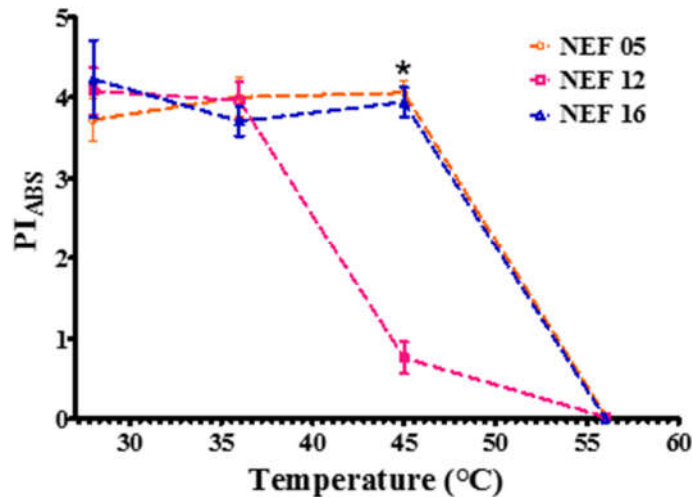


Figura 16: Índice de desempenho do fotossistema II,  $PI_{ABS}$ , de três genótipos de *J. curcas* (NEF05, NEF12, NEF16) submetidos as temperaturas de 28°C (controle), 36°C, 45°C e 56°C. Os dados representam as médias de 2 medições independentes, com 6 repetições para cada genótipo a cada temperatura testada. As barras representam o erro padrão da média. (\*) indica diferença significativa pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

A Figura 17 apresenta os dados de alguns parâmetros do teste JIP que podem contribuir para o estudo dos efeitos que o estresse térmico causado nas plantas de *J. curcas*, uma vez que o teste JIP combina parâmetros que ajudam a entender as modificações encontradas na curva indução de fluorescência Chl *a*. Pode-se observar na Figura 17A que na fração de centros de evolução do oxigênio (CEO) nas plantas consideradas sensíveis houve um grande declínio, passando de 1,0 a 28°C, atingindo 0,06 a 45°C. Porém, com a temperatura de 56°C, enquanto as plantas de NEF05 apresentaram queda significativa atingindo valores de -0,12, os genótipos NEF12 e NEF16 não diferiram nessa temperatura. O mesmo comportamento foi mostrado com os dados RC/ABS, Figura 17B. Para este parâmetro, no entanto, os dados são os mesmos à temperatura de 56°C. Na Figura 17C, o parâmetro  $F_0$  mostrou que até 45°C, as plantas do genótipo sensível, NEF12 e as plantas de genótipo tolerantes ao calor, NEF05 e NEF16, têm os mesmos resultados, mas a 56°C os resultados do NEF05 e as plantas NEF12 não mostram diferença significativa, sendo menores que os resultados das plantas NEF16.

Seguindo o mesmo padrão, a eficiência quântica máxima das reações fotoquímicas primárias de FSII ( $\phi P_0$ ) nas plantas NEF12 não diferiu significativamente dos outros genótipos a 28°C (controle) e 36°C, mas diminuiu de forma significativa de 0,83 a 28°C para 0,55 a 45°C, e 0,26 a 56°C. Não houve

diferença significativa entre as plantas dos três genótipos a 56°C, todas elas apresentaram os menores valores médios (Figura 17D e Tabela 5).

Adicionando a esses resultados o parâmetro  $\phi D_0$  (Figura 17E), foi possível observar que os genótipos mais tolerantes transportaram e utilizaram a energia capturada com mais eficiência, uma vez que apresentaram menor dissipação de energia. O genótipo NEF12 foi o que mais dissipou energia a 45°C, o que pode ser visto como uma forma de tentar preservar o aparato fotoquímico.

Com o objetivo de aprofundar o conhecimento sobre a cadeia de transporte de elétrons das plantas dos genótipos selecionados da pinhão manso, foram analisados os parâmetros  $\Psi E_0$ , que trata da eficiência das reações de redução de oxigênio no intersistema, e o parâmetro  $\delta R_0$ , que expressa a eficiência das reações de oxirredução do acceptor de elétrons do intersistema com os aceptores de elétrons finais do fotossistema I (FSI). Na Figura 17F, as maiores eficiências  $\Psi E_0$  foram encontradas nas plantas de NEF05 e NEF12 sob a temperatura de 45°C. Não houve diferença estatística entre as plantas dos três genótipos nas temperaturas de 28 e 36°C, enquanto na temperatura de 56°C, todas as plantas apresentaram os menores valores de  $\Psi E_0$ .

Analisando a eficiência das reações FSI, Figura 17G, as plantas do genótipo NEF05 apresentaram os maiores valores quando submetidas a uma temperatura de 56°C, seguidas pelas plantas de genótipo NEF12 sob uma temperatura de 45°C. Entretanto, as menores eficiências foram encontradas nas plantas submetidas às temperaturas mais amenas de 28 e 36°C.

Observou-se uma diminuição na fluorescência máxima,  $F_M$ , à medida que a temperatura foi aumentada (Figura 17H). As plantas dos genótipos NEF12 apresentaram uma diminuição nos valores deste parâmetro a partir da temperatura de 36°C. As plantas de NEF05 e NEF16 apresentaram uma diminuição significativa da  $F_M$  na temperatura de 56°C.

Após o tratamento com calor artificial nas temperaturas de 45 e 56°C, todas as plantas foram deixadas com as folhas muito comprometidas que caíram, aproximadamente, 5 dias após o tratamento. No entanto, as plantas de todos os genótipos apresentaram folhas jovens completamente expandidas 30 dias após o término do tratamento (Figura 18).

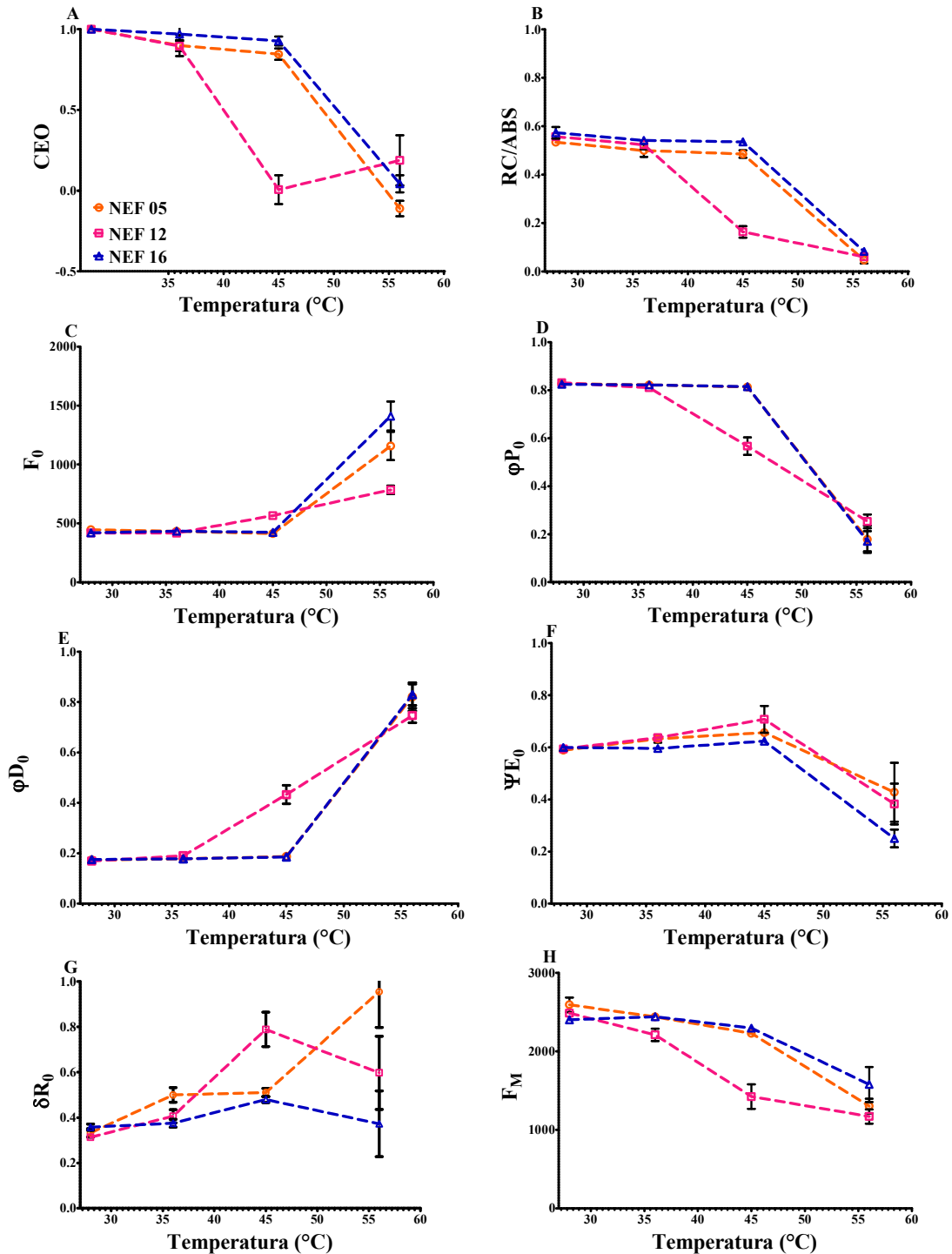


Figura 17: Efeito do tratamento térmico em alguns parâmetros do teste JIP realizado em plantas de três genótipos de pinhão manso. A- Fração dos centros de evolução do oxigênio (CEO). B- O rendimento quântico de PSII ( $\phi P_0$ ). C- Fluxo de absorção por seção transversal (ABS/ $SC_0$ ). D- Rendimento de dissipação de energia quântica ( $\phi D_0$ ). E- Densidade dos centros de reação ativos (RC/ABS). F- Probabilidade de um éxciton capturado mover um elétron na cadeia de transporte de elétrons de  $Q_A$  para  $Q_B$  ( $\Psi E_0$ ). G- Eficiência da oxirredução dos receptores de elétrons do intersistema para os aceptores finais de elétrons do FSI ( $\delta R_0$ ). H- Intensidade máxima de fluorescência ( $F_M$ ). Cada valor é a média de 2 medições independentes, com 6 repetições para cada genótipo em cada temperatura.

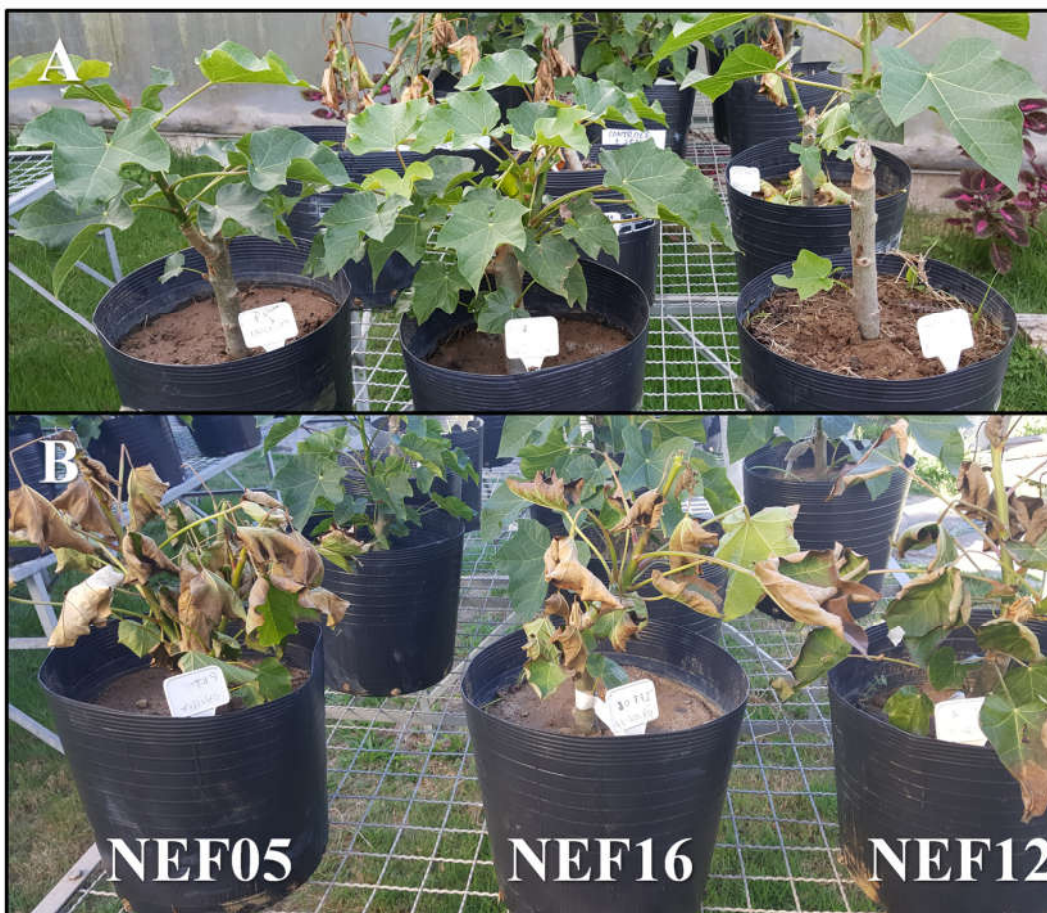


Figura 18: Plantas dos genótipos NEF05, NEF12 e NEF16 de *J. curcas* cinco dias após o tratamento térmico de 45°C (A) e 56°C (B).

### 7.1.3 Conteúdo de prolina

Os valores de prolina mostraram significância ao nível de 1% de probabilidade tanto entre os genótipos, quanto na interação genótipo x temperatura (Tabela 6). O teor de prolina (Figura 19) aumentou nas plantas dos genótipos NEF05, NEF12 e NEF16 à medida que a temperatura aumentou. Houve uma diferença estatística no conteúdo de prolina entre as plantas de controle (28°C) dos três genótipos (Figura 19). As plantas controle de NEF12 ( $4,6 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MF) apresentaram quantidade maior de prolina do que as plantas NEF05 e NEF16 ( $2,80$  e  $3,88 \mu\text{mol.g}^{-1}$  MF). As plantas submetidas a 45°C apresentaram aumento no conteúdo de prolina em relação às plantas controle e diferiram entre os genótipos.

O grupo de plantas submetidas a 56°C apresentou os maiores valores de conteúdo de prolina, com diferenças significativas entre os genótipos. As plantas NEF12 apresentaram os maiores valores registrados, com média de  $14,20 \mu\text{mol g}^{-1}$

<sup>1</sup> MF, o que corresponde a um valor 209% maior que as plantas controle, seguido pelo genótipo NEF05 cujas plantas apresentaram 11,85  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF (322% maior que a grupo de controle). No entanto, as plantas NEF16 não apresentaram diferença significativa entre os grupos submetidos a 45°C e o grupo submetido a 56°C. Nesse genótipo, as plantas submetidas a 45 e 56°C apresentaram aumento de 57,37% e 79,43%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 19).

Tabela 06: ANOVA dos parâmetros bioquímicos em plantas dos genótipos NEF05, NEF12 e NEF16 de *J. curcas* após tratamento de estresse térmico sob as temperaturas de 28, 45 e 56°C.

Fonte de Variação	GL	p-valor					
		PRO	APX	CAT	AST	SAC	AR
Tratamento	8	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Genótipo	2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Temperatura	2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Genótipo*Temperatura	4	<0,0001	<0,0001	0,0054	0,0006	0,0107	<0,0001
Resíduo	18						
Total	26						
CV (%)		13,27	13,47	12,61	3,78	5,62	7,12

Pro: prolina; APX: peroxidase; CAT: catalase; AST: açúcares solúveis totais; SAC: sacarose; AR: açúcares redutores. (n=3)

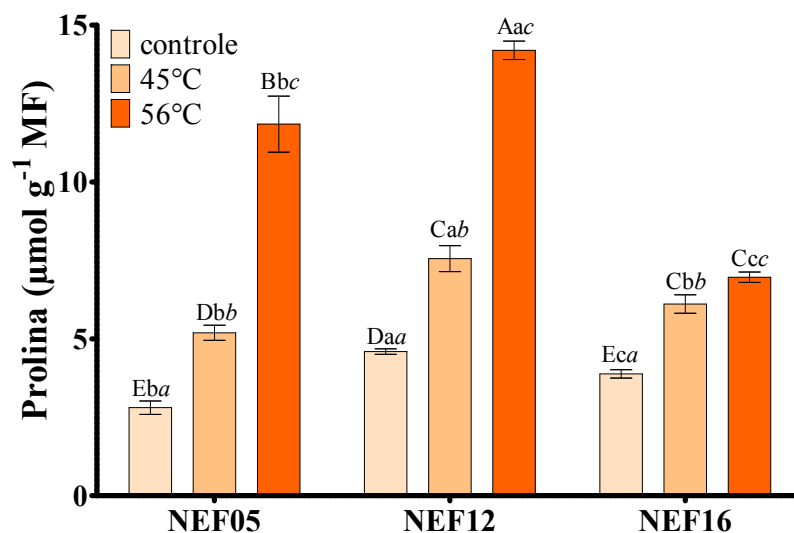


Figura 19: Teor de prolina em plantas de três genótipos de pinhão manso (NEF05, NEF12, NEF16) submetidas a estresse térmico por uma hora a 45 e 56°C. As plantas controle foram mantidas a 28°C. Cada valor corresponde à média de 2 medições independentes, com 3 repetições para cada genótipo em cada temperatura. Letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ). Letras maiúsculas comparam a interação entre os genótipos e as temperaturas; as letras minúsculas comparam diferenças entre os genótipos e as letras em itálico comparam as diferenças entre as temperaturas.

#### 7.1.4 Conteúdo de açúcares

Todos os teores de açúcares aqui estudados apresentaram resultados significantes ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott em todos os fatores de variação: genótipos, temperaturas e interação genótipo x temperatura, Tabela 6.

O teor total de carboidratos solúveis foi maior nas plantas controle NEF05 e nos genótipos NEF05 e NEF12 a 56°C (82,7, 81,9 e 83,2 mg g<sup>-1</sup> MF, respectivamente), Figura 20A. A 45°C, os valores mais altos foram encontrados nas plantas de genótipo NEF05, que apresentaram valores semelhantes ao grupo controle do genótipo NEF12 (73,1 e 78,1 mg g<sup>-1</sup> MF, respectivamente). As plantas submetidas a essa temperatura não apresentaram diferença significativa entre os genótipos NEF12 e NEF16. As plantas de controle NEF16 apresentaram os menores valores de carboidratos solúveis totais, e as plantas submetidas a 45°C não diferiram das plantas de controle, com um aumento desses valores apenas no grupo submetido a 56°C (Figura 20A).

Em relação ao teor de sacarose, os maiores valores foram encontrados nas plantas do grupo controle do genótipo NEF05 (66,6 mg g<sup>-1</sup> MF). As plantas do grupo controle de NEF12 e NEF16 não diferiram (51,7 e 53,9 mg g<sup>-1</sup> MF, respectivamente). Em todos os genótipos, as plantas submetidas a 45°C não apresentaram diferença significativa e no genótipo NEF16 obtiveram médias semelhantes as plantas submetidas a 56°C. Já no genótipo NEF12, não houve diferença significativa entre as plantas controle e a 56°C. As plantas controle de NEF05 e NEF12 não diferiram (Figura 20B).

Analisando o teor de açúcares redutores (Figura 20C), os maiores valores foram encontrados nas plantas submetidas a 56°C do genótipo NEF12 (32,8 mg g<sup>-1</sup> MF), seguidas pelas plantas de genótipo NEF05 submetidas à mesma temperatura (28,5 mg g<sup>-1</sup> MF). Entre as plantas de controle, foi observado que o maior teor desses açúcares foi encontrado no genótipo ao NEF12, seguido pelo genótipo NEF05 e depois do genótipo NEF16 com diferenças significativas (16,1, 26,4, 10,3 mg g<sup>-1</sup> MF, respectivamente). No genótipo NEF05, observou-se que, à medida que a temperatura aumentava, havia um aumento significativo no teor de açúcares redutores.

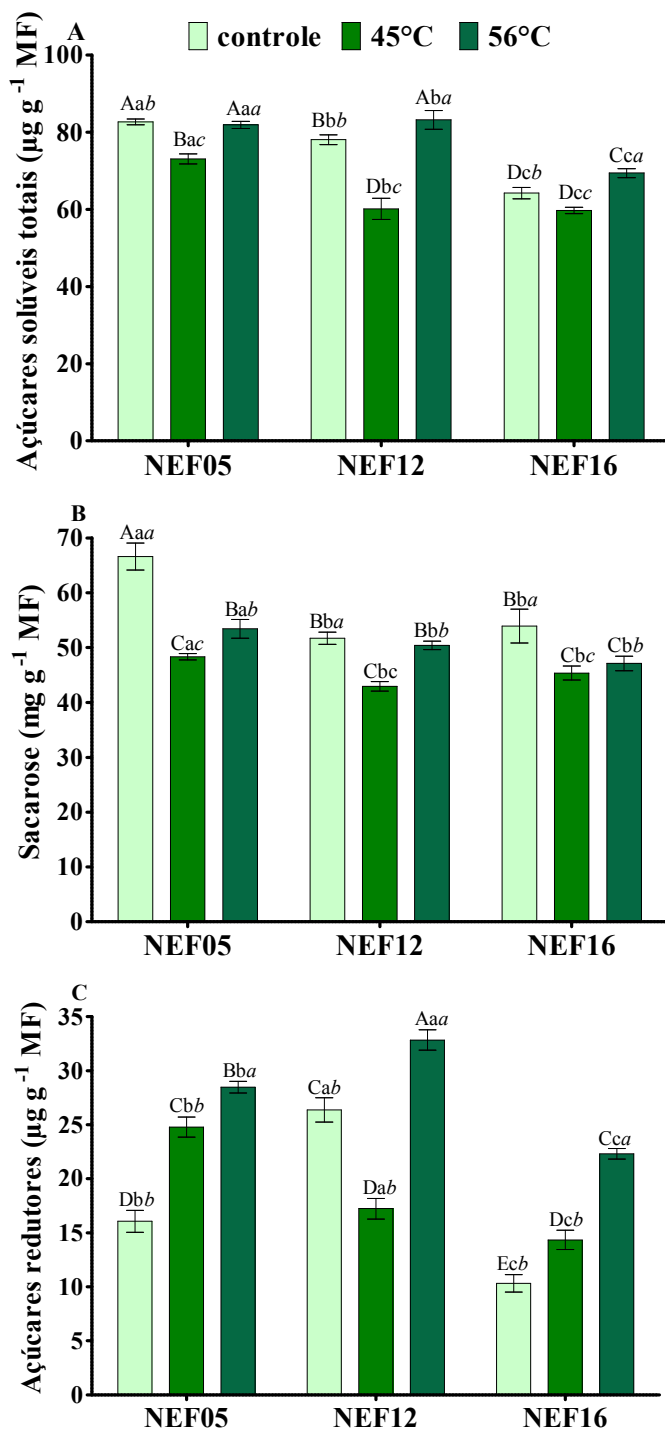


Figura 20: Efeito do estresse térmico no teor de açúcares solúveis totais (A), no teor de sacarose (B) e no teor de açúcares redutores (C) em plantas de três genótipos de pinhão manso (NEF05, NEF12, NEF16) submetidos ao tratamento de choque térmico por 1 hora a 45 e 56°C. Cada valor é a média de 2 medições independentes, com 3 repetições em cada temperatura. Letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ). Letras maiúsculas comparam a interação entre os genótipos e as temperaturas; as letras minúsculas comparam diferenças entre os genótipos; as letras em itálico comparam as diferenças entre as temperaturas.

O mesmo padrão pôde ser observado para as plantas do genótipo NEF16, mas com valores significativamente mais baixos. Esse padrão não pôde ser observado nas plantas NEF12, onde houve uma diminuição no teor dos açúcares redutores nas plantas sujeitas a 45°C. No entanto, vale ressaltar que em todos os genótipos, nas plantas expostas à temperatura mais estressante (56°C), foi observado um aumento significativo no conteúdo de açúcares redutores em comparação ao conteúdo encontrado nas plantas do grupo controle.

#### *7.1.5 Conteúdo de pigmentos fotossintéticos e antocianinas*

Quanto ao teor de clorofila *a*, as plantas NEF05 apresentaram aumento de aproximadamente 32% quando submetidas aos tratamentos a 45 e 56°C (Tabela 7). As plantas de controle NEF12 apresentaram valores médios de 0,72 mg g<sup>-1</sup> MF. As plantas submetidas a 45°C não apresentaram diferença significativa das plantas controle, enquanto as de 56°C apresentaram médias de 0,36 mg g<sup>-1</sup> MF, diminuição significativa de 50% no teor de clorofila *a*. Nas plantas NEF16, não houve diferença significativa entre as plantas submetidas a tratamentos térmicos e o grupo controle.

As plantas de NEF05 aumentaram em aproximadamente 34% o teor de clorofila *b* quando submetidas aos tratamentos a 45 e 56°C. As plantas de controle NEF12 apresentaram valores médios de 0,22 mg g<sup>-1</sup> MF. Os indivíduos submetidos a 45°C não apresentaram diferença significativa das plantas controle, enquanto aqueles a 56°C apresentaram médias de 0,09 mg g<sup>-1</sup> MF, queda significativa de 56,4% no teor de clorofila *b*. Nas plantas NEF16, não houve diferença significativa entre o grupo controle e as submetidas a 45°C, mas as plantas submetidas ao tratamento térmico mais severo apresentaram uma redução de 25,8% em relação ao grupo controle.

As plantas de genótipo NEF05 apresentaram um aumento de 17,3% e 24% no conteúdo de pigmentos carotenoides quando submetidas a tratamentos a 45 e 56°C, respectivamente. As plantas de controle de genótipo NEF12 apresentaram valores médios de 0,16 mg g<sup>-1</sup> MF. As plantas submetidas a 45 e 56°C apresentaram médias de 0,14 e 0,11 mg g<sup>-1</sup> MF, respectivamente, diminuição significativa de 12 e 32% no conteúdo de pigmentos carotenoides. Nas plantas NEF16, não houve diferença significativa entre as plantas do grupo controle e as submetidas aos tratamentos a 45 e 56°C (Tabela 7).



Em relação ao teor de antocianina, o NEF05 apresentou um aumento de 39,23% e 71,95% nos tratamentos a 45 e 56°C, respectivamente, em comparação ao grupo controle. As plantas de NEF12 apresentaram uma diminuição de 17,7% no teor de antocianina no tratamento a 45°C, no entanto, as plantas do tratamento 56°C apresentaram um aumento de 50,7%. Por outro lado, as plantas NEF16 apresentaram menor teor de antocianina com o aumento da temperatura. As plantas submetidas a 45 e 56°C apresentaram uma diminuição de aproximadamente 13% quando comparadas às plantas controle.

Tabela 7: Teor de pigmentos fotossintéticos e antocianinas em plantas dos genótipos NEF05, NEF12 e NEF16 de *J. curcas* submetidas as temperaturas de 28, 45 e 56°C.

Genótipos	Temperatura (°C)	Chl <i>a</i> (mg g <sup>-1</sup> MF)	Chl <i>b</i> (mg g <sup>-1</sup> MF)	Chl total (mg g <sup>-1</sup> MF)	Chl <i>a/b</i>	Carotenoides (mg g <sup>-1</sup> FM)	Antocianinas (A535 g <sup>-1</sup> MF)
NEF05	28	0,53±0,03 Bba	0,17±0,01 Cba	0,69±0,03 Cba	3,18±0,10 Bbb	0,15±0,01 Baa	1,06±0,03 Ebb
	45	0,71±0,03 Aba	0,23±0,00 Bba	0,95±0,03 Bba	3,05±0,18 Bbb	0,18±0,01 Aaa	1,47±0,01 Dbb
	56	0,68±0,03 Abb	0,21±0,01 Bbb	0,89±0,04 Bbb	3,23±0,03 Bba	0,19±0,01 Aaa	1,82±0,07 Bba
NEF12	28	0,72±0,01 Aca	0,22±0,02 Bca	0,94±0,03 Bca	3,35±0,21 Bab	0,16±0,01 Aba	1,42±0,05 Cab
	45	0,63±0,03 Aca	0,20±0,01 Bca	0,83±0,04 Bca	3,10±0,02 Bab	0,14±0,01 Bba	1,17±0,08 Eab
	56	0,36±0,03 Ccb	0,09±0,01 Dcb	0,46±0,04 Dcb	3,82±0,14 Aaa	0,11±0,01 Bba	2,15±0,06 Aaa
NEF16	28	0,80±0,03 Aaa	0,28±0,01 Aaa	1,09±0,03 Aaa	2,84±0,02 Bbb	0,18±0,01 Aaa	1,63±0,05 Cbb
	45	0,76±0,02 Aaa	0,24±0,01 Aaa	1,00±0,02 Aaa	3,09±0,05 Bbb	0,19±0,00 Aaa	1,44±0,04 Dbb
	56	0,70±0,05 Aab	0,21±0,01 Bab	0,91±0,05 Bab	3,31±0,15 Bba	0,17±0,02 Aaa	1,38±0,04 Dba

Os valores são medias ± erro padrão. Letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ). Letras maiúsculas comparam a interação entre os genótipos e as temperaturas; as letras minúsculas comparam diferenças entre os genótipos e as letras em itálico comparam as diferenças entre as temperaturas.

### 7.1.6 Atividade enzimática

O tratamento de calor mostrou forte significância sobre a atividade enzimática (Tabela 6). Tanto a enzima catalase quanto a peroxidase do ascorbato apresentaram respostas significativas ao nível de 1% de probabilidade em resposta aos fatores de variação.

Em relação à atividade da enzima catalase (CAT), foram observadas diferenças significativas entre os genótipos. Plantas do genótipo NEF05 submetidas aos tratamentos de 45 e 56°C não diferiram uma da outra, mas apresentaram duas vezes mais atividade da CAT (0,152 e 0,155  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$ , respectivamente) quando comparadas às plantas controle (0,075  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$ ), Figura 21A.

As plantas NEF12 mostraram um aumento na atividade de CAT à medida que a temperatura aumentou. No tratamento de 45°C, observou-se um aumento de 155% na atividade dessa enzima, enquanto no tratamento a 56°C, o aumento foi de 221%, quando comparado ao controle (0,093  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$ ). Já as plantas do genótipo ao NEF16 apresentaram comportamento semelhante ao das plantas do genótipo ao NEF12, com um aumento gradual da atividade enzimática de acordo com a temperatura. Observou-se que as plantas submetidas a 45°C e 56°C apresentaram aumento de 374% e 334%, respectivamente, em relação às plantas controle. Dentre todos os genótipos, as plantas de genótipo ao NEF12 apresentaram a maior atividade da enzima CAT no tratamento a 56°C (Figura 21A).

Houve uma diferença significativa na atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) nos genótipos NEF05, NEF12 e NEF16 em relação aos tratamentos térmicos. Uma tendência semelhante foi observada entre as plantas dos genótipos NEF05 e NEF16, uma vez que essas plantas não diferiram significativamente entre as plantas controle e as submetidas a 45°C, porém apresentaram um aumento de 254% e 437%, respectivamente, quando comparadas às plantas do grupo controle. Enquanto as plantas de genótipo NEF12 no grupo submetido a 45°C apresentaram uma diminuição de 54% na atividade de APX, naquelas no grupo submetido a tratamento a 56°C, um aumento de 418% foi observado quando comparado ao grupo controle. Observou-se que entre os genótipos, NEF12 foi o que apresentou a maior atividade enzimática no tratamento de calor mais severo (Figura 21B).

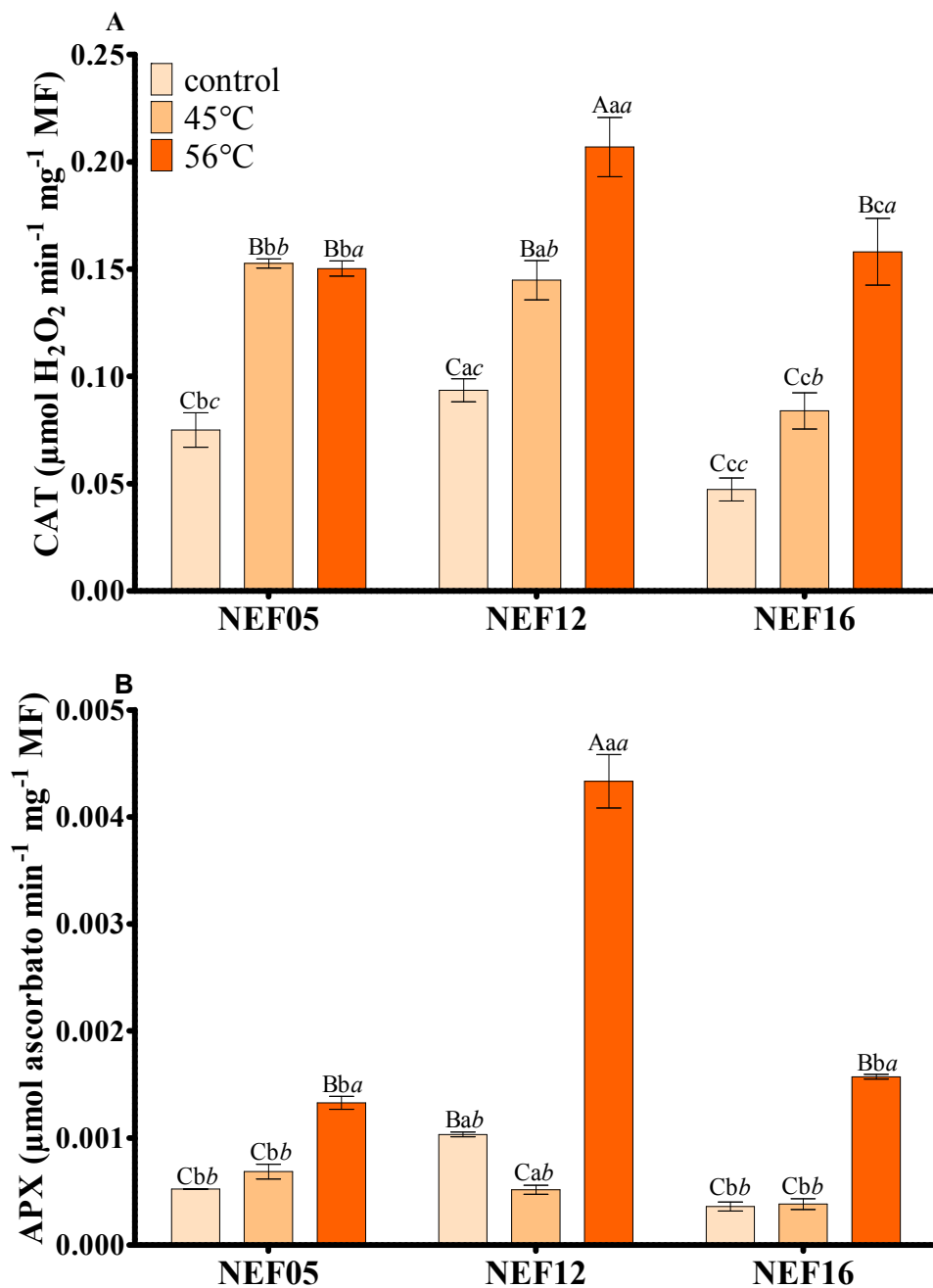


Figura 21: Efeito do estresse térmico na atividade das enzimas (A) catalase (CAT) e (B) ascorbato peroxidase (APX) em plantas de três genótipos de noz (NEF05, NEF12, NEF16), submetidas ao calor por 1 hora a temperaturas 28°C (controle), 45°C e 56°C. Cada valor é uma média de 2 medições independentes, com 3 repetições para cada genótipo a cada temperatura. Letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ). Letras maiúsculas comparam a interação entre os genótipos e as temperaturas; as letras minúsculas comparam diferenças entre os genótipos e as letras em *itálico* comparam as diferenças entre as temperaturas.

O índice de sensibilidade ao calor é uma ferramenta que ajuda a distinguir diferentes grupos de plantas de acordo com a capacidade dessas plantas de suportar altas temperaturas (CHEN et al., 2016). No artigo citado acima, os autores determinaram o HSI estudando a fluorescência transitória da clorofila a em plantas de quatro populações de croftonweed coletadas no sul da Índia. Ao final do estudo, os autores concluem que a força motriz total para a fotossíntese ( $\text{LogPI}_{\text{ABS}}$ ) e a dissociação do complexo evolutivo de oxigênio ( $V_K$ ) (OUKARROUM et al., 2016) são parâmetros que, quando correlacionados, podem garantir a separação das plantas indicando aquelas que são mais sensíveis, intermediárias e tolerantes ao calor. No presente trabalho, utilizando o ISC, observou-se que plantas de diferentes genótipos de *J. curcas* também podem ser separadas por esse método. Os resultados do ISC foram verificados através da análise das curvas OJIP e dos parâmetros do teste JIP.

O estresse térmico desestabiliza o FSII devido a alterações nas membranas tilacóides e a liberação do íon Mn das proteínas estabilizadoras de manganês (cluster Mn) no centro de reação do FSII, o que leva a uma menor taxa de transporte de elétrons e a um tempo maior para atingir a intensidade máxima de fluorescência (JAIN et al., 2018). A banda K evidenciada na fase O-J ( $\Delta W_{OJ}$ ) da diferença cinética entre as curvas transitórias foi demonstrada pelas plantas de todos os genótipos. Essa fase do J-O indica o fechamento do PSII devido à redução do controle de qualidade e o aparecimento da banda K em cerca de 0,3 ms (STIRBET e GOVINDJEE, 2011) mostrou que houve mudanças significativas em relação ao lado doador de FSII na CTE fotossintética dessas plantas quando expostas a altas temperaturas (JAIN et al., 2018). O valor do pico K foi relatado em trabalho anterior como um indicador de calor em relação à resposta da planta a alta temperatura (CHEN et al., 2016; JAIN; SINGH; PANDEY; RAMYA; SINGH; PRABHU, 2018; OUKARROUM; EL MADIDI; STRASSER, 2016; OUKARROUM; GOLTSEV; STRASSER, 2013).. A banda L foi visualizada na diferença cinética das curvas transitórias na fase O-K ( $\Delta W_{OK}$ ) de todos os genótipos, mostrando menor conectividade entre as diferentes unidades PSII sob estresse de temperatura. O componente mais sensível ao estresse de alta temperatura no aparelho fotossintético é o FSII, cuja desestabilização se torna um fator limitante para a fotossíntese (ZHOU, R. et al., 2017) e, conseqüentemente, leva a uma redução nas

taxas de assimilação de CO<sub>2</sub> e um aumento na produção de EROs que inibem o reparo de FSII (TAN et al., 2020).

A ausência da fase J-I nas plantas tolerantes (NEF05 e NEF16), observadas à temperatura de 56°C, e nas plantas sensíveis (NEF12) a 45°C, demonstrou a incapacidade de reduzir os aceptores de elétrons Q<sub>B</sub>, plastoquinona e citocromo b<sub>6</sub>f nestas plantas sob estresse térmico.

A cadeia de transporte de elétrons foi significativamente afetada pelo estresse térmico ao qual as plantas de genótipo de *J. curcas* foram submetidas. O aumento de F<sub>0</sub> e a diminuição da F<sub>M</sub> foram observados nas curvas OJIP de 45°C nas plantas sensíveis e 56°C nas plantas tolerantes. O aumento de F<sub>0</sub> foi atribuído à separação física do FSII dos complexos de pigmentos associados (antenas) (OUKARROUM et al., 2016; STIRBET e GOVINDJEE, 2011).

A avaliação da resposta dos diferentes genótipos ao CEO mostrou uma diminuição significativa observada a 45°C nas plantas NEF12 e a 56°C nas plantas NEF05 e NEF16. A consequência da destruição do complexo de evolução do oxigênio foi a inibição da cadeia fotossintética de transporte de elétrons (OUKARROUM et al., 2016; STRASSER et al., 2004).

O aumento significativo da fluorescência variável em relação a 0,3 ms (banda K), a diminuição da densidade do centro de reação ativo (RC/ABS), a diminuição da eficiência quântica do PSII ( $\phi P_0$ ) e a diminuição da probabilidade de um éxciton capturado se mover o elétron após o QA- ( $\Psi E_0$ ) sugere que o centro de reação do lado doador e do receptor de PSII foi significativamente inibido e que a estabilidade térmica do mecanismo fotossintético foi reduzida. Observações semelhantes foram feitas em folhas senescentes de *Vitis vinifera* L. cv. Red Globe que sofreu estresse térmico de curto prazo (ZHANG et al., 2018).

Corroborando com os resultados encontrados, temos o parâmetro  $\phi D_0$ , que aumentou enquanto os parâmetros de eficiência fotoquímica decaíram. A redução dos centros de reação ativos pode ter sido a causada pela transformação da energia de excitação em calor; portanto, os RCs, em vez de encaminhar os éxcitons para a plastoquinona, dissipam toda a energia retida como calor (JAIN; SINGH; PANDEY; RAMYA; SINGH; PRABHU, 2018).

Além da diminuição nos parâmetros acima, também foi observada a diminuição no índice de desempenho do FSII (PI<sub>ABS</sub>). O PI<sub>ABS</sub> é uma expressão multiparamétrica e foi amplamente utilizado para identificar a vitalidade da planta

exposta ao estresse ambiental e leva em consideração as principais etapas funcionais: a densidade dos centros de reação ativos pela clorofila (RC/ABS), a razão do rendimento quântico taxa de FSII ( $\phi P_0 / (1-\phi P_0)$ ); termo conformacional) e a eficiência da conversão de energia de excitação no transporte de elétrons em direção ao pool de plastoquinona ( $\Psi E_0 / (1-\Psi E_0)$ ) (STRASSER et al., 2004). Vários estudos apontam que o  $PI_{ABS}$  é um indicador muito sensível do estado fisiológico das plantas submetidas a estresse ambiental (Oukarroum et al., 2013, 2016). Neste estudo, houve uma clara diferenciação entre os genótipos mais sensíveis e menos sensíveis desse parâmetro.

Alterações na fase I-P (banda G) que se referem à redução de transportadores de elétrons, como a ferredoxina e o NADP, presentes no final da cadeia de transporte de elétrons no PSI e no parâmetro  $\delta R_0$ , que quantifica a eficiência dessas reações, mostraram que houve um aumento dessa eficiência nas plantas de genótipo NEF05 e NEF12 submetidas, respectivamente, a temperaturas de 56°C e 45°C. Resultado semelhante foi encontrado por Chen et al. (2016) ao analisar a fase IP em genótipos de trigo submetidos ao estresse térmico, os autores concluíram que o aumento da atividade do FSI não é a verdadeira razão pela qual as plantas desenvolvem tolerância ao estresse térmico, pois, embora o estresse térmico tenha consequências negativas no FSI, os efeitos da alta temperatura no FSII são mais visíveis (KALAJI et al., 2018) devido à sua maior sensibilidade (OUKARROUM et al., 2016).

O aumento gradual da temperatura foi acompanhado pelo acúmulo de prolina em plantas estressadas, indicando que esse aminoácido está fortemente associado à capacidade das plantas de tolerar o calor. De acordo com Gosavi et al. (2014), a prolina acumulada sob condição de estresse térmico pode atuar como um osmoprotetor em resposta ao estresse térmico, evitando a dessecação e ajudando a manter a integridade das membranas citoplasmáticas. Os mesmos autores encontraram um aumento percentual no conteúdo de prolina sob tratamento com estresse térmico nos genótipos de sorgo tolerantes à seca, seguidos pelos genótipos selvagens e suscetíveis.

Embora o genótipo ao NEF12 tenha sido classificado como o mais sensível ao estresse térmico pelo HSI, o acúmulo de prolina foi mais expressivo nas plantas desse genótipo, tanto nas condições de controle quanto nos tratamentos de temperatura de 45°C e 56°C. Assim, a quantidade de prolina acumulada nos

tratamentos de temperatura parece não afetar a integridade do FSII, no entanto, ao analisar os resultados nas curvas de diferença da fluorescência variável entre as etapas IP ( $\Delta W_{IP}$ ), que indica a redução da taxa de ferredoxina (KALAJI et al., 2018) e a eficiência de oxidação dos aceptores finais de elétrons do FSI ( $\delta R_0$ ), pode-se verificar que o genótipo ao NEF12 apresentou bandas G negativas e um valor médio de  $\delta R_0$  de 0,6, indicativo de que o fluxo de elétrons no FSI permaneceu ativo mesmo com os resultados verificados no PSII sob altas temperaturas. Segundo Oukarroum et al. (2013) o estresse térmico moderado, em torno de 40°C, aumenta a atividade do FSI e é capaz de acelerar sua oxidação em plantas sujeitas a até 50°C.

Quanto aos genótipos considerados menos sensíveis ao calor pelo ISC, o genótipo ao NEF05 também apresentou uma banda G negativa a 56°C e os maiores valores de  $\delta R_0$  (0,95). Enquanto o genótipo NEF16 mostrou bandas G positivas em todas as temperaturas, indicando que nas plantas desse genótipo o fluxo de elétrons nos fotossistemas I e II foi comprometido pelo tratamento

Esses resultados indicam que os tratamentos térmicos foram suficientes para causar danos ao FSI em diferentes níveis, dependendo do genótipo analisado, podendo-se dizer que nas plantas dos genótipos de *J. curcas* L., NEF05, quando submetidas a condições térmicas estressantes, manteve o fluxo de elétrons cíclico (fotofosforilação cíclica), permitindo a oxidação da ferredoxina e a manutenção da produção de ATP (JOHNSON, 2011).

Os tratamentos térmicos tiveram efeitos diferentes no conteúdo de pigmentos de cada genótipo. As clorofilas são responsáveis pela conversão da radiação luminosa em energia, na forma de ATP e NADPH, portanto estão intimamente relacionadas à eficiência fotossintética e, conseqüentemente, ao crescimento e adaptabilidade das plantas a diferentes ambientes. No presente estudo, observou-se que as plantas do genótipo NEF05 submetidas a tratamentos a 45 e 56°C apresentaram maior teor de clorofila *a*, *b* e total do que aquelas sob condições de controle, porém a maior eficiência fotoquímica foi encontrada nas plantas de controle. Esses dados corroboram o trabalho de Kalaji et al. (2012), no qual sugerem que os níveis de pigmentos não expressam a estrutura do aparato fotossintético nem informam a capacidade fotoquímica das plantas. Além disso, eles demonstram que, para muitos genótipos em situações específicas, nem sempre existe uma relação entre o teor de clorofila e a eficiência fotoquímica. Por



outro lado, esse aumento no teor de clorofila em plantas submetidas a tratamentos pode estar relacionado a uma tentativa de aclimatação, uma vez que o estresse térmico causa a degradação desses pigmentos, seria uma maneira de mantê-los em níveis aceitáveis para captura e elétrons e o transporte na cadeia fotossintética. Segundo Pereira Dias e Marengo (2007), as plantas tendem a sintetizar clorofila para aumentar a captura de fótons e otimizar o estágio fotoquímico da fotossíntese sob condições de estresse. Analisando dessa maneira, o genótipo ao NEF05 foi menos sensível aos tratamentos térmicos. Essa particularidade de permanecer verde pode ser um indicador morfológico para rastrear a tolerância ao calor, como mostrado no trigo e no tomate (SHARMA et al., 2014; ZHOU et al., 2017), corroborando com o ISC. Os genótipos NEF12 e NEF16 diminuíram o teor de clorofila sob estresse em 56°C, o que, segundo Wang et al. (2017), geralmente ocorre devido à inibição da biossíntese da clorofila quando as plantas são expostas ao estresse térmico, uma das causas prováveis sendo a desnaturação de enzimas na via biossintética desse pigmento.

O conteúdo de carotenoide foi aumentado nas plantas do genótipo NEF05 e mantido nos mesmos níveis do conteúdo da planta controle para o genótipo NEF16. Tendo em vista a natureza antioxidante desses pigmentos, é certo considerar, a partir desses resultados, que, nesses genótipos, seu aumento se deve à ação protetora para manter o potencial fotoquímico, uma vez que o excesso de fótons absorvidos pelas clorofilas é drenado para carotenoides que os dissipam na forma de calor, protegendo o PSII contra possíveis danos oxidativos Pereira Dias and Marengo (2007).

O tratamento a 45°C promoveu um aumento na concentração de antocianinas nos genótipos a NEF05 e NEF12, com uma diminuição nos valores no tratamento a 56°C. Esses pigmentos não estão diretamente ligados às máquinas fotossintéticas, mas, de forma secundária na cadeia de transporte de elétrons, foram apontados seus efeitos fotoprotetores, antioxidantes e osmóticos (soluto compatível) (ALBERTO; BORGES, 2009).

As plantas expostas aos tratamentos térmicos apresentaram as maiores atividades de CAT e APX, o que permitiu inferir que a produção de peróxido de hidrogênio foi maior nos grupos de plantas submetidas ao estresse do que no grupo controle. Sabe-se que, com o aumento da temperatura, ocorre um aumento na respiração (ZHOU, R. et al., 2017) e a especificidade da enzima RuBisCO para O<sub>2</sub>

em relação ao CO<sub>2</sub> também aumenta, resultando em aumento da fotorrespiração (TAN et al., 2020), que requer mais ATP, que deve ser fornecido por fluxos eletrônicos alternativos, como o fluxo cíclico de elétrons (TAN et al., 2020). O acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é uma consequência do aumento dos processos de respiração e fotorrespiração que são auxiliados pela redução de açúcares. Automaticamente, durante esses processos, há também a formação de espécies reativas de oxigênio, o que leva à geração de mais peróxido de hidrogênio e a uma maior demanda pela atividade antioxidante das enzimas CAT e APX.

Quanto aos teores de açúcares, em trabalho realizado com plantas de tomate submetidas ao calor (ZHOU, R. et al., 2017), destacaram que o estresse térmico afeta o teor de açúcares solúveis em folhas maduras. Portanto, também podemos inferir a possível causa de que os maiores valores de açúcares redutores também sejam encontrados em plantas submetidas ao tratamento a 56°C, uma vez que esses açúcares redutores (por exemplo, glicose, frutose, gliceraldeído, ribose) participam ativamente do processo de fotorrespiração e respiração.

Em níveis moderados de estresse, a fotorrespiração e o FEC fotossintética podem ajudar a proteger o FSI, levando à oxidação do P700 (P700<sup>+</sup>), que suprime a probabilidade de doação de elétrons de P700 a O<sub>2</sub>, diminuindo a produção de ERO dentro do FSI (TAN et al., 2020). No entanto, em níveis severos de estresse (56°C), mesmo com tantos dispositivos bioquímicos, os tecidos foliares das plantas de *J. curcas* pereceram.

## 7.2 EXPERIMENTO 2: RESTRIÇÃO HÍDRICA EM PLANTAS CULTIVADAS SOB ALTA TEMPERATURA

### 7.2.1 Potencial hídrico foliar ( $\Psi_{WF}$ ) e teor de água

Após os dez dias de suspensão hídrica (DSR), o potencial hídrico foliar ( $\Psi_{WF}$ ) medido na antemanhã (Figura 22A) foi alterado pelo tratamento de estresse hídrico, o que resultou em reduções significativas de  $\Psi_{WF}$  nas plantas do genótipo NEF10 (-0,33 MPa), NEF14 (-0,42 MPa) e NEF16 (-0,45 MPa) com relação ao controle. As temperaturas mais elevadas foram registradas entre às 12 e 13h, chegando a quase 50°C (Figura 11B). O  $\Psi_{WF}$  ao meio dia diferiu apenas no genótipo NEF16. Nesse genótipo, mais uma vez, controle e tratamento não diferiram e apresentaram os menores valores (Figura 22B). Curiosamente, plantas controle e tratamento do genótipo NEF16 não apresentaram diferenças significativas tanto no período da antemanhã quanto ao meio dia (49/28°C) (Tabela 8).

Tabela 8: ANOVA do potencial hídrico foliar ( $\Psi_{WF}$ ) antes do amanhecer (4:00h) e ao meio dia (12:00h) em plantas de seis genótipos de pinhão manso.

Fonte de variação	GL	p-valor	
		$\Psi_{WF}$ 4:00h	$\Psi_{WF}$ 12:00h
Tratamento	11	0,0038	0,0075
Condição	5	0,0096	0,1238
Acesso	1	0,0017	0,0015
Acesso*condição	5	0,4329	0,3990
Resíduo	24		
Total	35		
CV (%)		27,27	30,59

O tratamento de 10 DSR em plantas crescidas sob alta temperatura, acima de 45°C (CHEN et al., 2016), afetou significativamente o teor de água nos genótipos, mostrando clara diferença em comparação com as plantas controle e reidratadas. Os genótipos NEF05 e NEF16 apresentaram o maior conteúdo de água nessa condição (74 e 67%, respectivamente). Comparando os tratamentos dentro do mesmo genótipo, apenas os genótipos NEF14 e NEF16 não se igualaram as plantas controle após 10 dias de reidratação (Figura 23, Tabela 9).

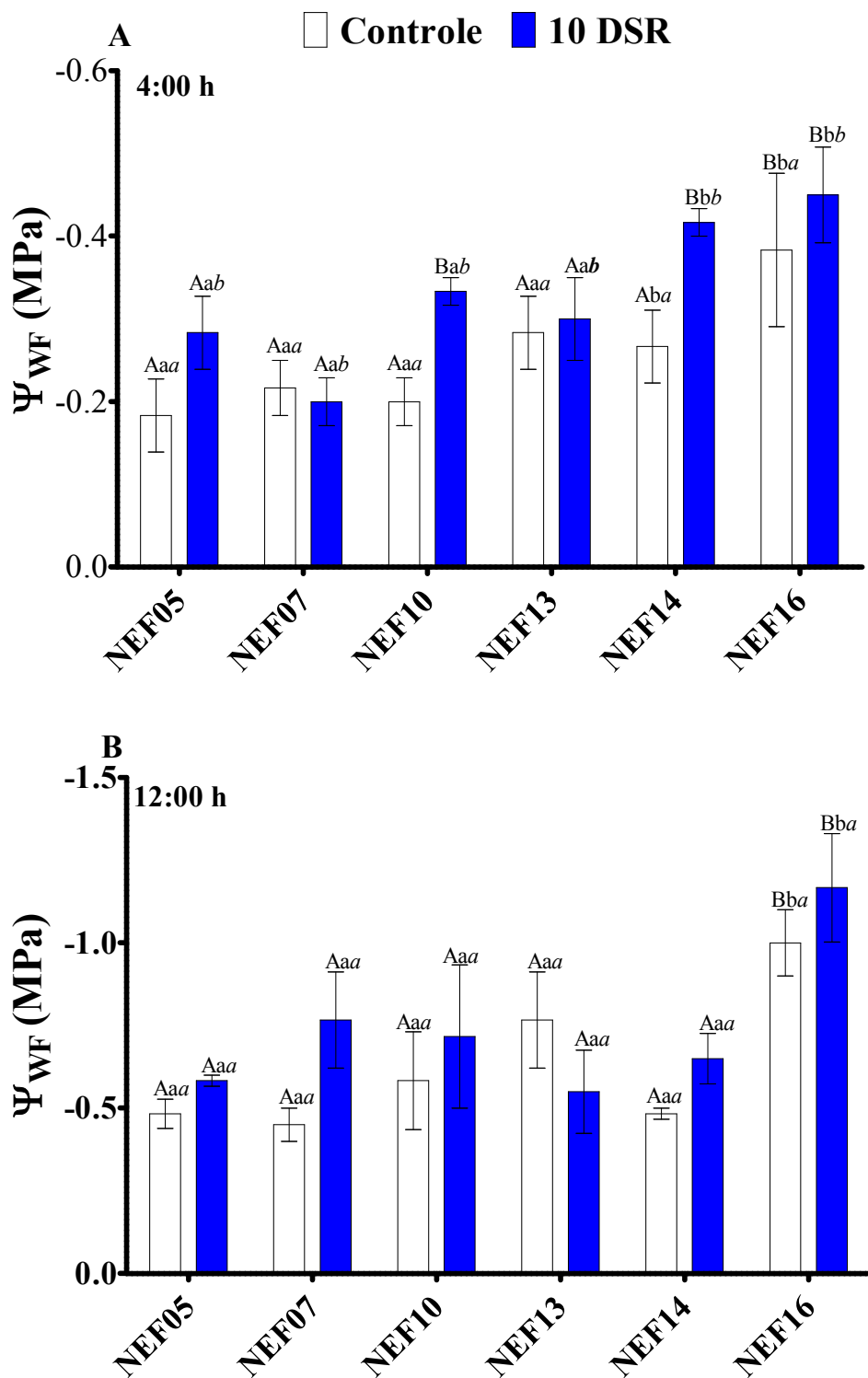


Figura 22 - Potencial hídrico foliar na antemã (A), potencial hídrico foliar ao meio-dia (B) em seis genótipos de *J. curcas* submetidos a restrição hídrica. Letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ). As barras representam o erro padrão. Letras maiúsculas comparam a interação entre os genótipos e as temperaturas; as letras minúsculas comparam diferenças entre os genótipos e as letras em itálico comparam as diferenças entre as temperaturas.

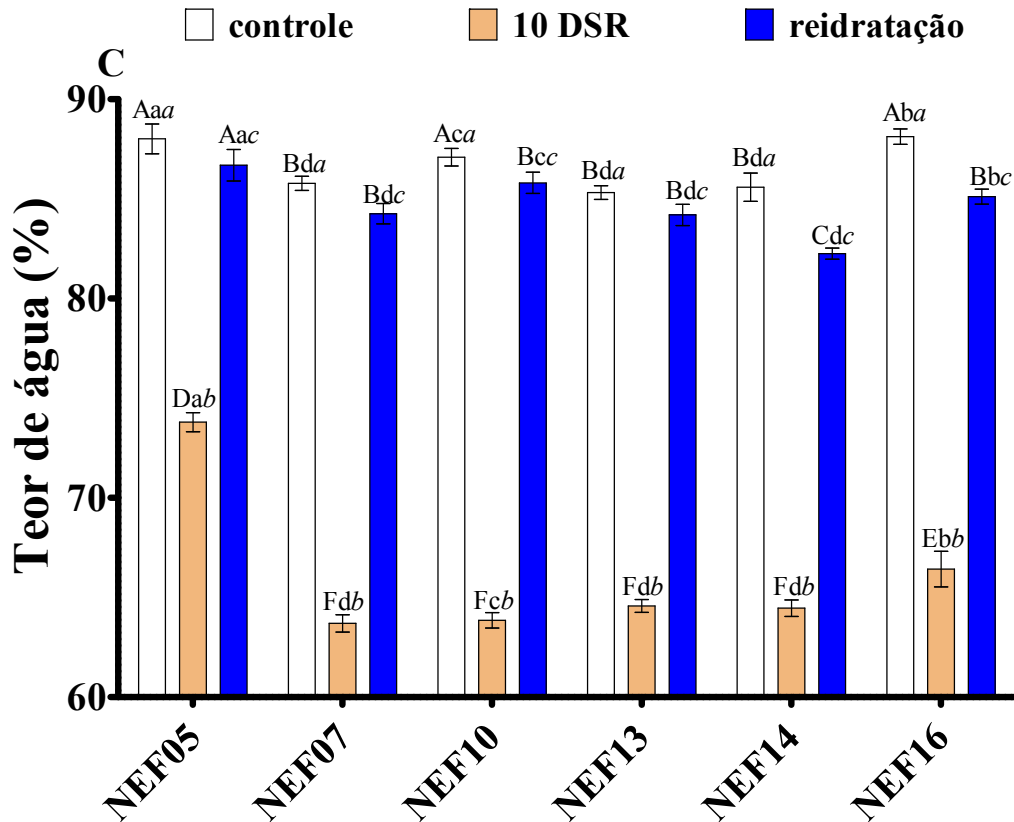


Figura 23: Teor de água foliar (C) em seis genótipos de *J. curcas* submetidos a restrição hídrica. Letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ). As barras representam o erro padrão. Letras maiúsculas comparam a interação entre os genótipos e as temperaturas; as letras minúsculas comparam diferenças entre os genótipos e as letras em itálico comparam as diferenças entre as temperaturas.

Tabela 9: ANOVA do teor de água foliar (%) em seis genótipos de *J. curcas* (NEF05, NEF07, NEF10, NEF13, NEF14, NEF16) submetidos a 10 dias de restrição hídrica.

Fonte de variação	GL	p-valor
		Teor de água (%)
Tratamento	17	<0,0001
Condição	2	<0,0001
Acesso	5	<0,0001
Acesso*condição	10	<0,0001
Resíduo	72	
Total	89	
CV (%)		1,15

### 7.2.2 Fluorescência da clorofila a e teste JIP

Em relação ao controle, na diferença da cinética das curvas de fluorescência da clorofila ( $\Delta V_T$ ), a característica mais evidente foi um aumento no nível de fluorescência entre os passos J-I em todas as plantas cultivadas sob alta temperatura e submetidas a restrição hídrica (Figura 24A a 24F). Após o período

de 10 dias de reidratação o genótipo NEF10 apresentou valores positivos entre as etapas O-I (Figura 24A), em NEF13 esses valores foram observados entre as etapas J-I (Figura 5C) e em NEF16 entre os passos O-J (Figura 24D).

Para elucidar ainda mais as diferenças entre os genótipos em resposta ao estresse hídrico, a fluorescência relativa entre as etapas O e K [0,02 ms e 0,3 ms, respectivamente =  $W_{OK} = (F_T - F_0) / (F_K - F_0)$ ], O e J [0,2 ms e 2 ms, respectivamente =  $W_{OJ} = (F_T - F_0) / (F_J - F_0)$ ], I e P [30 ms e  $F_M$ , respectivamente =  $W_{IP} = (F_T - F_0) / (F_P - F_0)$ ] foram normalizados e são mostrados como a diferença cinética  $\Delta W_{OK} = W_{OK} (\text{tratamento}) - W_{OK} (\text{controle})$ ,  $\Delta W_{OJ} = W_{OJ} (\text{tratamento}) - W_{OJ} (\text{controle})$ , respectivamente (Figuras 24A a 24F). As diferenças cinéticas  $\Delta W_{OK}$ ,  $\Delta W_{OJ}$  e  $\Delta W_{IP}$  tornaram as bandas L, K e G, respectivamente, visíveis.

Essas bandas têm um pico em torno de 0,15, 0,3 e 100 ms, respectivamente. As bandas L e K são um indicador de conectividade energética entre as unidades do FSII e a estabilidade do CEO (ZHOU et al., 2019), enquanto a banda G denota a dupla redução da plastocianina (PC) e de  $P_{700+}$  no FSI (OUKARROUM et al., 2009). Neste trabalho, em resposta ao déficit hídrico os genótipos apresentaram bandas L e K positivas, mostrando que a conectividade energética e a estabilidade do CEO decaíram após 10 dias de estresse, exceto o genótipo NEF07 que não apresentou banda K positiva (Figura 24A e 24B).

Também foram observadas bandas G positivas nas plantas submetidas ao estresse, o que sugere uma diminuição da eficiência de transferência de elétrons para o lado aceptor de elétrons PSI (Figura 25C), exceto os genótipos NEF05 e NEF14.

Após a reidratação os genótipos NEF05 e NEF10 apresentaram valores negativos de banda L (Figura 25D), enquanto que valores negativos de banda K foram observadas nos genótipos NEF05, NEF10 e NEF16 mostrando recuperação após o estresse hídrico (Figura 25F). Quanto à banda G, houve aumento do  $\Delta V_{IP}$  em todos os genótipos, mais pronunciadamente no genótipo NEF16 (~26% a mais que o controle), Figura 25E.

O efeito do estresse hídrico e da reidratação no transporte de elétrons fotossintético foi observado para todos os genótipos testados, conforme exibido pelas alterações dos parâmetros de teste JIP analisados (Figura 26). Para as plantas submetidas ao estresse hídrico, os valores de  $F_0$  foram em média 20% maiores nas plantas estressadas, exceto no genótipo NEF14 que apresentou

médias apenas 10% maiores que o controle. Houve aumento de aproximadamente 7% dos valores máximos de fluorescência ( $F_M$ ) em todos os genótipos (Figura 26A). Porém, após a reidratação, apenas NEF05 permaneceu com valores de  $F_0$  e  $F_M$  20% maiores que o controle, aproximadamente (Figura 26B).

Em nenhum dos genótipos o déficit hídrico provocou diferença na eficiência quântica máxima do FSII ( $F_V/F_M$ ) permanecendo igual ao controle e mantendo-se assim durante a reidratação. Todos os genótipos apresentaram redução de 50% no conteúdo de CEO após 10 dias de restrição hídrica, sem recuperação desse parâmetro após a reidratação, indicando dano severo ao FSII (Meng et al., 2016).

Dos fluxos de energia específicos expressos por valores de RC, nas plantas sob privação de água, a absorção ( $ABS/RC$ ) aumentou em aproximadamente 15% nos genótipos NEF05, NEF10 e NEF16. A dissipação ( $DI_0/RC$ ) aumentou em cerca de 27% nos genótipos NEF10 e NEF14 e 20% em NEF05 e NEF07. A captura de elétrons ( $TR_0/RC$ ) aumentou cerca de 12% durante a seca nos genótipos NEF05, NEF07, NEF10 e NEF16, enquanto que no transporte de elétrons ( $ET_0/RC$ ) foi observado aumento de 7%; NEF13 e NEF14 permaneceram iguais ao controle. Porém, após a reidratação, em NEF07, NEF14 e NEF16 foi observada uma diminuição de 20% na captura e transporte de elétrons em relação ao controle (Figura 26).

O fluxo de elétrons após  $Q_A$  ( $\Psi E_0$ ) não diferiu do controle em nenhuma das situações. Já o rendimento das reações de oxirredução do FSI ( $\delta R_0$ ) diminuiu 22% durante a seca e durante a reidratação foi observado aumento em todos os genótipos, exceto NEF05 para o qual foi observado queda de 18% em relação ao controle (Figura 26).

No entanto, as diminuições relativas de  $PI_{ABS}$  e  $PI_{TOTAL}$  foram variáveis para os genótipos testados (Figura 27A e 27B). O genótipo NEF07 mostrou aumento de  $PI_{ABS}$  e  $PI_{TOTAL}$  em 37 e 22%, respectivamente. O genótipo NEF10 não mostrou redução de  $PI_{ABS}$ , enquanto o  $PI_{TOTAL}$  foi reduzido em 13% pela seca. Em contraste, um declínio de  $PI_{ABS}$  (30%) e  $PI_{TOTAL}$  (44%) foi revelado no genótipo NEF05. Para os demais genótipos, a amplitude das mudanças dos índices de performance relativos foi localizada entre esses extremos. Usando os PIs como uma medida de suscetibilidade à seca, os genótipos puderam ser selecionados como menos sensíveis a seca (NEF07 e NEF10) e sensíveis (NEF16 e NEF05).

O índice de sensibilidade ao calor é dado pelo valor absoluto do coeficiente angular da reta, ou seja, quanto menor for o ângulo entre a reta e o eixo  $x$ , menor será a sensibilidade das plantas ao calor. Aplicando esse protocolo às plantas de pinhão manso crescidas a pleno sol no verão, conseguimos a seguinte sequência (Figura 28), do menos sensível ao mais sensível ao calor: NEF05 (2,7262), NEF16 (2,8903), NEF07 (3,2419), NEF10 (3,3245), NEF14 (3,9308), NEF13 (3,9828).



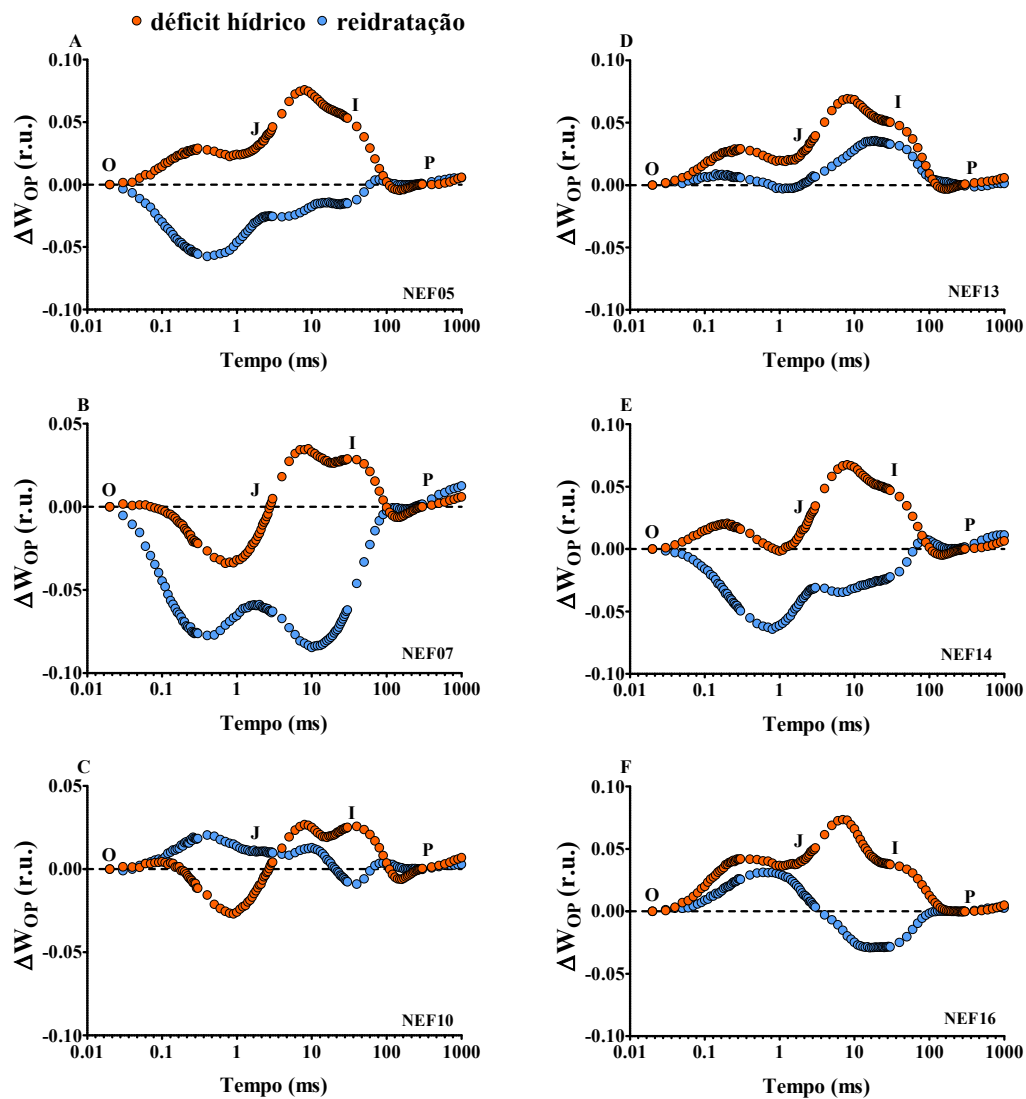


Figura 24: Cinética da fluorescência transiente da clorofila *a* relativa entre os passos O e P [ $\Delta W_{OP} = W_{OP}$  (tratamento) -  $W_{OP}$  (controle)] em genótipos de *J. curcas* submetidas ao déficit hídrico e reidratação. (n=5).

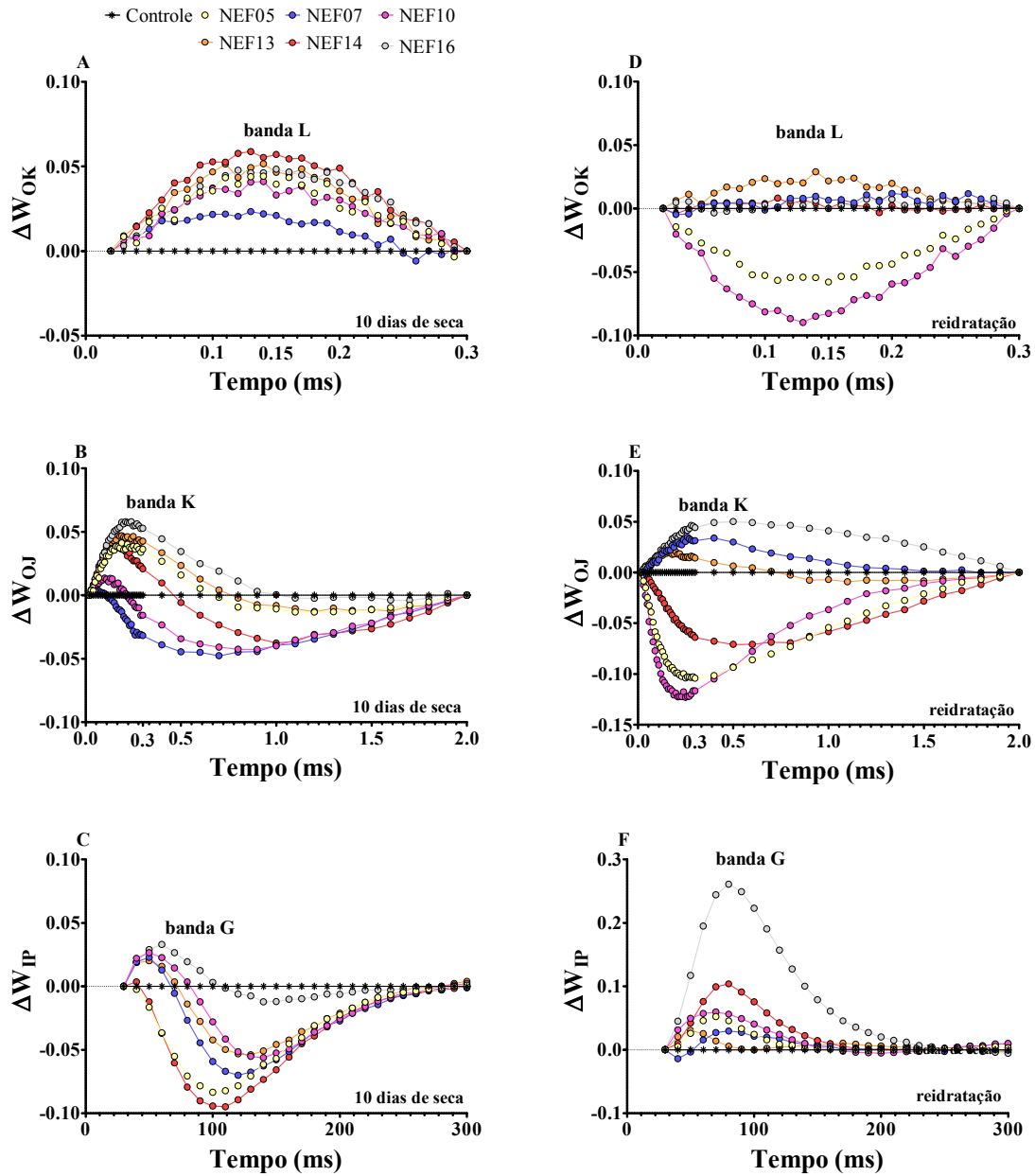


Figura 25: Cinética da fluorescência variável relativa evidenciando o aparecimento da (A e B) banda L [ $\Delta W_{OK} = \Delta W_{OK(\text{tratamento})} - \Delta W_{OK(\text{controle})}$ ]; (C e D) banda K [ $\Delta W_{OJ} = \Delta W_{OJ(\text{tratamento})} - \Delta W_{OJ(\text{controle})}$ ]; (E e F) banda G [ $\Delta W_{IP} = \Delta W_{IP(\text{tratamento})} - \Delta W_{IP(\text{controle})}$ ] em genótipos de *J. curcas* submetidas ao déficit hídrico e reidratação. O tempo está representado em escala logarítmica (ms). (n=5).

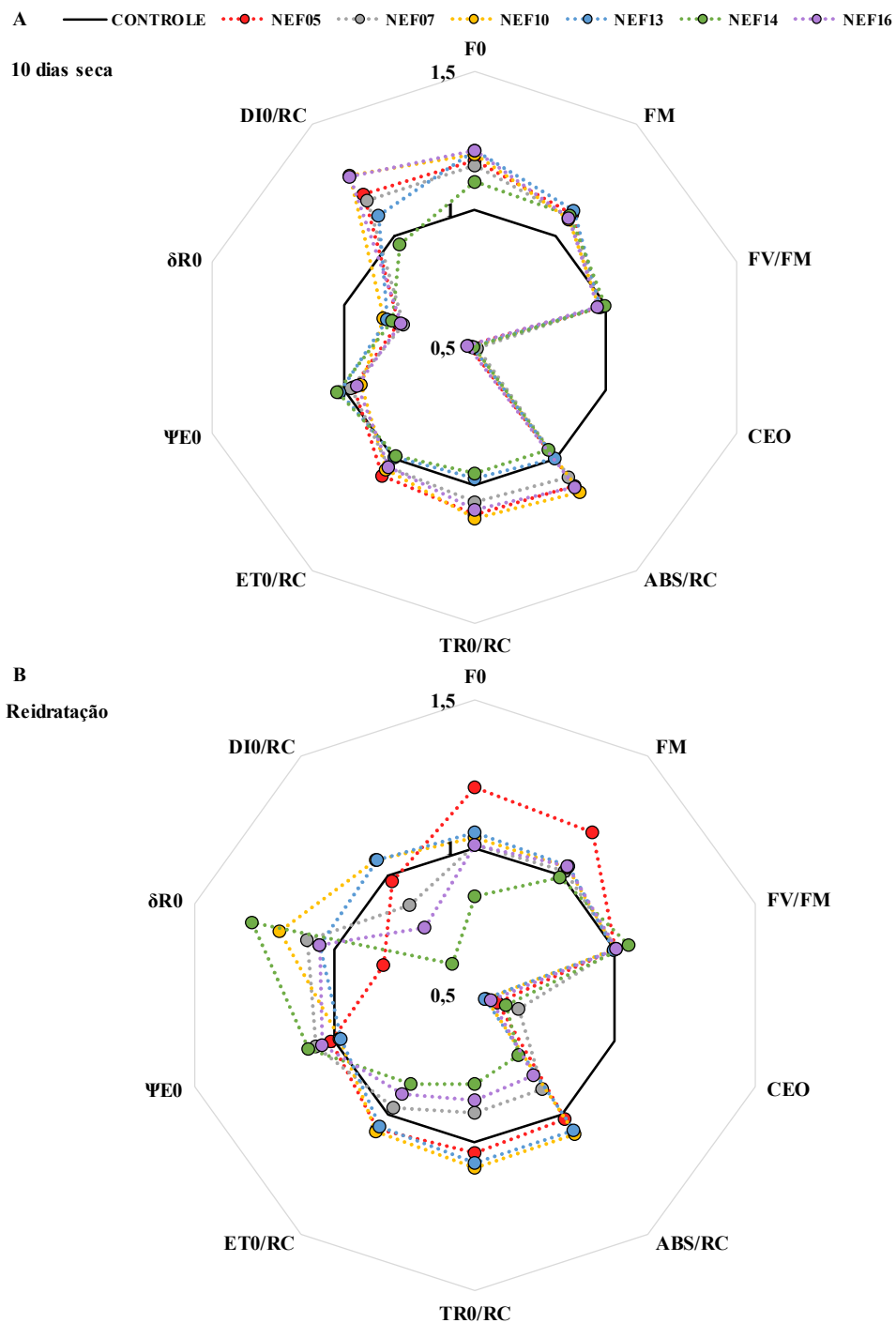


Figura 26: Fluorescência da clorofila a em diferentes genótipos de *J. curcas* submetidos ao déficit hídrico. Cada parâmetro foi normalizado com o valor do controle.  $F_0$  – fluorescência inicial;  $F_M$  – fluorescência máxima;  $CEO$  - complexo de evolução de oxigênio;  $ABS/RC$  – fluxo de absorção de energia;  $TR_0/RC$  – fluxo de captura de energia;  $ET_0/RC$  – fluxo de transporte de elétrons de  $Q_A$  para  $Q_B$ ;  $\Psi E_0$  – probabilidade de que um éxciton capturado transfira um elétron para as reações do intersistema (após  $Q_A$ );  $\delta R_0$  - rendimento quântico do transporte de elétrons no FSI;  $DI_0/RC$  - energia total dissipada por RC ativo como calor.

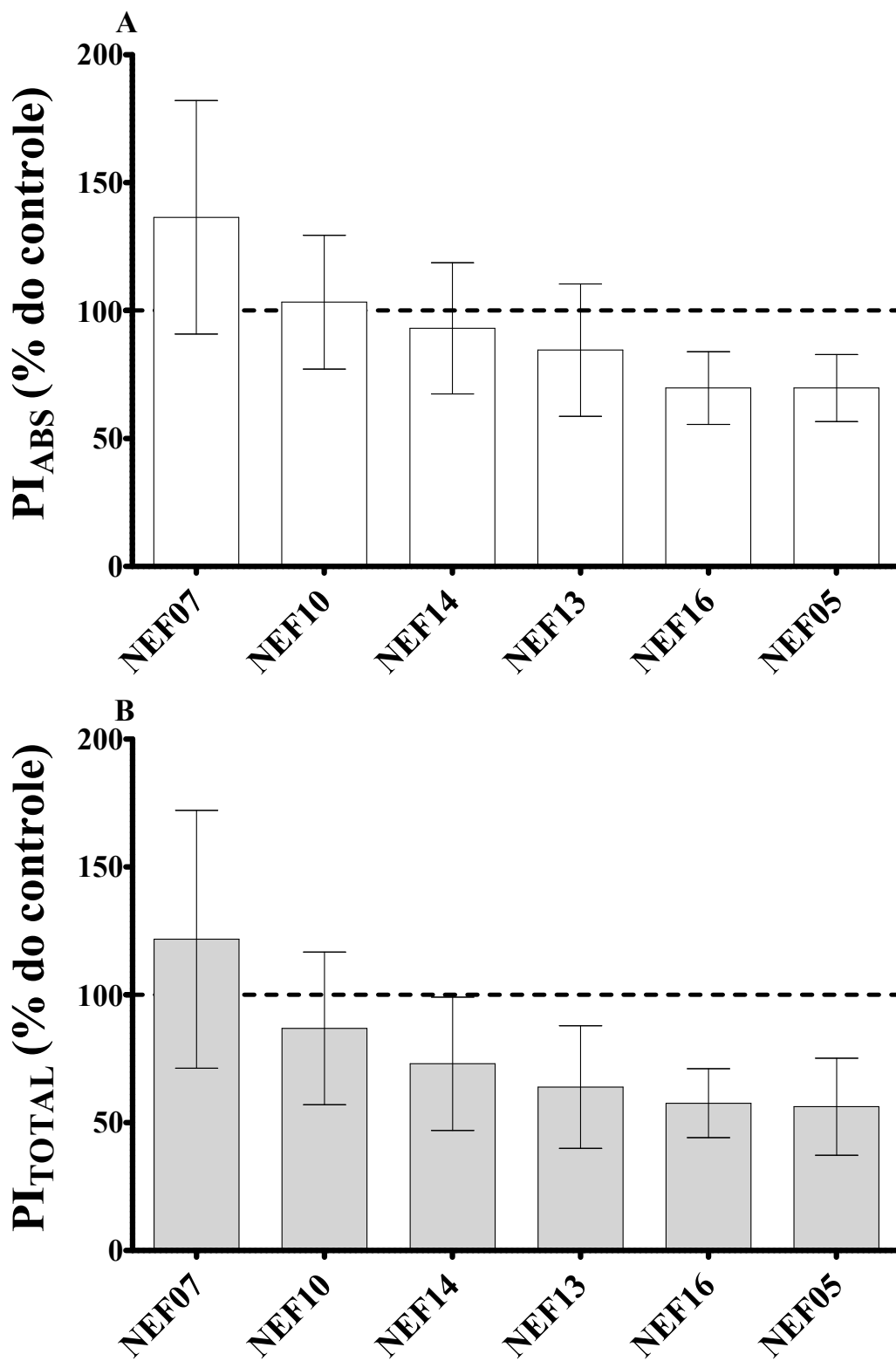


Figura 27 - Índices de desempenho PI<sub>ABS</sub> e PI<sub>TOTAL</sub> relativos dos genótipos NEF05, NEF07, NEF10, NEF13, NEF14 e NEF16 de *J. curcas* obtidos após 10 dias de restrição hídrica (média  $\pm$  erro padrão; (n = 5).

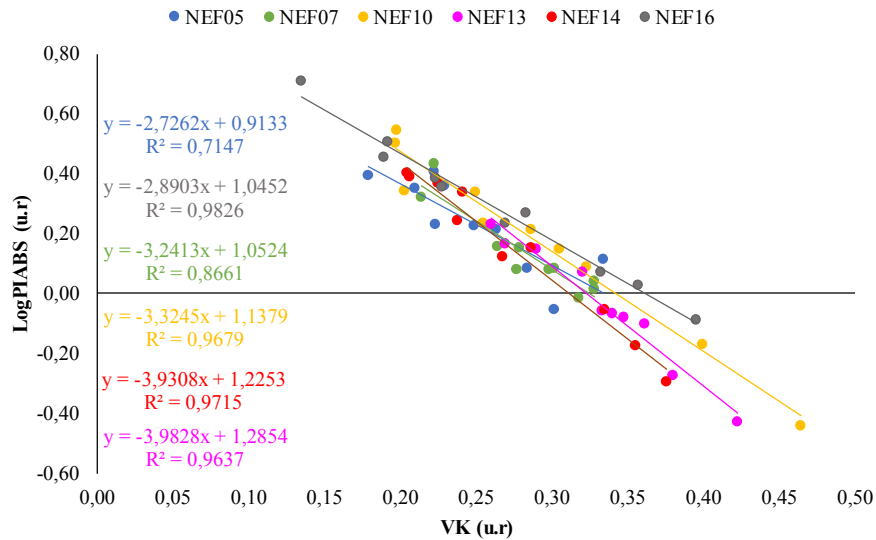


Figura 28: Índice de sensibilidade ao calor (ISC; valor absoluto de  $a$  na equação da linha  $(ax + b)$  de seis genótipos de *J. curcas*. O ISC foi calculado com base nos parâmetros do teste JIP:  $\text{LogPI}_{\text{ABS}}$  e  $V_K$ . Quanto maior o valor do ISC, maior a sensibilidade das plantas ao calor. Cada valor de ISC foi obtido a partir de 10 repetições.

### 7.2.3 Teor de pigmentos fotossintéticos e antocianinas

Na Tabela 12 pode-se observar que o tratamento de restrição hídrica por 10 dias e a reidratação afetou significativamente o conteúdo de pigmentos nos genótipos de pinhão manso. A Tabela 13 refere-se ao conteúdo de antocianinas, carotenoides e clorofila total. Foi observado que o estresse hídrico causou aumento do conteúdo de clorofila total nos genótipos NEF07 e NEF13, enquanto que no genótipo NEF05 houve diminuição do teor de clorofila. Nos genótipos NEF10, NEF14 e NEF16 o teor de clorofila não diferiu das plantas controle. Após a reidratação foram observados os maiores valores desse pigmento (Tabela 12).

O conteúdo de carotenoides não diminuiu com o tratamento de seca nos genótipos NEF05 e NEF07, aumentou no genótipo NEF13 e não diferiu do controle nos outros genótipos. Durante o tratamento de seca, NEF13, NEF14 e NEF16 apresentaram os maiores teores desse pigmento. Após a reidratação, em todos os genótipos foi observado aumento do conteúdo de carotenoides em relação ao controle.

O estresse hídrico e a reidratação causaram aumento no conteúdo de antocianinas nos genótipos NEF10, NEF13 e NEF14. Nos genótipos NEF05 e NEF07 não houve diferença entre as plantas submetidas a seca e o controle. Já em NEF16, não houve diferença entre os tratamentos.

Tabela 12: ANOVA dos teores de pigmentos clorofilas, carotenoides e antocianinas totais em plantas dos genótipos NEF05, NEF07, NEF10, NEF13, NEF14 E NEF16 de *J. curcas* após tratamento de restrição hídrica sob as condições de controle, seca e reidratação. (n=5)

	GL	p-valor		
		Clorofila total	Carotenoide total	Antocianina total
Condição	2	0,0001	0,0005	0,1781
Acesso	5	<0,0001	<0,0001	0,0027
Acesso*condição	10	<0,0001	0,0002	0,0993
Resíduo	72			
Total	89			
CV (%)		10,34	11,54	9,74

Tabela 13: teores de pigmentos clorofilas, carotenoides e antocianinas totais em plantas dos genótipos NEF05, NEF07, NEF10, NEF13, NEF14 E NEF16 de *J. curcas* após tratamento de restrição hídrica sob as condições de controle, seca e reidratação. (n=5)

Fonte de Variação	NEF05			NEF07			NEF10		
	Controle	Seca	Reidratação	Controle	Seca	Reidratação	Controle	Seca	Reidratação
Carotenoides	0,16Cbb	0,12Db <sup>a</sup>	0,27Bbb	0,15Cbb	0,09Cb <sup>a</sup>	0,31Abb	0,13Dbb	0,13Db <sup>a</sup>	0,27Bbb
Clorofila total	0,80Bbb	0,57Cb <sup>a</sup>	1,38Abb	0,80Bbb	0,43Cb <sup>a</sup>	1,44Abb	0,67Cbb	0,66Cb <sup>a</sup>	1,25Abb
Antocianinas	1,16Bab	1,13Baa	1,27Aab	1,11Bab	1,07Aaa	1,30Aab	1,02Bab	1,25Aaa	1,22Aab

Fonte de Variação	NEF13			NEF14			NEF16		
	Controle	Seca	Reidratação	Controle	Seca	Reidratação	Controle	Seca	Reidratação
Carotenoides	0,11Dbb	0,20Cb <sup>a</sup>	0,30Abb	0,17Cbb	0,15Cb <sup>a</sup>	0,31Ab <sup>a</sup>	0,32Abb	0,18Cb <sup>a</sup>	0,32Abb
Clorofila total	0,55Cab	0,93Baa	1,50Aab	0,83Bab	0,78Baa	1,61Aab	0,90Bab	0,83Baa	1,48Aab
Antocianinas	1,14Bab	1,36Aaa	1,34Aab	1,09Bab	1,22Baa	1,38Aab	1,31Aab	1,27Aaa	1,21Aab

Os valores são médias ± erro padrão. Letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ). Letras maiúsculas comparam a interação entre os genótipos e as temperaturas; as letras minúsculas comparam diferenças entre os genótipos e as letras em itálico comparam as diferenças entre as temperaturas.

#### 7.2.4 Prolina

O conteúdo de prolina dos genótipos de pinhão manso estudados foi afetado pelo estresse hídrico. Todas as plantas submetidas ao tratamento apresentaram aumento nos valores de prolina em comparação ao controle, sendo que em NEF10 o conteúdo de prolina aumentou em 100% e em NEF16 o aumento foi de 86% em relação ao controle. Em NEF05 foi observado valor 11% maior que do o controle nas plantas estressadas.

Após a reidratação, o conteúdo de prolina diminuiu, chegando a valores mais baixos do que o controle, exceto em NEF10, único genótipo em que os valores de reidratação se igualaram ao controle (Figura 29).

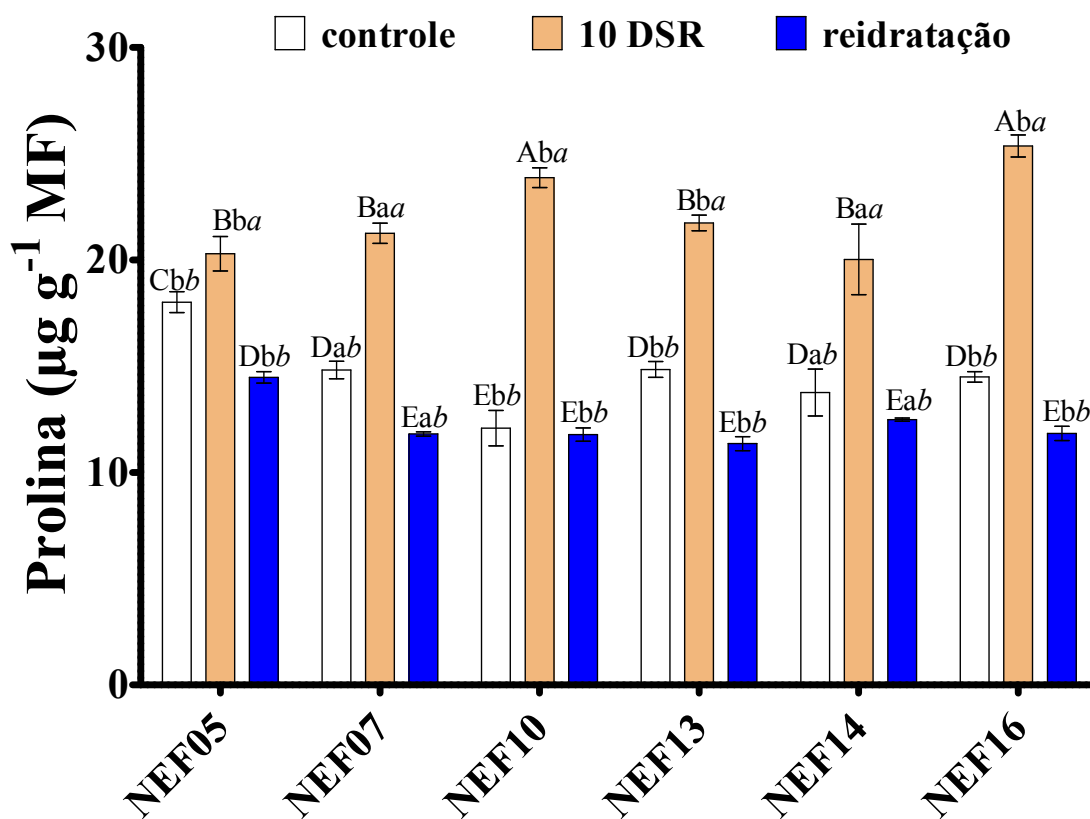


Figura 29: Conteúdo de prolina em plantas de seis genótipos de *J. curcas* (NEF05, NEF07, NEF10, NEF13, NEF14, NEF16) submetidas a déficit hídrico e reidratação. As barras representam o erro padrão. Letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ). Letras maiúsculas comparam a interação entre os genótipos e as temperaturas; as letras minúsculas comparam diferenças entre os genótipos e as letras em itálico comparam as diferenças entre as temperaturas. (n=5).

### 7.2.5 Atividade enzimática

Na Tabela 14 pode-se observar que o tratamento de 10 dias de restrição hídrica afetou a atividade enzimática das enzimas catalase e peroxidase do ascorbato (APX). A atividade da enzima (CAT) diferiu significativamente nas plantas dos genótipos NEF10 e NEF16 cultivadas sob temperaturas elevadas e submetidas ao déficit hídrico. Nessas plantas houve aumento expressivo da atividade enzimática na qual NEF10 apresentou valores 50% maiores do que as plantas controle, e NEF16 o aumento foi de 100%, ou seja, o dobro da atividade comparado as plantas controle (Tabela 15).

Enquanto que na atividade da APX foi observado que nos genótipos NEF13, NEF14 e NEF16 não houve diferença entre as plantas submetidas ao estresse e o controle, porém após a retomada da rega os níveis da atividade tornam-se menores do que o controle. No genótipo NEF10 ocorreu queda da atividade durante a seca e na reidratação os níveis se igualaram ao controle. Em NEF05 a atividade aumentou durante a seca e após a reidratação. Por fim, em NEF07, a seca provocou uma atividade seis vezes maior do que o controle (Tabela 15).



Tabela 14: ANOVA do conteúdo de prolina e atividade das enzimas catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) em plantas dos genótipos NEF05, NEF07, NEF10, NEF13, NEF14 E NEF16 de *J. curcas* após tratamento de restrição hídrica sob as condições de controle, seca e reidratação. (n=5)

Fator de Variação	p-valor			
	GL	Prolina	CAT	APX
Condição	2	0,0007	0,0010	<0,0001
Acesso	5	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Acesso*condição	10	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Resíduo	72			
Total	89			
CV (%)		6,70	29,54	16,30

Tabela 15: Conteúdo de prolina e atividade das enzimas catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) em plantas dos genótipos NEF05, NEF07, NEF10, NEF13, NEF14 E NEF16 de *J. curcas* após tratamento de restrição hídrica sob as condições de controle, seca e reidratação. (n=5)

Fonte de Variação	NEF05			NEF07			NEF10		
	Controle	Seca	Reidratação	Controle	Seca	Reidratação	Controle	Seca	Reidratação
Prolina	18,01Cab	20,29Baa	14,47Dac	14,82Dbb	21,26Bba	11,81Ebc	12,09Ebb	23,87Aba	11,87Ebc
CAT	0,04Cbb	0,08Cba	0,07Cbb	0,05Cbb	0,04Cba	0,06Cbb	0,08Cab	0,12Baa	0,06Cab
APX	3,6 <sup>E-04</sup> Ebb	6,3 <sup>E-04</sup> Eba	1,1 <sup>E-03</sup> Ebb	3,2 <sup>E-04</sup> Eab	1,8 <sup>E-03</sup> Aaa	6,7 <sup>E-04</sup> Dab	6,5 <sup>E-04</sup> Dcb	3,8 <sup>E-04</sup> Eca	4,1 <sup>E-04</sup> Ecb
Fonte de Variação	NEF13			NEF14			NEF16		
	Controle	Seca	Reidratação	Controle	Seca	Reidratação	Controle	Seca	Reidratação
Prolina	14,85Dbb	21,74Bba	11,36Ebc	13,76Dbb	20,03Bba	12,48Ebc	14,50Dab	25,36Aaa	11,84Eac
CAT	0,06Cbb	0,08Cba	0,06Cbb	0,06Cab	0,08Caa	0,08Cbb	0,20Aaa	0,04Cab	0,04Cab
APX	6,4 <sup>E-04</sup> Dcb	7,4 <sup>E-04</sup> Dca	4,0 <sup>E-04</sup> Ecb	8,4E-04Cbb	8,2 <sup>E-04</sup> Cba	5,2 <sup>E-04</sup> Ebb	9,4 <sup>E-04</sup> Cbb	8,1 <sup>E-04</sup> Dba	4,1 <sup>E-04</sup> Ebb

Os valores são médias ± erro padrão. Letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott ( $p > 0,05$ ). Letras maiúsculas comparam a interação entre os genótipos e as temperaturas; as letras minúsculas comparam diferenças entre os genótipos e as letras em itálico comparam as diferenças entre as temperaturas.

Este estudo foi realizado com o objetivo avaliar os efeitos do déficit hídrico sobre o metabolismo e o comportamento fotoquímico, bem como avaliar a tolerância à seca por meio do teste JIP em mudas de genótipos de pinhão manso cultivadas sob alta temperatura, nos permitindo identificar diferenças tanto no aparato fotossintético quanto nas estratégias de defesa contra danos oxidativos.

Os dados de potencial hídrico na antemanhã demonstraram a real situação hídrica das plantas, sem a interferência da temperatura ou transpiração, porém os dados de meio-dia foram ainda mais conclusivos pois demonstraram que a maioria dos genótipos possuem estratégias efetivas para diminuir a perda de água, modificando muito pouco o seu  $\Psi_{WF}$ , inclusive os genótipos NEF10 e NEF14 que durante a antemanhã estavam mais baixos do que ao meio-dia. Após a imposição do estresse hídrico, o genótipo NEF16 exibiu um status de água menor do que os outros na medição realizada tanto na antemanhã quanto ao meio-dia ( $\Psi_{WF}$  mais baixo), o que pode ser sugerido como uma ineficiência na absorção e transporte de água até as folhas.

Segundo Santos et al. (2010) poucas mudanças nos valores de  $\Psi_{WF}$  podem ser observadas após a restrição hídrica, que é quando as plantas ativam mecanismos de tolerância, e estas estão relacionadas com a síntese e acúmulo de compostos com atividade osmótica. Os resultados do presente estudo corroboram com aqueles encontrados por Falqueto et al. (2017) ao trabalharem com clones de seringueira submetidas ao déficit hídrico, no qual tanto as plantas do clone tolerante quanto do clone sensível, permaneceram sem diferenças até o 38º dia de estresse.

Embora o comportamento do  $\Psi_{WF}$  entre a maioria dos genótipos tenha sido semelhante, o efeito do estresse hídrico afetou de forma diversificada a cinética da fluorescência e os parâmetros fotoquímicos das plantas (teste JIP). Essas diferenças permitiram a comparação dos genótipos a nível de aparato fotossintético.

A fluorescência da clorofila *a* foi capaz de mostrar que todos os genótipos foram negativamente afetados pelo estresse. A presença de bandas demonstrou que o estresse hídrico inibiu a conectividade energética entre as subunidades do FSII (banda L) e inativou o CEO (banda K). Resultados semelhantes foram encontrados por Martins et al. (2017) ao trabalhar com estresse hídrico em plantas de crambe, uma oleaginosa também promissora para o biodiesel.

Porém, foi observada a banda G nos genótipos de *J. curcas* durante a seca e a reidratação, em intensidades diferentes. Essa banda denota as reações de oxirredução que ocorrem ao nível dos aceptores finais de elétrons do FSI. Durante a seca as curvas foram 3% maiores que o controle, enquanto que durante a reidratação chegaram a ser 30% maiores, principalmente nas plantas NEF16, o que demonstrou diminuição dos aceptores de elétrons no FSI. Os menores valores de  $\Delta W_{IP}$  são relatados em genótipos menos sensíveis ao estresse (REDILLAS et al., 2011), e no presente estudo, baixos valores foram observados em NEF07, o que corrobora com o índice de PIs relativos encontrado neste estudo. Resultados semelhantes de  $\Delta W_{IP}$  foram encontrados em linhagens de crambe tolerantes a seca (MARTINS et al., 2017).

Por meio do teste JIP foi possível fazer uma triagem baseada na sensibilidade dos genótipos ao estresse por calor (ISC) utilizando os valores da conectividade do CEO ( $V_K$ ) e do parâmetro indicativo da força motriz necessária para as reações do FSII ( $\log PI_{ABS}$ ) (CHEN et al., 2016) e a seca, utilizando os PIs relativos (JEDMOWSKI; BAYRAMOV; BRÜGGEMANN, 2014). Esses métodos de triagem baseado nos PIs são mais confiáveis, uma vez que o método mais tradicional utilizando o decaimento de  $F_v/F_m$  pode não corresponder a realidade dos diferentes genótipos. Santos et al. (2013), por exemplo, conseguiram verificar o decaimento de  $F_v/F_m$  em plantas de *J. curcas* cultivadas em duas regiões distintas no Brasil: semi-úmido e no semi-árido. No trabalho citado, esse parâmetro foi significativo nos períodos de maior seca e temperatura, porém no presente estudo não pode ser aplicado devido ao fato de que o  $F_v/F_m$  dos genótipos submetidos a 10 dias de restrição hídrica não diferiram do controle.

Assim como encontrado no trabalho de Liu et al. (2010), que estudaram a influência da intensidade da seca em seis espécies de ambiente cárstico, o  $F_v/F_m$  permaneceu estável enquanto o conteúdo de clorofila total diminuiu em NEF05, aumentou em NEF07 e não diferiu nos outros genótipos, indicando que a redução do conteúdo de clorofila total durante a seca ou seu aumento durante a reidratação não teve influência sobre a eficiência fotoquímica máxima. O autor sugeriu que a redução da absorvância da luz pela diminuição do conteúdo de pigmento era um mecanismo de fotoproteção, e pode ter sido mais influenciado pela taxa de dissipação não fotoquímica ( $DI_0/RC$ ).

Pelo índice de sensibilidade ao calor os genótipos NEF05 e NEF16 são os menos sensíveis ao calor, mas são bastante afetados pela seca, o que pode ser verificado com as bandas negativas L e K formadas após a reidratação e pelos PIs relativos com menores percentuais. Enquanto os genótipos NEF07 e NEF10 são menos sensíveis as condições impostas pelo presente trabalho, o que pode ser verificado com as bandas L, K e G durante a seca, e com o índice de PIs relativos, no qual obtiveram os maiores percentuais de  $PI_{ABS}$  e  $PI_{TOTAL}$ .

O teste JIP mostrou ainda uma forte inibição do CEO em todos os genótipos, tanto após a seca quanto após a reidratação esse parâmetro foi menor que o controle, e como consequência, segundo Oukarroum et al. (2007), ocorre a inibição da cadeia fotossintética de transporte de elétrons (OUKARROUM et al., 2007; OUKARROUM et al., 2016). Após seca severa, o autor concluiu que a persistência da banda K após a reidratação no genótipo Igrane de cevada apontou para um efeito mais duradouro do estresse no lado doador do FSII. Trabalhos anteriores mostraram que as diferenças na estabilidade do CEO entre plantas e condições diferentes são um bom parâmetro para seleção de genótipos (CELOVANE et al., 2018; CHEN et al., 2016; FALQUETO et al., 2017; ZHOU et al., 2019).

Mesmo apresentando os maiores valores de prolina e açúcares solúveis, NEF16 demonstrou que não conseguiu escapar do estresse, o que pode ser verificado pela cinética da fluorescência que mostrou bandas L e K nessas plantas mesmo depois da reidratação e pelo teste JIP,  $PI_{ABS}$  e  $PI_{TOTAL}$ . De acordo com Gosavi et al. (2014), a prolina acumulada sob condição de estresse térmico e hídrico (Oukarroum et al., 2007) pode atuar como um osmoprotetor em resposta ao estresse térmico, evitando a dessecação e ajudando a manter o turgor e a integridade das membranas citoplasmáticas. No presente estudo e no trabalho de Santos et al., (2013), as concentrações de prolina foram maiores durante o período de seca. Além de atuar como um osmorregulador, segundo Chen et al. (2016), a prolina pode ter um outro papel decisivo na cadeia de transporte de elétrons durante o estresse pois, como nessas condições o CEO pode perder seu *cluster* de Mn, deixando de enviar seus elétrons para a feofitina (Pheo) o que leva a um desequilíbrio no fluxo de elétrons para o RC. Ela pode atuar também como um doador alternativo interno de elétrons, ou seja, pode doar elétrons ao FSII em substituição a  $H_2O$  em períodos críticos, resultando no aumento de curta duração na redução da concentração Pheo/QA. Essa redução é evidenciada pelo

aparecimento de uma banda K e explica os resultados dos parâmetros da cadeia de transporte de elétrons ( $TR_0/RC$ ,  $ET_0/RC$ ,  $\Psi E_0$ ) no FSII obtidos durante o estresse neste estudo.

Tanto o estresse de seca como o calor podem levar a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, induzindo um estresse oxidativo que danifica estruturas tanto do cloroplasto quanto em outras regiões da célula. Para diminuir os danos do estresse oxidativo as plantas contam com uma gama de compostos antioxidantes, enzimáticos e não-enzimáticos (MENEZES-SILVA et al., 2017). Dentre as enzimas utilizadas no combate as EROs, a CAT e a APX atuam na dismutação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), anulando seu efeito tóxico, e tendo como produto oxigênio e água (MENEZES-SILVA et al., 2017). Embora Liu et al. (2010) afirmem que a CAT é muito sensível ao estresse abiótico atuando como um marcador de plantas estressadas, e Santos et al. (2013) tenham observado maior atividade desta enzima em *J. curcas* durante período de seca, nos genótipos deste estudo não foram encontradas diferenças significativas, exceto nas plantas do genótipo NEF16 submetidas a seca, nas quais foi observada maior atividade desta enzima. Silva et al. (2018) ao trabalharem com plantas de *J. curcas* submetidas a diferentes temperaturas também encontraram aumento significativo da atividade da CAT.

Como o calor influencia o aumento da respiração (ZHOU, R. et al., 2017) e na especificidade de catalização da enzima RuBisCO para  $O_2$  em relação ao  $CO_2$ , resultando em maiores taxas de fotorrespiração (TAN et al., 2020), podemos inferir que no genótipo NEF16 e NEF10 as taxas de fotorrespiração estavam mais elevadas, uma vez que nesse genótipo a atividade da CAT estava maior, isso porque dentro do cloroplasto não há enzima catalase. Essa enzima encontra-se nos peroxissomos, organelas que, juntamente com o cloroplasto e a mitocôndria, são responsáveis pelo processo de fotorrespiração e geração de  $H_2O_2$  durante a oxidação do glicolato a glioxilato (BARBOSA et al., 2014). Apesar de não ter o mesmo rendimento que as reações de carboxilação do ciclo de Calvin-Benson, a fotorrespiração é um mecanismo que auxilia na dissipação de energia consumindo NAPH e ATP, o que ajuda na proteção do FSI e do FSII durante situações de estresse (TAN et al., 2020). Esse processo acaba sendo uma estratégia para que a planta tolere um período de estresse.

Entre os genótipos testados, o que apresentou maior atividade da APX foi o NEF07 nas plantas submetidas ao estresse de seca. Menezes-Silva et al. (2017) ao trabalharem com genótipos de café submetidos ao estresse hídrico e Silva et al. (2018) com *J. curcas* sob estresse de calor, também observaram aumento na atividade da enzima peroxidase do ascorbato. Como em situações adversas é comum a maior produção de  $H_2O_2$  nos cloroplastos e nesta organela não há a enzima catalase, a eliminação deste composto é realizada pela APX, formando  $H_2O$  e monodesidroascorbato, que poderá entrar nas reações da glutathione redutase. Segundo Biehler e Fock (1996), a atividade da APX aumenta em situações de déficit hídrico, juntamente com a atividade da glutathione ascorbato que, assim como a fotorrespiração, também é considerada uma forma de dissipação da energia por promover a oxidação de moléculas de NADPH, regenerando esse substrato e protegendo os fotossistemas.

Quanto aos antioxidantes não enzimáticos, o conteúdo de carotenoides diminuiu após com o estresse hídrico nos genótipos NEF07 e NEF05, e manteve-se estável nos outros genótipos. Esses pigmentos fazem parte da antena dos FSII e auxiliam na captura e dissipação de energia na forma de calor, protegendo o fotossistema contra possíveis danos oxidativos (PEREIRA DIAS; MARENCO, 2007). Os dados mostram que o estresse de seca foi capaz de degradar esses pigmentos.

Nos genótipos NEF05 e NEF07 o conteúdo de antocianinas permaneceu o mesmo que o controle e tornou-se maior nas plantas após a reidratação, em NEF16 não houve diferença em nenhuma situação. As antocianinas não participam diretamente da cadeia de transporte de elétrons, mas a manutenção ou o aumento do seu conteúdo tem-se mostrado, de forma secundária, atuante como fotoprotetor, por minimizar a entrada excessiva de luz durante situações de estresse, além de atuar como um antioxidante não-enzimático e soluto compatível, auxiliando no aumento o turgor da célula (ALBERTO e BORGES, 2009).

Diante do exposto, o presente estudo conseguiu demonstrar que o déficit hídrico é um fator importante que afeta a sensibilidade dos genótipos ao calor. Foi possível por meio da fluorescência da clorofila *a* identificar os passos modificados na cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos quando mudas de diferentes genótipos de *J. curcas* crescidas sob altas temperaturas são submetidas ao estresse hídrico, bem como algumas estratégias fisiológicas, como o aumento da

concentração de prolina e a modulação da atividade enzimática, que ajudam a diminuir a sensibilidade.

Estes resultados apontam também a importância do conhecimento sobre o metabolismo de diferentes genótipos e seus fenótipos frente a ambientes diversos, o que facilita a escolha e a indicação dos genótipos para outros estudos na área fisiológica, biotecnológica e agrônômica.

## 9 CONCLUSÃO

As plantas dos seis genótipos de *J. curcas* usadas neste trabalho apresentaram diferenças distintas quando submetidas ao estresse térmico, principalmente nos parâmetros que descrevem a captura e transporte de elétrons no FSII. Foram encontradas diferenças principalmente no Índice de Desempenho do Fotossistema II ( $PI_{ABS}$ ) e seus componentes: Densidade de centros de reação ativos ( $RC/ABS$ ), Rendimento quântico máximo do FSII ( $\phi P_0$ ) e Probabilidade (no tempo 0) de um éxciton mover um elétrons na cadeia de transporte de elétrons após  $Q_A$  ( $\Psi E_0$ ), levando a conclusão de que a temperatura tem influência diferencial sobre a atividade de óxido-redução do FSII. Por essa razão pode-se considerar ainda que as categorias de resposta térmica das plantas dos diferentes genótipos de pinhão manso foram claramente diferenciadas pelo ISC realizado com base no  $PI_{ABS}$  à temperatura ambiente no verão: NEF12 sensível, NEF05 e NEF16 tolerante. Além disso, pode-se afirmar que o ISC foi bastante preciso, pois foi possível discriminar acessos mesmo com valores de índice muito próximos. Dados bioquímicos como o aumento de teor de pigmentos fotossintéticos, aumento da atividade enzimática e maior conteúdo de açúcares corroboram com o ISC, dando destaque ao genótipo NEF05.

As plantas dos genótipos de pinhão manso cultivadas em estufa agrícola sob alta temperatura e submetidas simultaneamente a restrição hídrica apresentaram modificações significativas no metabolismo. Os diferentes genótipos de *J. curcas* puderam ser classificados de acordo com os índices de performance relativos: NEF07 > NEF10 > NEF14 > NEF13 > NEF16 > NEF05. Ou seja, NEF07 destacou-se como o genótipo mais tolerante ao estresse conjugado (déficit hídrico e alta temperatura), enquanto o genótipo NEF05 mostrou-se o mais sensível. Ao analisar o metabolismo desses genótipos mais atentamente, percebe-se que eles possuem diferentes mecanismos de escape. O genótipo NEF16 apontou menor potencial hídrico nas plantas submetidas ao tratamento.



## 9 REFERÊNCIAS

AEBI, Hugo. [13] Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121–126, 1984.

ALBERTO, Saulo; BORGES, Bruno. REVISÃO Fotoinibição da Fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 4849, n. 4, p. 463–472, 2009.

BARBOSA, Marta Ribeiro et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciencia Rural**, v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, n. 1, p. 205–207, ago. 1973.

BEGGS, Christopher J.; WELLMANN, Eckard. Photocontrol of flavonoid biosynthesis. **Photomorphogenesis. plants**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1994. p. 733–751. Disponível em: <[http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-2624-5\\_20](http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-2624-5_20)>.

BENITEZ, Letícia Carvalho et al. Correlation of proline content and gene expression involved in the metabolism of this amino acid under abiotic stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 11, 2016.

BIEHLER, Klaus; FOCK, Heinrich. Evidence for the Contribution of the Mehler-Peroxidase Reaction in Dissipating Excess Electrons in Drought-Stressed Wheat. v. 112, n. 1, p. 265–272, 1996.

CELOVANE, Natiele Sandrini; ZAMPIROLLO, Jadson Bonini; et al. Photochemical activity in *Dalbergia nigra* ( Vell .) Fr . Allem . seedlings submitted to water deficit. v. 2018, n. 10, p. 409–415, 2018.

CELOVANE, Natiele Sandrini; BONINI ZAMPIROLLO, Jadson; et al. Photochemical activity in *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. Allem. seedlings submitted to water deficit. **Journal of Forest Science**, v. 64, n. 10, p. 409–415, 2018.

CHAVES FILHO, J. T; STACCIARINI-SERAPHIN, E. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St . -Hil.) em resposta ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 2, p. 199–204, 2001.

CHEN, Shiguo et al. Classification and characteristics of heat tolerance in *Ageratina adenophora* populations using fast chlorophyll a fluorescence rise O-J-I-P. **Environmental and Experimental Botany**, v. 122, p. 126–140, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.09.011>>.

DALLACORT, Rivanildo et al. Aptidão agroclimática do pinhão manso na região de Tangará da Agroclimatic aptitude of oil seed plant in the region of Tangará da Serra , Mato. p. 373–379, 2010.

DINIS, L. T. et al. Improvement of grapevine physiology and yield under summer stress by kaolin-foliar application: water relations, photosynthesis and oxidative damage. **Photosynthetica**, v. 55, n. 2, p. 641–651, 2017.

DOMICIANO, Gisele Pereira et al. Photosynthetic performance of contrasting *Jatropha curcas* genotypes during the flowering and fruiting stages. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 53, n. 1, p. 10–21, 2018.

DOS SANTOS, Claudiana Moura et al. Seasonal variations of photosynthesis, gas exchange, quantum efficiency of photosystem II and biochemical responses of *Jatropha curcas* L. grown in semi-humid and semi-arid areas subject to water stress. **Industrial Crops and Products**, v. 41, n. 1, p. 203–213, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.003>>.

DRUMOND, Marcos Antonio et al. Desempenho agrônômico de genótipos de pinhão manso no Semiárido pernambucano. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 44–47, 2010.

DUBOIS, Mlchel et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

FAHAD, Shah et al. Crop Production under Drought and Heat Stress: Plant Responses and Management Options. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. June, p. 1–16, 2017.

FALQUETO, Antelmo Ralph et al. Effects of drought stress on chlorophyll a fluorescence in two rubber tree clones. **Scientia Horticulturae**, v. 224, n. September 2016, p. 238–243, 2017.

GOSAVI, G. U. et al. Effect of heat stress on proline, chlorophyll content, heat shock proteins and antioxidant enzyme activity in sorghum (*Sorghum bicolor*) at seedlings stage. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 356–363, 2014.

HASANUZZAMAN, Mirza et al. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 9643–9684, 2013.

HOAGLAND, Dennis Robert; ARNON, Daniel Israel. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California Agricultural Experiment Station**, v. 347, n. 2nd edit, p. 1–32, 1950.

JAIN, Neelu; SINGH, G P; PANDEY, Rakesh; RAMYA, P; SINGH, P K; PRABHU, K V. Chlorophyll fluorescence kinetics and response of wheat (*Triticum aestivum* L.) under high temperature stress. v. 56, n. March, p. 194–201, 2018.

JAIN, Neelu; SINGH, G. P.; PANDEY, Rakesh; RAMYA, P.; SINGH, P. K.; NIVEDITA; et al. Chlorophyll fluorescence kinetics and response of wheat (*Triticum aestivum* L.) under high temperature stress. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 56, n. 3, p. 194–201, 2018.

JEDMOWSKI, C.; BAYRAMOV, S.; BRÜGGEMANN, W. Comparative analysis of drought stress effects on photosynthesis of Eurasian and North African genotypes of wild barley. **Photosynthetica**, v. 52, n. 4, p. 564–573, 2014.

JOHNSON, Giles N. Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1807, n. 3, p. 384–389, 2011.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.11.009>>.

KALAJI, H. M. et al. Prompt chlorophyll fluorescence as a tool for crop phenotyping: an example of barley landraces exposed to various abiotic stress factors. **Photosynthetica**, v. 56, n. 3, p. 953–961, 2018.

KALAJI, Hazem M. et al. Experimental in vivo measurements of light emission in plants: A perspective dedicated to David Walker. **Photosynthesis Research**, v. 114, n. 2, p. 69–96, 2012.

KUMAR, Ashwani; SHARMA, Satyawati. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. **Industrial Crops and Products**, v. 28, n. 1, p. 1–10, 2008.

LAVIOLA, Bruno Galveas et al. Establishment of new strategies to quantify and increase the variability in the Brazilian *Jatropha* genotypes. **Industrial Crops and Products**, v. 117, n. October 2016, p. 216–223, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.003>>.

LAVIOLA, Bruno Galvêas et al. Caracterização morfo-agronômica do banco de germoplasma de pinhao manso na fase jovem. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 3, p. 371–379, 2011.

LAVIOLA, Bruno Galvêas et al. Biometric and biotechnology strategies in *Jatropha* genetic breeding for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, n. December 2016, p. 894–904, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.116>>.

LEÓN-VILLANUEVA, Andrés et al. Proteomic analysis of non-toxic *Jatropha curcas* byproduct cake: Fractionation and identification of the major components. **Industrial Crops and Products**, v. 111, n. November 2017, p. 694–704, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.046>>.

LICHTENTHALER, Hartmut K.; BUSCHMANN, Claus. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement And Characterization by UV-VIS Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 1–1, p. 171–178, 2001.

LIMA NETO, M. C. et al. Cyclic electron flow, NPQ and photorespiration are crucial for the establishment of young plants of *Ricinus communis* and *Jatropha curcas* exposed to drought. **Plant Biology**, v. 19, n. 4, p. 650–659, 2017.

LIMA NETO, Milton Costa et al. *Jatropha curcas* and *Ricinus communis* display contrasting photosynthetic mechanisms in response to environmental conditions. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 3, p. 260–269, jun. 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-90162015000300260&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162015000300260&lng=en&tlng=en)>.

LIU, Chang Cheng et al. Influence of drought intensity on the response of six woody karst species subjected to successive cycles of drought and rewatering. **Physiologia Plantarum**, v. 139, n. 1, p. 39–54, 2010.

LUCENA, A M A et al. Características morfológicas de peças reprodutivas de

acessos de *Jatropha curcas* L . v. 10, p. 1–9, 2014.

MAES, W. H. et al. Plant-water relationships and growth strategies of *Jatropha curcas* L. seedlings under different levels of drought stress. **Journal of Arid Environments**, v. 73, n. 10, p. 877–884, 2009.

MARTINS, Madlles Q et al. Protective Response Mechanisms to Heat Stress in Interaction with High [ CO<sub>2</sub> ] Conditions in *Coffea* spp . v. 7, n. June, 2016.

MARTINS, Rodrigo Fantin Alves et al. Physiological responses to intense water deficit in two genotypes of crambe (*Crambe abyssinica* Hochst.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 7, p. 821–827, 2017.

MATHUR, Sonal; JAJOO, Anjana. Alterations in photochemical efficiency of photosystem II in wheat plant on hot summer day. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 20, n. 4, p. 527–531, 2014.

MATOS, Fábio Santos et al. Estratégia morfofisiológica de tolerância ao déficit hídrico de mudas de pinhão manso. **Magistra**, v. 26, n. 1, p. 19–27, 2014.

MEIRELES, Robson Celestino et al. Qualidade Fisiológica Das Sementes De Diferentes Genótipos De Pinhão-Manso Produzidos No Noroeste Do Estado Do Espírito Santo. **Revista Ifes Ciência**, v. 3, n. 1, p. 217–230, 2017.

MENEZES-SILVA, Paulo E. et al. Photosynthetic and metabolic acclimation to repeated drought events play key roles in drought tolerance in coffee. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 15, p. 4309–4322, 2017.

MENG, L. L. et al. Effects of drought stress on fluorescence characteristics of photosystem II in leaves of *Plectranthus scutellarioides*. **Photosynthetica**, v. 54, n. 3, p. 414–421, 2016.

NAKANO, Yoshiyuki; ASADA, Kozi. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867–880, 1981.

OUKARROUM, Abdallah et al. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, n. 3, p. 438–446, 2007.

OUKARROUM, Abdallah; EL MADIDI, Saïd; STRASSER, Reto J. Differential heat sensitivity index in barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) monitored by chlorophyll a fluorescence OKJIP. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 105, n. February 2018, p. 102–108, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.015>>.

OUKARROUM, Abdallah; GOLTSEV, Vasilij; STRASSER, Reto J. Temperature Effects on Pea Plants Probed by Simultaneous Measurements of the Kinetics of Prompt Fluorescence, Delayed Fluorescence and Modulated 820 nm Reflection. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–10, 2013.

OUKARROUM, Abdallah; SCHANSKER, Gert; STRASSER, Reto J. Drought stress

effects on photosystem i content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl a fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. **Physiologia Plantarum**, v. 137, n. 2, p. 188–189, 2009.

PAGANOVÁ, Viera et al. Can chlorophyll- a fluorescence parameters be used as bio-indicators to distinguish between drought and salinity stress in *Tilia cordata* Mill? **Environmental and Experimental Botany**, v. 152, n. August 2017, p. 149–157, 2017.

PERBONI, Anelise Tessari et al. Low temperatures on chlorophyll a fluorescence in plants of different canola hybrids. **Ciência Rural**, v. 45, n. 2, p. 215–222, 2015.

PEREIRA DIAS, Daniela; MARENCO, Ricardo Antonio. Fotossíntese e fotoinibição em mogno e acariquara em função da luminosidade e temperatura foliar Photosynthesis and photoinhibition in mahogany and acariquara as a function of irradiance and leaf temperature. **Pesq. agropec. bras**, n. 3, p. 305–311, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v42n3/02.pdf>>.

REDILLAS, Mark C.F.R. et al. The use of JIP test to evaluate drought-tolerance of transgenic rice overexpressing OsNAC10. **Plant Biotechnology Reports**, v. 5, n. 2, p. 169–175, 2011.

RIAZI, Ardeshir; MATSUDA, Kaoru; ARSLAN, Ahmet. Water-stress induced changes in concentrations of proline and other solutes in growing regions of young barley leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 36, n. 11, p. 1716–1725, 1985.

SANTOS, Cleberlito Fernandes; LIMA, Giuseppina Pace Pereira; MORGADO, Luiz Balbino. Tolerância e caracterização bioquímica em feijão-caupi submetido a estresse hídrico na pré-floração. **Naturalia**, v. 33, p. 34–44, 2010. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/141229/ISSN2177-0727-2010-33-34-44.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>.

SANTOS, Claudiana Moura dos et al. Seasonal variations of photosynthesis, gas exchange, quantum efficiency of photosystem II and biochemical responses of *Jatropha curcas* L. grown in semi-humid and semi-arid areas subject to water stress. **Industrial Crops and Products**, v. 41, n. 1, p. 203–213, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.003>>.

SCHOLANDER, P. F. et al. Sap Pressure in Vascular Plants. **Science**, v. 148, n. 3668, p. 339–346, 1965.

SHARMA, Dew Kumari et al. Genotypic response of detached leaves versus intact plants for chlorophyll fluorescence parameters under high temperature stress in wheat. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 8, p. 576–586, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2013.09.025>>.

SILVA ALVES, Rodrigo et al. Multiple-trait BLUP in longitudinal data analysis on *Jatropha curcas* breeding for bioenergy. **Industrial Crops and Products**, v. 130, n. December 2018, p. 558–561, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.019>>.

SILVA DALBERTO, Davi; GARBIN MARTINAZZO, Emanuela; ANTONIO

BACARIN, Marcos. Chlorophyll a fluorescence reveals adaptation strategies in drought stress in *Ricinus communis*. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 40, n. 4, p. 861–870, 2017.

SILVA, Diolina Moura; SANTOS JR., Ramon Negrão; DAMASCENO JR., Pedro Corrêa. Can One Use Chlorophyll A Fluorescence as a Physiological Marker of *Jatropha curcas* L.? In: Mulpuri, Sujatha; Bahadur, Bir; Carels, Nicolas (Org.). **Jatropha, Challenges a New Energy Crop**. 3. ed. Singapore: Springer, 2019. p. 289–321.

SILVA, Evandro Nascimento et al. Photosynthetic and Antioxidant Responses of *Jatropha curcas* Plants to Heat Stress: On the Relative Sensitivity of Shoots and Roots. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 37, n. 1, p. 255–265, 2018.

SILVA, L. Faria et al. Irrigation improves plant vitality in specific stages of mango tree development according to photosynthetic efficiency. **Photosynthetica**, v. 57, n. 3, p. 820–829, 2019.

STIRBET, Alexandrina; GOVINDJEE. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 104, n. 1–2, p. 236–257, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010>>.

STRASSER, Reto J. et al. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1797, n. 6–7, p. 1313–1326, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.03.008>>.

STRASSER, Reto J.; TSIMILLI-MICHAEL, Merope; SRIVASTAVA, Alaka. Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient. In: PAPAGEORGIOU, G. C.; GOVINDJEE (Org.). **Chlorophyll Fluoresc. A Signat. Photosynth. Adv. Photosynth. Respir. Ser.** Dordrecht: Springer, 2004. p. 321–362. Disponível em: <[http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-3218-9\\_12](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-3218-9_12)>.

TAIZ, Lincon et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal Diversidade vegetal**. [S.l.: s.n.], 2017. v. 6 ed.

TAN, Shun Ling et al. Responses of photosystem I compared with photosystem II to combination of heat stress and fluctuating light in tobacco leaves. **Plant Science**, v. 292, n. December 2019, p. 110371, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110371>>.

WANG, Xiaoli et al. Heat-responsive photosynthetic and signaling pathways in plants: Insight from proteomics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, 2017.

YUE, Yuanzheng et al. Variations in physiological response and expression profiles of proline metabolism-related genes and heat shock transcription factor genes in petunia subjected to heat stress. **Scientia Horticulturae**, v. 258, n. June, p. 108811, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108811>>.

YUSUF, Mohd Aslam et al. Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1797, n. 8, p. 1428–1438, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.002>>.

ZHANG, Kun et al. Effects of short-term heat stress on PSII and subsequent recovery for senescent leaves of *Vitis vinifera* L. cv. Red Globe. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 12, p. 2683–2693, dez. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095311918621434>>.

ZHANG, Mei-ping et al. Changes in chloroplast ultrastructure , fatty acid components of thylakoid membrane and chlorophyll a fluorescence transient in flag leaves of a super-high-yield hybrid rice and its parents during the reproductive stage. **Jl of Plant Physiology**, v. 167, n. 4, p. 277–285, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2009.09.017>>.

ZHOU, R. et al. Physiological Response to Heat Stress During Seedling and Anthesis Stage in Tomato Genotypes Differing in Heat Tolerance. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 203, n. 1, p. 68–80, 2017.

ZHOU, Ronghua et al. Drought-induced changes in photosynthetic electron transport in maize probed by prompt fluorescence, delayed fluorescence, P700 and cyclic electron flow signals. **Environmental and Experimental Botany**, v. 158, n. August 2018, p. 51–62, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.11.005>>.

ZIVCAK, Marek et al. Photosynthetic electron transport and specific photoprotective responses in wheat leaves under drought stress. **Photosynthesis Research**, v. 117, n. 1–3, p. 529–546, 2013.

## APÊNDICE

Tabela 3: Descrição dos parâmetros do teste JIP com base em Strasser et al. (2010), Jedmowski et al. (2014) e Meng et al. (2016).

Parâmetros da fluorescência	Descrição
$F_0 = F_{20\mu s}$	Fluorescência inicial; absorção de ftons quando todos os centros de reação estão abertos (oxidados).
$F_V = F_M - F_0$	Fluorescência variável.
$F_L = F_{150\mu s}$	Intensidade da fluorescência no passo L (150 $\mu s$ ) da curva OJIP.
$F_K = F_{300\mu s}$	Intensidade da fluorescência no passo K (300 $\mu s$ ) da curva OJIP.
$F_J = F_{2ms}$	Intensidade da fluorescência no passo J (2 ms) da curva OJIP.
$F_I = F_{30ms}$	Intensidade da fluorescência no passo I (30 ms) da curva OJIP.
$F_M = F_P \approx 400 ms$	Fluorescência máxima (quando todos os centros de reação do FSII estão fechados).
$V_T = (F_T - F_0) / (F_M - F_0)$	Fluorescência variável normalizada usando os pontos $F_0$ e $F_M$ .
$V_K = (F_K - F_0) / (F_M - F_0)$	Fluorescência variável relativa no passo K.
$W_{OK} = (F_T - F_0) / (F_K - F_0)$	Razão da fluorescência variável $F_T - F_0$ para a amplitude $F_K - F_0$ .
$W_{OJ} = (F_T - F_0) / (F_J - F_0)$	Razão da fluorescência variável $F_T - F_0$ para a amplitude $F_J - F_0$ .
$CEO = [1 - (V_K/V_J)]_{treatment} / [1 - (V_K/V_J)]_{control}$	Fração de centros de complexos de evolução de oxigênio (CEO).
$\phi P_0 = TR_0/ABS = F_V/F_M$	Rendimento quântico máximo do FSII ( $t=0$ ).
$\Psi E_0 = ET_0/TR_0 = 1 - V_J$	Probabilidade (no tempo 0) de um exciton mover um elétron na cadeia de transporte de elétrons após $Q_A$ .
$ABS/RC = (dV/dt_0/V_J) \times (1/\phi P_0)$	Fluxo de energia absorvida por RC ativo ou tamanho aparente da antena de um centro de reação ativo do FSII
$RC/ABS = \gamma RC / (1 - \gamma RC)$	Densidade de centros de reação ativos.
$\delta R_0 = RE_0/ET_0$	Eficiência com que um exciton pode mover um elétron do centro de um acceptor de elétrons do intersistema para os aceptores de elétrons do FSI.
$\phi D_0 = 1 - \phi P_0 = F_0/F_M$	Rendimento quântico da energia dissipada
$PI_{ABS} = (RC/ABS) \times (\phi P_0 / (1 - \phi P_0)) \times (\Psi E_0 / (1 - \Psi E_0))$	Índice de desempenho do fotossistema II.
$PI_{Total} = PI_{ABS} \times (\delta R_0 / (1 - \delta R_0))$	Índice de desempenho total (até os aceptores finais de elétrons do FSI).



