



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**LEONARDO FARIA SILVA**

**FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* COMO INDICADOR DE  
PORTA-ENXERTOS DE MANGA 'UBÁ' MAIS TOLERANTES AO  
DÉFICIT HÍDRICO**

VITÓRIA, ES

2020

**LEONARDO FARIA SILVA**

**FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* COMO INDICADOR DE  
PORTA-ENXERTOS DE MANGA 'UBÁ' MAIS TOLERANTES AO  
DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

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

VITÓRIA, ES

2020

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

---

F224f Faria-Silva, Leonardo, 1985-  
Fluorescência da clorofila *a* como indicador de porta-enxertos de manga 'Ubá' mais tolerantes ao déficit hídrico / Leonardo Faria-Silva. - 2020.  
103 f. : il.

Orientadora: Diolina Moura Silva.  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Plantas - Efeito da seca. 2. Manga. 3. *Mangifera indica*. 4. Fotossíntese. 5. Clorofila. 6. Aclimação. I. Silva, Diolina Moura. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

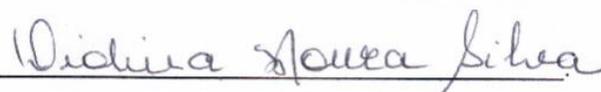
---

**LEONARDO FARIA SILVA**

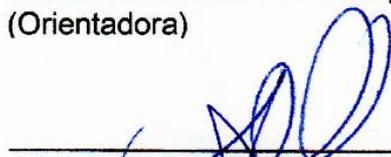
**FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* COMO INDICADOR DE  
PORTA-ENXERTOS DE MANGA 'UBÁ' MAIS TOLERANTES AO  
DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

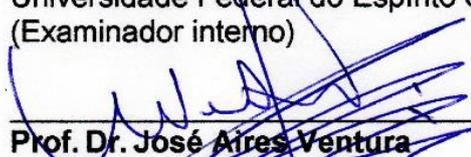
Aprovada em 13 de fevereiro de 2020.



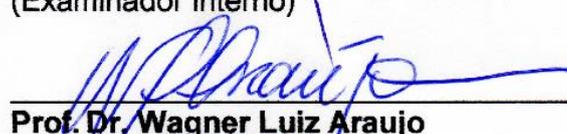
**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Diolina Moura Silva**  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)  
(Orientadora)



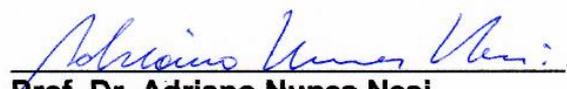
**Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos**  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)  
(Examinador interno)



**Prof. Dr. José Aires Ventura**  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER)  
(Examinador interno)



**Prof. Dr. Wagner Luiz Araujo**  
Universidade Federal de Viçosa (UFV)  
(Examinador externo)



**Prof. Dr. Adriano Nunes Nesi**  
Universidade Federal de Viçosa (UFV)  
(Examinador externo)

VITÓRIA, ES  
2020

À minha avó Julieta Felisberto da Silva  
(*in memoriam*), dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) por permitir o acesso gratuito a minha qualificação profissional.

A todos profissionais do setor de transporte da UFES pela disposição e amizade durante todas as viagens aos campos experimentais.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) e todos seus docentes pelo aprendizado.

À Fundação CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo aporte financeiro fornecido ao projeto.

À Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Diolina Moura Silva pela orientação, dedicação e confiança durante toda a caminhada.

À empresa Frucafé Mudas e Plantas Ltda., o diretor Erli Ropke e todos seus colaboradores pela prontidão em atender as demandas solicitadas para o desenvolvimento do projeto em sua área.

Aos membros da banca avaliadora, pela disponibilidade e por todo conhecimento compartilhado.

À família do Núcleo de Estudos em Fotossíntese da UFES, pelo apoio físico, emocional e intelectual durante a execução dos trabalhos.

À família Faria-Silva, em especial à Ceci (mãe), José Omar (pai), Gabriel (irmão) e Jackline (esposa), por serem as bases que sustentam todas as minhas conquistas.

*"Há três caminhos para o fracasso:  
não ensinar o que se sabe,  
não praticar o que se ensina  
e não perguntar o que se ignora".*

*(São Beda 672-735)*

## RESUMO

FARIA-SILVA, L. **Fluorescência da clorofila a como indicador de porta-enxertos de manga 'Ubá' mais tolerantes ao déficit hídrico**. 2020. 103f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

Visando selecionar os parâmetros fotoquímicos extraídos da cinética da fluorescência da clorofila *a* como sendo os mais simples, rápidos e eficientes para identificar precocemente o porta-enxerto mais vigoroso na formação de mudas da mangueira 'Ubá' tolerantes à seca, foi utilizado, como copa, o clone de *Mangifera indica* L cv. Ubá chamado 'Ubá clone 2' (UC2) e, como porta-enxerto, as mudas seminais de mangueira "Óleo", 'Ubá' e "Imbú". Inicialmente, foram analisados os porta-enxertos e suas respectivas combinações copa/porta-enxerto: UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú. Em seguida, as plantas foram separadas em três grupos: C0, nenhum ciclo de seca; C1, um ciclo de seca e C3, três ciclos de seca. Cada ciclo conteve 20 dias de déficit hídrico seguidos por 10 dias de retorno da irrigação. Posteriormente, foi aplicado um déficit hídrico de 35 dias em todos os grupos, mantendo uma parte em plena irrigação. Os parâmetros selecionados foram:  $F_2$  (relativo à presença da banda L, referente à desconectividade energética das subunidades do FSII),  $F_3$  (relativo à presença da banda K, referente ao desequilíbrio entre o fluxo de elétrons do Complexo de Evolução do Oxigênio para o centro de reação do FSII),  $Dl_0/RC$  (energia total dissipada por centro de reação ativo),  $PI_{ABS}$  (índice de desempenho potencial do FSII),  $PI_{TOTAL}$  (índice de desempenho fotoquímico total). O porta-enxerto "Óleo" foi o que gerou mudas de manga 'Ubá' mais vigorosas e tolerantes a seca quando expostas ao déficit hídrico uma única vez. No entanto, essa tolerância diminuiu quando as plantas foram submetidas a secas recorrentes, perdendo a capacidade de se recuperar após o terceiro déficit hídrico consecutivo. Ao final, foi possível concluir que a indução de tolerância à seca por meio da aclimação diferencial é dependente do porta-enxerto utilizado; e confirmar o uso da fluorescência da clorofila *a* como indicador de porta-enxertos de manga 'Ubá' mais tolerantes ao déficit hídrico.

Palavras-chave: *Mangifera indica* L. Fotossíntese. Seca. Aclimação diferencial. "Memória" ao estresse. Prolina.

## ABSTRACT

FARIA-SILVA, L. **Chlorophyll a fluorescence as indicator of 'Ubá' mango rootstocks more tolerant to water deficit**. 2020. 103f. Thesis (Doctoral in Biotechnology) — Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

In order to select the photochemical parameters extracted from the chlorophyll a fluorescence kinetics as being the simplest, fastest and most efficient for early identification of the most vigorous rootstock in the formation of drought tolerant mango tree, the clone of *Mangifera indica* L cv. Uba named 'Uba clone 2' (UC2) was used as scion and the seminal seedlings of "Oleo", 'Uba' and "Imbu" mango were used as rootstock. Initially, rootstocks and their respective scion/rootstock combinations were analyzed: UC2/Oleo, UC2/Uba and UC2/Imbu. Then, the plants were separated into three groups: C0, none drought cycle; C1, one drought cycle and C3, three drought cycles. Each cycle contained 20 days of water deficit followed by 10 days of rewatering. Subsequently, a 35 day water deficit was applied to all groups, keeping part of it in full irrigation. The selected parameters were:  $F_2$  (relative to the presence of the L band, i.e. energetic disconnectivity of the PSII subunits),  $F_3$  (relative to the presence of the K band, i.e. imbalance between the electron flow from the Oxygen Evolution Complex to the reaction center of the PSII),  $DI_0/RC$  (total energy dissipated by active reaction center),  $PI_{ABS}$  (potential performance index of the PSII),  $PI_{TOTAL}$  (total photochemical performance index). The "Oleo" rootstock was the one that generated 'Uba' mango seedlings that were more vigorous and drought tolerant when exposed to the water deficit only once. However, this tolerance decreased when the plants were subjected to recurrent droughts, losing the ability to recover after the third consecutive water deficit. In the end, it was possible to conclude that the induction of drought tolerance through differential acclimatization is dependent on the rootstock used; and confirm the use of chlorophyll a fluorescence as an indicator of 'Ubá' mango rootstocks more tolerant of water deficit.

Keywords: *Mangifera indica* L. Photosynthesis. Drought. Differential acclimation. Stress "memory". Proline.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Condições de desenvolvimento de cada porta-enxerto (cv. Óleo, Ubá e Imbú) aos 30 dias após o plantio (30 DAP), em janeiro de 2017. ....32

Figura 2 — Propagação vegetativa por enxertia do tipo garfagem no topo à inglesa simples, realizada 230 dias após o plantio dos porta-enxertos (230 DAP). (A) Estacas de manga 'Ubá Clone 2' (UC2) foram utilizadas como copas sobre os porta-enxertos "Óleo", 'Ubá' e "Imbú", gerando três combinações distintas de copa/porta-enxerto: UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú. (B) A copa foi coberta com plástico transparente para manter um microclima favorável ao desenvolvimento das gemas apicais até o surgimento dos primeiros folíolos. (C). Aos 60 dias após a enxertia (60 DAE) todas as combinações apresentaram mesma altura.....33

Figura 3 — Transplântio das mudas enxertadas, de sacolas (4 litros) para vasos maiores (25 litros), com intuito de evitar a restrição radicular durante a condução do experimento II.....34

Figura 4 — (A) Representação esquemática do delineamento experimental II. Grupo C0, plantas que receberam irrigação durante todo o experimento, mantendo a umidade do solo igual à capacidade de campo, não sendo submetidas a nenhum ciclo de seca; grupo C1, plantas que foram submetidas a apenas um ciclo de seca, e grupo C3, plantas que foram submetidas a três ciclos de seca. (B) Representação esquemática da simulação das secas recorrentes. Cada ciclo de seca consistiu em 20 dias de déficit hídrico, seguidos por 10 dias de recuperação. O déficit hídrico foi marcado pela suspensão da irrigação por 20 dias, tempo necessário para que a umidade do substrato atingisse valores 50% abaixo da capacidade de campo (CC) e o estresse hídrico não causasse danos irreversíveis nas plantas. Na recuperação, houve o retorno da irrigação por 10 dias, tempo necessário para que todas as plantas recuperassem pelo menos do primeiro déficit hídrico. ....35

Figura 5 — Transientes OJIP da fluorescência da clorofila *a* ao final dos três ciclos de seca (escala de tempo na base log), entre as combinações de copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) com (A, D e G) nenhum ciclo de seca — C0, (B, E

e H) um ciclo de seca — C1 e (C, F e I) três ciclos de seca — C3. Foi normalizada a fluorescência relativa variável entre as etapas (A, B e C)  $F_0$  e  $F_P - \Delta V_t$ , (D, E e F)  $F_0$  e  $F_I - \Delta V_{OI}$  e (G, H e I)  $F_I$  e  $F_P - \Delta V_{IP}$ , utilizando como referência a combinação UC2/Óleo em C0. ....59

Figura 6 — Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) entre as combinações de copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) com (A) nenhum ciclo de seca — C0, (B) um ciclo de seca — C1 e (C) três ciclos de seca — C3.....60

Figura 7 — Parâmetros fisiológicos relacionados à fluorescência da clorofila *a* das combinações copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) em cada déficit hídrico (seca) e remolhamento (recuperação), durante os três ciclos de seca do grupo C3. (A) Energia total dissipada por centro de reação,  $Dl_0/RC$ . (B) Eficiência com a qual um elétron de  $Q_B$  é transferido até os receptores finais do FSI,  $\delta R_0$ . (C) Índice de desempenho potencial do FSII,  $PI_{ABS}$ . (D) Índice de desempenho fotoquímico total,  $PI_{TOTAL}$ . Barras representam erro padrão. \*\*\* $p < 0,0001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ . ....61

Figura 8 — Parâmetros fisiológicos relacionados às trocas gasosas das combinações copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) em cada déficit hídrico (seca) e remolhamento (recuperação), durante os três ciclos de seca do grupo C3. (A) Taxa líquida de fotossíntese,  $A$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). (B) Eficiência aparente de uso da água  $A/g_s$  ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ). (C) Taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  intercelular,  $A/C_i$  ( $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (D) Eficiência instantânea de uso da água,  $A/E$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ). Barras representam erro padrão. \*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ . ....62

Figura 9 — Transientes OJIP da fluorescência da clorofila *a* (escala de tempo na base log) após a simulação da seca futura. Diferenças cinéticas foram observadas entre as combinações copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) submetidas ao déficit hídrico (DH) e mantidas em plena irrigação (IRR) para as plantas submetidas previamente (A, D e G) a nenhum ciclo de seca — C0, (B, E e H) a um ciclo de seca — C1 e (C, F e I) a três ciclos de seca — C3. Foi normalizada a fluorescência relativa variável entre as etapas (A, B e C)  $F_0$  e  $F_P - \Delta V_t$ , (D, E e F)  $F_0$  e  $F_K - \Delta V_{OK}$ , conhecida como banda L e (G, H e I)  $F_0$  e  $F_J - \Delta V_{OJ}$ , conhecida como banda K. Para isso, foi utilizada como referência a combinação UC2/Óleo C0 IRR. ....69

Figura 10 — Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) entre as combinações copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) submetidas ao déficit hídrico (DH) e mantidas em plena irrigação (IRR) para as plantas submetidas previamente (A) a nenhum ciclo de seca — C0, (B) a um ciclo de seca — C1 e (C) a três ciclos de seca — C3. ....71

Figura 11 — (A, B e C) Conteúdo de prolina, (D, E e F) índice de desempenho fotoquímico total -  $PI_{TOTAL}$  e (G, H e I) taxa de fotossíntese líquida -  $A$  entre as combinações copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) submetidas ao déficit hídrico (DH) e mantidas em plena irrigação (IRR) para as plantas submetidas previamente (A, D e G) a nenhum ciclo de seca — C0, (B, E e H) a um ciclo de seca — C1 e (C, F e I) a três ciclos de seca — C3. As barras indicam erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de comparações múltiplas Duncan ( $\alpha = 0,05$ ). ....73

Figura 12 — Correlação de Pearson do (A, B e C) índice de desempenho fotoquímico total ( $PI_{TOTAL}$ ) e da (D, E e F) condutância estomática ( $gs$ ) com conteúdo de prolina foliar, distinguindo cada combinação copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) sob déficit hídrico (DH) e mantida em plena irrigação (IRR), submetida previamente a (A, D e G) nenhum ciclo de seca — C0, (B, E e H) um ciclo de seca — C1 e (C, F e I) três ciclos de seca — C3. ....75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido abscísico
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> )
FSI	Fotossistema I
FSII	Fotossistema II
INCAPER	Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural
IPCC	Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (do inglês <i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i> )
IRGA	Analisador de trocas gasosas por infravermelho (do inglês <i>InfraRed Gas Analyzer</i> )
JIP	Teste realizado com a curva OJIP, baseado na teoria do fluxo de energia em biomembranas fotossintéticas
NADP <sup>+</sup>	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (forma oxidada) (do inglês <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i> )
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida hidrogenado (forma reduzida) (do inglês <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen</i> )
NPQ	Dissipação não fotoquímica (do inglês <i>non-photochemical quenching</i> )
OJIP	Curva de fluorescência da clorofila <i>a</i> registrada com o PEA, baseado no efeito Kautsky
P5C	$\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato
P5CDH	Desidrogenase da $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato

P5CR	Redutase da $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato
P5CS	Sintetase da $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato
PCA	Análise de componentes principais (do inglês <i>Principal Component Analysis</i> )
PEA	Analisador da eficiência da planta (do inglês <i>Plant Efficiency Analyser</i> )
ProDH	Desidrogenase da Prolina
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i> )
RUBISCO	Ribulose 1,5-difosfato carboxilase/oxigenase (do inglês <i>ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase</i> )
RuBP	Ribulose 1,5-difosfato (do inglês <i>ribulose-1,5-bisphosphate</i> )
SEAG	Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca
SPAD	Desenvolvimento de análise solo-planta (do inglês <i>Soil-Plant Analysis Development</i> )

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1	IMPACTOS DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS NA FRUTICULTURA .....	16
1.2	A MANGICULTURA EM DESTAQUE .....	17
1.3	A IMPORTÂNCIA DOS PORTA-ENXERTOS .....	19
1.4	O MÉTODO DA ACLIMATAÇÃO DIFERENCIAL.....	23
1.5	O USO DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA <i>a</i> .....	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
3.1	MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	31
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL I.....	32
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL II.....	33
3.4	CRESCIMENTO .....	36
3.5	FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA <i>a</i> .....	36
3.6	TEOR DE CLOROFILA .....	38
3.7	TROCAS GASOSAS .....	38
3.8	RELAÇÕES HÍDRICAS.....	38
3.9	QUANTIFICAÇÃO DE PROLINA FOLIAR .....	39

3.10	ESTATÍSTICA .....	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>CAPÍTULO 1: O desempenho fotossintético é determinado pela combinação copa/porta-enxerto na propagação de mangueira .....</b>	<b>41</b>
	a) FARIA-SILVA, L.; GALLON, C. Z.; SILVA, D. M. Photosynthetic performance is determined by scion/rootstock combination in mango seedling propagation. Scientia Horticulturae, v. 265, n. November 2019, p. 1–8, 2020. ....	41
<b>4.2</b>	<b>CAPÍTULO 2: O grau de tolerância diferencial à seca em mangueiras enxertadas é dependente do porta-enxerto utilizado.....</b>	<b>50</b>
<b>4.2.1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2.2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
4.2.2.1	Material vegetal e área de estudo .....	53
4.2.2.2	Delineamento experimental.....	53
4.2.2.3	Análise experimental .....	54
4.2.2.3.1	Medidas de crescimento.....	54
4.2.2.3.2	Relações hídricas.....	55
4.2.2.3.3	Medidas da fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	55
4.2.2.3.4	Medidas de fotossíntese.....	56
4.2.2.3.5	Quantificação da prolina.....	56
4.2.2.4	Análise estatística.....	57
<b>4.2.3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
4.2.3.1	Efeitos durante as secas recorrentes .....	58

4.2.3.2	Efeitos dos ciclos de seca anteriores no déficit hídrico posterior .....	68
<b>4.2.4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
4.2.4.1	Mangueiras 'Ubá' aclimatam diferencialmente a ciclos de secas recorrentes dependente do porta-enxerto utilizado .....	76
4.2.4.2	A aclimação diferencial em mangueiras 'Ubá' induz a tolerância ao déficit hídrico futuro dependente do porta-enxerto utilizado .....	79
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>99</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 IMPACTOS DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS NA FRUTICULTURA

São bastante convincentes os indícios de que o cenário climático futuro será amplamente modificado, com influência direta nos padrões de desenvolvimento de várias espécies de plantas. O Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (*Intergovernmental Panel on Climate Change* — IPCC) já divulgou, até o momento, cinco relatórios desde 1990, mostrando evidências científicas sobre o aquecimento global e suas consequências nas condições climáticas futuras (IPCC, 2014).

Os relatórios são conclusivos e apontam as mudanças climáticas vividas no século XXI como sendo uma ameaça à produção agrícola e à segurança alimentar, afetando diretamente no futuro do agronegócio. As alterações na distribuição de chuvas serão um dos parâmetros mais afetados, com o aumento da temperatura e da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico. Todos esses fatores podem alterar os períodos de desenvolvimento das plantas, atrasando o crescimento vegetativo e modificando as condições de colheita dos frutos (STHAPIT; SCHERR, 2012).

Pesquisas com grandes culturas anuais como milho, soja e arroz já são bastante abordadas. O maior interesse nessas espécies é por possuírem ciclo de desenvolvimento rápido, que agiliza a condução dos trabalhos, além da grande relevância econômica no mercado. Por outro lado, os efeitos a longo prazo em plantas perenes ainda é uma área que permanece incerta e pouco explorada, em especial na fruticultura. Apesar de serem espécies com melhor capacidade de adaptação, o maior tempo de exposição às variações climáticas fazem com que sejam também as mais sensíveis às mudanças. No entanto, ainda há muitas incertezas quanto à extensão dos danos para algumas espécies específicas (JARVIS et al., 2010; NATH et al., 2019).

Aliado às mudanças climáticas, outra grande preocupação futura é o rápido crescimento populacional. Atualmente somos 7,7 bilhões de pessoas no planeta. Existem evidências de que até o final do século a população mundial possa alcançar a marca dos 11 bilhões de pessoas, causando um aumento significativo na demanda

por alimentos (ROSER, 2020). Diante dessas previsões, cresce o interesse em investigações sobre o desempenho de espécies cultivadas mediante estresses ambientais, sobretudo, o estresse a seca na fruticultura tropical (STHAPIT; SCHERR, 2012; CHADWICK et al., 2015).

Dentro da fruticultura existem especificidades para cada cultura. As exigências climáticas necessárias para cada fruteira completar o seu ciclo de desenvolvimento são as mais distintas, pois as respostas fisiológicas aos estresses ambientais variam de acordo com a espécie e até mesmo a cultivar observada (RAO; SHIVASHANKARA; LAXMAN, 2016). A mangueira, por exemplo, necessita de um período seco e frio para induzir o início da florada (LAXMAN; ANNAPOORNAMMA; BIRADAR, 2016; MAKHMALE et al., 2016). Alterações na distribuição de chuva e na temperatura podem causar várias mudanças no zoneamento climático dessa cultura, exigindo adequação de manejo e novas estratégias de cultivo (PAULA et al., 2010).

## 1.2 A MANGICULTURA EM DESTAQUE

*Mangifera indica* L. é uma das espécies tropicais mais popular e cultivada em todo o mundo. Seus frutos são utilizados tanto para o consumo *in natura* quanto para o uso industrial na fabricação de sucos. Atualmente, a demanda por mangas nos países desenvolvidos está aumentando, mas a grande maioria ainda é originada de cultivos extrativistas e vendida nos mercados locais, tornando as mangueiras numa cultura de grande relevância econômica e social (MOHAMMAD; CHENG, 2015).

A produção mundial de manga atingiu um total de 50,6 milhões de toneladas em 2017. É uma das cinco culturas mais importantes da fruticultura, perdendo apenas para banana, maçã, uva e laranja. Sete países se destacam por responder por 80% da produção mundial (Índia, China, Tailândia, Indonésia, México, Paquistão e Brasil), sendo o Brasil o país com as áreas mais produtivas, com médias acima de 18 t/ha. O Brasil também se destaca quanto a exportação, onde mais de 10% da produção de manga é destinada ao mercado externo. (FAOSTAT, 2017).

As melhores áreas para produção comercial são aquelas com um período frio e seco antes da floração e abundante umidade do solo e temperaturas moderadamente

quentes (30 – 33 °C) durante o desenvolvimento dos frutos. O estresse por déficit hídrico impede o rubor vegetativo e proporciona mais tempo para o acúmulo de estímulos florais, induzindo a floração e adiantando a produção (LAXMAN; ANNAPOORNAMMA; BIRADAR, 2016; MAKHMALE et al., 2016). As estratégias de irrigação podem economizar quantidades consideráveis de água sem afetar o rendimento em grande extensão, possivelmente aumentando o peso médio do fruto, aparentemente sem efeitos negativos a longo prazo (SPREER et al., 2009; CARR, 2014; FARIA-SILVA et al., 2019).

No estado do Espírito Santo, a manga mais cultivada é a variedade 'Ubá'. Os frutos da mangueira 'Ubá' atendem perfeitamente às necessidades das indústrias de produção de polpa, que posteriormente encaminham essa polpa para as indústrias de sucos prontos para beber (BENEVIDES et al., 2008). A preferência por esses frutos é devida a polpa possuir maior teor de sacarose e menor acidez (SILVA et al., 2012), com sabor, aroma e cor marcante (OLIVEIRA et al., 2013), além de conter antioxidantes naturais, como  $\beta$ -caroteno e vitamina C superiores às variedades comumente encontradas no mercado (MATA et al., 2011). No entanto, a indústria atualmente está sujeita a flutuações no fornecimento de frutos. A instabilidade climática vigente nas regiões produtoras causa irregularidades na produção. A alta dependência pelas precipitações pluviométricas é devido ao predomínio de cultivos em condições de sequeiro.

O Governo do Estado do Espírito Santo, por meio da Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca (Seag), e do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), lançaram em 2003 o "Polo de Manga para a Indústria no Estado do Espírito Santo". O projeto visa atender as demandas do mercado e diversificar a agricultura local, com foco no aumento de produtividade, melhoria da qualidade e atendimento às exigências da agroindústria (INCAPER, 2009).

A mangueira cultivada no Espírito Santo possui uma característica marcante, que é a alternância fisiológica de produção. Essa instabilidade pode ser causada tanto pelas variáveis climáticas quanto pela qualidade das mudas. No ano de 2015, por exemplo, a ausência de chuvas no período vegetativo, logo após a colheita (janeiro) e na pós-

florada (agosto e setembro) comprometeu a emissão de novos ramos e o enchimento dos frutos, respectivamente. Com isso, houve menos formação de flores e aumento do número de frutos abortados, o que ocasionou prejuízos significativos à cultura na safra de 2015/16 (INMET, 2015; INCAPER, 2016; FARIA-SILVA et al., 2019).

Além dos fatores climáticos, o método de propagação das mudas também influencia na alternância fisiológica da produção. A instabilidade nesse caso está associada à qualidade das mudas originadas de diferentes porta-enxerto (KOEPEKE; DHINGRA, 2013). Fruticultores e viveiristas ainda divergem bastante sobre a escolha do melhor porta-enxerto para formação de mudas de mangueira. A deficiência em pesquisas nessa área leva ao desconhecimento sobre a formação de pomares com boa adaptabilidade às condições edafoclimáticas de cada região.

### 1.3 A IMPORTÂNCIA DOS PORTA-ENXERTOS

A enxertia é um método de propagação vegetativa muito comum na fruticultura. Consiste basicamente em conectar a parte aérea (epibioto, enxerto, copa, cavaleiro, *scion*) de uma planta matriz adulta, com a parte basal (hipobioto, porta-enxerto, cavalo, *rootstock*) de uma muda jovem, gerando a combinação copa/porta-enxerto (dibioto). A copa é o clone de interesse comercial, que carrega consigo material genético fiel à planta mãe. O porta-enxerto é o sistema radicular de interesse agrônomo, que controla, sobretudo, a produtividade. Os Porta-enxertos com maior tolerância aos estresses bióticos e abióticos influenciam positivamente na produtividade da copa (KOEPEKE; DHINGRA, 2013; LOVE et al., 2017).

Outra característica procurada com o uso do porta-enxerto é o avanço da idade fisiológica da planta. Mangueiras originadas de semente podem demorar mais de oito anos (idade cronológica) para iniciarem o período reprodutivo e terem sua primeira colheita comercialmente viável. Quando é realizada a enxertia, o material clonal utilizado como copa transmite a idade fisiológica da matriz para a planta enxertada (copa/porta-enxerto). O período reprodutivo nesse caso é adiantado e a primeira colheita pode ocorrer em até três anos (MORTON, 1987; LOVE et al., 2017).

O primeiro relato verificável de enxertia em plantas foi em 412 a.C. Nessa época a enxertia já parecia ser uma técnica comum. As primeiras pesquisas sobre o uso de porta-enxerto foram sobre características como resistência a doenças e tolerância ao frio (ROGERS; BEAKBANE, 1956).

A propagação via enxertia não é uma exclusividade da fruticultura. Na olericultura também são cultivadas plantas enxertadas em porta-enxertos que conferem tolerância a estresses abióticos e bióticos, regulando o tamanho do enxerto e contribuindo para a qualidade do fruto (TATEISHI, 1927; LEE et al., 2010; GREGORY et al., 2013).

A escolha correta do porta-enxerto melhora a comunicação raiz-copa por sinalizações hidráulicas e químicas. O contato físico entre raiz e solo pode ser aumentada pela maior distribuição do sistema radicular, intensificando a produção sustentável. A pressão hidráulica, fortemente afetada pela união do enxerto durante o processo de cicatrização, modula a quantidade de hormônios e nutrientes movidos para a copa. Os níveis de nutrientes, o teor de água e os hormônios controlam a capacidade fotossintética, afetando diretamente na taxa de crescimento da planta enxertada (GREGORY et al., 2013). Em mangueiras enxertadas foi possível observar maior eficiência de uso da água em comparação às não enxertadas (MINJA et al., 2017).

A quantidade e qualidade dos frutos são características de alta relevância econômica, amplamente influenciadas pelos porta-enxertos. O porta-enxerto interfere na sinalização hormonal, causando aumento de biomassa e fotossíntese, altamente correlacionadas com a produtividade (SMITH; HOULT; BRIGHT, 2003; CANTERO-NAVARRO et al., 2016).

O porta-enxerto também controla o crescimento da planta por meio da modulação da expressão de genes na copa. Diferentes combinações copa/porta-enxerto podem apresentar variações na expressão gênica de algumas proteínas (COOKSON; OLLAT, 2013; GREGORY et al., 2013; COCHETEL et al., 2017).

A mesma copa quando enxertada em diferentes porta-enxertos pode apresentar respostas diferenciadas quando expostas ao estresse por déficit hídrico, principalmente em relação à produtividade. Resultados assim já foram demonstrados para plantas de pimenta (PENELLA et al., 2017), pepino (ZHOU et al., 2007), citros

(RODRIGUEZ-GAMIR et al., 2010) e manga (LUVAHA; NETONDO; OUMA, 2007). As raízes têm influência significativa no funcionamento do aparelho fotossintético. O uso de plantas enxertadas sob condições de estresse favorece a planta por um mecanismo intrínseco que melhora a fotossíntese, promovendo maior crescimento e desenvolvimento (ZHOU et al., 2007).

Em pimenteiras, diferentes combinações de copa/porta-enxerto apresentaram variações na produtividade em resposta aos diferentes porta-enxertos e ao estresse de déficit hídrico. As plantas sem enxertia (pé franco) apresentaram maior queda na fotossíntese quando sob estresse (PENELLA et al., 2017).

Raízes de plantas de pepino têm influência significativa no funcionamento do aparelho fotossintético. O uso de plantas enxertadas sob condições de estresse ao frio favorece a planta através de um mecanismo intrínseco que melhora a fotossíntese, promovendo assim o crescimento e desenvolvimento (ZHOU et al., 2007).

Em citros, a tolerância à seca induzida por um determinado porta-enxerto pode estar relacionada ao maior ajuste osmótico, causado pelas menores reduções no teor de água relativo das folhas e pelos maiores potenciais de trocas gasosas foliares nas combinações com esse porta-enxerto em comparação às demais (RODRIGUEZ-GAMIR et al., 2010).

A escolha do porta-enxerto ideal faz parte das estratégias de implantação de um pomar. Em mangueiras enxertadas, a alteração fisiológica é um parâmetro importante a ser considerado para seleção de porta-enxertos adequados. Em algumas combinações de copa/porta-enxertos, de acordo com o genótipo escolhido como porta/enxerto, pode ocorrer aumento da capacidade fotossintética e da condutância estomática, influenciando significativamente a taxa de transpiração (DAYAL et al., 2016).

Os genótipos poliembriônicos são mais usados como porta-enxertos do que os monoembriônicos. Essa preferência é devido às plantas originadas de sementes poliembriônicas serem réplicas genéticas exatas do progenitor feminino, independentemente da fonte de pólen. A semente monoembriônica gera apenas um broto de origem zigótica (híbridos). Já a semente poliembriônica gera vários brotos,

onde apenas um tem origem zigótica, enquanto os demais são nucelares (clones) (KRISHNA; SINGH, 2007; NIMBOLKAR et al., 2016).

Na região de origem da mangueira 'Ubá' (Zona da Mata em Minas Gerais) o porta-enxerto mais utilizado é o da mangueira "Imbú" (VIECCCELLI et al., 2016). No Espírito Santo, a preferência é pelo porta-enxerto "Óleo". Não há relatos na literatura sobre essa variedade. No entanto, a manga "Óleo" possui características semelhantes a outra variedade já descrita na literatura, conhecida como manga "D'água" (DONADIO, 1996). Assim como a manga D'água, os frutos da manga "Óleo" também são pequenos e arredondados, com coloração da casca esverdeada e com muitas fibras longas na polpa. As sementes são grandes e apresentam alta taxa de poliembrionia. As plantas são grandes vigorosas e muito produtivas. É possível que, devido ao regionalismo, a manga "Óleo" seja outra denominação da variedade manga "D'água".

Os efeitos dos porta-enxertos no crescimento, floração, produtividade e atributos de qualidade dos frutos das culturas frutíferas ainda são complexos e mal compreendidos. Estudos sobre a compreensão dos mecanismos subjacentes a esses efeitos ajudariam no melhoramento e seleção de porta-enxertos. É necessário estudar mais sobre a compreensão das substâncias de crescimento endógeno, das interações de porta-enxertos, do solo ou dos fatores climáticos, o que ajudaria a seleção e uso mais eficiente de porta-enxertos no futuro. Existe uma necessidade urgente de desenvolver porta-enxertos tolerantes a estresses bióticos e abióticos em diferentes culturas de frutas tropicais, subtropicais e temperadas (NIMBOLKAR et al., 2016).

Desempenho de porta-enxertos, como resistência a doenças (ARRIEL et al., 2016; BISPO et al., 2016), compatibilidade (MARTÍNEZ-BALLESTA et al., 2010; MINJA et al., 2017), crescimento (DAYAL et al., 2016; DONADIO et al., 2019), tolerância a salinidade (ZUAZO; RAYA; RUIZ, 2004; PANDEY et al., 2014), já são amplamente estudados. No entanto, pouco se sabe sobre a interação fotossintética entre copa/porta-enxertos em mangueiras 'Ubá' expostas a eventos recorrentes de déficit hídrico, assim como a possível aclimatação diferencial adquirida em cada combinação copa/porta-enxerto.

#### 1.4 O MÉTODO DA ACLIMATAÇÃO DIFERENCIAL

Além da escolha correta do porta-enxerto, existe outra estratégia chamada “rustificação” ou aclimatação que é realizada antes do transplante das mudas para o campo. O termo aclimatação, do ponto de vista agrícola, está relacionado à adoção de um conjunto de práticas operacionais adotadas durante a fase final de produção das mudas no viveiro, com a finalidade de aumentar a tolerância às adversidades edafoclimáticas possivelmente encontradas no campo (JACOBS DF, 2009).

Do ponto de vista biológico, a aclimatação é um processo complexo de reconhecimento e adaptação das mudas às condições de plantio. Com isso, ocorrem alterações nos mecanismos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos de defesa, para as plantas tolerarem as condições limitantes encontradas durante o estabelecimento no campo (LIMA et al., 2014). Uma das práticas envolvidas na fase de aclimatação inclui a manipulação do manejo da irrigação. A escassez hídrica no solo faz com que as plantas desenvolvam estratégias para minimizar as necessidades fisiológicas, como transpiração e fotossíntese, para sobreviverem com perdas mínimas de água (KINOSHITA; SEKI, 2014; KARLEC et al., 2017).

A restrição hídrica causa menor alocação de massa seca para sustentar o crescimento da parte aérea e os fotoassimilados são direcionados para o incremento do sistema radicular. O maior incremento radicular em relação à parte aérea é uma característica adaptativa comum às plantas submetidas ao estresse hídrico. Nessas condições, a planta aumenta a capacidade de obter água em outras camadas do solo e o produtor economiza na irrigação (LIMA et al., 2014). Estudos nessa área auxiliam na compreensão de como cada espécie pode crescer em condições ambientais adversas.

A exposição contínua a alguma condição estressante resulta em perda da capacidade das plantas responderem ao estresse (SCHEFFER et al., 2001). Por outro lado, quando submetidas a estresses recorrentes são capazes de aclimatar e, até mesmo, exibir respostas mais rápidas e em maior magnitude quando comparadas com plantas que passaram por apenas um evento estressante (BRUCE et al., 2007; BANERJEE; WANI; ROYCHOUDHURY, 2017; MENEZES-SILVA et al., 2017).

Poucas informações estão disponíveis sobre o comportamento de espécies perenes sujeitas a secas recorrentes. As fruteiras cultivadas em áreas vulneráveis à seca, por exemplo, estão expostas ao estresse hídrico quase todos os anos, e isso pode estimular a resposta às secas futuras. O estresse hídrico consecutivo, causado pelas secas recorrentes, pode afetar algumas plantas de maneira diferencial. As alterações epigenéticas sofridas durante esses estresses fazem com que algumas plantas adquiram uma aclimação diferencial, evento também conhecido como tolerância diferencial ou até mesmo “memória” ao estresse. Esses eventos são considerados por alguns pesquisadores como sendo a inteligência da planta (BRUCE et al., 2007; WALTER et al., 2011; MUNNÉ-BOSCH; ALEGRE, 2013; FLETA-SORIANO; MUNNÉ-BOSCH, 2016; HAAK et al., 2017).

A aclimação pode ser inferida para algumas espécies, aumentando a tolerância às adversidades futuras causadas pelas mudanças globais (NIKIFOROU; MANETAS, 2016). As modificações estruturais, genéticas e bioquímicas fazem as plantas terem uma resposta de aclimação mais rápida e maior tolerância no próximo evento de seca, quando em comparação com aquelas não estressadas anteriormente. Esse comportamento pode ser associado à “memorização” do estresse anterior (VILLAR-SALVADOR et al., 1999; MOLINIER et al., 2006; WANG et al., 2017; NEVES et al., 2018; TOMBESI et al., 2018).

O grau de resposta da aclimação é dependente da intensidade do estresse sofrido pelas secas recorrentes (BACKHAUS et al., 2014). A recuperação limitada da condutância estomática pode ser explicada pela recuperação fotossintética incompleta após o estresse hídrico. A fotossíntese líquida, a condutância estomática, a taxa de transporte de elétrons fotoquímicos e o conteúdo de clorofila diminuem com o aumento do déficit hídrico. Por outro lado, a dissipação de energia não fotoquímica aumenta, sugerindo uma fotoproteção (LIU et al., 2010).

Estudos recentes produziram evidências que indicam que os mecanismos epigenéticos são realmente essenciais para a aclimação ao estresse em plantas (KINOSHITA; SEKI, 2014). O potencial da tolerância diferencial para a estabilização dos ecossistemas em eventos climáticos extremos pode ser considerado como medida de mitigação e adaptação às mudanças climáticas (WALTER et al., 2013).

Plantas submetidas a vários eventos de seca no passado, futuramente podem apresentar menor inibição de crescimento do que aquelas não expostas anteriormente a esse estresse. A aclimatação pode melhorar a alocação de fotoassimilados para as raízes e a capacidade de absorção de água e minerais (KOZLOWSKI; PALLARDY, 2002).

Sob condições de déficit hídrico, uma das principais respostas de tolerância das plantas é o ajuste osmótico (SANDERS; ARNDT, 2012). O ajuste osmótico é o acúmulo ativo de solutos para manter a pressão de turgor em resposta à diminuição do potencial hídrico. Já foi demonstrado para diversas plantas cultivadas, como trigo, sorgo e girassol, que uma série de solutos se acumula com o ajuste osmótico (açúcares solúveis, ácidos carboxílicos, potássio, cálcio, cloreto, nitrato e aminoácidos) (TURNER, 2017).

Os solutos que se acumulam também são chamados de osmólitos e incluem além dos açúcares, também a prolina e a glicina betaína. O acúmulo de prolina em resposta ao déficit hídrico ocorre com o aumento da síntese e diminuição da degradação. A prolina é sintetizada a partir do ácido L-glutâmico (glutamato) via  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5C) por meio das enzimas sintetase da P5C (P5CS) e redutase da P5C (P5CR). A degradação da prolina ao glutamato ocorre por meio das enzimas desidrogenase da prolina (ProDH) e desidrogenase da P5C (P5CDH). Em resposta ao déficit hídrico, a P5CS é induzida e a ProDH é reprimida, resultando em um acúmulo líquido de prolina (BRAY, 2001).

O acúmulo de prolina sob estresse osmótico é acompanhado pelo aumento na concentração de açúcares solúveis. A participação de vários hormônios e açúcares serve para regular a síntese e a degradação da prolina. As diferentes localizações da enzima P5CR indicam que a prolina pode ser sintetizada tanto no citosol quanto no estroma de cloroplastos. Já a degradação ocorre na mitocôndria (BALIBREA et al., 1997; KAVI KISHOR; SREENIVASULU, 2014).

Produção de prolina como ajuste osmótico já foi observada em diferentes cultivares de manga sob déficit hídrico. O conteúdo de prolina nas folhas aumentou durante a restrição hídrica e reduziu significativamente após a reidratação (ELSHEERY; CAO,

2008). Também já foi observado que esse aumento de prolina é maior em mangueiras enxertadas do que de pé franco (PENELLA et al., 2017).

Os aumentos no acúmulo de prolina foliar também podem estar intimamente relacionados ao aumento do nível de ácido abscísico (ABA) e à diminuição da condutância estomática (ZAHARAH; RAZI, 2009). Isso porque, a redução da condutância estomática com o estresse hídrico pode ser atribuída ao aumento do acúmulo de ABA, hormônio esse que está associado a indução da síntese de prolina (HARE; CRESS; VAN STADEN, 1999).

Além de atuar no ajuste osmótico durante o déficit hídrico, a biossíntese de prolina também ajuda a manter as taxas de NADP<sup>+</sup>/NADPH altas e evitar o estresse oxidativo causado pelo excesso de NADPH produzido na etapa fotoquímica da fotossíntese. Durante a síntese da prolina o NADPH é utilizado como agente redutor pelas enzimas P5CS e P5CR, gerando NADP<sup>+</sup>. O oposto ocorre durante a degradação, onde NADP<sup>+</sup> é utilizado como agente oxidante pelas enzimas ProDH e P5CDH, gerando NADPH. O processo de equilíbrio entre a síntese e degradação de prolina é eficaz na desintoxicação das espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) induzidas pelo estresse. Esse é um dos meios necessários para a manutenção do crescimento da planta (KAVI KISHOR; SREENIVASULU, 2014; ASHRAF et al., 2018).

É possível estimar as variações nas taxas de NADP<sup>+</sup>/NADPH associadas ao transporte de elétrons fotoquímicos nas plantas de forma rápida e não invasiva por meio da fluorescência da clorofila *a* (SIVAK; WALKER, 1985; STRASSER; SRIVASTAVA; GOVINDJEE, 1995; STRASSER; TSIMILLI-MICHAEL; SRIVASTAVA, 2004).

## 1.5 O USO DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a*

A capacidade fotossintética das plantas cultivadas é amplamente utilizada como um dos atributos fisiológicos mais importantes na avaliação do vigor, da biomassa e do rendimento econômico de cada cultivar (LICHTENTHALER et al., 2013; JOHNSON, 2016).

O estresse por déficit hídrico causa danos primários ao aparato fotossintético. O FSII possui maior resistência durante o déficit hídrico quando comparado ao FSI, mas em condições de extrema seca os impactos negativos são observados em todo fotossistema (LAURIANO et al., 2006; KALAJI et al., 2016).

As variações no desempenho fotossintético mediante estresses abióticos são nitidamente observadas por meio da fluorescência da clorofila *a*. A vantagem desse método é que as análises não são destrutivas e podem ser realizadas tanto em laboratório quanto em condições de campo (*in situ*). Isso faz com que tenha alto potencial para uso como indicador de estresses em plantas cultivadas (GUO; TAN, 2015; GOLTSEV et al., 2016; KALAJI et al., 2016; JOHNSON, 2018).

Para medir a fluorescência da clorofila *a*, normalmente é utilizado um fluorômetro portátil do modelo Handy-PEA (Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, Reino Unido). A sigla PEA vem do inglês *Plant Efficiency Analyser*, que significa “analisador de eficiência da planta”. Com esse equipamento é possível obter uma curva de fluorescência transiente relacionada ao efeito Kautsky, conhecida como curva OJIP (STRASSER; SRIVASTAVA; GOVINDJEE, 1995; STIRBET; GOVINDJEE, 2011).

Com base na teoria do fluxo de energia em biomembranas, os dados da curva OJIP são processados por diversas equações e cálculos, resultando em dezenas de parâmetros relacionados à cadeia fotossintética de transporte de elétrons. Os cálculos desses parâmetros permitem obter valores da eficiência de toda a cascata de energia, desde a absorção no FSII à redução dos receptores finais de elétrons do FSI (STRASSER; SRIVASTAVA; GOVINDJEE, 1995; STRASSER; TSIMILLI-MICHAEL; SRIVASTAVA, 2004; TSIMILLI-MICHAEL, 2019). Esse processo é conhecido como teste JIP e pode ser executado pelo programa PEA plus, versão 1.13 (Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, Reino Unido) (HANSATECH, 2018; STIRBET et al., 2018).

Os parâmetros fisiológicos obtidos pelo teste JIP são relacionados basicamente à etapa fotoquímica da fotossíntese. Para obter parâmetros fisiológicos diretamente relacionados à etapa bioquímica da fotossíntese, é utilizado o analisador de trocas gasosas por infravermelho (IRGA, do inglês *InfraRed Gas Analyser*). Essa ferramenta

permite coletar informações do fluxo de CO<sub>2</sub> e do vapor d'água através dos estômatos e calcular parâmetros referentes à fotossíntese líquida (LONG; FARAGE; GARCIA, 1996). No entanto, a relação entre a fluorescência da clorofila *a* e a assimilação de carbono fotossintético é estreita, imediata e precisa. O que faz do fluorômetro Handy-PEA um equipamento que pode dar referências precisas sobre a eficiência fotossintética (SIVAK; WALKER, 1985).

A capacidade de compreender o comportamento fotossintético das plantas em condições ambientais adversas permite rastrear genótipos com características desejáveis. Para algumas arbóreas, por exemplo, já foi possível diagnosticar o desempenho sob alta luminosidade em campo, por meio da fluorescência da clorofila *a*, selecionando as espécies mais promissoras para uso na recuperação de áreas degradadas (GONÇALVES; SANTOS JÚNIOR, 2005).

O método da fluorescência da clorofila *a* também pode ser potencialmente utilizado na triagem de genótipos mais tolerantes a seca (GUHA; SENGUPTA; REDDY, 2013), a salinidade (BACARIN et al., 2011; ESTAJI et al., 2019), a metais pesados (HASAN; BASAHI; ISMAIL, 2013; FRANI et al., 2017; FASEELA et al., 2019), ao frio (ARSLAN; EYİDOĞAN; EKMEKÇİ, 2003), dentre outros efeitos ambientais adversos.

Os métodos estudados por meio da técnica da fluorescência da clorofila *a* também são passíveis de patentes. Com as leituras realizadas por meio do fluorômetro Handy-PEA é possível determinar o estado nutricional das plantas (CARTENSEN et al., 2016) e até mesmo a qualidade de frutos e hortaliças (BEAUDRY et al., 1998).

Durante a seca, as plantas controlam a perda de água diminuindo a abertura estomática. Com menor condutância estomática, as trocas gasosas são comprometidas e a demanda bioquímica por fotoassimilados (ATP e NADPH) diminui significativamente (LIU et al., 2010). Nessas condições, o rendimento fotoquímico pode manter em plena atividade, diminuindo a razão NADP<sup>+</sup>/NAPH. O grande problema é que o excesso de NADPH provoca a produção de ROS, causando o estresse oxidativo (MASHILO et al., 2017).

A fotoinibição no FSII pode funcionar como fotoproteção diante da produção de ROS pelo FSI (TIKKANEN; MEKALA; ARO, 2014). Aliado a isso, ocorre o aumento na

biossíntese de prolina que ajuda a manter o equilíbrio da razão  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  (ASHRAF et al., 2018). Essa relação estreita do conteúdo de prolina e da fluorescência da clorofila *a* com o estresse por déficit hídrico, faz com que sejam ótimos métodos indicadores.

Considerando que o desempenho fotossintético é determinado pela combinação copa/porta-enxerto e que a análise da fluorescência da clorofila *a* é um método rápido, não destrutivo e confiável para identificar o porta-enxerto mais promissor na produção de mudas de mangueira 'Ubá' (FARIA-SILVA; GALLON; SILVA, 2020), foi testada a hipótese de que diferentes porta-enxertos devem alterar o desempenho fotossintético da copa após restrições hídricas recorrentes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* com potencial de indicadores específicos para caracterização do porta-enxerto mais vigoroso e capaz de gerar mangueiras 'Ubá' mais tolerantes ao déficit hídrico recorrente.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar as variações no desempenho fotossintético de diferentes porta-enxertos utilizados na produção de mudas de manga 'Ubá' usando as análises da cinética da fluorescência da clorofila *a*.
- Quantificar as variações no desempenho fotossintético de clones de manga 'Ubá' enxertados sobre diferentes porta-enxertos, usando as análises da cinética da fluorescência da clorofila *a*.
- Relacionar as variações do desempenho fotossintético dos porta-enxertos com suas respectivas combinações copa/porta-enxerto.
- Identificar o porta-enxerto mais promissor na formação de mudas de manga 'Ubá' em condições de conforto hídrico.
- Identificar o porta-enxerto mais promissor na formação de mudas de manga 'Ubá' em condições estressantes de déficit hídrico.
- Investigar os efeitos das secas recorrentes na aclimação diferencial de mangueiras 'Ubá' enxertadas com diferentes porta-enxertos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Mudas de manga (*Mangifera indica* L.) das cultivares Óleo, Ubá e Imbú foram utilizadas como porta-enxertos na produção de mudas da mangueira 'Ubá Clone 2' (UC2). As sementes de manga "Óleo" e 'Ubá' foram coletadas de plantas da região do município de Ecoporanga e Linhares, Espírito Santo, Brasil, respectivamente. Esses são os porta-enxertos que os viveiristas e agricultores da região consideram ser os mais promissores na produção de mudas de manga. Enquanto a mangueira "Imbú" é o porta-enxerto mais utilizado na formação de pomares de manga da região da Zona da Mata, Minas Gerais, Brasil. Suas sementes foram coletadas em plantas do município de Dona Euzébia, Minas Gerais, Brasil.

Estacas de 'Ubá Clone 2' foram coletadas em plantas-mãe de Minas Gerais, Brasil. Essas matrizes foram de uma seleção em massa realizada por viveiristas da região, onde foram observadas características agrônômicas importantes, como alto rendimento e qualidade do fruto. O experimento foi realizado no viveiro comercial Frucafé Mudas e Plantas Ltda., localizado no município de Linhares, Espírito Santo, Brasil (latitude 19° 19' 13,7" S; longitude 40° 04' 55,3" O; 38 m de altitude).

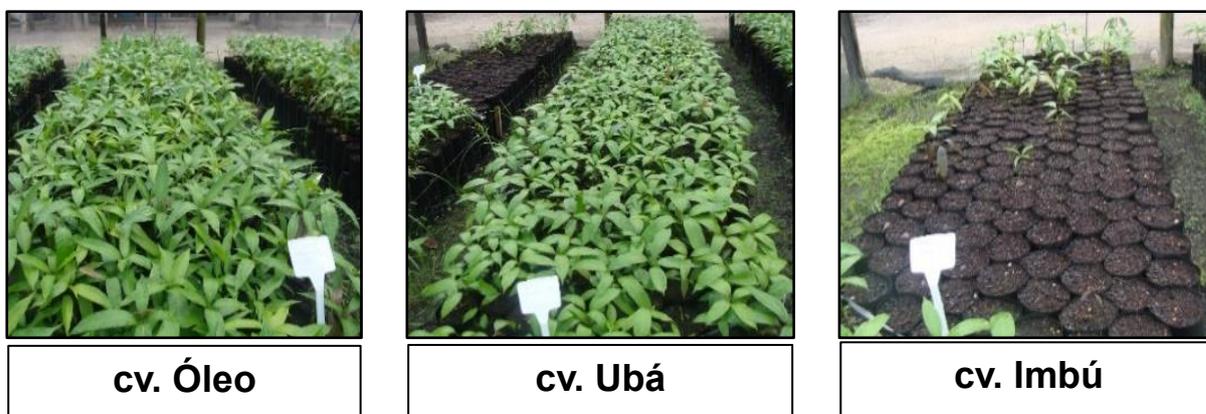
Em dezembro de 2016, as sementes de cada porta-enxerto foram germinadas em sacos de polietileno de quatro litros (20 × 32 cm) contendo substrato com compostos orgânicos de densidade aparente 0,23 g cm<sup>-3</sup>. O desenvolvimento das mudas ocorreu em casa de vegetação, onde as médias de temperatura e umidade relativa do ar dia/noite foram de 33/25 °C e 50/90%, respectivamente. A média diária da radiação fotossinteticamente ativa foi de 400 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Os manejos fitossanitário, nutricional e hídrico foram mantidos conforme os padrões convencionais do viveiro.

### 3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL I

Esse delineamento foi utilizado para identificar o porta-enxerto mais promissor na formação de mudas de manga 'Ubá' em condições normais de conforto hídrico. Os resultados foram discutidos no CAPÍTULO 1.

A princípio, foram utilizados porta-enxertos (cv. Óleo, Ubá e Imbú) propagados por sementes. Em janeiro de 2017, aos 30 dias após o plantio (DAP), foram coletados dados de porcentagem de germinação, número de brotos por sementes e altura do maior broto (Figura 1). As demais análises foram iniciadas quando as mudas passaram a apresentar folhas definitivas completamente expandidas, aos 60, 100, 180 e 230 DAP. Para isso, foi realizado o desbaste (deixando o broto mais alto) e em seguida selecionadas as 30 mudas mais vigorosas em cada porta-enxerto. Sendo que cada muda pertencia a uma unidade amostral.

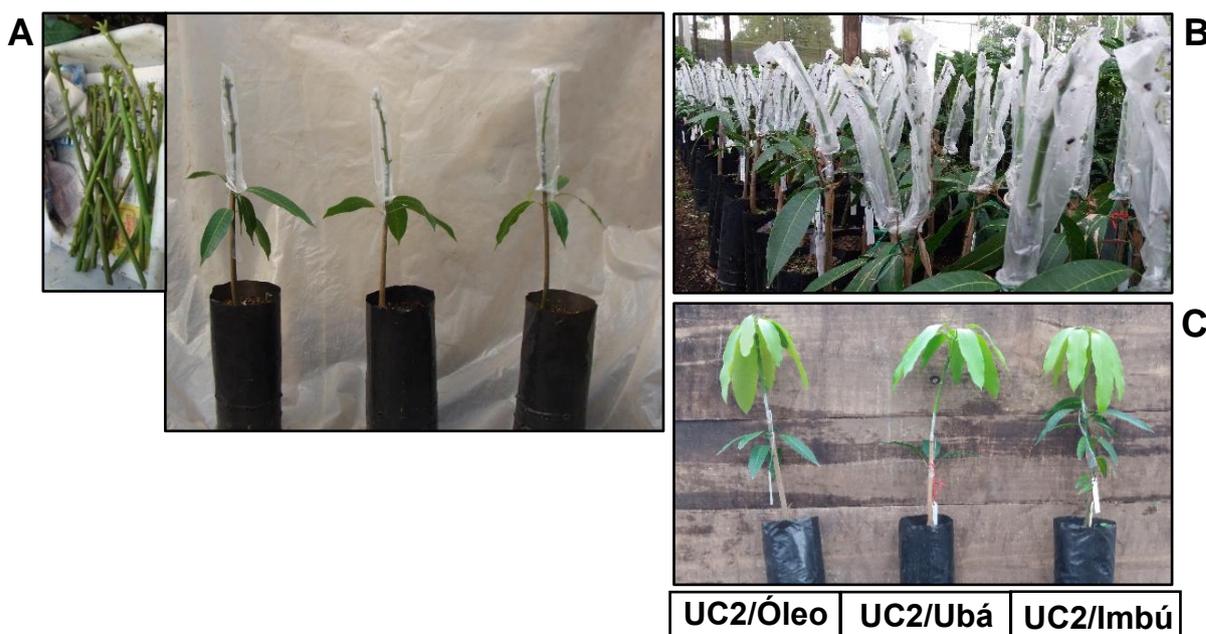
Figura 1 — Condições de desenvolvimento de cada porta-enxerto (cv. Óleo, Ubá e Imbú) aos 30 dias após o plantio (30 DAP), em janeiro de 2017.



Em seguida, foram utilizadas as combinações copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) originadas da propagação vegetativa por enxertia do tipo garfagem no topo à inglesa simples (Figura 2). A enxertia ocorreu em agosto de 2017, aos 230 DAP, quando todos os porta-enxertos estavam em média com 70 cm de altura e 8 mm de diâmetro. O corte em bisel foi realizado 20 cm acima da região do colo de cada porta-enxerto e as estacas da mangueira 'Ubá Clone 2' (UC2) utilizadas como copa foram padronizadas com tamanho médio de 15 cm, logo, todas as plantas

enxertadas iniciaram com a mesma altura. Para manter um microclima favorável ao desenvolvimento das gemas apicais, a copa foi coberta com um plástico transparente, até o início do aparecimento dos primeiros folíolos. A coleta de dados foi realizada aos 100, 160, 220 e 280 dias após a enxertia (DAE).

Figura 2 — Propagação vegetativa por enxertia do tipo garfagem no topo à inglesa simples, realizada 230 dias após o plantio dos porta-enxertos (230 DAP). (A) Estacas de manga ‘Ubá Clone 2’ (UC2) foram utilizadas como copas sobre os porta-enxertos ‘Óleo’, ‘Ubá’ e ‘Imbú’, gerando três combinações distintas de copa/porta-enxerto: UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú. (B) A copa foi coberta com plástico transparente para manter um microclima favorável ao desenvolvimento das gemas apicais até o surgimento dos primeiros folíolos. (C). Aos 60 dias após a enxertia (60 DAE) todas as combinações apresentaram mesma altura



### 3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL II

Esse delineamento foi utilizado para identificar o porta-enxerto mais promissor na formação de mudas de mangueira ‘Ubá’ em condições estressantes de déficit hídrico e investigar os efeitos das secas recorrentes na aclimação diferencial de cada combinação copa/porta-enxerto. Os resultados foram discutidos no CAPÍTULO 2.

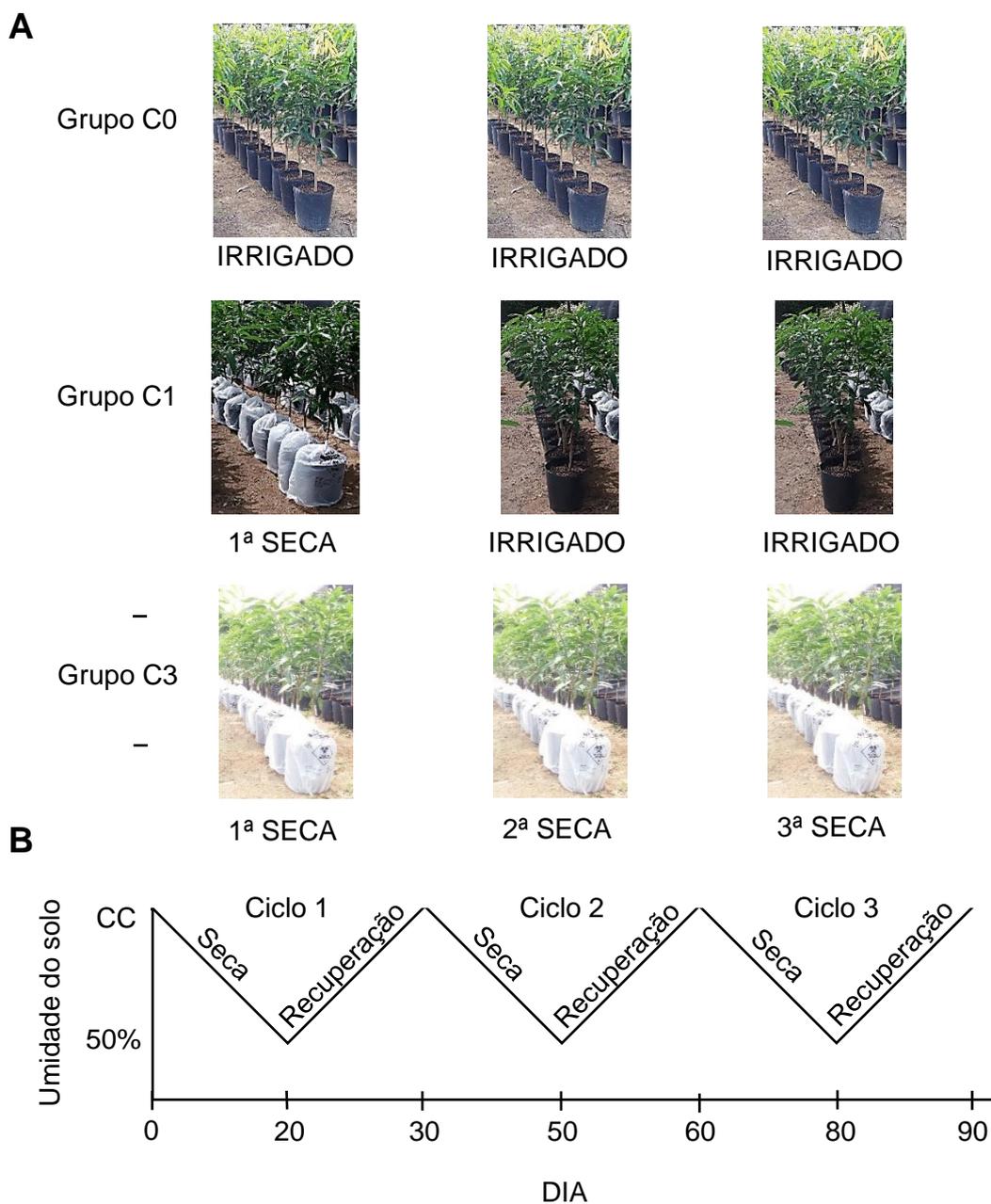
Para prosseguir com os experimentos e evitar a restrição de raízes, as mesmas plantas utilizadas no CAPÍTULO 1 foram transplantadas para vasos de polietileno de 25 litros contendo substrato com compostos orgânicos similares aos das sacolas de plantio (Figura 3).

Figura 3 — Transplântio das mudas enxertadas, de sacolas (4 litros) para vasos maiores (25 litros), com intuito de evitar a restrição radicular durante a condução do experimento II.



Quando atingiram 1,0 m de altura média, as plantas das três combinações copa/porta-enxerto foram separadas em três grupos de dez plantas cada (fatorial  $3 \times 3$  e  $n = 10$ ) (Figura 4). O primeiro grupo recebeu irrigação durante todo o experimento, mantendo a umidade do solo igual à capacidade de campo, não sendo submetido a nenhum ciclo de seca (grupo C0). O segundo grupo foi submetido a apenas um ciclo de seca (grupo C1), enquanto o terceiro grupo foi submetido a três ciclos de seca (grupos C3). Cada ciclo de seca consistia em 20 dias de desidratação (irrigação suspensa), intercalados com 10 dias de reidratação (retorno da irrigação). Os tempos foram estimados por testes preliminares realizados em três exemplares de cada combinação de copa/porta-enxerto selecionados aleatoriamente. Com esses testes, foi possível identificar o tempo máximo de desidratação necessários para que as taxas de fotossíntese líquida atingissem valores próximos a zero e o tempo mínimo de reidratação para que as mesmas recuperassem.

Figura 4 — (A) Representação esquemática do delineamento experimental II. Grupo C0, plantas que receberam irrigação durante todo o experimento, mantendo a umidade do solo igual à capacidade de campo, não sendo submetidas a nenhum ciclo de seca; grupo C1, plantas que foram submetidas a apenas um ciclo de seca, e grupo C3, plantas que foram submetidas a três ciclos de seca. (B) Representação esquemática da simulação das secas recorrentes. Cada ciclo de seca consistiu em 20 dias de déficit hídrico, seguidos por 10 dias de recuperação. O déficit hídrico foi marcado pela suspensão da irrigação por 20 dias, tempo necessário para que a umidade do substrato atingisse valores 50% abaixo da capacidade de campo (CC) e o estresse hídrico não causasse danos irreversíveis nas plantas. Na recuperação, houve o retorno da irrigação por 10 dias, tempo necessário para que todas as plantas recuperassem pelo menos do primeiro déficit hídrico.



Cerca de seis meses após o final dos ciclos de seca (janeiro de 2019), cinco plantas de cada combinação (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) dentro de cada grupo (C0, C1 e C3) foram submetidas a 35 dias de déficit hídrico (DH), simulando uma seca severa, enquanto nas outras cinco plantas a irrigação foi mantida normalmente (IRR). O delineamento foi o inteiramente casualizado, com fatorial  $3 \times 3 \times 2$  e  $n = 5$ .

Todas as análises fotossintéticas e bioquímicas foram realizadas em folhas jovens totalmente expandidas (5ª a 6ª folha a partir do ápice).

### 3.4 CRESCIMENTO

O crescimento longitudinal da parte aérea foi determinado medindo a altura desde a região do colo da planta, na base do caule, até o topo da gema apical e os valores foram expressos em centímetros (cm). O crescimento radial do caule foi determinado medindo o diâmetro fixado a 10 cm acima do colo da planta e os valores foram expressos em milímetros (mm). Para calcular a taxa de crescimento relativo (TCR) expressa em  $\text{cm}^3 \text{cm}^{-3} \text{day}^{-1}$ , o volume total da parte aérea foi estimado pelo produto entre altura ( $H$ ) e diâmetro quadrado ( $D^2$ ) medidos no início ( $t_0$ ) e no fim ( $t_1$ ) do experimento, por meio da equação  $\text{TCR} = (\ln H_1.D_1^2 - \ln H_0.D_0^2)/(t_1 - t_0)$  (POMMERENING; GRABARNIK, 2019).

### 3.5 FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a*

Para medir a fluorescência da clorofila *a* foi utilizado o fluorômetro portátil “analisador da eficiência da planta” (*Plant Efficiency Analyzer* — PEA), modelo Handy-PEA (Hansatech Instruments, King’s Lynn, Norfolk, UK). As folhas foram adaptadas ao escuro por 40 min, para a completa oxidação dos centros de reação. Em seguida foram expostas por 1 s ao pulso saturante de luz de  $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com comprimento de onda de 650 nm. As coletas foram realizadas sempre entre 8h e 10h da manhã.

O tempo da fluorescência inicial foi fixado em 20  $\mu\text{s}$  ( $F_0 = F_1 = O$ ), do pico máximo da banda L em 150  $\mu\text{s}$  ( $F_2 = F_L$ ), da banda K em 300  $\mu\text{s}$  ( $F_3 = F_K$ ), da etapa J em

2ms ( $F_4 = F_J = J$ ) e da etapa-I em 30ms ( $F_5 = F_I = I$ ) (STRASSER; SRIVASTAVA; GOVINDJEE, 1995; STRASSER; TSIMILLI-MICHAEL; SRIVASTAVA, 2004). A fluorescência máxima ( $F_M = F_P = P$ ) ocorreu entre 300 e 800ms.

Os dados originais obtidos pelos transientes da fluorescência da clorofila *a* gerou um padrão cinético conhecido como curva OJIP, ou efeito kautisky. A fluorescência variável entre as fases O e P dessa curva foi expressa como  $V_t$ , determinada pelos transientes da fluorescência da clorofila *a* normalizados entre  $F_0$  e  $F_M$  ( $F_P$ ) [ $V_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$ ]. Para cada amostra, foi calculada a diferença da fluorescência variável em relação a uma referência ( $\Delta V_t$ ). Em seguida, a fluorescência variável entre as fases O e J foi determinada normalizando os transientes entre  $F_0$  e  $F_J$  [ $V_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$ ]. A diferença da variável entre esses pontos ( $\Delta V_{OJ}$ ) é conhecida como banda K. Também foi realizada a normalização entre  $F_0$  e  $F_K$  [ $V_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$ ], onde a diferença da variável ( $\Delta V_{OK}$ ) é conhecida como banda L. Para avaliar a fase inicial O-I, a cinética da fluorescência foi normalizada entre  $F_0$  e  $F_I$  [ $V_{OI} = (F_t - F_0)/(F_I - F_0)$ ] e em seguida calculada a diferença da variável ( $\Delta V_{OI}$ ). Para avaliar a fase final I-P, a cinética da fluorescência foi normalizada entre  $F_I$  e  $F_M$  [ $V_{IP} = (F_t - F_I)/(F_M - F_I)$ ] e em seguida calculada a diferença da variável ( $\Delta V_{IP}$ ), também conhecida como banda G (STRASSER; TSIMILLI-MICHAEL; SRIVASTAVA, 2004; STIRBET; GOVINDJEE, 2011).

A cinética da fluorescência da clorofila *a* transiente foi analisada pelo teste-JIP, usando o programa PEA plus (Hansatech Instruments, versão 1,13). Esse método é baseado na teoria de fluxo de energia por biomembranas fotossintéticas, que utiliza equações e cálculos que levam para os valores de eficiência de toda a cascata de energia, da absorção de elétrons no lado dos receptores do FSII à redução dos aceptores finais de elétrons no lado dos receptores do FSI (STIRBET et al., 2018). (STRASSER; SRIVASTAVA; GOVINDJEE, 1995; STIRBET et al., 2018). Tornando possível a obtenção de vários parâmetros relacionados à cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos, que permitem uma descrição do desempenho dos fotossistemas II e I em relação a diferentes características estruturais e funcionais.

### 3.6 TEOR DE CLOROFILA

Os teores de clorofila foram quantificados usando o clorofilômetro portátil “desenvolvimento de análise da relação solo-planta” (*soil-plant analysis development*, SPAD), Mod. SPAD-502 (Konica Minolta, Osaka, Japão). O princípio de funcionamento desse equipamento é baseado na transmitância da luz vermelha (650 nm), comprimento de onda compreendido entre as faixas de absorção das clorofilas *b* e *a* (645 e 663, respectivamente). Essa transmitância é detectada através da folha, e convertida em sinais digitais, onde a diferença entre a taxa de luz retida e transmitida é lida como índice da concentração de clorofila, expressa em unidades SPAD ou índice de clorofila (*Chl*) (CASSOL et al., 2008; KONICA MINOLTA LTD., 2016). Foram utilizadas as médias de seis leituras, nas mesmas folhas que foram medidas a fluorescência da clorofila *a*.

### 3.7 TROCAS GASOSAS

A taxa de fixação do CO<sub>2</sub>, ou seja, a fotossíntese líquida (*A*, μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), assim como a condutância estomática (*g<sub>s</sub>*, mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), a taxa de transpiração (*E*, mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) e as razões *A/E*, *A/g<sub>s</sub>* e *A/C<sub>i</sub>*, foram determinadas por meio do “analisador de gás por infravermelho” (*infrared gas analyser* — IRGA), modelo LCi-Pro (ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, UK). A câmara de aclimação acoplada ao equipamento foi configurada para fornecer quantidades fixas de luz (1350 μmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>) e CO<sub>2</sub> (380 ppm). As medidas foram realizadas entre 9h e 11h da manhã.

### 3.8 RELAÇÕES HÍDRICAS

O potencial hídrico foliar ( $\psi_w$ ) foi medido na antemanhã ( $\psi_{pd}$ , MPa), entre 4h30min e 5h30min e ao meio dia ( $\psi_{md}$ , MPa), entre 12h e 13h, usando a câmara de pressão do tipo Scholander (Soilmoisture Equipment Corp., Santa Barbara, CA, USA). A condutância hidráulica foliar ( $K_L$ , mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> MPa<sup>-1</sup>) foi estimada pela razão da transpiração total (*E*) com a diferença do potencial hídrico entre a antemanhã ( $\psi_{pd}$ ) e

o meio dia ( $\psi_{md}$ ), conforme demonstrado na equação 1 (HUBBARD et al., 2001; LIU et al., 2005).

$$K_L (\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}) = \frac{E (\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1})}{\psi_{pd} - \psi_{md}} \quad (1)$$

A umidade do substrato foi obtida a uma profundidade de 20 cm com a utilização do medidor de umidade portátil, modelo HFM 2030 (Falker™ Tecnal, BR). Esse equipamento expressa valores em porcentagem de umidade volumétrica (% — v/v), ou seja, o conteúdo de água (cm<sup>3</sup>) por volume de substrato (cm<sup>3</sup>). Para validar os resultados, foram realizadas correlações preliminares entre os valores coletados pelo equipamento e os valores reais da umidade volumétrica (cm<sup>3</sup> cm<sup>-3</sup>), calculada por meio da densidade aparente determinada pelo método do anel volumétrico.

### 3.9 QUANTIFICAÇÃO DE PROLINA FOLIAR

Os níveis de prolina no tecido foliar foram determinados pelo método adaptado de BATES et al., (1973). As folhas foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas a - 80 °C até a realização das análises. Foram maceradas aproximadamente 0,5 g de folha em cadinhos com 10 ml de ácido sulfosalicílico 3% (p/v). O homogeneizado foi filtrado em filtro de papel e 2 ml do filtrado foram transferidos para um tubo de ensaio. Foram adicionados a cada tubo 2 ml de solução de ninidrina ácida (Ninidrina 1,8% (p/v) em 6:4 v/v de ácido acético e ácido fosfórico 6 M) e 2 ml de ácido acético glacial, em seguida foram aquecidos a 97 °C em banho-maria por 1 h. A reação foi finalizada colocando os tubos em banho de gelo por 5 min. A mistura da reação foi extraída com 4 ml de tolueno e agitada por 20 s em vortex. O cromóforo dissolvido no tolueno (sobrenadante róseo) foi aspirado da fase aquosa à temperatura ambiente e a absorbância a 520 nm lida em espectrofotômetro (UV752P OEM, Guangdong, China, Mainland), usando o tolueno como branco. A curva padrão foi construída de 0 a 100 µg ml<sup>-1</sup> de L-prolina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e usada para determinar os níveis de prolina das amostras na base de massa fresca, conforme demonstrado na equação 2.

$$\text{Prolina } (\mu\text{g}^{-1} \text{ MF}) = \frac{\text{Prolina } (\mu\text{g ml}^{-1}) \cdot \text{Tolueno (ml)}}{\text{Massa fresca (g)}} \quad (2)$$

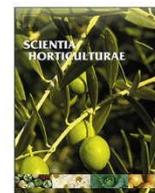
### 3.10 ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no InfoStat (Statistical Software, Córdoba, Argentina). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) (\*\*p < 0,001, \*\*p < 0,01 e \*p < 0,05) e as médias classificadas pelo teste de Scott-Knott e Duncan no nível de confiança de 0,05. Para identificar parâmetros importantes associados a diferentes porta-enxertos e seus respectivos enxertos, aplicamos uma análise estatística multivariada das análises de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*). Os autovetores derivados da PCA foram utilizados para identificar as variáveis que tendem a ter um forte relacionamento com um determinado componente principal (PC1, PC2,...), devido ao grande número de variáveis geradas (JOLLIFFE, 1973; JOLLIFFE; CADIMA; CADIMA, 2016).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CAPÍTULO 1: O desempenho fotossintético é determinado pela combinação copa/porta-enxerto na propagação de mudas de manga

- a) FARIA-SILVA, L.; GALLON, C. Z.; SILVA, D. M. Photosynthetic performance is determined by scion/rootstock combination in mango seedling propagation. **Scientia Horticulturae**, v. 265, n. November 2019, p. 1–8, 2020.



# Photosynthetic performance is determined by scion/rootstock combination in mango seedling propagation



Leonardo Faria-Silva<sup>a</sup>, Camilla Zanotti Gallon<sup>b</sup>, Diolina Moura Silva<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Photosynthesis Research Center, Biotechnology Graduate Program, Federal University of Espírito Santo, 1468 Marechal Campos Avenue, 29047-105 Vitória, ES, Brazil

<sup>b</sup> Photosynthesis Research Center, Biotechnology Graduate Program, Federal University of Espírito Santo, 1468 Marechal Campos Avenue, 29047-105 Vitória, ES, Brazil

<sup>c</sup> Photosynthesis Research Center, Biotechnology Graduate Program, Federal University of Espírito Santo, 1468 Marechal Campos Avenue, 29047-105 Vitória, ES, Brazil

## ARTICLE INFO

### Keywords:

*Mangifera indica* L.  
Photochemical yield  
Water use efficiency  
Mango seedlings  
Gas exchange  
Proline content

## ABSTRACT

This study aimed to identify the most promising rootstock for the development of 'Uba' mango seedlings. We used three polyembryonic *Mangifera indica* L. rootstock cultivars ('Oleo', 'Uba' and 'Imbu') and one 'Uba' scion cultivar, 'Uba Clone 2' ('UC2'). The chlorophyll *a* fluorescence, gas exchange, proline content and growth of the rootstocks and their respective scion/rootstock combinations (UC2/Oleo, UC2/Uba and UC2/Imbu) were analyzed. The parameters selected for the PSII photochemical system by chlorophyll *a* fluorescence kinetics ( $F_2$ ,  $F_3$ ,  $dV/dt_0$ ,  $DI_0/RC$ ,  $DF_{ABS}$  and  $DF_{TOTAL}$ ) were suggested as physiological indicators and the leaf proline content was suggested as a biochemical indicator for identifying the higher PSII quantum efficiency, increased water use efficiency and greater vegetative growth in UC2/Oleo. With these results, it was possible to better understand the potential effects of 'Oleo', 'Uba' and 'Imbu' rootstocks on 'Uba' mango scion performance, distinguish the grafted plants on the 'Oleo' rootstock and confirm the superiority of this rootstock in the production of 'Uba' mango seedlings under optimal environmental conditions. Thus, measuring chlorophyll *a* fluorescence, a fast and nondestructive method, can be highly useful for identifying the most promising rootstock for the production of 'Uba' mango seedlings, replacing time-consuming methods in crop management.

## 1. Introduction

Chlorophyll *a* fluorescence analysis has recently become a popular method for detecting abiotic stress, including drought, salt, high-light, osmotic, and heavy metal stress, in plants (Faria-Silva et al., 2019, 2017; Faseela et al., 2019; Maxwell and Johnson, 2000; Pereira et al., 2000). It has also been widely used to study the physiological state of plants (Sitko et al., 2017), for example, to study the effects of fertilization on plant growth (Pogrzeba et al., 2017) or phenotype mutants (Daszkowska-Golec et al., 2017). Generally, these analyses are used in conjunction with other morphological, chemical and physiological parameters (Adams and Demmig-Adams, 2004; Bussotti and Pollastrini, 2015; Donadio et al., 2019; Hermans et al., 2003; Kalaji et al., 2017, 2014; Murchie and Lawson, 2013; Salvatori et al., 2014).

Among the different techniques and approaches for measuring chlorophyll fluorescence in plants, fluorescence emission transient analysis (i.e., the OJIP transient or JIP test) (Strasser et al., 2004, 2000, 1995; Tsimilli-michael and Strasser, 2008) combines rapid and easy measurements with the collection of a large and informative set of data on the physiological and photochemical properties of plants.

The 'JIP test' developed by Strasser et al. (2000) offers the possibility of obtaining a deeper view of the conditions of photosynthetic machinery under specific types of stress, as it allows scientists to distinguish the effect of stress on specific phenomena involved in light absorption and light conversion into biochemical energy. JIP-test parameters describe the events related to light absorption (ABS), energy trapping (TR), electron transport (ET), dissipation (DI) and reduction of the end electron acceptors (RE). All these events are expressed as probabilities and yields, specific fluxes of energy (per reaction center, RC), phenomenological fluxes (per cross-section, CS) and performance indexes (PIs) (Goltsev et al., 2016; TSIMILLI-MICHAEL, 2019).

Portable fluorometers that calculate transient chlorophyll fluorescence parameters allow for the collection of abundant information on photosynthetic machinery performance for numerous samples in a short time (Kalaji et al., 2014). This is very important for professionals who must make quick decisions about agrotechniques or maintaining a culture. The ability to distinguish the background of the stress reaction of fruit seedlings using the transient fluorescence method would be very advantageous.

Mango (*Mangifera indica* L.) is one of the most popular tropical fruits

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [farasilva.leonardo@gmail.com](mailto:farasilva.leonardo@gmail.com) (L. Faria-Silva), [millazg@gmail.com](mailto:millazg@gmail.com) (C.Z. Gallon), [diolina.silva@ufes.br](mailto:diolina.silva@ufes.br) (D. Moura Silva).

in the world and is among those most widely cultivated for both fresh and industrial consumption. Most mangos are sold in local markets and consumed domestically, but demand in developed countries is increasing, indicating the great economic and social relevance of this fruit (Mohammad and Cheng, 2015). The most preferable mango fruits for the pulp processing and juice production industries are those of the 'Uba' cultivar. This is because, in addition to having high yield, an attractive pulp color and a high soluble solids content, 'Uba' also produces fruits with excellent nutritional properties due to its levels of carotenoids and ascorbic acid, which are efficient antioxidants against free radicals (Faria-Silva et al., 2017; Oliveira et al., 2016; Rosalie et al., 2015).

Grafting is an indispensable practice in the production of mango seedlings. However, the lack of knowledge about which is the best rootstock for ensuring graft success is a widespread problem that causes economic loss to mango growers, especially because it often arises when the orchard is already established. Grafting is an effective way to overcome biotic and abiotic stresses (Keatinge et al., 2014; Schwarz et al., 2010) and could enhance plant tolerance to drought (Penella et al., 2017), salt (Colla et al., 2010; Koleška et al., 2018; Zuazo et al., 2004) and temperature (Venema et al., 2008); improve disease resistance (Guan et al., 2012) and fruit quality (Grieneisen et al., 2018); and increase yield (Huang et al., 2009). In grafting, the rootstock is the main part that allows the plants to overcome biotic and abiotic stresses (Warschefsky et al., 2016); the use of appropriate rootstocks can enhance plant yield through increased accumulation of soil nutrients, avoidance of soil pathogen infection and tolerance to soil drought, flooding, and salinity (Martínez-Ballesta et al., 2010).

The aim of our experiment was to identify which chlorophyll fluorescence parameters could be easily used to detect rootstock vigor. In this study, we focused our attention on changes in the state and yield of the photosynthetic apparatus during rootstock growth and after grafting to find the best parameters/markers for identifying the most promising rootstock for the formation of 'Uba' mango seedlings. For further insight, we performed measurements of additional chlorophyll content, gas exchange and proline parameters already established by researchers, which served to validate our results.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material and growing conditions

The experimental materials utilized for the present investigation consisted of three polyembryonic rootstock ('Oleo', 'Uba' and 'Imbu' mango) grafted with the scion cultivar 'Uba Clone 2' ('UC2'). Mango rootstocks are normally grown from seeds, preferably from polyembryonic genotypes, which are exact genetic replicas of the female parent regardless of the pollen source (Krishna and Singh, 2007; Nimbolkar et al., 2016). 'Oleo' and 'Uba' mango seeds were obtained from plants in Ecoporanga and Linhares, Espírito Santo State, Brazil, respectively, while 'Imbu' mango seeds were obtained from a commercial nursery (Dona Euzébia city, Minas Gerais State, Brazil). The experiment was carried out in the commercial nursery Frucafé Mudás e Plantas Ltda., located in Linhares, Espírito Santo, Brazil (19°19'13.7"S, 40°04'55.3"W, altitude of 38 m). Seeds of each rootstock were germinated in polyethylene bags, and the seedlings were grown under controlled growth conditions. The development of seedlings occurred in a greenhouse, where the average temperature and relative air humidity (day/night) were 33/25 °C and 50/90%, respectively. The daily mean photosynthetically active radiation was 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , with a 14 h photoperiod. Phytosanitary, nutritional and water management practices were implemented according to conventional nursery standards.

At 60, 100, 180 and 230 days after planting (DAP), growth, chlorophyll a fluorescence and gas exchange data were collected. Then, plants 70 cm tall and with an 8 mm stem diameter were selected for grafting. Cuttings of 'UC2' were also selected for use as scions, all with

the same graft size (15 cm). The grafting method used was splice grafting, performed 20 cm above the collar region of the stem of rootstocks. Thus, soon after grafting, all plants had the same height. This vegetative propagation method is very popular among commercial seedling nurseries (Lee et al., 2010). At 100, 160, 220 and 280 days after grafting (DAG), analyses of growth, proline content, chlorophyll a fluorescence, and gas exchange data were performed for the scion/rootstock combinations (UC2/Oleo, UC2/Uba and UC2/Imbu).

Throughout the experimental phase, routine mango cultivation techniques were used, and irrigation was performed daily to maintain field capacity.

### 2.2. Growth measurements

Shoot extension growth (height) was determined from the collar region at the base to the longest shoots at the top and expressed in centimeters (cm). Stem radial growth (diameter) was determined by measuring stem circumferences 10 cm above the collar region and expressed in millimeters (mm).

### 2.3. Chlorophyll a fluorescence measurements

The polyphasic chlorophyll a fluorescence transient was measured using a portable fluorimeter (Handy-PEA, Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, UK) during the morning, between 8:00 and 10:00 a.m., on fully expanded young leaves, which were previously dark adapted for 40 min. The dark-adapted samples were exposed to saturating light of 3000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at a wavelength of 650 nm for 1 s. The initial fluorescence was 20  $\mu\text{s}$  ( $F_0 = F_1 = O$ ), the maximum peak of the L band was 150  $\mu\text{s}$  ( $F_2$ ), the maximum peak of the K band was 300  $\mu\text{s}$  ( $F_3$ ), the J step was 2 ms ( $F_4$ ), the I step was 30 ms ( $F_5$ ), and the maximum fluorescence was  $\sim 300$  ms ( $F_M = P$ ) (Strasser et al., 2004).

The results for the chlorophyll a fluorescence transient (OJIP curve) were used to calculate the JIP-test parameters (Strasser et al., 1995; Tsimilli-Michael et al. 2000) (Table A1). The Chlorophyll content index (ChI) was determined the mean of five readings by portable chlorophyll meter reading (SPAD 502, Minolta, Japan).

### 2.4. Gas exchange measurements

The net  $\text{CO}_2$  uptake rate, i.e., net photosynthesis (A,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), stomatal conductance (gs,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), transpiration rate (E,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) and A/E ratio were determined on fully expanded leaves (5th-6th leaf from the apex) in the steady state under saturating light conditions (1.350  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) and with 380 ppm  $\text{CO}_2$  by a portable gas exchange system (LCi-Pro model, ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, UK). The analysis was performed between 8:00 and 10:00 a.m.

### 2.5. Proline determination

Proline content was determined as described by Bates et al. (1973) with minor modifications. Proline was extracted from 0.5 g of young, fully expanded mango leaves by grinding the leaves in 10 ml of 3% sulfosalicylic acid. The homogenate was filtered through filter paper, and 2.0 ml of the filtrate was reacted with 2.0 ml of glacial acetic acid and 2.0 ml of acidic ninhydrin in a test tube, after which the mixture was incubated at 97 °C in a water bath for 60 min. The reaction was terminated in an ice bath for 5 min, and the reaction mixture was extracted with 4 ml of toluene and vortexed for 20 s. The toluene phase at the top (pink-red in color) was carefully collected with a pipette and read at 520 nm using a spectrophotometer (Genesys 150 UV-vis, Thermo Scientific, Waltham, USA) with toluene as a blank. The proline concentration in the sample was determined from a standard curve using analytical-grade proline (L-proline, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) with 0–30  $\text{mg ml}^{-1}$  L-proline and calculated on a fresh

weight (FW) basis.

## 2.6. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using InfoStat (Statistical Software, Córdoba, Argentina). Data were submitted to analysis of variance (ANOVA), and the means were ranked by the Scott-Knott test at a 5% probability ( $n = 20$ ). Means of different graft combinations were compared using the Scott-Knott test at the 0.05 confidence level ( $n = 20$ ).

To identify important parameters associated with different rootstocks and their respective grafts, we applied a multivariate statistical analysis: principal component analysis (PCA). Due to the large number of generated variables, the eigenvectors derived from the PCA were used to identify the variables that tended to have a strong relationship with a particular PC (Jolliffe, 1973; Jolliffe et al., 2016).

## 3. Results

### 3.1. Identification of the most important photochemical parameters

The main utility of PCA is to reduce the dimensionality of the data set, retaining as much information as possible in a smaller number of PCs. The choice of the PC number and variables to be used depends on the researcher's requirements. One of the methods used involves rejecting variables with eigenvalues lower than 0.70 (correlation between the PC and the original variables). In our study, the components used were those that explained at least 70% of the data variation, which were PC1 and PC2. After that, variables with eigenvalues above 0.90 were selected (Table 1). Photochemical parameters that showed eigenvalues below 0.90, such as those related to the chlorophyll content and density of reaction centers (Chl and RC/CS<sub>0</sub>), were considered of low significance to distinguish rootstocks (Jolliffe, 1973; Jolliffe et al., 2016).

### 3.2. Variation between ungrafted rootstocks

The germination percentage was 97, 95 and 22% for cvs. 'Oleo', 'Uba' and 'Imbu', and the number of shoots per seed was 3, 4 and 2, respectively. The average height (cm) and diameter (mm) at 60 DAP were 25.56 cm and 4.21 mm, respectively, for cv. 'Oleo', 17.10 cm and 3.09 mm for cv. 'Uba' and 18.48 cm and 3.12 mm for cv. 'Imbu'. On other analyzed days, the differences between the rootstocks remained similar: at 230 DAP, the corresponding values were 84.83 cm and 9.35 mm for cv. 'Oleo', 65.11 cm and 8.07 mm for cv. 'Uba' and 72.56 cm and 7.62 mm for cv. 'Imbu'. Therefore, to better represent the

**Table 1**

Principal component analysis (PCA) showing the correlation of each component eigenvector with the original variables, eigenvalues, and percent variance of chlorophyll fluorescence parameters for ungrafted and grafted rootstocks.

Parameters	Ungrafted plants		Grafted plants	
	PC1	PC2	PC1	PC2
F <sub>2</sub>	-0.30	<b>0.92</b>	-0.59	0.78
F <sub>3</sub>	-0.34	<b>0.92</b>	-0.56	0.65
dV/dt <sub>0</sub>	<b>-0.90</b>	0.37	<b>-0.92</b>	0.20
DI <sub>0</sub> /RC	<b>-0.90</b>	0.24	<b>-0.90</b>	0.02
DF <sub>ABS</sub>	<b>0.95</b>	-0.27	<b>0.99</b>	-0.07
DF <sub>TOTAL</sub>	<b>0.90</b>	-0.30	<b>0.91</b>	-0.19
Chl	0.68	-0.03	0.09	0.18
RC/CS <sub>0</sub>	0.85	-0.11	0.43	0.58
Explained variance (eigenvalue)	30.77	11.20	31.12	11.46
Proportion of total variance (%)	0.51	0.19	0.52	0.19
Cumulative variance	0.51	0.70	0.52	0.71

Vector loadings  $\geq 0.90$  in bold.

photosynthesis results, the means of the four collection days were analyzed (60, 100, 180 and 230 DAP).

Chlorophyll *a* fluorescence transients allow one to obtain relative variable curves taken at a specific time interval after the beginning of recording and then subtract them from the control transient. In our study, the control was cv. 'Oleo' because it showed superior visual characteristics, such as a greater height and diameter. With this analysis, positive bands were primarily observed for 'Uba' and 'Imbu' rootstocks, especially on the O-J and J-I normalized curves (Fig. 1a). These two cultivars showed positive L and K bands in the same order with respect to those of cv. 'Oleo' (Fig. 1c,e).

Table 2 shows the photosynthetic variables with significant differences between the rootstocks, while for proline content, the values were statistically equal. When compared to the other cultivars, cv. 'Oleo' showed 6% lower values of F<sub>2</sub> and F<sub>3</sub>, and cv. 'Uba' showed 8% higher values. The values of cv. 'Imbu' and cv. 'Oleo' were statistically equal. The dV/dt<sub>0</sub> values of cv. 'Oleo' were 12% lower than those of the other cultivars, and those of cv. 'Uba' were 17% higher. The values of cv. 'Oleo' and cv. 'Imbu' were statistically equal.

The DI<sub>0</sub>/RC values were significantly different among the three rootstocks. Specifically, cv. 'Oleo' showed values 17% lower than those of the other two cultivars, while cv. 'Uba' presented values 17% higher. Furthermore, cv. 'Imbu' showed intermediate values. The DF<sub>ABS</sub> and DF<sub>TOTAL</sub> values were also significantly different among the three rootstocks. Specifically, cv. 'Oleo' presented positive DF<sub>ABS</sub> values, while cv. 'Uba' showed negative values and cv. 'Imbu' showed values equal to zero. Therefore, the PI<sub>ABS</sub> values of cv. 'Oleo' were greater than 1, those of cv. 'Uba' were less than 1, and those of cv. 'Imbu' were equal to one. Regarding DF<sub>TOTAL</sub>, negative values were observed for cvs. 'Uba' and 'Imbu', and values equal to zero were observed for cv. 'Oleo'. Furthermore, cv. 'Uba' showed a more negative value (-0.26) than cv. 'Imbu' (-0.06), indicating that the PI<sub>TOTAL</sub> value was less than 1 in cvs. 'Uba' and 'Imbu' and equal to one in cv. 'Oleo'.

The values of net photosynthesis (A), stomatal conductance (gs) and the A/E ratio were statistically equal between cv. 'Uba' and cv. 'Imbu'. In contrast, cv. 'Oleo' showed gs and A/E values 47% higher and an A value 23% higher than those in the other cultivars.

### 3.3. Variation between scion/rootstock combinations

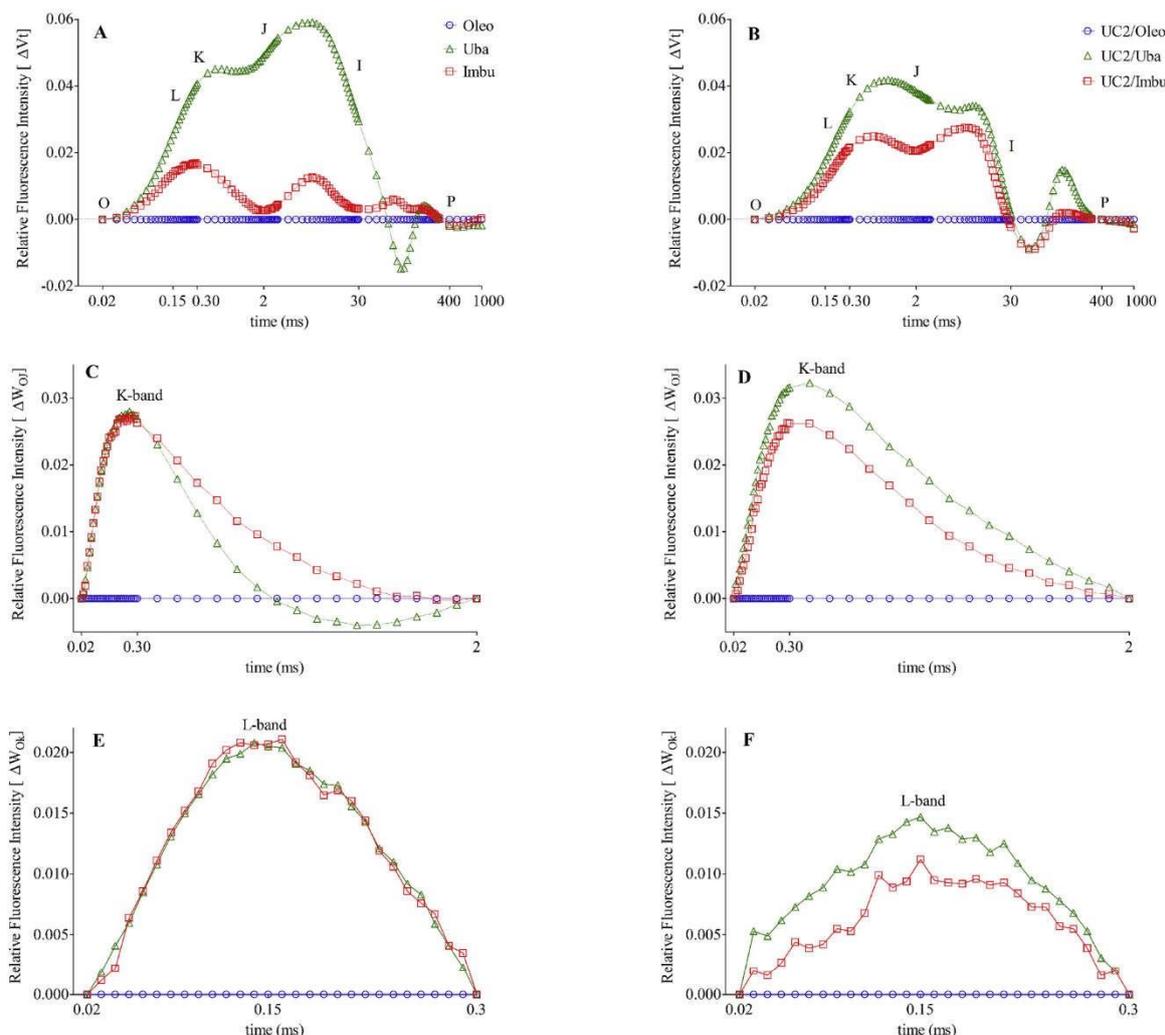
At 100 DAG, the scion already produced mature, fully expanded leaves, allowing photosynthesis analysis to be initiated. The average height (cm) and diameter (mm) on this day were 45.96 cm and 10.19 mm for UC2/Oleo, 42.38 cm and 9.24 mm for UC2/Uba and 41.60 cm and 7.97 mm for UC2/Imbu, respectively. These differences increased during the experiment, especially those of height; at 280 DAG, the values for average height and diameter were 159.72 cm and 20.98 mm for UC2/Oleo, 125.41 cm and 21.61 mm for UC2/Uba, and 118.65 cm and 19.31 mm for UC2/Imbu, respectively.

Following the pattern of comparisons made between the rootstocks for relative variable curves of fluorescence intensity, cv. 'Oleo' was considered the control. The UC2/Uba and UC2/Imbu combinations showed predominantly positive bands, especially on the O-J and J-I normalized curves (Fig. 1). UC2/Uba and UC2/Imbu maintained positive K and L bands, similar to those found for their respective rootstocks before grafting.

For all the analyzed photochemistry parameters, only UC2/Oleo presented means significantly different from the means of the other combinations, while the UC2/Uba and UC2/Imbu combinations showed means equal to each other (Table 2).

The F<sub>2</sub> and F<sub>3</sub> values were 7% lower in the UC2/Oleo plants than in the other plants. These results were similar to those collected for the rootstocks before grafting; however, the difference was that the UC2/Imbu plants had, together with the UC2/Uba plants, higher values of F<sub>2</sub> and F<sub>3</sub>.

The results for the dV/dt<sub>0</sub> and DI<sub>0</sub>/RC parameters were also similar



**Fig. 1.** Polyphasic fluorescence of OJIP for dark-adapted chlorophyll *a*, with A, C, and E showing ungrafted plants ('Oleo', 'Uba' and 'Imbu' rootstocks) and B, D, and F showing grafted plants (UC2/Oleo, UC2/Uba and UC2/Imbu combinations). Double normalization A, B at  $F_0$  and  $F_M$  (OJIP), C, D at  $F_0$  and  $F_J$  (K band) and E, F at  $F_0$  to  $F_K$  (L band).

to the results collected for the respective rootstocks (ungrafted plants). UC2/Oleo plants showed the lowest values for these two parameters (12 and 16% lower, respectively), and UC2/Uba and UC2/Imbu presented statistically equal values.

The mean  $DF_{ABS}$  value was positive for all grafts evaluated. Nevertheless, UC2/Oleo plants showed driving force values two times higher than those of the other plants. On the other hand, the mean  $DF_{TOTAL}$  value of UC2/Oleo plants was zero, and that for the other two combinations was negative. For both  $DF_{ABS}$  and  $DF_{TOTAL}$ , UC2/Uba and UC2/Imbu showed equal statistical values.

Considering gas exchange analysis, only UC2/Oleo presented means significantly different from the others, while UC2/Uba and UC2/Imbu showed means equal to each other. Except for net photosynthesis (A), the parameters did not differ significantly between the three combinations. UC2/Oleo plants showed higher  $g_s$  and A/E values (35% and 13% higher, respectively) than the other combinations, and UC2/Uba and UC2/Imbu presented statistically equal values. The results for grafted plants were similar to those collected for their respective rootstocks.

For proline content, UC2/Imbu presented significantly lower values than the other combinations. This was because grafted plants of UC2/Oleo and UC2/Uba showed 53% and 34% higher proline contents compared to those of their ungrafted rootstocks, respectively, while grafted plants of UC2/Imbu showed a 24% lower content.

## 4. Discussion

### 4.1. Links between chlorophyll *a* fluorescence and gas exchange and the identification of the most promising rootstocks

Plotting the difference between double-normalized O-J kinetics, called the K band, revealed the presence of a peak at 300  $\mu s$ , labeled  $F_3$  by the JIP test. This parameter indicates an imbalance between the donation of electrons from the oxygen-evolving complex to the oxidized PSII reaction center chlorophyll and the reoxidation of reduced PSII acceptors. Plotting the difference between double-normalized O-K kinetics, called the L band, revealed the presence of a peak at 150  $\mu s$ , labeled  $F_2$  by the JIP test. This parameter shows the level of disconnection between reaction centers and their light-harvesting complexes. Finally, the J-I normalized curve demonstrates an imbalance between the reduction and oxidation of quinone A ( $Q_A$ ) (Stirbet et al., 2014; Tsimilli-Michael and Strasser, 2013).

K and L bands are usually applied to differentiate plants under adverse abiotic conditions, such as nutritional toxicity (Li et al., 2010), water deficit (Jedrowski et al., 2013) and heat stress (Brestic et al., 2012). These studies showed bands in stressed plants in relation to control plants. Pepper grafting onto suitable rootstocks has positive effects on cultivation performance, to the extent that the same scions in different pepper rootstocks present different yields (Penella et al.,

**Table 2** JIP-test results, photosynthesis parameters and proline content of 'Oleo', 'Uba' and 'Imbu' rootstocks of mango trees ungrafted and grafted with 'Uba mango clone 2' (UC2').

Grafting	Rootstock	F <sub>2</sub> (L-band peak)	F <sub>3</sub> (k-band peak)	dV/dt <sub>0</sub>	DI <sub>0</sub> /RC	DF <sub>ABS</sub>	DF <sub>TOTAL</sub>	gs (mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	A (µmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	A/E	Proline (µg g <sup>-1</sup> FW)
Ungrafted plants	Oleo	995.70 ± 15.11 B	1342.47 ± 24.64 B	0.97 ± 0.03 B	0.50 ± 0.01 C	0.08 ± 0.02 A	0.00 ± 0.03 A	0.39 ± 0.05 A	11.07 ± 0.54 A	7.99 ± 0.49 A	38.90 ± 2.39 A
	Uba	1091.99 ± 9.10 A	1461.14 ± 13.35 A	1.17 ± 0.03 A	0.63 ± 0.01 A	-0.14 ± 0.02 C	-0.26 ± 0.02 C	0.28 ± 0.02 B	9.31 ± 0.38 B	5.81 ± 0.21 B	40.50 ± 3.81 A
	Imbu	1034.88 ± 12.97 B	1371.96 ± 18.43 B	1.03 ± 0.04 B	0.58 ± 0.02 B	0.00 ± 0.02 B	-0.06 ± 0.02 B	0.25 ± 0.02 B	8.74 ± 0.44 B	5.08 ± 0.23 B	48.79 ± 5.10 A
Grafted plants	UC2/Oleo	801.99 ± 14.39 b	1133.54 ± 22.01 b	0.74 ± 0.02 b	0.45 ± 0.02 b	0.25 ± 0.03 a	0.00 ± 0.03 a	0.33 ± 0.03 a	10.71 ± 0.47 a	4.72 ± 0.12 a	59.81 ± 3.56 a
	UC2/Uba	855.50 ± 17.09 a	1223.10 ± 25.06 a	0.86 ± 0.03 a	0.53 ± 0.02 a	0.12 ± 0.04 b	-0.10 ± 0.03 b	0.23 ± 0.02 b	9.83 ± 0.44 a	4.14 ± 0.15 b	54.45 ± 7.77 a
	UC2/Imbu	863.41 ± 12.28 a	1226.03 ± 20.65 a	0.84 ± 0.02 a	0.54 ± 0.02 a	0.13 ± 0.03 b	-0.12 ± 0.03 b	0.26 ± 0.03 b	9.56 ± 0.61 a	4.23 ± 0.17 b	37.12 ± 4.31 b

Data are presented as means ± SEs. \*, \*\*, and \*\*\*\* indicate significance at p ≤ 0.05, 0.01, and 0.001 respectively; ns: not significant. Uppercase letters compare means between the ungrafted rootstocks; lowercase letters compare means between the grafted rootstocks; the letters were assigned according to Scott-Knott test results (α = 0.05).

2017). Our study revealed bands for the 'Uba' and 'Imbu' rootstocks and their respective combinations with 'UC2' scions (UC2/Uba and UC2/Imbu). Since the plants experienced the same edaphoclimatic conditions, the differences found were exclusively genotypic. This result shows that by analyzing these fluorescence peaks, we can identify the most promising rootstock, even after grafting.

dV/dt<sub>0</sub>, also known as M<sub>0</sub>, reflects the rate of primary photochemistry, i.e., the difference between the rates of Q<sub>A</sub> reduction and Q<sub>A</sub>-reoxidation after the onset of illumination (Srivastava et al., 1997). Higher values of this parameter are important stress markers and are directly correlated with the amount of dissipated excitation energy at the level of the antenna chlorophyll at time zero, quantified by the parameter DI<sub>0</sub>/RC. This energy is dissipated via heat and chlorophyll *a* fluorescence, called nonphotochemical quenching of energy, and the increases in heat dissipation rate develop at the cost of chlorophyll *a* fluorescence emission (Demetriou et al., 2007). Higher dissipation was observed in the 'Uba' and 'Imbu' rootstocks than in the other rootstock, indicative of abiotic stress caused by adverse environmental conditions that normally occurs in plants under light (Bayat et al., 2018; Faria-Silva et al., 2017), heat (Kun et al., 2018; Moreno et al., 2008), salinity (Demetriou et al., 2007) and water (Faria-Silva et al., 2019) stress.

DF<sub>ABS</sub> and DF<sub>TOTAL</sub> are the overall photosynthetic driving forces in PSII with respect to absorption. These parameters can be used to estimate the sum of individual indexes involved in PSII-driven processes (DF<sub>ABS</sub>) and integral functional activity of the PSII, intersystem and PSI electron transport chain components (DF<sub>TOTAL</sub>). They are obtained by the logarithm of the performance indexes PI<sub>ABS</sub> and PI<sub>TOTAL</sub>, respectively (Goltsev et al., 2016). With this calculation, we obtained positive values when the indexes were > 1, negative values when the indexes were < 1 and a value of zero when the indexes were = 1. These parameters, together with DI<sub>0</sub>/RC, were the only ones able to statistically distinguish the three rootstocks before grafting. On the other hand, after grafting, it was possible to identify only the UC2/Oleo plants as being the plants with lower energy dissipation and a higher driving force. This finding showed that cv. 'Oleo' was the rootstock with the best photochemical performance and, for this reason, the best adapted to the climatic adversities.

Photochemical responses are associated with stomatal conductance and transpiration to examine plant performance. Chlorophyll *a* fluorescence is linked to gas exchange measurements under field conditions, and this fast and easy method can be used to deduce ecophysiological relevant parameters (Bucher et al., 2018; Long et al., 1996). Mesquita et al. (2016) compared the grafting of two rootstocks with the same *Citrus* scion and obtained different results for gs. Moreover, some tomato rootstocks can increase the water use efficiency (WUE) of scion/rootstock combinations due to their association with root-derived traits (Cantero-navarro et al., 2016).

In our study, transpiration (E) of the 'Oleo' rootstock was higher than that of the other two cultivars because of its increased stomatal conductance (gs), but its net photosynthesis (A) was sufficiently high to obtain a greater WUE (A/E). The A/E ratio was used to calculate the instantaneous WUE, which relates to the ability of the plant to perform gaseous exchange with minimal water loss (Seibt et al., 2008). Similar results were observed for grafted plants, where the UC2/Oleo combination showed the highest WUE. This suggests that the 'Oleo' rootstock performed best with the 'UC2' scion.

#### 4.2. Relationships between photochemical performance and proline content

Proline plays an important role in many plant biochemical processes, especially under stress. These processes include osmoregulation, which performs a protective function, preventing the oxidation of water, suppressing the production of free radicals and scavenging singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) by maintaining a favorable NADP<sup>+</sup>/NADPH ratio (Alia and Matsyik, 2001; Ashraf et al., 2018).

The electron flow from the excited photosystem primarily serves to

reduce  $\text{NADP}^+$  to NADPH, which in turn enters the Calvin cycle. In the case of a decreased  $\text{NADP}^+$  supply resulting from stress conditions, the  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  ratio decreases, causing overloading of the electron transport chain and leakage of electrons from ferredoxin to  $\text{O}_2$ , reducing it to superoxide anion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). This process is called the Mehler reaction. This reaction is a rate-limiting step, and once initiated, it generates more aggressive reactive oxygen species (ROS) (Sharma et al., 2012). Electron transfer reactions in the presence of oxygen can give rise to the production of reactive intermediates, which themselves can cause different kinds of damage to the cell. In addition to  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , a very reactive singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) can be generated by  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  decreases in association with light absorption by chlorophylls. The same chlorophyll molecules that are needed for the use of light energy in photosynthesis also carry the potential danger of being singlet oxygen producers (Krieger-Liszkay, 2005).  $\text{NADP}^+$  is generated during the synthesis and NADPH during the degradation of proline; therefore, maintaining a favorable  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  ratio is critical for both the maintenance of plant growth under stressful conditions and maintaining the cellular redox balance (Ashraf et al., 2018; Hare et al., 1999; Kavi Kishor and Sreenivasulu, 2014).

Proline content is an efficient biochemical indicator that can be used to study quantitative trait locus (QTL) localization in response to drought stress (Czyczyło-Mysza and Myśków, 2017). Proline content can also serve as a biomarker of air quality; for example, mango leaves exposed to high pollution stress showed increased proline content (Mukherjee et al., 2019). In addition to water deficit, root restriction in mango seedlings also promotes a higher proline content in the leaves than observed in control plants (Zaharah and Razi, 2009). Comparing plants under abiotic stress and plants under optimal environmental conditions (control plants) generally reveals an increase in proline content accompanied by a decrease in both photochemical performance and the net photosynthetic rate. Water stress negatively affected the maximum photochemical efficiency of PSII and net photosynthetic rate in two mango cultivars but increased their proline content (Elsheery and Cao, 2008). The same pattern was observed for rye inbred lines under the impact of drought (Czyczyło-Mysza and Myśków, 2017), chickpea under cold stress (Arslan et al., 2003) and mustard under salt stress (Wani et al., 2019). This is in contrast to our results, as we observed a positive correlation between proline and  $\text{PI}_{\text{ABS}}$  (Fig. 2C) and negative correlations of proline with  $F_2$  and  $F_3$  (Fig. 2A, B). It is noteworthy that in our study, there was no induction of stress; therefore, the rootstocks (ungrafted seedlings) did not differ in leaf proline content. However, after grafting (scion/rootstock combination), there was a significant increase for all combinations, especially for grafting onto the 'Oleo' rootstock (UC2/Oleo), which in addition to presenting a higher quantum efficiency of PSII ( $\text{PI}_{\text{ABS}}$ ) before and after grafting, was also the rootstock that most increased the proline content in the scion (Fig. 2C).

The effects of incompatible grafts are damaging to plants and lead to the activation of protective mechanisms. The upregulation of some differentially expressed genes in incompatible cucumber/pumpkin graft combinations promoted the accumulation of osmoregulatory substances in the cells of the plants, such as various soluble sugars and proline (Ren et al., 2018).

With these results, it was possible to better understand the potential effects of 'Oleo', 'Uba' and 'Imbu' rootstocks on 'Uba' mango scion performance, distinguish the grafted plants on the 'Oleo' rootstock and confirm the superiority of this rootstock in the production of 'Uba' mango seedlings under optimal environmental conditions. This supports the hypothesis that the 'Oleo' rootstock maintained a more robust root system capable of providing better photosynthetic performance to the scion (UC2/Oleo) than did the other rootstocks.

## 5. Conclusion

Chlorophyll *a* fluorescence measurements combined with gas

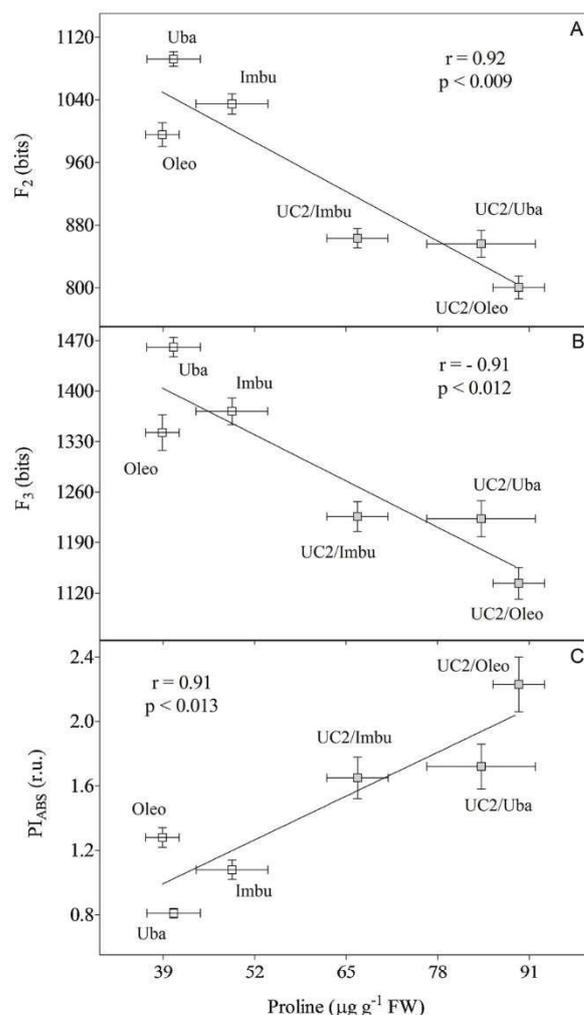


Fig. 2. Pearson correlation coefficients ( $r$ ) between leaf proline content and fluorescence intensity at 0.15 ms ( $F_2$ ) (A), fluorescence intensity at 0.30 ms ( $F_3$ ) (B) and the potential performance index of PSII ( $\text{PI}_{\text{ABS}}$ ) (C).

exchange analysis can be highly informative for identifying the most promising rootstock for the production of 'Uba' mango seedlings. In addition, in some cases, it can replace much more expensive and time-consuming procedures in crop management. The parameters selected for the PSII photochemical system by chlorophyll *a* fluorescence kinetics ( $F_2$ ,  $F_3$ ,  $dV/dt_0$ ,  $DI_0/RC$ ,  $DF_{\text{ABS}}$ ,  $DF_{\text{TOTAL}}$ ,  $gs$  and  $A/E$ ) were suggested as physiological indicators and the leaf proline content was suggested as a biochemical indicator for identifying the higher quantum efficiency of PSII, increased WUE and greater vegetative growth of 'Uba' mango scion when grafted onto the 'Oleo' rootstock (UC2/Oleo). The results suggest that this rootstock, under optimal environmental conditions, is the most promising rootstock for the development of 'Uba' mango seedlings and that UC2/Oleo is the most compatible scion/rootstock combination.

## Author contribution

LF-S conducted the experiment and data analysis and wrote the first draft. LF-S and CZG performed the experiments. LF-S, CZG and DMS interpreted the data and wrote the manuscript. DMS designed the studies, directed the experiment, and gave final approval for the manuscript to be published. All authors commented on the results and the manuscript.

## Funding information

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

## CRediT authorship contribution statement

**Leonardo Faria-Silva:** Investigation, Data curation, Formal analysis, Visualization. **Camilla Zanotti Gallon:** Writing - original draft, Validation. **Diolina Moura Silva:** Project administration, Supervision, Funding acquisition, Writing - review & editing, Conceptualization, Methodology.

## Declaration of Competing Interest

None.

## Acknowledgements

We thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil), the nursery Frucafé Mudas e Plantas Ltda., and the director Erli Ropke for supporting this research.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109247>.

## References

- Adams, W.W., Demmig-Adams, B., 2004. Chlorophyll fluorescence as a tool to monitor plant response to the environmental. In: Papageorgiou, G.C., Govindjee (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 583–604.
- Alia, Mohanty P., Matysik, J., 2001. Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids* 21, 195–200. <https://doi.org/10.1007/s007260170026>.
- Arsilan, Ö., Eyidoğan, F., Ekmekçi, Y., 2003. Freezing tolerance of chickpea: biochemical and molecular changes at vegetative stage. *Biol. Plant.* 1–9.
- Ashraf, M.A., Iqbal, M., Rasheed, R., Hussain, I., Perveen, S., Mahmood, S., 2018. Dynamic proline metabolism: importance and regulation in Water-limited environments. *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress*. Elsevier Inc., pp. 323–336. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812689-9.00016-9>.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>.
- Bayat, L., Arab, M., Aliniaefard, S., Seif, M., Lastochkina, O., Li, T., 2018. Effects of growth under different light spectra on the subsequent high light tolerance in rose plants. *AoB Plants* 10, 1–17. <https://doi.org/10.1093/aobpla/ply052>.
- Brestic, M., Zivcak, M., Kalaji, H.M., Carpentier, R., Allakhverdiev, S.I., 2012. Photosystem II thermostability in situ: environmentally induced acclimation and genotype-specific reactions in *Triticum aestivum* L. *Plant Physiol. Biochem.* 57, 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.05.012>.
- Bucher, S.F., Bernhardt-Römermann, M., Römermann, C., 2018. Chlorophyll fluorescence and gas exchange measurements in field research: an ecological case study. *Photosynthetica* 56, 1161–1170. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0809-5>.
- Bussotti, F., Pollarini, M., 2015. Evaluation of leaf features in forest trees: methods, techniques, obtainable information and limits. *Ecol. Indic.* 52, 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.12.010>.
- Cantero-navarro, E., Romero-aranda, R., Fernández-mu, R., Martínez-andújar, C., Pérez-alfocea, F., Albacete, A., 2016. Improving agronomic water use efficiency in tomato by rootstock-mediated hormonal regulation of leaf biomass. *Plant Sci.* 251, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.03.001>.
- Colla, G., Roupshael, Y., Leonardi, C., Bie, Z., 2010. Role of grafting in vegetable crops grown under saline conditions. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 127, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.08.004>.
- Czyżyło-Mysza, I., Myśków, B., 2017. Analysis of the impact of drought on selected morphological, biochemical and physiological traits of rye inbred lines. *Acta Physiol. Plant.* 39, 87. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2385-x>.
- Daszkowska-Golec, A., Skubacz, A., Marzec, M., Slota, M., Kurowska, M., Gajecka, M., Gajewska, P., Płociniczak, T., Sitko, K., Pacak, A., Szweykowska-Kulinska, Z., Szarejko, I., 2017. Mutation in HvCBP20 (Cap binding protein 20) adapts barley to drought stress at phenotypic and transcriptomic levels. *Front. Plant Sci.* 8, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00942>.
- Demetriou, G., Neonaki, C., Navakoudis, E., Kotzabasis, K., 2007. Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus—the protective role of polyamines. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.bbatio.2007.02.020>.
- Donadio, L.C., Lederman, I.E., Roberto, S.R., Stucchi, E.S., 2019. Dwarfing-canopy and rootstock cultivars for fruit trees. *Rev. Bras. Frutic.* 41, 1–12. <https://doi.org/10.1590/0100-29452019997>.
- Elsheery, N.I., Cao, K.-F., 2008. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. *Acta Physiol. Plant.* 30, 769–777. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0179-x>.
- Faria-Silva, L., Gallon, C.Z., Purgatto, E., Silva, D.M., 2017. Photochemical metabolism and fruit quality of Ubá mango tree exposed to combined light and heat stress in the field. *Acta Physiol. Plant.* 39, 238. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2533-3>.
- Faria-Silva, L., Gallon, C.Z., Filgueiras, P.R., Silva, D.M., 2019. Irrigation improves plant vitality in specific stages of mango tree development according to photosynthetic efficiency. *Photosynthetica* 57, 820–829. <https://doi.org/10.32615/ps.2019.091>.
- Faseela, P., Sinisha, A.K., Brestič, M., Puthur, J.T., 2019. Chlorophyll a fluorescence parameters as indicators of a particular abiotic stress in rice. *Photosynthetica* 57, 108–115. <https://doi.org/10.32615/ps.2019.147>.
- Goltsev, V.N., Kalaji, H.M., Paunov, M., Bába, W., Horaczek, T., Mojski, J., Kociel, H., Allakhverdiev, S.I., 2016. Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus. *Russ. J. Plant Physiol.* 63, 869–893. <https://doi.org/10.1134/S1021443716050058>.
- Grieneisen, M.L., Aegerter, B.J., Scott Stoddard, C., Zhang, M., 2018. Yield and fruit quality of grafted tomatoes, and their potential for soil fumigant use reduction. A meta-analysis. *Agron. Sustain. Dev.* 38. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0507-5>.
- Guan, W., Zhao, X., Hassell, R., Thies, J., 2012. Defense mechanisms involved in disease resistance of grafted vegetables. *HortScience* 47, 164–170. <https://doi.org/10.21273/hortsci.47.2.164>.
- Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J., 1999. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *J. Exp. Bot.* 50, 413–434. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.333.413>.
- Hermans, C., Smeyers, M., Maldonado Rodriguez, R., Eyletters, M., Strasser, R.J., Delhaye, J.P., 2003. Quality assessment of urban trees: a comparative study of physiological characterisation, airborne imaging and on site fluorescence monitoring by the OJIP-test. *J. Plant Physiol.* 160, 81–90. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00917>.
- Huang, Y., Tang, R., Cao, Q., Bie, Z., 2009. Improving the fruit yield and quality of cucumber by grafting onto the salt tolerant rootstock under NaCl stress. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 122, 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.04.004>.
- Jedemowski, C., Ashoub, A., Brüggemann, W., 2013. Reactions of Egyptian landraces of *Hordeum vulgare* and *Sorghum bicolor* to drought stress, evaluated by the OJIP fluorescence transient analysis. *Acta Physiol. Plant.* 35, 345–354. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1077-9>.
- Jolliffe, I.T., 1973. In a variables discarding II: real data analysis. *Component principal. J. R. Stat. Soc.* 22, 21–31.
- Jolliffe, I.T., Cadima, J., Cadima, J., 2016. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos. Trans. Biol. Sci.* 374. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>.
- Kalaji, H.M., Schansker, G., Ladle, R.J., Goltsev, V., 2014. Frequently Asked Questions About in Vivo Chlorophyll Fluorescence: Practical Issues. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-0024-6>.
- Kalaji, H.M., Schansker, G., Brestic, M., Bussotti, F., Calatayud, A., Ferroni, L., Goltsev, V., Guidi, L., Jajoo, A., Li, P., Losciale, P., Mishra, V.K., Misra, A.N., Nebauer, S.G., Pancaldi, S., Penella, C., Pollarini, M., Suresh, K., Tambussi, E., Yannicari, M., Zivcak, M., Cetner, M.D., Samborska, I.A., Stürbet, A., Olsowska, K., Kunderlikova, K., Shelonzek, H., Rusinowski, S., Bába, W., 2017. Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynth. Res.* 132, 13–66. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0318-y>.
- Kavi Kishor, P.B., Sreenivasulu, N., 2014. Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? *Plant Cell Environ.* 37, 300–311. <https://doi.org/10.1111/pce.12157>.
- Keatinge, J.D.H., Lin, L.J., Ebert, A.W., Chen, W.Y., Hughes, J.D.A., Luther, G.C., Wang, J.F., Ravishankar, M., 2014. Overcoming biotic and abiotic stresses in the Solanaceae through grafting: current status and future perspectives. *Biol. Agric. Hortic.* 30, 272–287. <https://doi.org/10.1080/01448765.2014.964317>.
- Koleška, I., Hasanagić, D., Todorović, V., Murtić, S., Maksimović, I., 2018. Grafting influence on the weight and quality of tomato fruit under salt stress. *Ann. Appl. Biol.* 172, 187–196. <https://doi.org/10.1111/aab.12411>.
- Krieger-Liszka, A., 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 56, 337–346. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh237>.
- Krishna, H., Singh, S.K., 2007. Biotechnological advances in mango (*Mangifera indica* L.) and their future implication in crop improvement — a review. *Biotechnol. Adv.* 25, 223–243. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.01.001>.
- Kun, Z., Bai-hong, C., Yan, H.A.O., Rui, Y., Yu-an, W., 2018. Effects of short-term heat stress on PSII and subsequent recovery for senescent leaves of *Vitis vinifera* L. *Cv. Red Globe*. *J. Integr. Agric.* 17, 2683–2693. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62143-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62143-4).
- Lee, J.M., Kubota, C., Tsao, S.J., Bie, Z., Echevarria, P.H., Morra, L., Oda, M., 2010. Current status of vegetable grafting: Diffusion, grafting techniques, automation. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 127, 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.08.003>.
- Li, Q., Chen, L.S., Jiang, H.X., Tang, N., Yang, L.T., Lin, Z.H., Li, Y., Yang, G.H., 2010. Effects of manganese-excess on CO<sub>2</sub> assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport of leaves, and antioxidant systems of leaves and roots in *Citrus grandis* seedlings. *BMC Plant Biol.* 10, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-42>.
- Long, S.P., Farage, P.K., Garcia, R.L., 1996. Measurement of leaf and canopy photosynthetic CO<sub>2</sub> exchange in the field. *J. Exp. Bot.* 47, 1629–1642. <https://doi.org/10.1093/jxb/47.11.1629>.

- 1093/jxb/47.11.1629.
- Martínez-Ballesta, M.C., Alcaraz-López, C., Muries, B., Mota-Cadenas, C., Carvajal, M., 2010. Physiological aspects of rootstock-scion interactions. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 127, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.08.002>.
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>.
- Mesquita, G.L., Zambrosi, F.C.B., Tanaka, F.A.O., Boaretto, R.M., Quaggio, J.A., Ribeiro, R.V., Mattos, D., 2016. Anatomical and physiological responses of Citrus trees to varying boron availability are dependent on rootstock. *Front. Plant Sci.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00224>.
- Mohammad, S.U., Cheng, Q., 2015. Recent Application of Biotechniques for the Improvement of Mango Research. *Applied Plant Genomics and Biotechnology*. Elsevier Ltd, pp. 195–212. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100068-7.00012-4>.
- Moreno, S.G., Vela, H.P., Alvarez, M.O.S., 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Rev. Educ. Bioquímica* 27, 119–129.
- Mukherjee, S., Chakraborty, A., Mondal, S., Saha, S., Haque, A., Paul, S., 2019. Assessment of common plant parameters as biomarkers of air pollution. *Environ. Monit. Assess.* 191, 400. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7540-y>.
- Murchie, E.H., Lawson, T., 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. *J. Exp. Bot.* 64, 3983–3998. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert208>.
- Nimbolkar, P.K., Awachare, C., Reddy, Y.T.N., Chander, S., Hussain, F., 2016. Role of rootstocks in fruit production – a review role of rootstocks in fruit production – a review. *J. Agric. Eng. Food Technol.* 3.
- Oliveira, B.G., Costa, H.B., Ventura, J.A., Kondratyuk, T.P., Barroso, M.E.S., Correia, R.M., Pimentel, E.F., Pinto, F.E., Endringer, D.C., Romão, W., 2016. Chemical profile of mango (*Mangifera indica* L.) using electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS). *Food Chem.* 204, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.117>.
- Penella, C., Nebauer, S.G., López-Galarza, S., Quiñones, A., San Bautista, A., Calatayud, Á., 2017. Grafting pepper onto tolerant rootstocks: An environmental-friendly technique overcome water and salt stress. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 226, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.020>.
- Pereira, W.E., De Siqueira, D.L., Martínez, C.A., Puiatti, M., 2000. Gas exchange and chlorophyll fluorescence in four citrus rootstocks under aluminium stress. *J. Plant Physiol.* 157, 513–520. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80106-6](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80106-6).
- Pogrzeba, M., Rusinowski, S., Sitko, K., Krzyżak, J., Skalska, A., Małkowski, E., Ciszek, D., Werle, S., McCalmont, J.P., Mos, M., Kalaji, H.M., 2017. Relationships between soil parameters and physiological status of *Miscanthus x giganteus* cultivated on soil contaminated with trace elements under NPK fertilisation vs. Microbial inoculation. *Environ. Pollut.* 225, 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.058>.
- Ren, Y., Xu, Q., Wang, L., Guo, S., Shu, S., Lu, N., Sun, J., 2018. Involvement of metabolic, physiological and hormonal responses in the graft-compatible process of cucumber/pumpkin combinations was revealed through the integrative analysis of mRNA and miRNA expression. *Plant Physiol. Biochem.* 129, 368–380. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.06.021>.
- Rosalie, R., Joas, J., Deytieu-Belleau, C., Vulcain, E., Payet, B., Dufossé, L., Léchaudel, M., 2015. Antioxidant and enzymatic responses to oxidative stress induced by pre-harvest water supply reduction and ripening on mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Cogshall') in relation to carotenoid content. *J. Plant Physiol.* 184, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.05.019>.
- Salvatori, E., Fusaro, L., Gottardini, E., Pollastrini, M., Goltsev, V., Strasser, R.J., Bussotti, F., 2014. Plant stress analysis: application of prompt, delayed chlorophyll fluorescence and 820nm modulated reflectance. Insights from independent experiments. *Plant Physiol. Biochem.* 85, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.11.002>.
- Schwarz, D., Roupael, Y., Colla, G., Venema, J.H., 2010. Grafting as a tool to improve tolerance of vegetables to abiotic stresses: thermal stress, water stress and organic pollutants. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 127, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.016>.
- Seibt, U., Rajabi, A., Griffiths, H., Berry, J.A., 2008. Carbon isotopes and water use efficiency: sense and sensitivity. *Oecologia* 155, 441–454. <https://doi.org/10.1007/s00442-007-0932-7>.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessaraki, M., 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>.
- Sitko, K., Rusinowski, S., Kalaji, H.M., Szopiński, M., Małkowski, E., 2017. Photosynthetic efficiency as bioindicator of environmental pressure in A. Halleri. *Plant Physiol.* 175, 290–302. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00212>.
- Srivastava, A., Guisse, B., Greppin, H., Strasser, R.J., 1997. Regulation of antenna structure and electron transport in Photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll a fluorescence transient: OKJIP. *Biochim. Biophys. Acta* 1320, 95–106.
- Stirbet, A., Riznichenko, G.Y., Rubin, A.B., Govindjee, 2014. Modeling chlorophyll a fluorescence transient: relation to photosynthesis. *Biochemistry* 79, 291–323. <https://doi.org/10.1134/S0006297914040014>.
- Strasser, R.J., Srivastava, A., Govindjee, 1995. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.* 61, 32–42. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1995.tb09240.x>.
- Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M., 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples, in: *probing Photosynthesis: mechanism. Regulation & Adaptation*. 445–483.
- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A., 2004. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou, G.C., Govindjee (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 321–362. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_12).
- Tsimilli-michael, M., Strasser, R.J., 2008. In Vivo Assessment of Stress Impact on Plants' Vitality: Applications in Detecting and Evaluating the Beneficial Role of Mycorrhization on Host You Can Find About the Book at: Tsimilli-michael M, Strasser RJ (2008) in Vivo Assessment of Stress Impac. pp. 1–22.
- Tsimilli-Michael, M., Strasser, R.J., 2013. The energy flux theory 35 years later: formulations and applications. *Photosynth. Res.* 117, 289–320. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9895-1>.
- Tsimilli-Michael, M., 2019. Revisiting JIP-test: an educative review on concepts, assumptions, approximations, definitions and terminology. *Photosynthetica* 57, 90–107. <https://doi.org/10.32615/ps.2019.150>.
- Venema, J.H., Dijk, B.E., Bax, J.M., van Hasselt, P.R., Elzenga, J.T.M., 2008. Grafting tomato (*Solanum lycopersicum*) onto the rootstock of a high-altitude accession of *Solanum habrochaites* improves suboptimal-temperature tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 63, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.12.015>.
- Wani, A.S., Ahmad, A., Hayat, S., Tahir, I., 2019. Epibrassinolide and proline alleviate the photosynthetic and yield inhibition under salt stress by acting on antioxidant system in mustard. *Plant Physiol. Biochem.* 135, 385–394. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.01.002>.
- Warschafsky, E.J., Klein, L.L., Frank, M.H., Chitwood, D.H., Londo, J.P., von Wettberg, E.J.B., Miller, A.J., 2016. Rootstocks: diversity, domestication, and impacts on shoot phenotypes. *Trends Plant Sci.* 21, 418–437. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.11.008>.
- Zaharah, S.S., Razi, I.M., 2009. Growth, stomata aperture, biochemical changes and branch anatomy in mango (*Mangifera indica*) cv. Chokanan in response to root restriction and water stress. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 123, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.07.022>.
- Zuazo, V.H.D., Raya, A.M., Ruiz, J.A., 2004. Impact of salinity on the fruit yield of mango (*Mangifera indica* L. Cv. 'Osteen'). *Eur. J. Agron.* 21, 323–334. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2003.10.004>.

## 4.2 CAPÍTULO 2: O grau de tolerância diferencial à seca em mangueiras enxertadas é dependente do porta-enxerto utilizado

### Resumo

Diante da atual necessidade de identificar plantas frutíferas mais tolerantes a períodos sucessivos de seca, este estudo objetivou determinar, por meio da fluorescência da clorofila *a*, a eficiência da aplicação de ciclos de déficit hídrico como método para indicar porta-enxertos de mangueiras (*Mangifera indica* L.) com maior capacidade de aclimação diferencial. A cinética da fluorescência da clorofila *a*, as alterações gasosas e o conteúdo de prolina foliar foram utilizados como métodos para rastrear a dinâmica do desempenho fotossintético em diferentes combinações copa/porta-enxerto de mangueiras 'Ubá'. Nossos resultados mostraram que as mangueiras enxertadas e expostas a múltiplos ciclos de seca desenvolveram uma tolerância diferencial que potencializou seus mecanismos fotossintéticos, no entanto, a intensidade da resposta variou dependendo do porta-enxerto utilizado. As mangueiras 'Ubá', formadas a partir do porta-enxerto 'Óleo', submetidas a três ciclos de seca, mantiveram baixa eficiência fotossintética, tanto na irrigação (IRR) quanto no déficit hídrico (DH). Mostrando que essas plantas foram prejudicadas por secas anteriores e não "memorizaram" a tolerância futura à seca. Já as plantas geradas com o porta-enxerto 'Imbú' apresentaram maior eficiência fotossintética na IRR e menor no DH, mas com conteúdo de prolina mais alto. Mostrando que essas plantas "memorizaram" estresses anteriores e potencializaram a produção de prolina como uma proteção para tolerar secas futuras.

### Palavras-chave

Fluorescência da clorofila *a*; déficit hídrico; *Mangifera indica* L.; aclimação diferencial; prolina; "memória" ao estresse.

#### 4.2.1 INTRODUÇÃO

Pesquisas pioneiras sobre tolerância de plantas às condições climáticas ambientais estão associadas ao uso de porta-enxertos. A escolha do porta-enxerto influencia a translocação da água das raízes para a copa, causando alterações nos resultados fotossintéticos da combinação copa/porta-enxerto formada (GREGORY et al., 2013; FARIA-SILVA; GALLON; SILVA, 2020). O sucesso na produção de mudas de *Mangifera indica* L. depende da escolha correta do porta-enxerto. Características como resistência a doenças (RIBEIRO et al., 1995) e produtividade (SMITH; HOULT; BRIGHT, 2003) são frequentemente estudadas durante a seleção de combinações apropriadas entre copa/porta-enxerto. No entanto, com as constantes mudanças na distribuição de chuvas recentemente registradas em países tropicais (CHADWICK et al., 2015), a tolerância à seca também passou a ser foco nos estudos de plantas enxertadas (BITHELL et al., 2016).

Os cenários futuros das mudanças climáticas prevêem uma distribuição espaço-temporal das chuvas mais distorcida, além de secas mais extremas, representando riscos para a saúde das plantas perenes. Essas espécies são expostas ao estresse hídrico quase todos os anos, e isso pode estimular naturalmente a tolerância à seca (TOMBESI et al., 2018). O déficit hídrico causado pelas secas recorrentes afeta algumas plantas de maneira diferenciada e as alterações epigenéticas sofridas durante esses períodos fazem com que adquiram uma “memória” ao estresse, evento também conhecido como tolerância diferencial (NEVES et al., 2018). Isso leva as plantas a terem uma resposta de aclimação mais rápida e maior tolerância no próximo evento de estresse hídrico (WANG et al., 2017).

Além da escolha correta do porta-enxerto e da tolerância natural adquirida no campo, existe outra estratégia chamada “rustificação” ou “aclimação” que é realizada antes do transplante das mudas para a formação do pomar. Esse método é referente ao conjunto de práticas operacionais adotadas durante a fase final da produção de mudas, e seu objetivo é aumentar a tolerância às adversidades edafoclimáticas encontradas no campo (JACOBS DF, 2009; KINOSHITA; SEKI, 2014; KARLEC et al., 2017).

A capacidade fotossintética da cultivar enxertada é um parâmetro amplamente utilizado como atributo fisiológico para avaliar o vigor, a biomassa e o rendimento econômico considerado na seleção do porta-enxerto mais adequado (DAYAL et al., 2016). É possível detectar essas variações tanto em mangueiras sob condições ambientais ótimas (FARIA-SILVA; GALLON; SILVA, 2020), quanto sob estresse por déficit hídrico (GUO; TAN, 2015)

A técnica da fluorescência da clorofila *a* é um método rápido e não destrutivo que, associado ao teste JIP, calcula parâmetros relacionados ao desempenho fotoquímico desde a absorção de energia no fotossistema II (FSII) até a redução completa dos receptores finais no fotossistema I (FSI) (STRASSER; TSIMILLI-MICHAEL; SRIVASTAVA, 2004), possibilitando rastrear as cultivares mais tolerantes à seca (GUHA; SENGUPTA; REDDY, 2013).

A fluorescência da clorofila *a* combinada com as medições de trocas gasosas, por meio do analisador de gás por infravermelho (IRGA), permite ao usuário correlacionar a eficiência fotossintética do FSII diretamente à taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>, eliminando a fotorrespiração (MURCHIE; LAWSON, 2013).

Os efeitos da seca no comportamento fisiológico de cultivares de *Mangifera indica* L. têm sido amplamente investigados. No entanto, poucas informações estão disponíveis sobre o comportamento desta espécie quando expostas a eventos recorrentes de seca. Portanto, este estudo teve como objetivo confirmar, por meio da fluorescência da clorofila *a*, a eficiência da aplicação de ciclos recorrentes de seca como método para identificar porta-enxertos de manga com maior habilidade de imprimir “memória” de estresse em resposta a déficits hídricos futuros.

## **4.2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.2.1 Material vegetal e área de estudo**

Três genótipos de porta-enxertos poliembriônicos de *Mangifera indica* L. (cv. Óleo, Ubá e Imbú) foram enxertados com a copa da cultivar 'Ubá Clone 2' (UC2), e as análises foram realizadas posteriormente nas respectivas combinações copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú).

As sementes de manga "Óleo" e 'Ubá' foram coletadas de plantas localizadas, respectivamente, nos municípios de Ecoporanga e Linhares, Espírito Santo, Brasil. Esses são os porta-enxertos que os viveiristas e agricultores da região entendem ser os mais promissores na produção de mudas de manga 'Ubá'. Por outro lado, a mangueira 'Imbú' é o porta-enxerto mais utilizado na região da Zona da Mata, Minas Gerais, Brasil, e suas sementes foram coletadas em plantas do município de Dona Euzébia, Minas Gerais, Brasil. As estacas UC2 foram coletadas em plantas matrizes, originadas de uma seleção massal realizada por viveiristas da região Zona da Mata, Minas Gerais, Brasil, onde foram observadas características agrônômicas importantes, como alto rendimento e qualidade do fruto.

O experimento foi realizado no viveiro comercial Frucafé Mudas e Plantas Ltda., localizado no município de Linhares, Espírito Santo, Brasil (latitude 19° 19 ' 13,7 " S; longitude 40° 04' 55,3" W; 38 m de altitude). Um total de 30 mudas por combinação copa/porta-enxerto foram transplantadas e cultivadas em vasos de polietileno de 25 L contendo um substrato com compostos orgânicos de densidade aparente 0,23 g cm<sup>-3</sup>, em fevereiro de 2018 (6 meses após o enxerto). As plantas foram irrigadas e fertilizadas conforme necessário, e nenhuma restrição no desenvolvimento radicular foi observada ao final do experimento.

### **4.2.2.2 Delineamento experimental**

Quando alcançaram a média de 1,0 m de altura (abril de 2018), as plantas das três combinações copa/porta-enxerto foram separadas em três grupos (C0, C1 e C3). Grupo C0, submetido a nenhum ciclo de seca, esse grupo de plantas recebeu irrigação

durante todo o experimento, mantendo a umidade do solo igual à capacidade de campo. Grupo C1, submetido a apenas um ciclo de seca. Grupo C3, submetido a três ciclos de seca. Cada ciclo de seca consistiu em um período de déficit hídrico (sem irrigação por 20 dias) seguido de um período de recuperação (retorno da irrigação por 10 dias).

A seca foi imposta suspendendo a irrigação até que o conteúdo de água no solo atingisse cerca de 50% da capacidade de campo. Os 20 dias de déficit hídrico foram estimados por testes preliminares realizados em três exemplares de cada combinação copa/porta-enxerto, selecionados aleatoriamente. Foi possível observar por esses testes o mínimo teor de umidade do substrato necessário para alcançar valores próximos a zero na fotossíntese líquida (indicando estresse hídrico), porém, mantendo a capacidade de recuperação durante o retorno da irrigação (APÊNDICE A).

Cerca de seis meses após o final dos ciclos de seca (janeiro de 2019), metade das mudas de cada combinação (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) dentro de cada grupo (C0, C1 e C3) foram submetidas a 35 dias de déficit hídrico (DH), enquanto a outra parte foi mantida em plena irrigação (IRR).

#### **4.2.2.3 Análise experimental**

##### **4.2.2.3.1 Medidas de crescimento**

A altura e diâmetro das mudas foram medidos no início ( $t_0$ ) e no final ( $t_1$ ) do experimento. O crescimento longitudinal da parte aérea (altura) foi determinado a partir do colo da planta (base) até os brotos mais longos do ápice e expressos em centímetros (cm). O crescimento radial do caule (diâmetro) foi determinado a 10 cm acima da região do colo e expresso em milímetros (mm). Foi utilizado o produto da altura (H) com o diâmetro ao quadrado ( $D^2$ ) para estimar o volume total da parte aérea das mudas, como taxa de crescimento relativo [TCR =  $(\ln H_1 \cdot D_1^2 - \ln H_0 \cdot D_0^2)/(t_1 - t_0)$ ], expresso em  $\text{cm}^3 \text{cm}^{-3} \text{dia}^{-1}$  (POMMERENING; GRABARNIK, 2019).

#### 4.2.2.3.2 Relações hídricas

O potencial hídrico foliar ( $\psi_w$ ) foi medido na antemanhã ( $\psi_{pd}$ ; MPa), entre 4h30min e 5h30min e ao meio dia ( $\psi_{md}$ ; MPa), entre 12h e 13h, usando a câmara de pressão do tipo Scholander (Soilmoisture Equipment Corp., Santa Barbara, CA, USA). A condutância hidráulica foliar ( $K_L$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$ ) foi estimada pela razão da transpiração total ( $E$ ) com a diferença do potencial hídrico entre a antemanhã ( $\psi_{pd}$ ) e o meio dia ( $\psi_{md}$ ) [ $K_L = E/(\psi_{pd} - \psi_{md})$ ] (HUBBARD et al., 2001; LIU et al., 2005).

A umidade do substrato foi obtida a uma profundidade de 20 cm com a utilização do medidor de humidade portátil, modelo HFM 2030 (Falker™ Tecnal, BR). Esse equipamento expressa valores em porcentagem de umidade volumétrica (% — v/v), ou seja, o conteúdo de água ( $\text{cm}^3$ ) por volume de substrato ( $\text{cm}^3$ ).

Foi obtida uma correlação preliminar dos índices medidos pelo equipamento (%) com os valores reais de umidade volumétrica ( $UV$ ,  $\text{cm}^3 \text{cm}^{-3}$ ) (APÊNDICE B).

A densidade aparente ( $D = \text{peso seco/volume recipiente}$ ) foi determinada pelos métodos cilíndricos e de pesagem. A partir do peso úmido e seco do substrato foi possível calcular a umidade gravimétrica [ $UG = (\text{peso úmido} - \text{peso seco})/(\text{peso seco})$ ] e a umidade volumétrica ( $UV = UG \cdot D$ ).

#### 4.2.2.3.3 Medidas da fluorescência da clorofila a

Para medir a fluorescência da clorofila *a* foi utilizado o fluorômetro portátil modelo Handy-PEA (Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, UK). As coletas foram realizadas entre 8h00min e 10h00min em folhas previamente adaptadas ao escuro por 40 min. Em seguida foram expostas ao pulso saturante de luz de  $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com comprimento de onda de 650 nm durante 1 s.

A fluorescência inicial foi fixada em  $20 \mu\text{s}$  ( $F_0 = F_1 = O$ ), o  $F_2$  (pico máximo da banda L) em  $150 \mu\text{s}$ , o  $F_3$  (pico máximo da banda K) em  $300 \mu\text{s}$ , o  $F_4$  (etapa J) em  $2 \text{ms}$  e o  $F_5$  (etapa I) em  $30 \text{ms}$  (STRASSER; SRIVASTAVA; GOVINDJEE, 1995; STRASSER; TSIMILLI-MICHAEL; SRIVASTAVA, 2004). A fluorescência máxima ( $F_M = P$ ) variou de  $300 \text{ms}$  a  $800 \text{ms}$ .

Os transientes originais da curva OJIP foram normalizados entre os dois extremos de fluorescência, a fase O ( $F_0$ ) e P ( $F_M$ ). A fluorescência variável foi determinada por transientes de fluorescência da clorofila *a* normalizados entre  $F_0$  e  $F_M$  [ $V_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$ ]. Foi calculada a diferença dos transientes ( $\Delta V_t$ ) em relação a uma referência. Semelhante foi calculado para  $V_{OJ}$  [ $V_{OJ} = (F_t - F_0)/(F_J - F_0)$ ],  $V_{OK}$  [ $V_{OK} = (F_t - F_0)/(F_K - F_0)$ ],  $V_{OI}$  [ $V_{OI} = (F_t - F_0)/(F_I - F_0)$ ] e  $V_{IP}$  [ $V_{IP} = (F_t - F_I)/(F_M - F_I)$ ].  $\Delta V_{OJ}$ ,  $\Delta V_{OK}$ ,  $\Delta V_{OI}$  e  $\Delta V_{IP}$ , também conhecidos como etapa J, banda L, banda K e banda G, respectivamente (STRASSER; TSIMILLI-MICHAEL; SRIVASTAVA, 2004; STIRBET; GOVINDJEE, 2011).

Os resultados dos transientes da fluorescência da clorofila *a* (curva OJIP) foram analisados pelo teste JIP usando o programa PEA plus (Hansatech Instruments, versão 1,13) (STRASSER; SRIVASTAVA; GOVINDJEE, 1995; STIRBET et al., 2018). Foram discutidos os parâmetros mais significantes como indicadores fisiológicos, conforme demonstrado por Faria-Silva et al. (2019; 2020) (APÊNDICE C).

#### 4.2.2.3.4 Medidas de fotossíntese

A taxa líquida de assimilação de  $\text{CO}_2$ , ou seja, fotossíntese líquida ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), taxa de transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e razões  $A/E$ ,  $A/g_s$  e  $A/C_i$  foram determinadas em folhas jovens completamente expandidas (5<sup>a</sup>-6<sup>a</sup> folha do ápice). As medidas foram realizadas com um sistema portátil de trocas gasosas, modelo LCi-Pro (ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, UK) acoplado a uma câmara de aclimação com luz fixada em  $1350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e concentração de  $\text{CO}_2$  ambiente  $\sim 380 \text{ ppm}$ . As análises foram coletadas entre 9h00min e 11h00min.

#### 4.2.2.3.5 Quantificação da prolina

O conteúdo de prolina foi quantificado como descrito por Bates et al. (1973), com algumas adaptações. 0,5 g de folhas jovens completamente expandidas foram maceradas em 10 ml de ácido sulfossalicílico a 3%. O homogenato foi filtrado em papel de filtro e em seguida 2,0 ml do filtrado foi reagido com 2,0 ml de ácido acético glacial e 2,0 ml de ninidrina ácida em tubo de ensaio incubado em banho-maria a

97 °C por 60 min. A reação foi finalizada em banho de gelo por 5 min e a mistura de reação (enamina) foi extraída com 4 ml de tolueno, agitando no vórtex por 20 s. A fase de tolueno no topo (sobrenadante cor rosa avermelhada) foi cuidadosamente aspirada com uma pipeta e lida a 520 nm usando espectrofotômetro (Genesys 150 UV-Vis, Thermo Scientific, Waltham, EUA), usando tolueno como branco. A concentração de prolina na amostra foi determinada a partir de uma curva padrão utilizando prolina de grau analítico (L-prolina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) com 0 a 30 mg ml<sup>-1</sup> de prolina e calculada em base de peso fresco (PF).

#### **4.2.2.4 Análise estatística**

O delineamento para a aplicação dos ciclos de seca teve um fatorial 3 × 3 com dez repetições, enquanto para a simulação da seca futura teve fatorial 3 × 3 × 2 com cinco repetições. Ambos dispuseram de 90 unidades experimentais, onde cada planta foi considerada uma unidade experimental, dispostas em um delineamento inteiramente casualizado. As análises estatísticas foram realizadas no InfoStat estudantil, versão livre (Statistical Software, Córdoba, Argentina). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) (\*\*p < 0,001, \*p < 0,01 \*p < 0,05). Diferenças significativas foram comparadas pelo teste de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ). Além disso, uma análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) foi realizada para detectar variáveis que pudessem distinguir melhor os grupos de comparações.

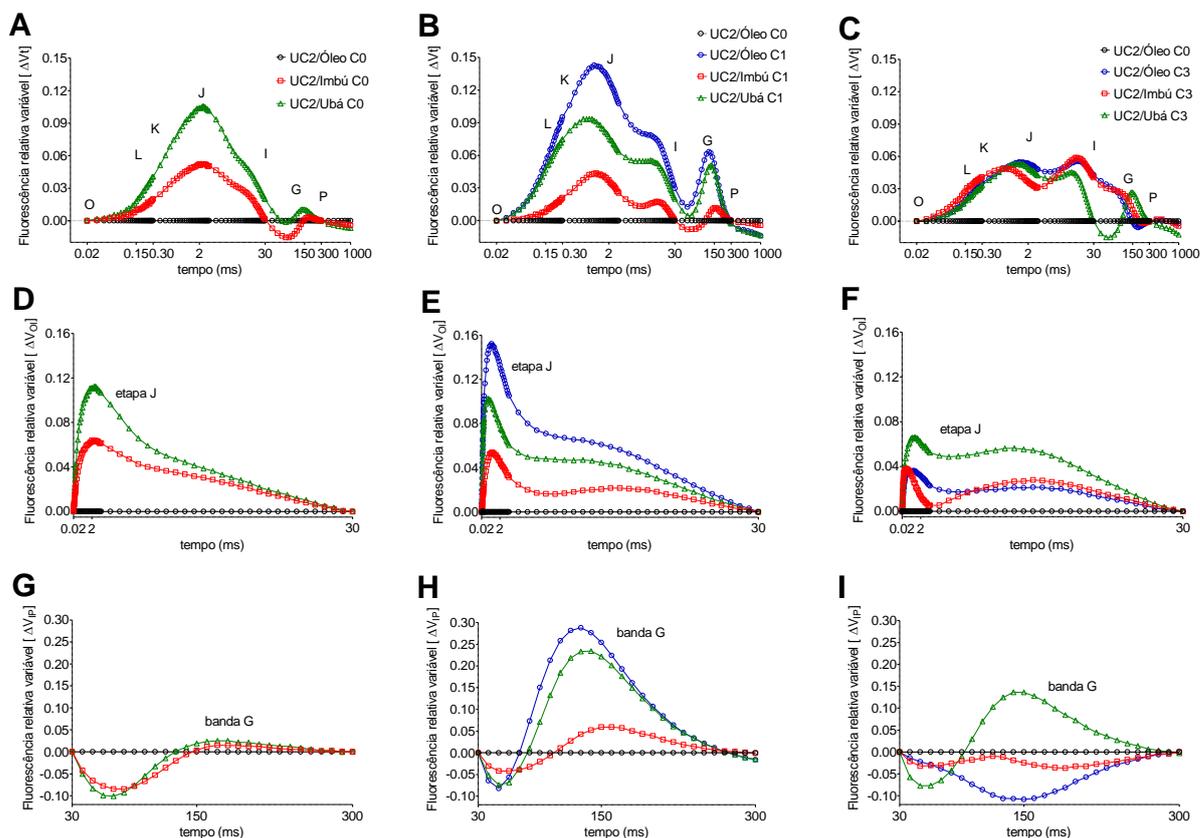
### 4.2.3 RESULTADOS

#### 4.2.3.1 Efeitos durante as secas recorrentes

Normalizações dos transientes de fluorescência da clorofila *a* foram feitas para uma comparação entre as curvas OJIP das combinações copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) de cada grupo (C0, C1 e C3) no final dos ciclos de seca (dia 90) (Figura 5). A diferença cinética foi calculada usando UC2/Óleo C0 como referência em todos os grupos, permitindo obter curvas predominantemente positivas com a intensidade relativa de fluorescência na fase O-P ( $\Delta V_t$ ). Variações relativas da intensidade de fluorescência foram encontradas nas fases O-I ( $\Delta V_{OI}$ ) e I-P ( $\Delta V_{IP}$ ), permitindo destacar a etapa J e a banda G, respectivamente.

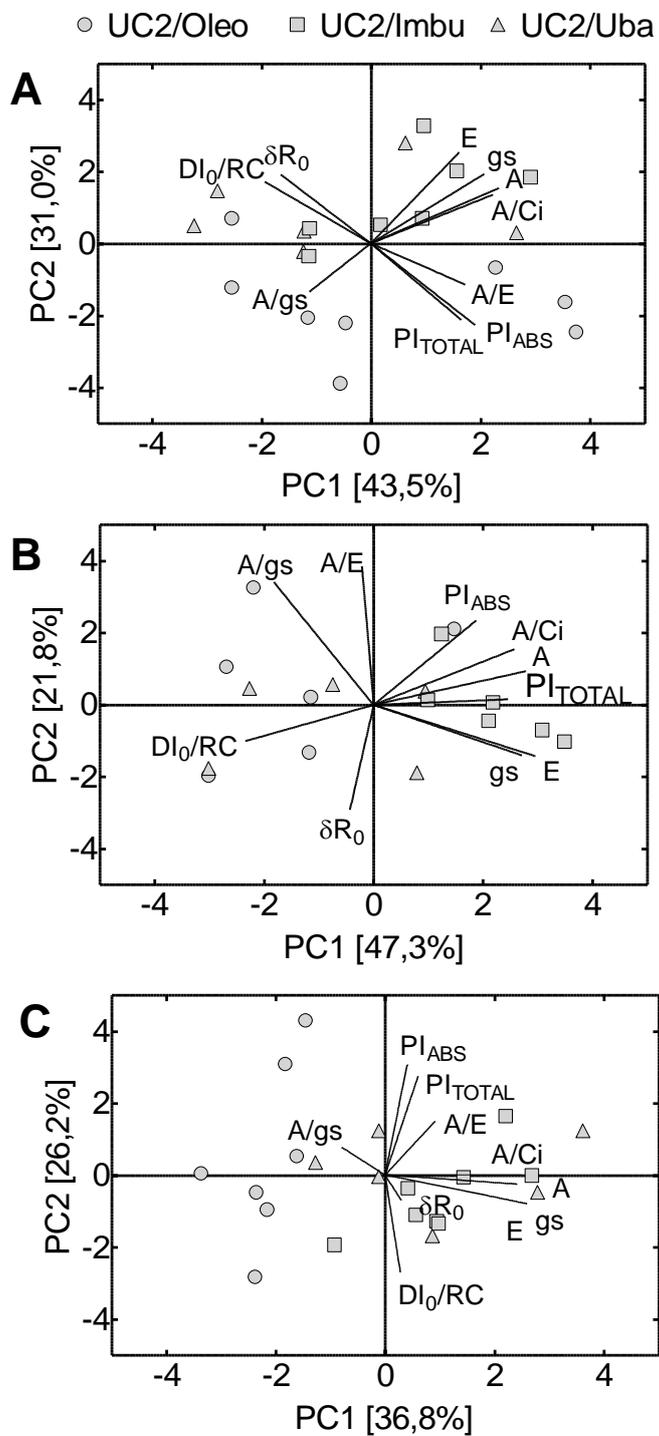
A amplitude máxima positiva da etapa J foi registrada para UC2/Ubá (~ 10%), UC2/Óleo (~ 15%) e UC2/Ubá (7%) em C0, C1 e C3, respectivamente (Figura 5 D, E, F). Foi observada banda G para UC2/Óleo (~ 30%) e UC2/Ubá (~ 15%) em C1 e C3, respectivamente (Figura 5 H, I). Em C0, não houve formação de banda G em nenhuma combinação copa/porta-enxerto (Figura 5 G). UC2/Imbú não apresentou formação aparente dessa banda em nenhum grupo, enquanto UC2/Óleo obteve banda G negativa (~ - 10%) no grupo C3 (Figura 5 I).

Figura 5 — Transientes OJIP da fluorescência da clorofila *a* ao final dos três ciclos de seca (escala de tempo na base log), entre as combinações de copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) com (A, D e G) nenhum ciclo de seca — C0, (B, E e H) um ciclo de seca — C1 e (C, F e I) três ciclos de seca — C3. Foi normalizada a fluorescência relativa variável entre as etapas (A, B e C)  $F_0$  e  $F_P - \Delta V_t$ , (D, E e F)  $F_0$  e  $F_I - \Delta V_{O_i}$  e (G, H e I)  $F_I$  e  $F_P - \Delta V_{I_P}$ , utilizando como referência a combinação UC2/Óleo em C0.



Os parâmetros do teste JIP foram analisados com as variáveis de trocas gasosas pela PCA, permitindo observar padronização nos agrupamentos das combinações copa/porta-enxerto (Figura 6). Um gráfico único de C0, C1 e C3 foi obtido com alto coeficiente de correlação cofenética entre os dados padronizados e as variáveis originais (0,91, 0,90 e 0,87, respectivamente), refletindo um bom ajuste entre as matrizes de similaridade. As variáveis que melhor explicaram os agrupamentos foram  $PI_{TOTAL}$ ,  $PI_{ABS}$ ,  $DI_0/RC$  e  $\delta R_0$ , A, E, gs, A/gs, A/E e A/Ci.

Figura 6 — Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) entre as combinações de copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) com (A) nenhum ciclo de seca — C0, (B) um ciclo de seca — C1 e (C) três ciclos de seca — C3.



Em C0, foi possível identificar semelhanças entre UC2/Ubá e UC2/Imbú. As combinações UC2/Óleo foram diferenciadas das demais devido aos valores mais elevados de  $PI_{TOTAL}$  ( $\uparrow 27\%$ ) e  $PI_{ABS}$  ( $\uparrow 54\%$ ). Em C1, foi possível identificar semelhanças entre UC2/Ubá e UC2/Óleo. As combinações UC2/Imbú foram diferenciadas das demais devido aos valores mais altos de  $PI_{TOTAL}$  ( $\uparrow 50\%$ ),  $A$  ( $\uparrow 39\%$ ),  $gs$  ( $\uparrow 51\%$ ) e  $A/Ci$  ( $\uparrow 44\%$ ). Em C3, foi possível identificar semelhanças entre UC2/Ubá e UC2/Imbú. As combinações UC2/Óleo foram diferenciadas das demais devido aos valores mais baixos de  $A$  ( $\downarrow 36\%$ ),  $gs$  ( $\downarrow 44\%$ ),  $E$  ( $\downarrow 34\%$ ) e  $A/Ci$  ( $\downarrow 37\%$ ). Ao observar separadamente o grupo C3, foi possível acompanhar os efeitos de cada déficit hídrico (seca) e remolhamento (recuperação) no desempenho fotoquímico (Figura 7) e fotossintético (Figura 8) das mangueiras enxertadas.

Figura 7 — Parâmetros fisiológicos relacionados à fluorescência da clorofila *a* das combinações copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) em cada déficit hídrico (seca) e remolhamento (recuperação), durante os três ciclos de seca do grupo C3. (A) Energia total dissipada por centro de reação,  $D_0/RC$ . (B) Eficiência com a qual um elétron de  $Q_B$  é transferido até os receptores finais do FSI,  $\delta R_0$ . (C) Índice de desempenho potencial do FSI,  $PI_{ABS}$ . (D) Índice de desempenho fotoquímico total,  $PI_{TOTAL}$ . Barras representam erro padrão. \*\*\* $p < 0,0001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ .

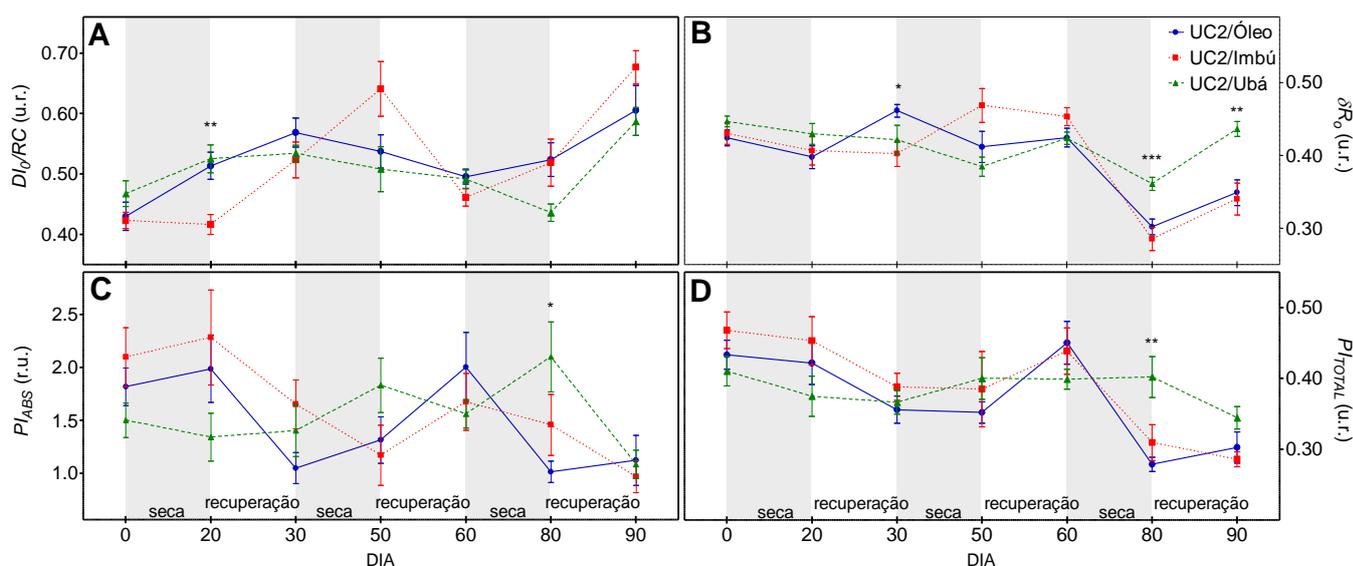
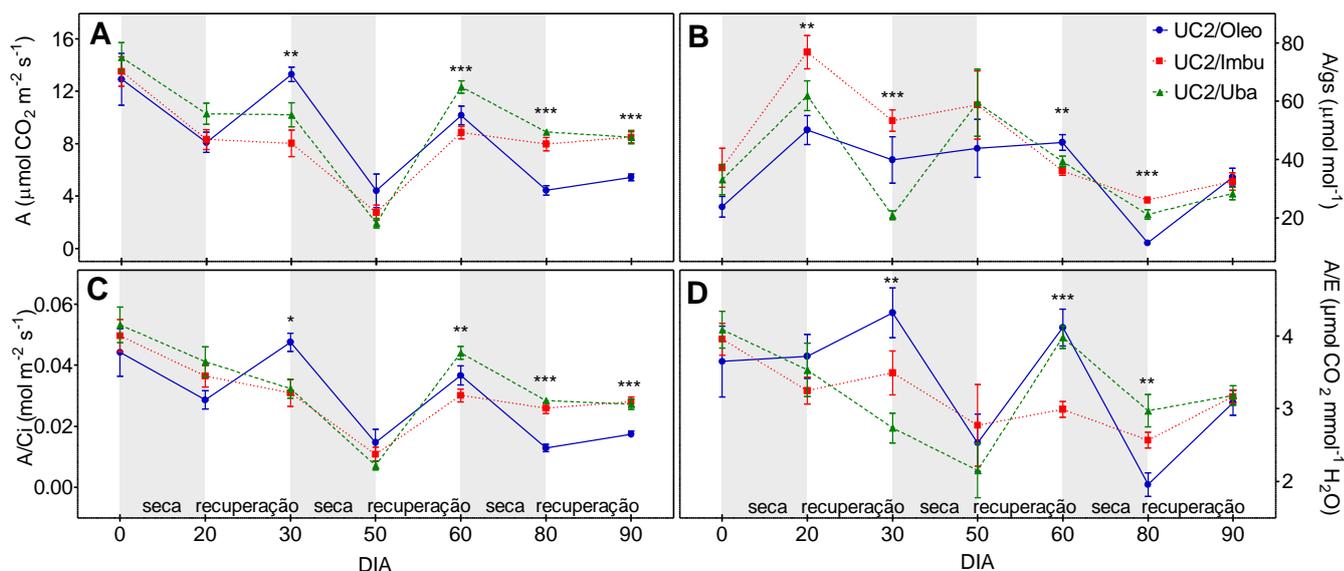


Figura 8 — Parâmetros fisiológicos relacionados às trocas gasosas das combinações copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) em cada déficit hídrico (seca) e remolhamento (recuperação), durante os três ciclos de seca do grupo C3. (A) Taxa líquida de fotossíntese,  $A$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). (B) Eficiência aparente de uso da água  $A/g_s$  ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ). (C) Taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  intercelular,  $A/C_i$  ( $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (D) Eficiência instantânea de uso da água,  $A/E$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ). Barras representam erro padrão. \*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ .



No início do experimento (dia 0), todas as plantas apresentaram médias estatisticamente iguais para todos os parâmetros analisados. Após a primeira seca (dia 20),  $D_iO/RC$  permaneceu estável para UC2/Imbú, enquanto para UC2/Óleo e UC2/Ubá houve aumento, atingindo uma média 25% maior (Figura 7 A). Essa variação não afetou os demais parâmetros fotoquímicos avaliados. A respeito dos parâmetros relacionados às trocas gasosas,  $A$  (Figura 8 A) e  $A/C_i$  (Figura 8 C) diminuíram na mesma proporção para todas as combinações copa/porta-enxerto, mantendo estatisticamente iguais.  $A/g_s$  aumentou para as três combinações, mas em maior proporção para UC2/Imbú, que apresentou média 37% maior em comparação às demais (Figura 8 B).  $A/E$  permaneceu estável para UC2/Óleo e diminuiu 15% para as demais, mas essa variação não foi suficiente para apresentar diferença estatística (Figura 8 D).

Após a primeira recuperação (dia 30),  $D_iO/RC$  permaneceu invariável para UC2/Óleo e UC2/Ubá, enquanto para UC2/Imbú aumentou 26% e foi estatisticamente igual aos

demais.  $\delta R_0$  permaneceu invariável para UC2/Ubá e UC2/Imbú, enquanto para UC2/Óleo houve aumento de 16%, atingindo média 12% maior que as demais combinações copa/porta-enxerto (Figura 7 B). Essas variações não refletiram em alterações nos índices de desempenho fotoquímico,  $PI_{ABS}$  (Figura 7 C) e  $PI_{TOTAL}$  (Figura 7 D). Os parâmetros de trocas gasosas  $A$  e  $A/Ci$  foram mantidos estáveis para UC2/Ubá e UC2/Imbú, enquanto para UC2/Óleo aumentaram e atingiram médias 50% superiores às demais combinações.  $A/E$  continuou diminuindo para UC2/Ubá, enquanto para UC2/Óleo e UC2/Imbú permaneceu invariável, atingindo valores médios respectivamente 58 e 28% maiores que UC2/Ubá.  $A/gs$  permaneceu inalterável para UC2/Óleo e diminuiu 66% e 31% para UC2/Ubá e UC2/Imbú, respectivamente. UC2/Imbú e UC2/Óleo apresentaram médias de  $A/gs$  respectivamente 156 e 92% maiores que UC2/Ubá.

Após a segunda seca (dia 50), tanto  $DI_0/RC$  quanto  $\delta R_0$  permaneceram invariáveis para UC2/Óleo e UC2/Ubá, mas continuaram a aumentar para UC2/Imbú.  $PI_{ABS}$  e  $PI_{TOTAL}$  permaneceram estatisticamente inalterados. Houve redução de 71% em  $A$  e  $A/Ci$  para todas as combinações copa/porta-enxerto. As combinações UC2/Ubá e UC2/Óleo tiveram  $A/gs$  aumentados em 186%, enquanto para UC2/Imbú não houve alteração.  $A/E$  permaneceu estável para UC2/Ubá UC2/Imbú e diminuiu 41% para UC2/Óleo. Nesse momento, não houve diferença estatística entre as combinações copa/porta-enxerto em todos os parâmetros avaliados.

Após a segunda recuperação (dia 60),  $DI_0/RC$  para UC2/Óleo e UC2/Ubá manteve inalterado, enquanto para UC2/Imbú diminuiu 28%.  $\delta R_0$ ,  $PI_{ABS}$  e  $PI_{TOTAL}$  mantiveram estatisticamente com os mesmos valores do dia 50. Houve aumento médio de 169% em  $A$  e  $A/Ci$  para UC2/Óleo e UC2/Imbú. Para UC2/Ubá, esse aumento foi de 526%, atingindo valor 30% superior às demais combinações copa/porta-enxerto. Para UC2/Ubá e UC2/Imbú  $A/gs$  diminuiu em 36%, enquanto para UC2/Óleo esse parâmetro permaneceu estatisticamente inalterado. Isso fez com que  $A/gs$  para UC2/Óleo fosse em média 22% maior do que para UC2/Ubá e UC2/Imbú.  $A/E$  aumentou 74% para UC2/Óleo e UC2/Ubá, enquanto para UC2/Imbú esse parâmetro permaneceu estatisticamente inalterado. Isso fez com que  $A/E$  para UC2/Imbú fosse em média 26% menor do que para UC2/Óleo e UC2/Ubá.

Após a terceira seca (dia 80),  $DI_o/RC$  permaneceu estatisticamente nas mesmas proporções para todas as combinações copa/porta-enxerto.  $\delta R_o$  diminuiu em média 67% para UC2/Óleo e UC2/Imbú, enquanto para UC2/Ubá permaneceu inalterado. Isso fez com que  $\delta R_o$  para UC2/Ubá apresentasse média 25% maior do que para as demais combinações copa/porta-enxerto.  $PI_{ABS}$  aumentou em 35% para UC2/Ubá, diminuiu 50% para UC2/Óleo e permaneceu estável para UC2/Imbú. Assim, UC2/Ubá e UC2/Imbú apresentaram médias 107 e 44% maiores, respectivamente, do que para UC2/Óleo.  $PI_{TOTAL}$  permaneceu inalterado para UC2/Ubá, enquanto para UC2/Óleo e UC2/Imbú houve redução média de 61%. Assim, para UC2/Ubá,  $PI_{TOTAL}$  apresentou média 115% maior do que para UC2/Óleo e UC2/Imbú. Houve redução média de 64% em  $A$  e  $A/Ci$  para UC2/Óleo e UC2/Ubá, enquanto para UC2/Imbú não houveram alterações desses parâmetros. Assim, para UC2/Óleo,  $A$  e  $A/Ci$  apresentaram média 47% menor do que para UC2/Ubá e UC2/Imbú. Houve redução média de 60% em  $A/gs$  e  $A/E$  para UC2/Óleo e de 36% para UC2/Ubá, enquanto para UC2/Imbú não houve alteração.  $A/gs$  para UC2/Imbú e UC2/Ubá alcançou valores, respectivamente, 130 e 86% maiores do que para UC2/Óleo.  $A/E$  para UC2/Ubá e UC2/Imbú atingiu valores, respectivamente, 52 e 31% maiores do que para UC2/Óleo.

Após a terceira recuperação (dia 90),  $DI_o/RC$  aumentou em média 30% para todas as combinações copa/porta-enxerto, mantendo valores estatisticamente iguais.  $\delta R_o$  permaneceu com os valores médios nas mesmas proporções para todas as combinações, mantendo esse parâmetro 25% maior para UC2/Ubá.  $PI_{ABS}$  e  $PI_{TOTAL}$  para UC2/Ubá apresentaram decréscimos de 48 e 29%, respectivamente, enquanto para as demais combinações esses parâmetros permaneceram estatisticamente inalterados. Ao final,  $PI_{ABS}$  e  $PI_{TOTAL}$  não apresentaram diferenças estatísticas entre as combinações copa/porta-enxerto.  $A$  e  $A/Ci$  permaneceram inalteradas, mantendo as proporções do período anterior (dia 80). Para UC2/Óleo,  $A/gs$  e  $A/E$  aumentou, respectivamente, 200 e 57%. Para as demais combinações, esses parâmetros permaneceram estatisticamente nas mesmas proporções. Ao final,  $A/gs$  e  $A/E$  não apresentaram diferenças estatísticas entre as combinações copa/porta-enxerto.

As relações hídricas das folhas foram medidas em cada combinação copa/porta-enxerto nas condições de conforto hídrico (dias 80 e 90 do ciclo C0), de seca (dia 80 do ciclo C3) e de recuperação (dia 90 do ciclo C3) (Tabela 1).

O potencial hídrico foliar na antemanhã ( $\psi_{pd}$ ) para UC2/Óleo na condição de seca foi 100% mais negativo (- 0,54 MPa) quando comparado ao conforto hídrico. Na recuperação aumentou na mesma proporção, retornando à média (- 0,33 MPa) estatisticamente igual ao conforto hídrico. UC2/Ubá apresentou a maior média de  $\psi_{pd}$  na condição seca (- 0,25 MPa) e UC2/Óleo a menor (- 0,54 MPa). UC2/Imbú foi a combinação com a menor média de  $\psi_{pd}$  na condição de recuperação (- 0,50 MPa), 70% mais negativa do que na condição de conforto hídrico (- 0,29 MPa) e estatisticamente igual à condição seca. O potencial hídrico foliar ao meio-dia ( $\psi_{md}$ ) para UC2/Ubá no conforto hídrico foi 35% menor em comparação a UC2/Óleo e UC2/Imbú, que foram estatisticamente iguais entre si. Em condições de seca, o UC2/Ubá apresentou  $\psi_{md}$  20% menor em comparação a UC2/Óleo.

Tabela 1 — Potencial hídrico foliar na antemanhã ( $\psi_{pd}$ ; MPa) e ao meio dia ( $\psi_{md}$ ; MPa). Taxa de transpiração foliar ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e condutância hidráulica foliar ( $K_L$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$ ) de cada combinação copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) nas condições de conforto hídrico (dias 80 e 90 do ciclo C0), de seca (dia 80 do ciclo C3) e de recuperação (dia 90 do ciclo C3). \*\*\* $p < 0,0001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  e ns (não significativo). Os dados são as médias  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística (maiúscula) entre as combinações copa/porta-enxerto para a mesma condição hídrica e (minúscula) entre as condições hídricas para a mesma combinação copa/porta-enxerto por meio do teste de comparações múltiplas Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

Condições hídricas (CH)	Combinação copa/porta-enxerto (C/P)	$\psi_{pd}$	$\psi_{md}$	$E$	$K_L$
Conforto hídrico	UC2/Óleo	-0,25 $\pm$ 0,03 Aa	-0,40 $\pm$ 0,04 Aa	2,28 $\pm$ 0,09 Ba	23,73 $\pm$ 5,76 Aa
	UC2/Ubá	-0,23 $\pm$ 0,03 Aa	-0,54 $\pm$ 0,05 Ba	2,83 $\pm$ 0,21 Aa	12,96 $\pm$ 3,65 Ba
	UC2/Imbú	-0,29 $\pm$ 0,03 Aa	-0,40 $\pm$ 0,03 Aa	3,07 $\pm$ 0,13 Aa	29,51 $\pm$ 2,83 Aa
Seca	UC2/Óleo	-0,54 $\pm$ 0,03 Cb	-0,62 $\pm$ 0,02 Bb	2,28 $\pm$ 0,01 Ba	40,66 $\pm$ 1,79 Aa
	UC2/Ubá	-0,25 $\pm$ 0,03 Aab	-0,50 $\pm$ 0,05 Aa	2,99 $\pm$ 0,37 Aba	12,51 $\pm$ 1,58 Ba
	UC2/Imbú	-0,44 $\pm$ 0,03 Bb	-0,59 $\pm$ 0,02 ABb	3,08 $\pm$ 0,07 Aa	25,06 $\pm$ 6,39 Ba
Recuperação	UC2/Óleo	-0,33 $\pm$ 0,01 Aa	-0,49 $\pm$ 0,00 Aa	1,86 $\pm$ 0,07 Bb	11,97 $\pm$ 1,11 Ba
	UC2/Ubá	-0,34 $\pm$ 0,02 Ab	-0,45 $\pm$ 0,02 Aa	2,38 $\pm$ 0,14 Aa	22,46 $\pm$ 0,91 Ba
	UC2/Imbú	-0,50 $\pm$ 0,05 Bb	-0,58 $\pm$ 0,04 Bb	2,41 $\pm$ 0,16 Ab	42,79 $\pm$ 1,89 Aa
CH		***	**	**	ns
C/P		***	ns	***	*
CH x C/P		**	**	ns	ns

Para UC2/Óleo,  $\psi_{md}$  55% foi mais negativo (- 0,62 MPa) na condição seca do que no conforto hídrico. Na recuperação,  $\psi_{md}$  retornou a uma média (- 0,49 MPa) estatisticamente igual ao conforto hídrico. Para UC2/Ubá não foi observada diferença estatística para  $\psi_{md}$  entre as condições hídricas, mantendo média de - 0,50 MPa. Para UC2/Imbú, a média de  $\psi_{md}$  na seca e recuperação foi estatisticamente igual (- 0,58 MPa) e 45% mais negativo do que na condição de conforto hídrico (- 0,40 MPa).

A taxa de transpiração foliar ( $E$ ) sob condições de conforto hídrico, seca e recuperação foi 20% menor para UC2/Óleo em comparação com as outras duas combinações, que foram estatisticamente iguais entre si. Para todas as combinações copa/porta-enxertos, a média de  $E$  na condição de seca foi mantida estatisticamente igual ao conforto hídrico. Para UC2/Ubá,  $E$  foi estatisticamente igual na condição de

seca e recuperação. Tanto para UC2/Óleo quanto para UC2/Imbú,  $E$  foi 20% menor na condição de recuperação em comparação à seca.

A condutância hidráulica foliar ( $K_L$ ) não apresentou diferenças estatísticas entre as condições hídricas. Na condição de conforto hídrico, as médias entre UC2/Imbú e UC2/Óleo foram estatisticamente iguais, enquanto para UC2/Ubá  $K_L$  foi 50% menor. Na condição de seca, as médias entre UC2/Ubá e UC2/Imbú foram estatisticamente iguais, cerca de 50% inferior à média para UC2/Óleo. Na recuperação, as médias entre UC2/Óleo e UC2/Ubá foram estatisticamente iguais, cerca de 60% menores do que para UC2/Imbú.

No final dos três ciclos de seca (dia 90), foram medidas a altura (cm), o diâmetro (mm) e a taxa de crescimento relativa (TCR,  $\text{mm cm}^{-3} \text{ dia}^{-1}$ ) (Tabela 2). Não houve interação das combinações copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) com os grupos (C0, C1 e C3) para nenhuma das variáveis de crescimento avaliadas. A altura média da UC2/Imbú foi 7 e 20% menor que a UC2/Ubá e UC2/Óleo, respectivamente. As plantas do grupo C3 apresentaram altura média 13 e 20% menor que as plantas do grupo C1 e C0, respectivamente. O diâmetro médio nos grupos C1 e C3 foi estatisticamente igual e 7% menor que no grupo C0. UC2/Imbú apresentou diâmetro 7% menor que as demais combinações. A TCR de UC2/Óleo e UC2/Ubá foi estatisticamente igual, com média 22% menor que UC2/Imbú. As plantas do grupo C3 apresentaram TCR 30% menor que os grupos C0 e C1, que foram estatisticamente iguais entre si.

Tabela 2 — Altura (cm), diâmetro (mm) e taxa de crescimento relativo (TCR,  $\text{mm cm}^{-3} \text{ day}^{-1}$ ) das combinações copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) e dos grupos (C0, C1 e C3) no final dos três ciclos de seca (dia 90). \*\*\* $p < 0,0001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  e ns (não significativo). Os dados são as médias  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística (maiúscula) entre as combinações copa/porta-enxerto e (minúscula) entre os grupos, pelo teste Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	TCR ( $\text{mm cm}^{-3} \text{ dia}^{-1}$ )
Copa/porta-enxerto (C/P)			
UC2/Óleo	142,88 $\pm$ 2,48 A	21,56 $\pm$ 0,34 A	8,75 $\pm$ 0,74 B
UC2/Ubá	125,09 $\pm$ 2,39 B	21,78 $\pm$ 0,33 A	9,18 $\pm$ 0,71 B
UC2/Imbú	116,19 $\pm$ 2,39 C	20,16 $\pm$ 0,33 B	11,42 $\pm$ 0,71 A
Grupo (G)			
C0	140,81 $\pm$ 2,43 a	22,14 $\pm$ 0,33 a	11,41 $\pm$ 0,73 a
C1	129,82 $\pm$ 2,44 b	20,92 $\pm$ 0,33 b	10,64 $\pm$ 0,72 a
C3	113,53 $\pm$ 2,39 c	20,45 $\pm$ 0,33 b	7,29 $\pm$ 0,71 b
C/P	***	**	*
G	***	**	**
C/P $\times$ G	ns	ns	ns

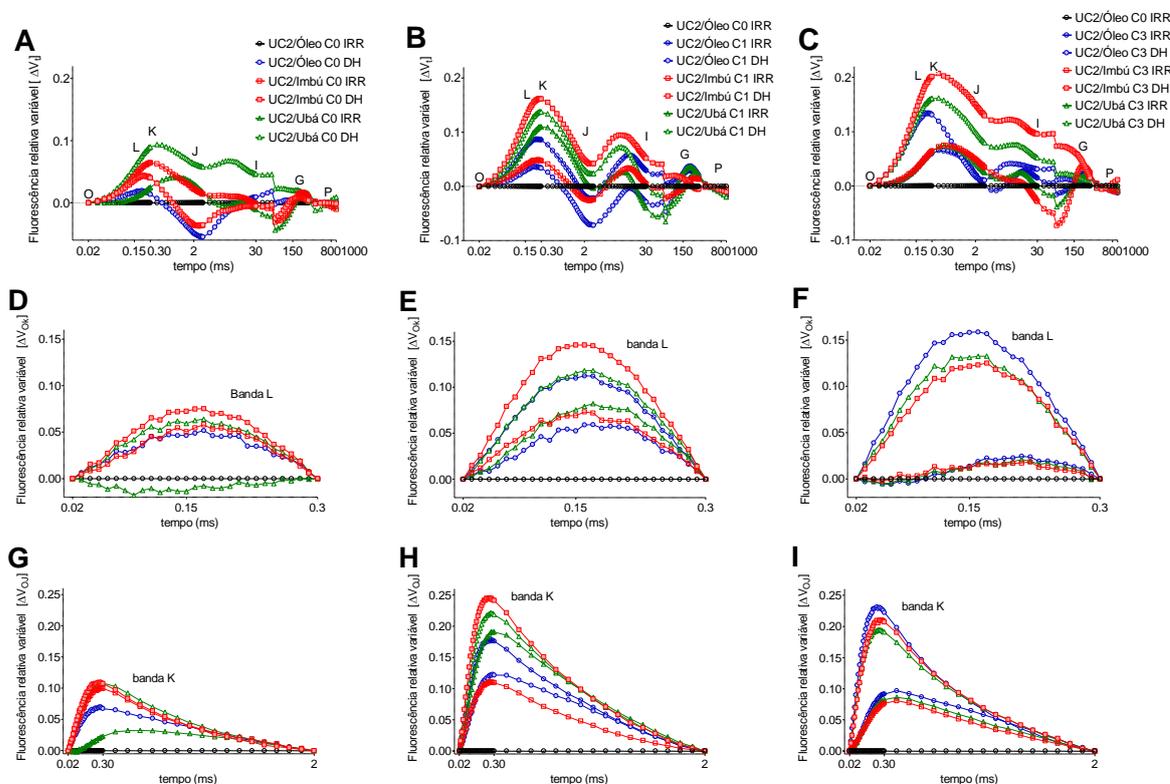
#### 4.2.3.2 Efeitos dos ciclos de seca anteriores no déficit hídrico posterior

Normalizações dos transientes de fluorescência da clorofila *a* foram feitas para uma comparação entre as curvas OJIP das combinações copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) submetidas ao déficit hídrico (DH) e mantidas em plena irrigação (IRR) de cada grupo (C0, C1 e C3) (Figura 9).

A diferença cinética em todos os grupos foi calculada usando UC2/Óleo C0 IRR como referência, permitindo obter curvas predominantemente positivas com a intensidade relativa de fluorescência na fase O-P ( $\Delta V_t$ ). Variações relativas da intensidade de fluorescência foram encontradas nas fases O-K ( $\Delta V_{OK}$ ) e O-J ( $\Delta V_{OJ}$ ), permitindo destacar a banda L e a banda K, respectivamente. Essas bandas foram positivas para todas as combinações copa/porta-enxerto em todos os grupos, exceto para UC2/Ubá C0 IRR, que não apresentou banda L (Figura 9 D).

As menores amplitudes de banda L foram encontradas nas plantas do grupo C0 (~ 5%) (Figura 9 D, G). Nas plantas do grupo C1, essa banda foi maior para UC2/Imbú C1 DH (~ 15%), UC2/Ubá C1 DH (~ 10%) e UC2/Óleo C1 IRR (~ 10%); e menor para UC2/Óleo C1 DH (~ 5%), UC2/Imbú C1 IRR (~ 7%) e UC2/Ubá C1 IRR (~ 7%) (Figura 9 E). Nas plantas do grupo C3, a banda L foi maior nas combinações copa/porta-enxerto impostas ao déficit hídrico: UC2/Óleo C3 DH (~ 15%), UC2/Ubá C3 DH (~ 12%) e UC2/Imbú C3 DH (~ 12%); enquanto na condição irrigada não houve formação dessa banda para nenhuma combinação (Figura 9 F).

Figura 9 — Transientes OJIP da fluorescência da clorofila *a* (escala de tempo na base log) após a simulação da seca futura. Diferenças cinéticas foram observadas entre as combinações copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) submetidas ao déficit hídrico (DH) e mantidas em plena irrigação (IRR) para as plantas submetidas previamente (A, D e G) a nenhum ciclo de seca — C0, (B, E e H) a um ciclo de seca — C1 e (C, F e I) a três ciclos de seca — C3. Foi normalizada a fluorescência relativa variável entre as etapas (A, B e C)  $F_O$  e  $F_P - \Delta V_t$ , (D, E e F)  $F_O$  e  $F_K - \Delta V_{OK}$ , conhecida como banda L e (G, H e I)  $F_O$  e  $F_J - \Delta V_{OJ}$ , conhecida como banda K. Para isso, foi utilizada como referência a combinação UC2/Óleo C0 IRR.

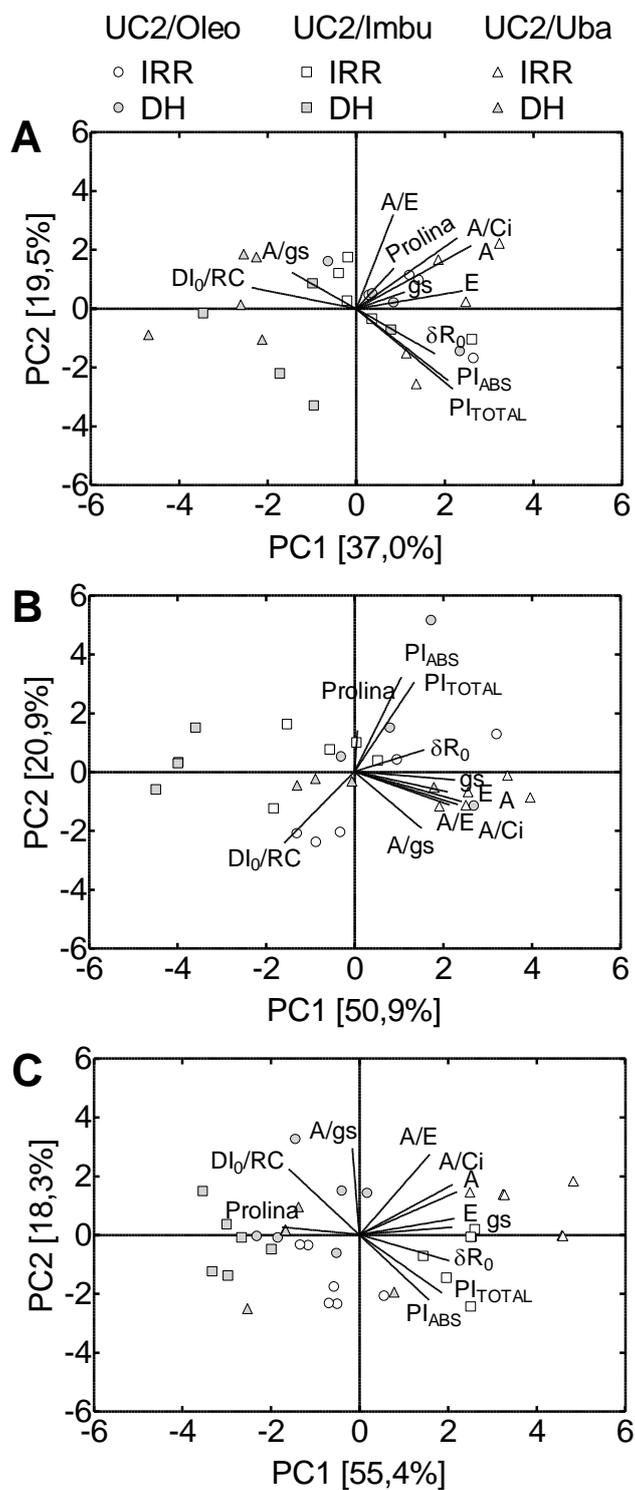


As amplitudes na banda K seguiram variações semelhantes às observadas na banda L. Nas plantas do grupo C0, a amplitude foi a mesma para UC2/Imbú C0 DH, UC2/Imbú C0 IRR e UC2/Ubá C0 DH (~ 10%), enquanto para UC2/Óleo C0 DH foi de aproximadamente 7%. Já para UC2/Ubá C0 IRR não houve formação aparente da banda K (Figura 9 G).

Nas plantas do grupo C1, a banda K foi maior para UC2/Imbú C1 DH (~ 25%), UC2/Ubá C1 DH (~ 22%), UC2/Ubá C1 IRR (~ 18%) e UC2/Óleo C1 IRR (~ 18%); e menor para UC2/Óleo C1 DH (~ 12%) e UC2/Imbú C1 IRR (~ 12%). Nas plantas do grupo C3, essa banda foi maior nas combinações copa/porta-enxerto impostas ao déficit hídrico: UC2/Óleo C3 DH (~ 23%), UC2/Imbú C3 DH (~ 20%) e UC2/Ubá C3 DH (~ 20%); enquanto na condição irrigada foi observada uma amplitude de banda K semelhante para todas as combinações copa/porta-enxertos (~ 10%).

Os parâmetros do teste JIP calculados por meio dos resultados da cinética de fluorescência da clorofila *a* foram analisados com as variáveis de trocas gasosas e com o conteúdo de prolina pela análise multivariada PCA, permitindo observar padronização de agrupamentos das combinações copa/porta-enxerto sob déficit hídrico (DH) e irrigadas (IRR) (Figura 10). Foi obtido um gráfico único dos grupos C0, C1 e C3 com alto coeficiente de correlação cofenética entre os dados padronizados e as variáveis originais (0,84, 0,93 e 0,96, respectivamente), refletindo um bom ajuste entre as matrizes de similaridade. Os parâmetros do teste JIP e das trocas gasosas que melhor explicaram essas separações foram os mesmos avaliados durante os ciclos de seca, com acréscimo do conteúdo de prolina foliar.

Figura 10 — Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) entre as combinações copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) submetidas ao déficit hídrico (DH) e mantidas em plena irrigação (IRR) para as plantas submetidas previamente (A) a nenhum ciclo de seca — C0, (B) a um ciclo de seca — C1 e (C) a três ciclos de seca — C3.

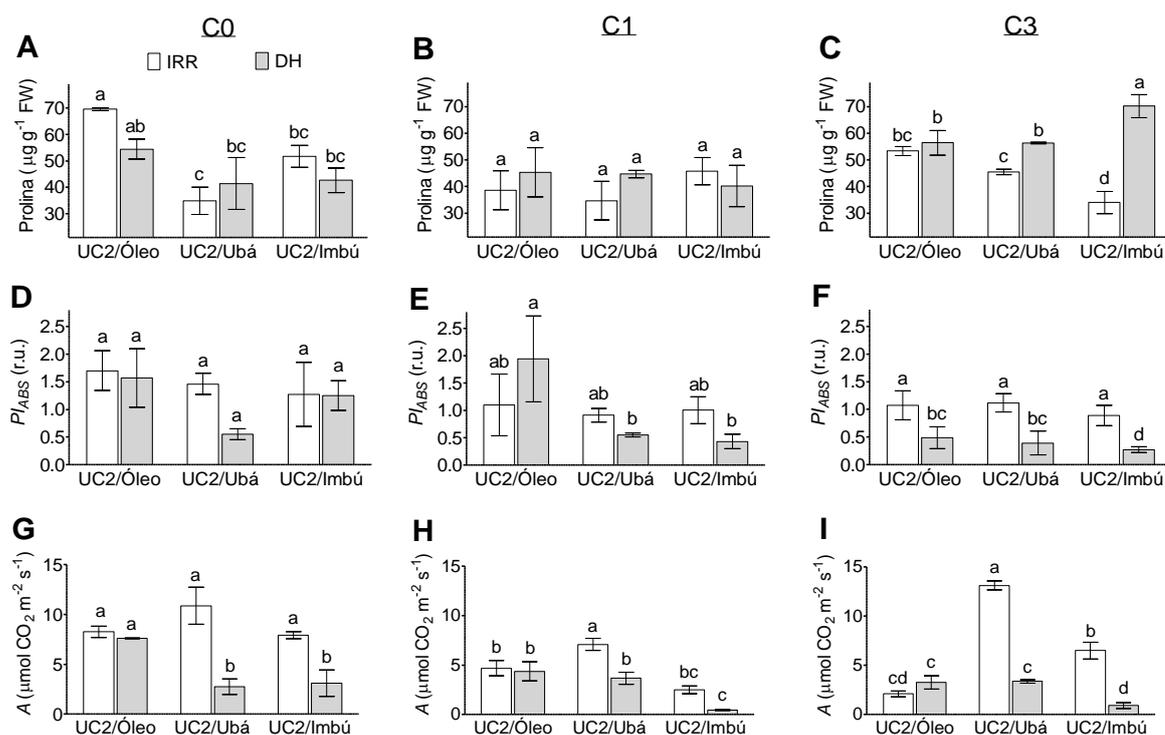


As plantas da combinação UC2/Óleo que não foram submetidas previamente a nenhum ciclo de seca, ao passarem pelo primeiro déficit hídrico (UC2/Óleo C0 DH) não distinguiram daquelas sob irrigação constante (UC2/Óleo C0 IRR) (Figura 10 A). As médias de conteúdo de prolina,  $PI_{ABS}$  e  $A$  foram estatisticamente iguais (Figura 11 A, D, G). Já a média do conteúdo de prolina para UC2/Ubá C0 IRR e UC2/Imbú C0 IRR foi 40% menor que para UC2/Óleo C0 IRR (Figura 11 A).

UC2/Ubá C0 DH e UC2/Imbú C0 DH apresentaram agrupamentos em quadrantes opostos a UC2/Ubá C0 IRR e UC2/Imbú C0 IRR (Figura 10 A), sobretudo devido aos menores valores médios de  $A$  sob déficit hídrico (~ 65% menor) (Figura 11 G). UC2/Ubá C0 DH e UC2/Imbú C0 DH apresentaram média de  $A$  60% menor que UC2/Óleo C0 DH (Figura 11 G). O conteúdo de prolina e  $PI_{ABS}$  não apresentaram variações significativas entre DH e IRR para nenhuma combinação copa/porta-enxerto.

As plantas da combinação UC2/Óleo e UC2/Imbú que passaram previamente por um ciclo de seca, ao passarem por um novo déficit hídrico (UC2/Óleo C1 DH e UC2/Imbú C1 DH), não distinguiram daquelas sob irrigação constante (UC2/Óleo C1 IRR) (Figura 10 B). As médias de conteúdo de prolina,  $PI_{ABS}$  e  $A$  comparadas entre DH e IRR foram estatisticamente iguais para essas combinações (Figura 11). Para UC2/Ubá C1 DH e UC2/Imbú C1 DH,  $PI_{ABS}$  apresentou média 75% menor que para UC2/Óleo C1 DH (Figura 11 E). Para UC2/Imbú C1 DH,  $A$  apresentou média 90% menor que para UC2/Óleo C1 DH e UC2/Ubá C1 DH (Figura 11 H). Para UC2/Óleo C1 IRR e UC2/Imbú C1 IRR,  $A$  apresentou média 50% menor que para UC2/Ubá C1 IRR (Figura 11 H). O conteúdo de prolina,  $PI_{ABS}$  e  $A$  não apresentaram variações significativas entre DH e IRR para nenhuma combinação copa/porta-enxerto, exceto para UC2/Ubá. A média de  $A$  para UC2/Ubá C1 DH foi 48% menor que para UC2/Ubá C1 IRR.

Figura 11 — (A, B e C) Conteúdo de prolina, (D, E e F) índice de desempenho fotoquímico total -  $PI_{TOTAL}$  e (G, H e I) taxa de fotossíntese líquida -  $A$  entre as combinações copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) submetidas ao déficit hídrico (DH) e mantidas em plena irrigação (IRR) para as plantas submetidas previamente (A, D e G) a nenhum ciclo de seca — C0, (B, E e H) a um ciclo de seca — C1 e (C, F e I) a três ciclos de seca — C3. As barras indicam erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de comparações múltiplas Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).



As plantas da combinação UC2/Óleo que foram submetidas previamente a três ciclos de seca, ao passarem novamente por outro déficit hídrico (UC2/Óleo C0 DH), não distinguiram daquelas sob irrigação constante (UC2/Óleo C3 IRR). As combinações UC2/Ubá e UC2/Imbú C3 DH apresentaram agrupamentos em quadrantes opostos a UC2/Ubá e UC2/Imbú C3 IRR (Figura 10 C), sobretudo devido aos maiores conteúdos médios de prolina sob déficit hídrico, que foram 20 e 50% maiores para UC2/Ubá e UC2/Imbú C3 DH, respectivamente (Figura 11 C). O conteúdo de prolina foi igual estatisticamente entre UC2/Óleo C3 DH e IRR. UC2/Óleo e UC2/Ubá C3 DH apresentaram média de conteúdo de prolina 20% menor que UC2/Imbú C3 DH. Por

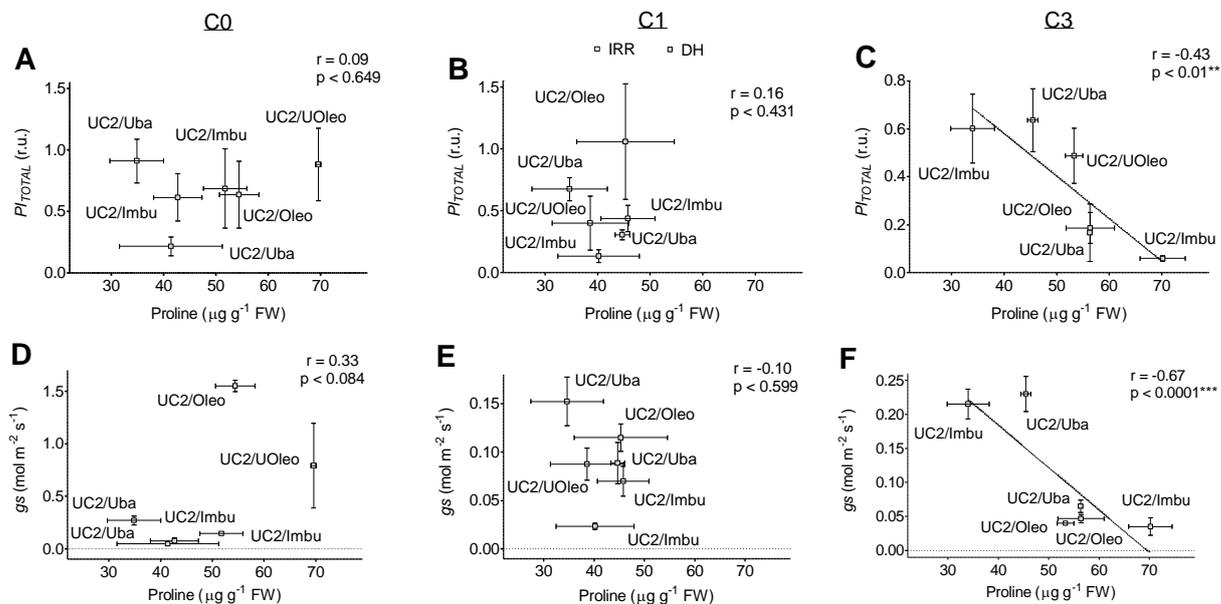
outro lado, UC2/Imbú C3 IRR apresentou conteúdo de prolina 30% menor que UC2/Óleo e UC2/Ubá C3 IRR (Figura 11 C).

$PI_{ABS}$  para UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú C3 DH foi, respectivamente, 55, 64 e 90% menor que para UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú C3 IRR. O parâmetro  $A$  para UC2/Ubá e UC2/Imbú C3 DH foi, respectivamente, 70 e 85% menor que UC2/Ubá e UC2/Imbú C3 IRR, enquanto entre UC2/Óleo C3 DH e IRR foi estatisticamente igual. Por outro lado, UC2/Óleo C3 IRR apresentou  $A$  80 e 70% menor que UC2/Ubá e UC2/Imbú C3 IRR, respectivamente.

As possíveis correlações do conteúdo de prolina com as variáveis  $PI_{TOTAL}$  e  $gs$  foram representadas em gráficos contendo as médias e os erros padrões de cada combinação copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú) submetida ao déficit hídrico (DH) e mantida em plena irrigação (IRR), separadamente em cada grupo (C0, C1 e C3) (Figura 12). Foi possível observar correlações significativas apenas nas plantas submetidas previamente a três ciclos de seca (grupo C3) (Figura 12 C, F). Também foi apenas nesse grupo que foi possível observar variações no conteúdo de prolina. Nessas plantas, o conteúdo de prolina teve correlação negativa com  $PI_{TOTAL}$  ( $-0,43$ ,  $p < 0,01$ ) e  $gs$  ( $-0,67$ ,  $p < 0,0001$ ).

As plantas da combinação UC2/Imbú C3 apresentaram as maiores discrepâncias entre IRR e DH, com os maiores valores no DH (56,6 a 83,2  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW) e menores no IRR (20,1 a 46,2  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW). Para UC2/Imbú C3 DH houve incremento do conteúdo de prolina em 100% em relação à UC2/Imbú C3 IRR, refletindo em diminuição significativa de  $PI_{TOTAL}$  ( $\downarrow 90\%$ ) e  $gs$  ( $\downarrow 80\%$ ). Para UC2/Ubá C3 DH houve incremento do conteúdo de prolina em 25% em relação à UC2/Ubá C3 IRR, refletindo em diminuição significativa de  $PI_{TOTAL}$  ( $\downarrow 70\%$ ) e  $gs$  ( $\downarrow 70\%$ ). Para UC2/Óleo C3 DH não houve incremento do conteúdo de prolina nem diminuição de  $gs$  em relação à UC2/Óleo C3 IRR, mas houve diminuição significativa de  $PI_{TOTAL}$  ( $\downarrow 60\%$ ). Para UC2/Óleo C3 IRR  $gs$  apresentou valor médio tão baixo quanto para UC2/Óleo, UC2/Ubá e UC2/Imbú DH ( $\sim 0,05 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

Figura 12 — Correlação de Pearson do (A, B e C) índice de desempenho fotoquímico total ( $PI_{TOTAL}$ ) e da (D, E e F) condutância estomática ( $gs$ ) com conteúdo de prolina foliar, distinguindo cada combinação copa/porta-enxerto (UC2/Óleo, UC2/Uba e UC2/Imbú) sob déficit hídrico (DH) e mantina em plena irrigação (IRR), submetida previamente a (A, D e G) nenhum ciclo de seca — C0, (B, E e H) um ciclo de seca — C1 e (C, F e I) três ciclos de seca — C3.



#### 4.2.4 DISCUSSÃO

##### 4.2.4.1 Mangueiras ‘Ubá’ aclimatam diferencialmente a ciclos de secas recorrentes dependente do porta-enxerto utilizado

Com os resultados obtidos durante os ciclos de secas recorrentes, foi possível entender melhor o comportamento da mangueira enxertada em eventos sucessivos de seca, ou seja, imediatamente após cada déficit hídrico e recuperação. A simulação dos ciclos de seca utilizados nesse trabalho foi inspirada em metodologias frequentemente utilizadas pela maioria dos pesquisadores que pretendiam observar mudanças na tolerância diferencial ao estresse. Esse método já foi relatado para plantas de metabolismo respiratório C3, como citrus (NEVES et al., 2018) e café (MENEZES-SILVA et al., 2017; GUEDES et al., 2018), também para C4 (WALTER et al., 2011) e as de metabolismo ácido das crassulácias (CAM, do inglês *crassulacean acid metabolism*) (FLETA-SORIANO; PINTÓ-MARIJUAN; MUNNÉ-BOSCH, 2015).

As secas recorrentes podem induzir a formação de plantas potencialmente melhores para prosperar em condições estressantes futuras. Esse aumento da tolerância ao déficit hídrico futuro está frequentemente relacionado a mecanismos epigenéticos, que podem ser considerados uma determinada “memória” ao estresse, ou seja, uma aclimação diferencial (VILLAR-SALVADOR et al., 1999; IWASAKI; PASZKOWSKI, 2014; KINOSHITA; SEKI, 2014). Há também algumas evidências de que os porta-enxertos possam influenciar significativamente a aclimação a esses eventos sucessivos de seca (NEVES et al., 2018).

Para avaliar o potencial fisiológico das plantas sob estresse, um dos métodos mais comumente utilizado, de forma rápida, prática e não destrutiva é a análise da fluorescência da clorofila *a* (STRASSER; TSIMILLI-MICHAEL; SRIVASTAVA, 2004; GUO; TAN, 2015), associado com os parâmetros fisiológicos relacionados às trocas gasosas (MURCHIE; LAWSON, 2013).

A fase O-I denota as propriedades cinéticas para oxidação/redução do *pool* de plastoquinona (PQ) e a fase I-P elucidada alterações no fluxo de elétrons da plastoquinona reduzida (PQH<sub>2</sub>, plastoquinol) até os aceptadores finais de elétrons do

FSI (MUNDAY; GOVINDJEE, 1969; STIRBET; GOVINDJEE, 2011). As maiores amplitudes registradas pelo  $\Delta V_{OI}$  (etapa J) para UC2/Ubá e UC2/Imbú no grupo de plantas que não passaram por nenhum ciclo de seca (C0) mostraram que, em condições de conforto hídrico, UC2/Óleo apresentou a maior taxa de redução de PQ, confirmando o uso dessa combinação copa/porta-enxerto como referência. Na etapa J, os menores picos positivos foram observados no grupo das plantas submetidas anteriormente a três ciclos de seca recorrentes (C3), indicando que o estresse causado pelos déficits hídricos anteriores tornou a planta capaz de manter a taxa de redução do PQ (captura de elétrons para o redução do PQ) após o terceiro déficit hídrico sucessivo, principalmente para UC2/Óleo e UC2/Imbú. O aumento da amplitude da etapa J no grupo C1 sugere uma limitação da transferência de elétrons além do  $Q_A$ , sobretudo para UC2/Óleo. A supressão de amplitude registrada pelo  $\Delta V_{IP}$  (banda G) para UC2/Imbú em grupos submetidos anteriormente a um (C1) e três (C3) ciclos de seca recorrentes, sugere que secas anteriores não influenciaram as mudanças no estado redox do FSI. Por outro lado, o aparecimento de banda G negativa para UC2/Óleo C3 sugere que as secas recorrentes induziram essas plantas a adquirirem tolerância às limitações associadas ao FSI, ao contrário do UC2/Ubá, que manteve uma banda G positiva.

Como a linearidade entre a taxa de transporte de elétrons e a assimilação líquida de  $CO_2$  estava ausente devido à existência de captura de elétrons alternativos, especialmente pela fotorrespiração, uma abordagem multivariada foi uma boa alternativa (LOSCIALE et al., 2015). No presente trabalho, foi utilizada a análise de componentes principais. A lógica desse método é considerar os principais fatores que afetam a fotossíntese líquida, identificar as variáveis mais relacionadas e combinar todas usando uma abordagem multivariada.

No grupo que não sofreram nenhuma seca anterior, foi possível separar as plantas da combinação UC2/Óleo C0 como aquelas com maior eficiência de uso da água ( $A/gs$  e  $A/E$ ) e desempenho fotoquímico ( $PI_{ABS}$  e  $PI_{TOTAL}$ ). Por outro lado, no grupo submetido a três ciclos de seca, a separação das plantas UC2/Óleo C3 ocorreu devido à menor capacidade de trocas gasosas, confirmada pelos menores valores na taxa líquida de fotossíntese ( $A$ ), condutância estomática ( $gs$ ), transpiração ( $E$ ) e taxa de

assimilação de CO<sub>2</sub> intercelular ( $A/C_i$ ). Assim, em geral, os ciclos de seca interferiram mais severamente na etapa bioquímica do que na etapa fotoquímica da fotossíntese.

A diminuição na condutância estomática resulta em menor consumo de ATP e NADPH para a assimilação de CO<sub>2</sub>, o que pode resultar em uma taxa reduzida no transporte linear de elétrons (NIINEMETS et al., 1999; CHALLABATHULA; ZHANG; BARTELS, 2018). No entanto, quando o desempenho fotoquímico é mantido ou até mesmo aumentado, é indicativo que um importante mecanismo de proteção da fotoinibição possa ter ocorrido, é o caso da fotorrespiração (LUVAHA; NETONDO; OUMA, 2007; MASHILO et al., 2017). A via foto-respiratória é usada como escape alternativo para a energia dos fótons quando a taxa de assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> é restrita. Isso reduz os possíveis efeitos de estresses oxidativos causados pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) em tilacóides, como a desativação de enzimas relacionadas à fotossíntese e a consequente inibição da atividade funcional do FSII (BRATT et al., 2016; NOWICKA et al., 2018). A assimilação reduzida de CO<sub>2</sub> é uma resposta comum às condições de estresse que ocorrem como resultado do fechamento estomático e causam mais danos ao aparelho fotossintético. Além dessas limitações estomáticas, existem também outras que vão além da capacidade de abertura e fechamento dos estômatos, como a taxa de carboxilação da rubisco, que pode ser associada às menores taxas de assimilação de CO<sub>2</sub> intercelular ( $A/C_i$ ) (LUVAHA; NETONDO; OUMA, 2007; MASHILO et al., 2017). No presente estudo, a estratégia de fotorrespiração foi mais evidente nas plantas da combinação UC2/Óleo C3, confirmados pelos menores valores de  $A/C_i$  e pela ausência de danos ao FSI, confirmada pela presença de banda G negativa na cinética de fluorescência da clorofila *a*.

Analisando cada déficit hídrico (seca) e remolhamento (recuperação) dos ciclos de seca do grupo C3, foi possível identificar que o UC2/Óleo perdeu a capacidade de recuperação da fotossíntese no terceiro ciclo de seca, momento em que o déficit hídrico causou uma drástica diminuição no índice de rendimento quântico do FSII ( $P_{IABS}$ ). Assim, foi possível compreender que, para UC2/Óleo C3, a sequência de três secas prejudicou a atividade fotoquímica do FSII a ponto de impedir a recuperação da fotossíntese líquida no terceiro ciclo de seca. UC2/Ubá e UC2/Imbú aumentaram a capacidade de recuperação da fotossíntese no segundo ciclo de seca. No entanto, no

terceiro déficit hídrico, as plantas da combinação UC2/Imbú foram as únicas que não sofreram alterações nos parâmetros fisiológicos relacionados às trocas gasosas, sugerindo que os dois ciclos de seca anteriores induziram tolerância ao déficit hídrico.

O estresse hídrico anterior pode levar as plantas a uma estratégia menos conservadora em relação à eficiência no uso da água. Pode ocorrer uma regulação diferencial da transpiração estomática, que permite a planta perder mais água durante a diminuição do potencial hídrico da folha, causada pela progressiva redução hídrica no solo (TOMBESI et al., 2018). Esse comportamento foi mais evidenciado para UC2/Imbú C3, confirmado pela maior condutância hidráulica das folhas ( $K_L$ ) observada após os três ciclos consecutivos de seca. A condutância hidráulica está diretamente relacionada à maior compatibilidade entre copa/porta-enxerto (MARTÍNEZ-BALLESTA et al., 2010) e, conseqüentemente, ao aumento da taxa líquida de fotossíntese (HUBBARD et al., 2001; LIU et al., 2005).

Alguns experimentos de enxertia relataram que porta-enxertos tolerantes à seca geraram copas que puderam manter maior capacidade de absorção de água sob condições de estresse hídrico. Isso resultou na condição hídrica das folhas mais favorável e, conseqüentemente, na maior capacidade fotossintética, tanto estomática quanto não estomática, atribuída principalmente à condutância hidráulica das raízes (LI et al., 2019). Assim, foi possível identificar as mudas de manga Ubá enxertadas no porta-enxerto Imbú (UC2/Imbú) como plantas com maior potencial de aclimação para secas sucessivas.

#### **4.2.4.2 A aclimação diferencial em mangueiras ‘Ubá’ induz a tolerância ao déficit hídrico futuro dependente do porta-enxerto utilizado**

Com os resultados obtidos após a simulação da seca futura, foi possível entender melhor os efeitos dos ciclos de seca anteriores sobre a tolerância ao déficit hídrico futuro em mangueiras enxertadas. O comportamento do porta-enxerto durante eventos sucessivos de seca é amplamente explorado, mas pouco se sabe sobre os efeitos desses ciclos na tolerância das combinações copa/porta-enxerto a secas futuras.

Os efeitos do estresse hídrico variam de acordo com o genótipo da planta, com a intensidade e duração do estresse e com a impressão que os episódios anteriores deixaram na planta. Essa “memória”, ou mais didaticamente falando, essa resposta diferencial ao estresse, pode ser definida como as modificações estruturais, genéticas e bioquímicas que ocorreram como consequência da exposição ao estresse e que tornaram a planta mais tolerante ou mais sensível ao contato futuro com o mesmo fator estressante (FLETA-SORIANO; MUNNÉ-BOSCH, 2016).

Para entender o efeito do estresse hídrico na fotossíntese, a cinética polifásica da fluorescência rápida da clorofila *a*, representada pelos transientes OLKJIP, pode ser um indicador sensível para refletir as alterações na fotoquímica do FSII e FSI (VAN RENSBURG et al., 1996; ELSHEERY; CAO, 2008). A amplitude na fase O-K, registrada por  $\Delta V_{OK}$  (banda L), indica a conectividade energética das subunidades do FSII e na fase O-J, registrada por  $\Delta V_{OJ}$  (banda K), representa a eficiência do complexo evolutivo do oxigênio (CEO) (MUNDAY; GOVINDJEE, 1969; STIRBET; GOVINDJEE, 2011).

O incremento de banda L positiva para todas as plantas do grupo C3 submetidas ao déficit hídrico (DH) em comparação às irrigadas (IRR), sugere um estresse gerado por danos primários ao PSII, como a desconectividade das unidades de PSII. A banda K acentuada para as combinações copa/porta-enxerto C3 DH, pode ser devida a um desequilíbrio entre o fluxo de elétrons do CEO para o centro de reação do FSII. A banda K evidente nessas plantas sugere que o estresse causado pelo déficit hídrico pode ter destruído o CEO e prejudicado a capacidade de transferência de elétrons no lado doador do FSII. Para UC2/Imbú DH, houve maiores amplitudes das bandas L e K nos grupos C0 e C1 e menores no grupo C3, sugerindo que os estresses causados pelos três ciclos de secas anteriores influenciaram na maior capacidade de proteção do FSII em resposta à seca futura.

O estresse por déficit hídrico pode inibir a fotossíntese, diminuindo o suprimento de ribulose 1,5-difosfato (RuBP) causado pela baixa síntese de ATP. Também pode aumentar a atividade oxigenase da RuBP carboxilase/oxigenase (RUBISCO), reduzindo a eficiência da carboxilação (URBAN; AARROUF; BIDEL, 2017). Diminuir o processo de carboxilação no ciclo de Calvin causa menos demanda por NADPH

gerado na cadeia transportadora de elétrons fotoquímicos. Sob essas condições, se a planta mantiver o transporte linear de elétrons com a produção concomitante de NADPH e ATP via FSII e FSI, o excesso de elétrons livres gerados na membrana do tilacoide pode causar estresse oxidativo grave (CHALLABATHULA; ZHANG; BARTELS, 2018). Por outro lado, se a planta mantiver o transporte cíclico de elétrons envolvendo apenas o FSI, os elétrons reciclam em torno do FSI e redirecionam a ferredoxina à plastoquinona. Assim, o gradiente de prótons através dos tilacóides mantém a produção de ATP no fluxo cíclico de elétrons sem a formação de NADPH. Essa é uma estratégia importante para o crescimento das plantas, pois gera um gradiente de pH através das membranas dos tilacóides ( $\Delta\text{pH}$ ), contribuindo para a síntese de ATP, desencadeando a dissipação não fotoquímica (NPQ, do inglês *non-photochemical quenching*) sob condições de estresse e mitigando a produção de ROS. Dessa forma, pode ocorrer o equilíbrio da taxa de produção ATP/NADPH e a proteção do FSI (YAMORI; SHIKANAI, 2016). No presente estudo, não foram observadas variações significativas no desempenho fotoquímico do FSI após o déficit hídrico, sugerindo que o fluxo cíclico de elétrons pode ter sido uma das proteções desse fotossistema. Mostrando que a transferência de elétrons das plastoquinonas receptoras primárias ( $Q_A$ ) e secundárias ( $Q_B$ ) no FSII foi bloqueada sob condição de estresse.

Existem outras estratégias eficazes na desintoxicação das ROS provocadas pelo excesso de elétrons livres nos cloroplastos. Como é o caso das xantofilas, um tipo de carotenóide que atua como pigmento acessório e fotoprotetor, envolvido direta ou indiretamente no NPQ. Já foi relatado em campo que o teor de carotenóides totais aumentou significativamente nas folhas de *Mangifera indica* L. Cv. Ubá cultivadas sob efeito conjugado de excesso de luz e temperatura (FARIA-SILVA et al., 2017) e sob ausência de irrigação (FARIA-SILVA et al., 2019). Há evidências de que esse efeito é um componente chave da “memória” dos cloroplastos em resposta ao estresse fotooxidativo anterior (JAHNS; HOLZWARTH, 2012).

Com o aumento do teor de carotenóides, também já foi demonstrado que o estresse por déficit hídrico aumentou proporcionalmente o conteúdo de prolina de duas cultivares de manga mais comumente cultivadas no Sudoeste da China (“Choke Anand” e “Khieo Sawoei”) (ELSHEERY; CAO, 2008). Além de atuar

diretamente no ajuste osmótico durante o déficit hídrico, a ciclagem do substrato para a biossíntese de prolina determina a homeostase metabólica e a razão  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  por meio da via oxidativa da pentose fosfato. Durante a síntese e a degradação da prolina são gerados  $\text{NADP}^+$  e  $\text{NADPH}$ , respectivamente (ASHRAF et al., 2018). No presente trabalho, foi observado maior acúmulo de prolina nas folhas de mangueiras sob déficit hídrico quando as plantas já haviam passado por três ciclos recorrentes de secas prévias (grupo C3), principalmente para a combinação UC2/Imbú. A correlação negativa entre o conteúdo de prolina e a eficiência de uso da água no grupo C3 sugere que o desempenho da prolina foi mais direcionado à manutenção do equilíbrio  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  do que para o controle osmótico.

O acúmulo de prolina foliar pode estar intimamente relacionado ao aumento do nível de ácido abscísico (ABA), ao menor potencial hídrico e à diminuição da condutância estomática (ZAHARAH; RAZI, 2009). A redução da condutância estomática, mediante estresse hídrico em condições de seca, pode ser atribuída ao acúmulo de ABA, hormônio esse que está relacionado à indução da síntese de prolina (HARE; CRESS; VAN STADEN, 1999). No presente estudo, foi possível observar essa estreita relação entre o aumento de prolina e a diminuição da condutância estomática para as combinações UC2/Ubá e UC2/Imbú do grupo de plantas submetidas a três ciclos sucessivos de seca (grupo C3). Nesse grupo, o aumento da prolina também esteve fortemente relacionado à diminuição do índice de desempenho fotoquímico total ( $PI_{TOTAL}$ ), mas desta vez para todas as combinações copa/porta-enxerto. Esse resultado sugere que o aumento na síntese de prolina foi uma estratégia de defesa “memorizada” pelas secas anteriores para responder de maneira mais eficaz ao déficit hídrico futuro, especialmente para a combinação UC2/Imbú, onde o incremento no conteúdo de prolina foi mais relevante. UC2/Óleo manteve baixa fotossíntese líquida, mesmo nas plantas irrigadas (IRR), refletindo a não recuperação após os três ciclos de seca.

O conteúdo de prolina já mostrou ser um indicador bioquímico que, somado a indicadores fisiológicos registrados pela fluorescência da clorofila *a*, demonstrou que o desempenho fotossintético é dependente da combinação copa/porta-enxerto, identificando o porta-enxerto “Óleo” como sendo o mais promissor na formação de mudas de manga ‘Ubá’ cultivadas em condições de conforto hídrico (FARIA-SILVA;

GALLON; SILVA, 2020). Porém, os pomares de mangueiras em áreas vulneráveis à seca são expostos ao estresse hídrico quase todos os anos e isso pode naturalmente estimular a resposta das plantas a esses eventos estressantes. Para entender o efeito do estresse hídrico causado pelas secas anteriores sobre a fotossíntese de mangueiras enxertadas e identificar as plantas com maior tolerância à seca futura, a medição da fluorescência rápida da clorofila *a*, trocas gasosas e conteúdo de prolina foliar observadas em conjunto pela análise de componentes principais (PCA), se mostrou um método útil e eficaz. De fato, a “memória” do estresse do porta-enxerto “Imbú” ocorreu devido à exposição anterior a três ciclos de secas recorrentes.

O porta-enxerto “Óleo” gerou copas de mangueira ‘Ubá’ com mais vigor e melhor capacidade de tolerar o déficit hídrico pela primeira vez. No entanto, essa tolerância diminuiu quando foram submetidas a secas recorrentes, perdendo a capacidade de se recuperar após o terceiro déficit hídrico consecutivo. Um efeito inverso foi encontrado para o porta-enxerto “Imbú”, que gerou copas de mangueira ‘Ubá’ com menos vigor e menor capacidade de tolerar o primeiro déficit hídrico. No entanto, essa tolerância aumentou no terceiro déficit hídrico consecutivo. Os resultados mostraram que as mudas de mangueira ‘Ubá’ expostas a múltiplos ciclos de seca puderam desenvolver uma aclimação diferencial que potencializou seus mecanismos fotossintéticos, com a intensidade de resposta variando conforme o porta-enxerto utilizado.

A validação desses resultados foi possível aplicando um déficit hídrico severo (35 dias de seca) cerca de seis meses após o final dos ciclos de seca. Nesse momento, as mangueiras ‘Ubá’ geradas com o porta-enxerto “Óleo” e expostas a três ciclos de secas recorrentes, mantiveram baixa eficiência fotossintética tanto nas plantas submetidas ao déficit hídrico quanto nas irrigadas, sem interferência no conteúdo de prolina. Mostrando que UC2/Óleo foram prejudicadas pelas secas anteriores e não se aclimataram diferencialmente para tolerar a seca posterior. Já as combinações copa/porta-enxerto geradas com o porta-enxerto “Imbú” (UC2/Imbú) apresentaram maior eficiência fotossintética nas plantas irrigadas e maior conteúdo de prolina nas plantas sob déficit hídrico. Mostrando que essas plantas “memorizaram” os estresses anteriores e potencializaram a produção de prolina como proteção para tolerar a seca posterior.

## 5. CONCLUSÕES

Os parâmetros fotoquímicos extraídos da cinética da fluorescência da clorofila *a* indicados como sendo os mais simples, rápidos e eficientes para identificar precocemente o porta-enxerto mais vigoroso na formação de mudas da mangueira 'Ubá' tolerantes à seca, foram:  $F_2$  (relativo à presença da banda L, referente à desconectividade energética das subunidades do FSII),  $F_3$  (relativo à presença da banda K, referente ao desequilíbrio entre o fluxo de elétrons do Complexo de Evolução do Oxigênio para o centro de reação do FSII),  $DI_0/RC$  (energia total dissipada por centro de reação ativo),  $PI_{ABS}$  (índice de desempenho potencial do FSII),  $PI_{TOTAL}$  (índice de desempenho fotoquímico total, dos fótons absorvidos no FSII até a redução de receptores finais no FSI). Durante este trabalho foi observado que as plantas da mangueira 'Ubá' expostas a múltiplos ciclos de seca desenvolveram uma aclimação diferencial que potencializou seus mecanismos fotossintéticos, e que a intensidade da resposta variou dependendo do porta-enxerto utilizado. O porta-enxerto "Óleo" foi o que gerou mudas de manga 'Ubá' mais vigorosas e tolerantes a seca quando expostas ao déficit hídrico uma única vez. No entanto, essa tolerância diminuiu quando as plantas foram submetidas a secas recorrentes, perdendo a capacidade de se recuperar após o terceiro déficit consecutivo. Um efeito inverso foi encontrado para o porta-enxerto "Imbú", que ao primeiro déficit hídrico gerou mudas menos vigorosas e menos tolerantes, porém, após o terceiro ciclo de seca consecutivo foi registrada maior tolerância ao déficit hídrico nestas plantas. Cerca de seis meses após o final desses ciclos, uma seca mais severa de 35 dias de déficit hídrico mostrou que as mangueiras 'Ubá' geradas com o porta-enxerto "Óleo" (UC2/Óleo), que haviam passado previamente por três ciclos de secas recorrentes, apresentaram baixa eficiência fotossintética e conteúdo de prolina inalterado quando comparadas às plantas mantidas sob irrigação. Já as copas geradas com o porta-enxerto "Imbú" (UC2/Imbú) apresentaram menor dissipação de energia fotoquímica ( $DI_0/RC$ , banda L) e maior conteúdo de prolina, indicando que os ciclos de seca anteriores induziram o aumento da tolerância ao déficit hídrico futuro. Ao final, foi possível concluir que a indução de tolerância à seca por meio da aclimação diferencial é dependente do porta-enxerto utilizado; e confirmar o uso da fluorescência da clorofila *a* como indicador de porta-enxertos de manga 'Ubá' mais tolerantes ao déficit hídrico.

## REFERÊNCIAS

ARRIEL, D. A. A. et al. Genetic control of resistance on *Mangifera indica* to *Ceratocystis* wilt. **Scientia Horticulturae**, v. 211, p. 312–318, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423816304319>>.

ARSLAN, Ö.; EYİDOĞAN, F.; EKMEKÇİ, Y. Freezing tolerance of chickpea: biochemical and molecular changes at vegetative stage. **Biologia Plantarum**, n. X, p. 1–9, 2003.

ASHRAF, M. A. et al. Dynamic Proline Metabolism: Importance and Regulation in Water-Limited Environments. In: **Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. p. 323–336.

BACARIN, M. A. et al. Chlorophyll a fluorescence as indicative of the salt stress on *Brassica napus* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 23, n. 4, p. 261–266, 2011.

BACKHAUS, S. et al. Recurrent Mild Drought Events Increase Resistance Toward Extreme Drought Stress. **Ecosystems**, p. 1068–1081, 2014.

BALIBREA, M. E. et al. Fast changes in soluble carbohydrates and proline contents in tomato seedlings in response to ionic and non-ionic iso-osmotic stresses. **Journal of Plant Physiology**, v. 151, n. 2, p. 221–226, 1997.

BANERJEE, A.; WANI, S. H.; ROYCHOUDHURY, A. Epigenetic Control of Plant Cold Responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. September, p. 1–5, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.01643/full>>.

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, 1973.

BENEVIDES, S. D. et al. Qualidade da manga e polpa da manga Ubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 571–578, 2008.

BISPO, W. M. S. et al. Photosynthesis impairments precede noticeable changes in leaf water status of mango plants infected by *Ceratocystis fimbriata*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 146, n. 2, p. 419–432, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10658-016-0928-4>>.

BITHELL, S. L. et al. Fine root dry matter relative to mango (*Mangifera indica*) tree scion size grafted on size-controlling rootstocks, is negatively related to scion growth rate. **Trees - Structure and Function**, v. 30, n. 4, p. 1181–1190, 2016.

BRATT, A. et al. Organelle redox autonomy during environmental stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 39, n. 9, p. 1909–1919, 2016.

BRAY, E. A. Plant Response to Stress. **Nature**, v. 15, p. 1–5, 2001.

BRUCE, T. J. A. et al. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, v. 173, n. 6, p. 603–608, 2007.

CANTERO-NAVARRO, E. et al. Improving agronomic water use efficiency in tomato by rootstock-mediated hormonal regulation of leaf biomass. **Plant Science**, v. 251, p. 90–100, 2016.

CARR, M. K. V. THE WATER RELATIONS AND IRRIGATION REQUIREMENTS OF MANGO (*Mangifera indica* L.): A REVIEW. **Experimental Agriculture**, v. 50, n. 01, p. 1–23, 2014. Disponível em: <[http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0014479713000288](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0014479713000288)>.

CASSOL, D. et al. An evaluation of non-destructive methods to estimate total chlorophyll content. **Photosynthetica**, v. 46, n. 4, p. 634–636, 2008.

CHADWICK, R. et al. Large rainfall changes consistently projected over substantial areas of tropical land. **Nature Climate Change**, v. 6, n. 2, p. 177–181, 2015.

CHALLABATHULA, D.; ZHANG, Q.; BARTELS, D. Protection of photosynthesis in desiccation-tolerant resurrection plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 227, n. April, p. 84–92, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.05.002>>.

COCHETEL, N. et al. Root transcriptomic responses of grafted grapevines to heterogeneous nitrogen availability depend on rootstock genotype. **Journal of Experimental Botany**, p. 1–17, 2017.

COOKSON, S. J.; OLLAT, N. Grafting with rootstocks induces extensive transcriptional re-programming in the shoot apical meristem of grapevine. **BMC plant biology**, v. 13, n. 1, p. 147, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3852942&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

DAYAL, V. et al. Growth, yield and physiology of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars as affected by polyembryonic rootstocks. **Scientia Horticulturae**, v. 199, p. 186–197, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423815303642>>.

DONADIO, L. C. **Variedades brasileiras de manga**. São Paulo: Fundação Editora da UNESP, 1996.

DONADIO, L. C. et al. Dwarfing-canopy and rootstock cultivars for fruit trees. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 3, p. 1–12, 2019.

ELSHEERY, N. I.; CAO, K.-F. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 6, p. 769–777, 2008.

ESTAJI, A. et al. How glycine betaine induces tolerance of cucumber plants to salinity stress? **Photosynthetica**, v. 57, n. 3, p. 753–761, 2019.

FAOSTAT. **FAO Statistics Database on the World Wide Web**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 14 jan. 2020.

FARIA-SILVA, L. et al. Photochemical metabolism and fruit quality of Ubá mango tree exposed to combined light and heat stress in the field. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, p. 238, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11738-017-2533-3>>.

FARIA-SILVA, L. 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.32615/ps.2019.091>>.

FARIA-SILVA, L.; GALLON, C. Z.; SILVA, D. M. Photosynthetic performance is determined by scion/rootstock combination in mango seedling propagation. **Scientia Horticulturae**, v. 265, n. November 2019, p. 1–8, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109247>>.

FASEELA, P. et al. Chlorophyll a fluorescence parameters as indicators of a particular abiotic stress in rice. **Photosynthetica**, v. 57, p. 108–115, 2019.

FLETA-SORIANO, E.; MUNNÉ-BOSCH, S. Stress Memory and the Inevitable Effects of Drought : A Physiological Perspective. **Frontier in Plant Science**, v. 7, n. February, p. 1–6, 2016.

FLETA-SORIANO, E.; PINTÓ-MARIJUAN, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Evidence of drought stress memory in the facultative CAM, *Aptenia cordifolia*: Possible role of phytohormones. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–12, 2015.

FRANI, M. C. et al. Effects of excess cadmium in soil on JIP-test parameters , hydrogen peroxide content and antioxidant activity in two maize inbreds and their hybrid. **Photosynthetica**, v. 55, n. X, p. 1–10, 2017.

GOLTSEV, V. N. et al. Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 63, n. 6, p. 869–893, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S1021443716050058>>.

GONÇALVES, J. F. de C.; SANTOS JÚNIOR, U. M. dos. Utilization of the chlorophyll a fluorescence technique as a tool for selecting tolerant species to environments of high irradiance. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 3, p. 307–313, 2005.

GREGORY, P. J. et al. Contributions of roots and rootstocks to sustainable, intensified crop production. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 5, p. 1209–1222, 2013.

GUEDES, F. A. de F. et al. Transcriptional memory contributes to drought tolerance in coffee (*Coffea canephora*) plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 147, n. November 2017, p. 220–233, 2018.

GUHA, A.; SENGUPTA, D.; REDDY, A. R. Polyphasic chlorophyll a fluorescence kinetics and leaf protein analyses to track dynamics of photosynthetic performance in mulberry during progressive drought. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 119, p. 71–83, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.12.006>>.

GUO, Y.; TAN, J. Recent advances in the application of chlorophyll a fluorescence from photosystem II. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 1, p. 1–14, 2015.

HAAK, D. C. et al. Multilevel Regulation of Abiotic Stress Responses in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. September, p. 1–24, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.01564/full>>.

HANSATECH. **PEA+ software**. Disponível em: <<http://www.hansatech-instruments.com/>>. Acesso em: 25 jan. 2020.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Proline synthesis and degradation: A model system for elucidating stress-related signal transduction. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 333, p. 413–434, 1999.

HASAN, I.; BASAHI, J.; ISMAIL, I. Gas Exchange, Chlorophyll Fluorescence and Antioxidants as Bioindicators of Airborne Heavy Metal Pollution in Jeddah, Saudi Arabia. **Current World Environment Journal**, v. 8, n. 2, p. 203–213, 2013.

HUBBARD, R. M. et al. Stomatal conductance and photosynthesis vary linearly with plant hydraulic conductance in ponderosa pine. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, n. 1, p. 113–121, 2001.

INCAPER. **Polo de Manga para indústria no estado do Espírito Santo** (DCM/Incaper, Ed.). [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[www.incaper.es.gov.br](http://www.incaper.es.gov.br)>.

INCAPER. **Relatório de Gestão do Exercício de 2015** (B. de S. Costa et al., Eds.). Vitória/ES: Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural - INCAPER, 2016. .

INMET. **Estações automáticas: Gráficos**. Disponível em: <[http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede\\_estacoes\\_auto\\_graf](http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf)>. Acesso em: 29 set. 2019.

IPCC, 2014. **Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Switzerland: Geneva, 2014.

IWASAKI, M.; PASZKOWSKI, J. Epigenetic memory in plants. **The EMBO Journal**, v. 33, n. 18, p. 1987–1998, 2014.

JACOBS DF, L. T. H. A Guide for Tribal Nurseries. In: **Nursery manual for native plants**. 1. ed. United States: Department of Agriculture, 2009. 12p. 75–76.

JAHNS, P.; HOLZWARTH, A. R. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1817, n. 1, p. 182–193, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.04.012>>.

JARVIS, A. et al. Scenarios of climate change within the context of agriculture. In: REYNOLDS, M. P. (Ed.). **Climate change and crop production**. Wallingford UK: CAB International, 2010. p. 9–37.

JOHNSON, M. P. Photosynthesis. **Essays In Biochemistry**, v. 60, n. 3, p. 255–273, 2016. Disponível em: <<http://essays.biochemistry.org/cgi/doi/10.1042/EBC20160016>>.

JOHNSON, M. P. Metabolic regulation of photosynthetic membrane structure tunes electron transfer function . **Biochemical Journal**, n. January, p. 1–10, 2018.

JOLLIFFE, I. T. in a Variables Discarding II : Real Data Analysis . Component Principal. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 22, n. 1, p. 21–31, 1973.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J.; CADIMA, J. Principal component analysis : a review and recent developments. **Philosophical Transactions Royal Society**, v. 374, n. 1–16, 2016.

KALAJI, H. M. et al. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 102, p. 1–11, 2016.

KARLEC, F. et al. Desenvolvimento de tetranychus urticae koch (acari: Tetranychidae) em difrentes cultivares de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 1, 2017.

KAVI KISHOR, P. B.; SREENIVASULU, N. Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? **Plant, Cell and Environment**, v. 37, n. 2, p. 300–311, 2014.

KINOSHITA, T.; SEKI, M. Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 11, p. 1859–1863, 2014.

KOEPKE, T.; DHINGRA, A. Rootstock scion somatogenetic interactions in perennial composite plants. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 9, p. 1321–1337, 2013.

KONICA MINOLTA LTD. **Manual for Chlorophyll Meter SPAD-502**. Osaka, Japan: Konica Minolta Sensing Europe B.V., 2016.

KOZLOWSKI, T. T.; PALLARDY, S. G. **Acclimation and Adaptive Responses of Woody Plants to Environmental Stresses**. [s.l.] The New York Botanical Garden, 2002. v. 68

KRISHNA, H.; SINGH, S. K. Biotechnological advances in mango (*Mangifera indica* L.) and their future implication in crop improvement — A review. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 223–243, maio 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975007000043>>.

LAURIANO, J. A. et al. Mechanisms of energy dissipation in peanut under water stress. **Photosynthetica**, v. 44, n. 3, p. 404–410, 2006.

LAXMAN, R. H.; ANNAPOORNAMMA, C. J.; BIRADAR, G. Mango. In: RAO, N. K. S.; SHIVASHANKARA, K. S.; LAXMAN, R. H. (Ed.). **Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops**. New Delhi: Springer India, 2016. p. 169–181.

LEE, J. M. et al. Current status of vegetable grafting: Diffusion, grafting techniques, automation. **Scientia Horticulturae**, v. 127, n. 2, p. 93–105, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2010.08.003>>.

LI, S. Y. et al. Photosynthesis in reciprocal grafts of drought-tolerant and drought-sensitive cultivars of soybean under water stress. **Photosynthetica**, v. 57, n. 4, p. 942–949, 2019.

LICHTENTHALER, H. K. et al. Chlorophyll fluorescence kinetics, photosynthetic activity, and pigment composition of blue-shade and half-shade leaves as compared to sun and shade leaves of different trees. **Photosynthesis Research**, v. 117, n. 1–3, p. 355–366, 2013.

LIMA, P. R. et al. Avaliação morfofisiológica em mudas de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos durante a rustificação. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 3, p. 316–326, 2014. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2179-80872014000300005&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2179-80872014000300005&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.

LIU, C. C. 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.

LIU, L. et al. Coordination between Stomatal Conductance and Leaf-specific Hydraulic Conductance in Maize (*Zea mays* L.). **Journal of Agricultural Meteorology**, v. 61, n. 3, p. 143–152, 2005.

LONG, S. P.; FARAGE, P. K.; GARCIA, R. L. Measurement of leaf and canopy photosynthetic CO<sub>2</sub> exchange in the field. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 11, p. 1629–1642, 1996. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/47.11.1629>>.

LOSCIALE, P. et al. A multivariate approach for assessing leaf photo- assimilation performance using the IPL index. **Physiologia plantarum**, v. 154, n. 4, p. 609–620, 2015.

LOVE, K. et al. Tropical Fruit Tree Propagation Guide 1. **College of Tropical Agriculture and Human Resources**, n. July, p. 1–10, 2017.

LUVAHA, E.; NETONDO, G. W.; OUMA, G. Physiological responses of mango (*Mangifera indica*) rootstock seedlings to water stress. **Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 2, n. 4, p. 6–12, 2007.

MAKHMALE, S. et al. Impact of climate change on phenology of Mango – The case study. **Ecology, Environment and Conservation**, v. 22, n. October, p. 127–132, 2016.

MARTÍNEZ-BALLESTA, M. C. et al. Physiological aspects of rootstock-scion interactions. **Scientia Horticulturae**, v. 127, n. 2, p. 112–118, 2010.

MASHILO, J. et al. Drought tolerance of selected bottle gourd [ *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.] landraces assessed by leaf gas exchange and photosynthetic efficiency. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 120, p. 75–87, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942817303212>>.

MATA, G. M. S. C. et al. Teores de  $\beta$ -caroteno e vitamina C durante o amadurecimento da manga “UBÁ” ( *Mangifera indica* L . var . Ubá ). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 2, p. 225–229, 2011.

MENEZES-SILVA, P. 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.

MINJA, R. et al. Effects of Rootstock Type and Scion Cultivar on Grafting Success and Growth of Mango (*Mangifera indica* L.) Seedlings. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 16, n. 2, p. 1–9, 2017.

MOHAMMAD, S. U.; CHENG, Q. Recent application of biotechniques for the improvement of mango research. In: **Applied Plant Genomics and Biotechnology**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2015. p. 195–212.

MOLINIER, J. et al. Transgeneration memory of stress in plants. **Nature**, v. 442, n. August, 2006.

MORTON, J. F. Mango. In: MORTON, J. F. (Ed.). **Fruits of warm climates**. [s.l.: s.n.]p. 221–239.

MUNDAY, J. C.; GOVINDJEE. Light-Induced Changes in the Fluorescence Yield of Chlorophyll a In Vivo: III. The Dip and the Peak in the Fluorescence Transient of *Chlorella pyrenoidosa*. **Biophysical Journal**, v. 9, n. 1, p. 1–21, 1969. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(69\)86365-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(69)86365-4)>.

MUNNÉ-BOSCH, S.; ALEGRE, L. Cross-stress tolerance and stress “ memory ” in plants : An integrated view. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 1–2, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.02.002>>.

MURCHIE, E. H.; LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 13, p. 3983–3998, 2013.

NATH, V. et al. Impact of Climate Change on Tropical Fruit Production Systems and its Mitigation Strategies. In: MAHDI, S. S. (Ed.). **Climate Change and Agriculture in India: Impact and Adaptation**. Cham: Springer International Publishing AG, 2019. p. 129–146.

NEVES, D. M. et al. Recurrent water deficit causes alterations in the profile of redox proteins in citrus plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 132, n. July, p. 497–507, 2018.

NIINEMETS, Ü. et al. Responses of foliar photosynthetic electron transport, pigment stoichiometry, and stomatal conductance to interacting environmental factors in a mixed species forest canopy. **Tree Physiology**, v. 19, n. 13, p. 839–852, 1999.

NIKIFOROU, C.; MANETAS, Y. Ecological stress memory: Evidence in two out of seven species through the examination of the relationship between leaf fluctuating asymmetry and photosynthesis. **Ecological Indicators**, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470160X16306410>>.

NIMBOLKAR, P. K. et al. Role of Rootstocks in Fruit Production – A Review Role of Rootstocks in Fruit Production – A Review. **Journal of Agricultural Engineering and Food Technology**, v. 3, n. 3, 2016.

NOWICKA, B. et al. Improving photosynthesis , plant productivity and abiotic stress tolerance – current trends and future perspectives. **Journal of Plant Physiology**, v. 231, n. August, p. 415–433, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.10.022>>.

OLIVEIRA, G. P. et al. Caracterização de acessos de mangueira Ubá na Zona da Mata Mineira. **Ciência Rural**, v. 43, n. 6, p. 962–969, 2013.

PANDEY, P. et al. Biochemical and salt ion uptake responses of seven mango (*Mangifera indica* L.) rootstocks to NaCl stress. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 367–372, 2014.

PAULA, A. et al. Impacto do aquecimento global no zoneamento climático da mangueira para o Estado de Pernambuco. **EMBRAPA-CNPTIA**, p. 40–46, 2010.

PENELLA, C. et al. Grafting pepper onto tolerant rootstocks: An environmental-friendly technique overcome water and salt stress. **Scientia Horticulturae**, v. 226, n. April, p. 33–41, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.020>>.

POMMERENING, A.; GRABARNIK, P. Principles of Relative Growth Analysis. In: **Individual-based Methods in Forest Ecology and Management**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 253–301.

RAO, N. S.; SHIVASHANKARA, K. S.; LAXMAN, R. H. **Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops**. [s.l.: s.n.]

RIBEIRO, I. J. A. et al. Mango wilt. XIV Selection of mango (*Mangifera indica* L.) rootstocks resistant to the mango wilt fungus *Ceratocystis fimbriata*. **Acta Horticulturae**, v. 370, p. 159–166, 1995.

RODRIGUEZ-GAMIR, J. et al. Citrus rootstock responses to water stress. **Scientia Horticulturae**, v. 126, n. 2, p. 95–102, 2010.

ROGERS, W. S.; BEAKBANE, A. B. Stock and Scion Relations. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 8, p. 217–236, 1956.

ROSER, M. Future Population Growth. **Our World in Data**, 2020. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/future-population-growth>>.

SANDERS, G. J.; ARNDT, S. K. Osmotic Adjustment Under Drought Conditions. In: AROCA, R. (Ed.). **Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 199–229.

SCHEFFER, M. et al. Catastrophic shifts in ecosystems. **Nature**, v. 413, n. 6856, p. 591–596, 2001.

SILVA, D. F. P. Da et al. Amadurecimento de manga “Ubá” com etileno e carbureto de cálcio na pós-colheita. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 213–220, 2012.

SIVAK, M. N.; WALKER, D. A. Chlorophyll a fluorescence: can it shed light on fundamental questions in photosynthetic carbon dioxide fixation? **Plant, Cell and Environment**, v. 8, p. 439–448, 1985.

SMITH, M. W.; HOULT, M. D.; BRIGHT, J. D. Rootstock affects yield, yield efficiency, and harvest rate of “Kensington Pride” mango. **HortScience**, v. 38, n. 2, p. 273–276, 2003.

SPREER, W. et al. Yield and fruit development in mango (*Mangifera indica* L. cv. Chok Anan) under different irrigation regimes. **Agricultural Water Management**, v. 96, n. 4, p. 574–584, 2009.

STHAPIT, S. R.; SCHERR, S. J. **Tropical Fruit Tree Species and Climate Change**. [s.l: s.n.]

STIRBET, A. et al. Chlorophyll a fluorescence induction: Can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses? **Photosynthetica**, v. 56, n. X, p. 1–19, 2018.

STIRBET, A.; 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.

STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; GOVINDJEE. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. **Photochemistry and Photobiology**, v. 61, n. 1, p. 32–42, 1995.

STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient. In: PAPAGEORGIU, G. C.; GOVINDJEE (Ed.). **Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2004. p. 321–362.

TATEISHI, K. Grafting Watermelon onto Pumpkin. **Journal of Japanese Horticulture**, v. 39, p. 5–8, 1927.

TIKKANEN, M.; MEKALA, N. R.; ARO, E. M. Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1837, n. 1, p. 210–215, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.001>>.

TOMBESI, S. et al. Effect of water stress “memory” on plant behavior during subsequent drought stress. **Environmental and Experimental Botany**, 2018.

TSIMILLI-MICHAEL, M. Revisiting JIP-test: An educative review on concepts, assumptions, approximations, definitions and terminology. **Photosynthetica**, v. 57, p. 90–107, 2019.

TURNER, N. C. Turgor maintenance by osmotic adjustment, an adaptive mechanism for coping with plant water deficits. **Plant Cell and Environment**, v. 40, n. 1, p. 1–3, 2017.

URBAN, L.; AARROUF, J.; BIDEL, L. P. R. Assessing the Effects of Water Deficit on Photosynthesis Using Parameters Derived from Measurements of Leaf Gas Exchange and of Chlorophyll a Fluorescence. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. December, p. 1–18, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.02068/full>>.

VAN RENSBURG, L. et al. Can screening criteria for drought resistance in *Nicotiana tabacum* L. be derived from the polyphasic rise of the chlorophyll a fluorescence transient (OJIP)? **South African Journal of Botany**, v. 62, n. 6, p. 337–341, 1996.

VIECCELLI, J. C. et al. CHARACTERIZATION OF LEAVES AND FRUITS OF MANGO (*Mangifera indica* L.) CV. IMBU. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, n. 3, 2016. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-29452016000300802&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452016000300802&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.

VILLAR-SALVADOR, P. et al. Effect of water stress conditioning on the water relations, root growth capacity, and the nitrogen and non-structural carbohydrate concentration of *Pinus halepensis* Mill. (Aleppo pine) seedlings. **Annales des Sciences Forestières**, v. 56, n. 6, p. 459–465, 1999.

WALTER, J. et al. Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, n. 1, p. 34–40, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.10.020>>.

WALTER, J. et al. Ecological stress memory and cross stress tolerance in plants in the face of climate extremes. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 3–8, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.02.009>>.

WANG, S. et al. Experience of inundation or drought alters the responses of plants to subsequent water conditions. **Journal of Ecology**, v. 105, n. 1, p. 176–187, 2017.

YAMORI, W.; SHIKANAI, T. Physiological Functions of Cyclic Electron Transport Around Photosystem I in Sustaining Photosynthesis and Plant Growth. **The Annual Review of Plant Biology**, v. 67, p. 81–106, 2016.

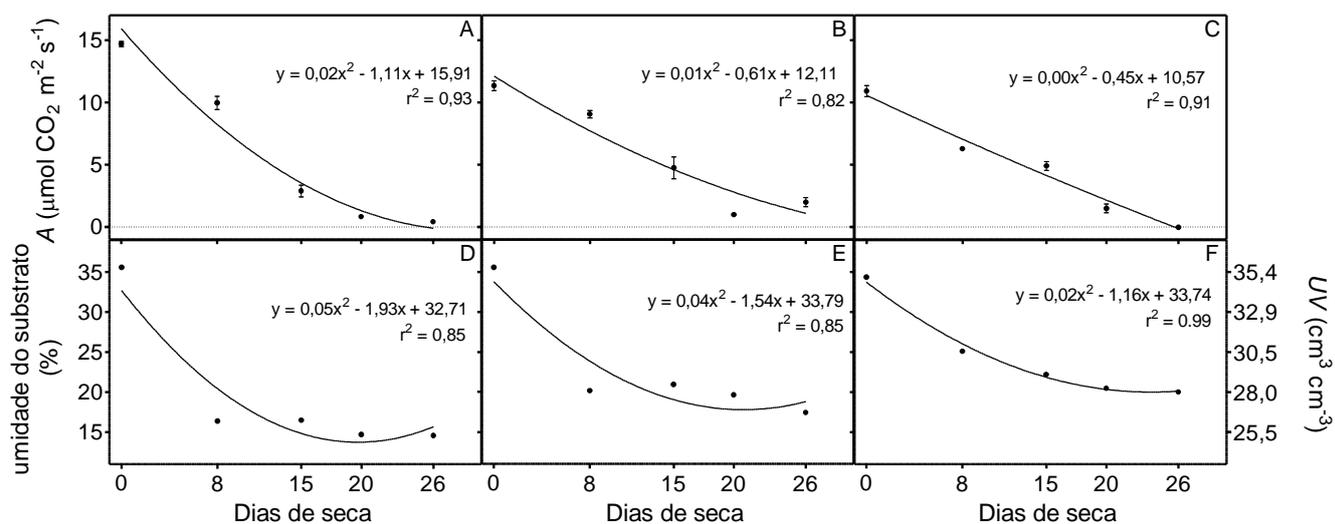
ZAHARAH, S. S.; RAZI, I. M. Growth, stomata aperture, biochemical changes and branch anatomy in mango (*Mangifera indica*) cv. Chokanan in response to root restriction and water stress. **Scientia Horticulturae**, v. 123, n. 1, p. 58–67, 2009.

ZHOU, Y. et al. Chill-induced decrease in capacity of RuBP carboxylation and associated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in cucumber leaves are alleviated by grafting onto figleaf gourd. **Annals of Botany**, v. 100, n. 4, p. 839–848, 2007.

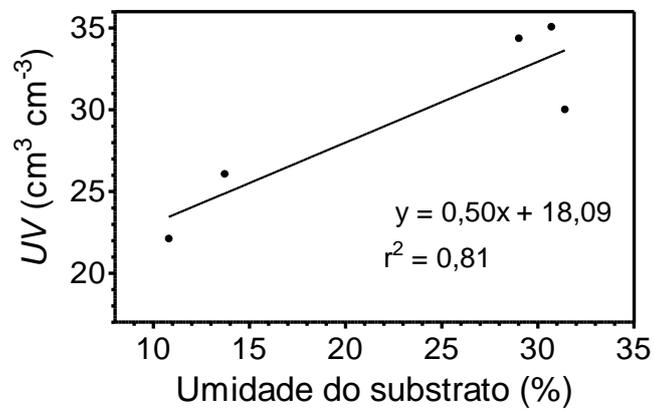
ZUAZO, V. H. D.; RAYA, A. M.; RUIZ, J. A. Impact of salinity on the fruit yield of mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Osteen'). **European Journal of Agronomy**, v. 21, n. 3, p. 323–334, 2004.

## **APÊNDICES**

APÊNDICE A – Relações entre (A, B, C) taxa de fotossíntese líquida ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) com os dias de seca; e (D, E, F) teor de umidade do substrato com os dias de seca; em vasos de combinação UC2/Óleo (A, D), UC2/Ubá (B, E) e UC2/Imbú (C, F). A umidade do substrato foi representada pelo medidor portátil HydroFarm (%) e pelo cálculo da umidade volumétrica (UV) do substrato, ou seja, conteúdo de água ( $\text{cm}^3$ ) por volume total de substrato ( $\text{cm}^3$ ). As barras de erro representam  $\pm$  EP da média ( $n=3$ ).



APÊNDICE B – Relação entre a umidade do substrato calculada por umidade volumétrica ( $UV$ ,  $\text{cm}^3 \text{cm}^{-3}$ ) e medida com o aparelho HydroFarm (%).



APÊNDICE C – Siglas, fórmulas e definições da cinética dos transientes da fluorescência da clorofila *a* utilizados para o cálculo dos parâmetros biofísicos, de acordo com o teste JIP

(continua)

Sigla	Fórmula	Definição
$F_0$	$F_1 = F_{20\mu s}$	Intensidade de fluorescência inicial, quando todos os centros de reação ativos (CR) do fotossistema II (FSII) estão abertos.
$F_2$	$F_{150\mu s}$	Valor da fluorescência em 150 $\mu s$ (pico da banda L)
$F_3$	$F_{300\mu s}$	Valor da fluorescência em 300 $\mu s$ (pico da banda K)
$F_4$	$F_J = F_{2ms}$	Valor da fluorescência em 2 ms (etapa J).
$F_5$	$F_I = F_{30ms}$	Valor de fluorescência em 30 ms (etapa I).
$F_M$	$F_P = \sim F_{550ms}$	Valor máximo sob iluminação saturada (etapa P).
$F_V$	$F_M - F_0$	Fluorescência variável máxima.
$V_J$	$(F_J - F_0)/(F_M - F_0)$	Fluorescência variável relativa na etapa J.
$M_0$	$4 \cdot (F_{300\mu s} - F_0)/(F_M - F_0)$	Valor aproximado da inclinação inicial da curva de fluorescência variável relativa.
$RC/CS_0$	$\phi P_0 \cdot (V_J/M_0) \cdot F_0$ $= (RC/ABS) \cdot (ABS/CS_0)$	Número de CR do FSII por seção transversal (CS) (em $t = 0$ )
$dV/dt_0$	$M_0$	Índice fotoquímico primário calculado pela taxa de fechamento dos CRs.
$ABS/RC$	$M_0 \cdot (1/V_J) \cdot (1/\phi P_0)$	Fluxo de energia absorvida por CR, medido pelo tamanho aparente da antena do FSII.
$TR_0/RC$	$M_0 \cdot (1/V_J)$	Fluxo de energia capturada por CR, levando à redução da quinona A ( $Q_A^-$ ).
$DI_0/RC$	$ABS/RC - TR_0/RC$	Energia total dissipada por CR (em $t = 0$ )
$\phi P_0$	$1 - F_0/F_M = TR_0/ABS$	Rendimento quântico máximo da fotoquímica primária do FSII.

APÊNDICE C – Siglas, fórmulas e definições da cinética dos transientes da fluorescência da clorofila *a* utilizados para o cálculo dos parâmetros biofísicos, de acordo com o teste JIP.

(conclusão)

Sigla	Fórmula	Definição
$\psi E_0$	$1 - V_J = ET_0/TR_0$	Eficiência com a qual um elétron capturado no FSII é transferido de $Q_A$ para $Q_B$ .
$\delta R_0$	$(1 - V_J)/(1 - V_J) = RE_0/ET_0$	Eficiência com a qual um elétron de $Q_B$ é transferido até os receptores finais do fotossistema I (FSI).
$\phi E_0$	$1 - F_J/F_M = ET_0/ABS$	Rendimento quântico para transporte de elétrons
$\phi R_0$	$1 - F_J/F_M = RE_0/ABS$	Rendimento quântico do fluxo de transporte de elétrons até os aceptores finais do FSI.
$PI_{ABS}$	$(RC/ABS) \cdot (\phi P_0/(1 - \phi P_0)) \cdot (\psi E_0/(1 - \psi E_0))$	Índice de desempenho potencial do FSII.
$PI_{TOTAL}$	$PI_{ABS} \cdot (\delta R_0/(1 - \delta R_0))$	Índice de desempenho fotoquímico total, medido pela conservação de energia de fótons absorvidos no FSII até a redução de receptores finais no FSI.
$DF_{ABS}$	$\log(PI_{ABS})$	Força motora do FSII em relação à absorção.
$DF_{TOTAL}$	$\log(PI_{TOTAL})$	Força motora do FSII e FSI em relação à absorção.

Fonte: (STRASSER; TSIMILLI-MICHAEL; SRIVASTAVA, 2004; STIRBET et al., 2018)