



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

**THAÍS ARAUJO DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO CALOR DE  
DIFERENTES ACESSOS DE *JATROPHA CURCAS* L.**

**VITÓRIA  
2016**

**THAÍS ARAUJO DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO CALOR DE  
DIFERENTES ACESSOS DE *JATROPHA CURCAS* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal, Área de Concentração: Fisiologia Vegetal.  
Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Diolina Moura Silva  
Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup> Camilla Zanotti Gallon

**VITÓRIA  
2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

S237a Santos, Thais Araujo dos, 1989-  
Avaliação da tolerância ao calor de diferentes acessos de  
*Jatropha curcas* L. / Thais Araujo dos Santos. – 2016.  
51 f. : il.

Orientador: Diolina Moura Silva.  
Coorientador: Camilla Zanotti Gallon.  
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e  
Naturais.

1. Fluorescência. 2. Óleos vegetais como combustível. 3.  
Pinhão-mansão. 4. Clorofila. I. Silva, Diolina Moura. II. Gallon,  
Camilla Zanotti, 1979-. III. Universidade Federal do Espírito  
Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

---

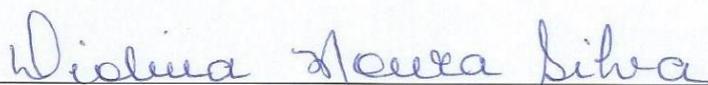
Thais Araújo dos Santos

**“Avaliação da tolerância ao calor de diferentes acessos de pinhão manso”**

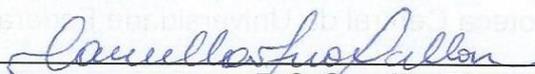
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Vegetal.

Aprovada em 29 de fevereiro de 2016.

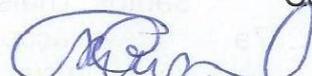
Comissão Examinadora:



**Dr<sup>a</sup>. Diolinda Moura Silva (UFES)**  
Orientadora e Presidente da Comissão



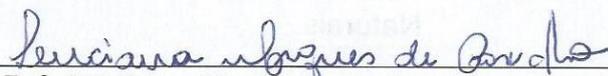
**Dr<sup>a</sup>. Camilla Zanotti Gallon (UFES)**  
Coorientadora



**Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol (UFES)**  
Examinador interno



**Dr<sup>a</sup>. Patrícia Machado Bueno Fernandes (UFES/PPGBIOTEC)**  
Examinadora Externa



**Dr<sup>a</sup>. Luciana Marques de Carvalho (EMBRAPA)**  
Examinadora Externa

Agradeço a Deus pela benção da vida e por nunca me desamparar. Aos meus queridos pais, Henrique e Eliana, a minha irmã, Thatiany, aos demais familiares e amigos pelo apoio nos momentos de ausência, carinho, confiança e por sempre acreditarem na minha capacidade. A vocês dedico este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo, de maneira especial ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV), pela oportunidade e ajuda para a realização deste trabalho, e a Coordenação De Aperfeiçoamento De Pessoal De Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os professores do PPGBV, agradeço pelo companheirismo e dedicação ao ato de ensinar e fazer enxergar novos horizontes. Em especial, à Prof<sup>a</sup> Diolina Moura Silva que acreditou no meu potencial e desde 2010/2 vem me incentivando e servindo de exemplo, tanto profissional quanto pessoal.

Aos queridos colegas do Núcleo de Estudos da Fotossíntese e a Dr.<sup>a</sup> Camilla Gallon (co-orientadora), muito obrigada pela ajuda e companheirismo, não apenas durante o mestrado, mas por toda a caminhada até aqui.

Aos professores Dr. Antônio F. de Souza e Dr. André Assis Pires (IFES, campi Santa Teresa e Itapina, respectivamente), por cederem as plantas dos acessos utilizados neste trabalho.

Ao professor Dr. Paulo Filgueiras (departamento de química, UFES), pela disponibilidade e atenção dispensada na ajuda com a confecção e interpretação dos resultados da análise multiparamétrica utilizada.

À Comissão examinadora agradeço pelas críticas e sugestões que serão uma valiosa contribuição para ajudar a corrigir e melhorar este trabalho.

À funcionária Elizabete Souza Santos (Betinha), obrigada pelas palavras de carinho, pelo apoio, pelo ombro amigo de todas as horas e pelo sorriso de “Bom dia!” sempre iluminado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

*“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seus semelhantes.”*

*Albert Schweitzer*

*“A natureza é o único livro que oferece um conteúdo valioso em todas as suas folhas”.*

*Johann Goethe*

# **Avaliação da tolerância ao calor de diferentes acessos de *Jatropha curcas* L.**

## **RESUMO**

*Jatropha curcas* L. é uma espécie de planta cuja semente produz um óleo relativamente simples de ser convertido em biocombustível. Com o objetivo de avaliar a tolerância às altas temperaturas em nove acessos de pinhão manso cultivados em vasos plásticos na área experimental da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil, foram analisados, durante os meses de fevereiro e junho de 2015, o índice de clorofila e a cinética de indução da fluorescência da clorofila *a*. Os resultados obtidos revelaram que, em fevereiro (mês com temperaturas máximas diárias em torno de 35°C), seis acessos obtiveram os maiores índices de clorofila, enquanto que os outros três acessos apresentaram índices menores. As curvas OJIP da fluorescência transiente da clorofila *a*, apresentaram diferenças marcantes e observou-se pelo Teste JIP que três dos acessos mostraram ineficiência na capacidade de reoxidação da Quinona A reduzida, dois acessos apresentaram uma redução progressiva do acúmulo de plastoquinona; e um acesso apresentou danos no Fotossistema I, com deficiência na redução do "pool" de Plastoquinonas e da Plastocianina nas membranas do tilacóide e da clorofila *a* P<sub>700</sub><sup>+</sup>, durante o verão. Em julho (mês com as maiores alternâncias de temperatura dia/noite - 30/19°C), um acesso apresentou inativação dos complexos de evolução do oxigênio, dois apresentaram desconectividade entre as unidades do Fotossistema II; e três apresentaram danos no lado doador do Fotossistema II, ao nível do pool de plastoquinona. Dentre os nove acessos avaliados, somente um não apresentou inativação em um ou mais passos da curva OJIP da fluorescência transiente da clorofila *a* durante os períodos analisados. A análise do componente principal aplicada aos dados do teste JIP revelou a formação de dois grandes grupos representando a época de coleta dos dados e indicaram que as alterações para distinguir o comportamento dessas plantas em fevereiro e junho ocorrem desde as reações iniciais no Fotossistema II até o final do transporte de elétrons da fase fotoquímica, quando os aceptores finais de elétrons do Fotossistema I são reduzidos. A normalização dos dados obtidos pelo no Teste JIP revelou o índice de

desempenho do FSII ( $PI_{ABS}$ ) como a principal característica alterada em ambos os meses e, principalmente, o parâmetro indicado para identificar os níveis de tolerância às altas temperaturas conjugadas a outros estresses ambientais nos períodos analisados. Esse parâmetro é uma expressão multiparamétrica que combina algumas respostas parciais do aparato fotossintético, pois combina as três propriedades principais que determinam a atividade potencial do Fotossistema II: a densidade de centros de reação ativos, a eficiência das reações fotoquímicas e a capacidade para transferir os elétrons excitados após a redução da Quinona A. Assim, foi possível separar os nove acessos de pinhão manso em relação às condições de alta temperatura: NEF10,19,21 > NEF13,15,16 < NEF12,14,17.

Levando-se em conta o que foi observado, os acessos aqui estudados mostraram divergências nos mecanismos de tolerância ao estresse associados à capacidade de manter o equilíbrio no processo fotoquímico acoplado com as variações diárias. Ao mesmo tempo, sugerem diferenças fisiológicas no aparato fotossintético em uma mesma espécie e que necessitam de novas investigações.

Palavras-chave: Pinhão manso, fluorescência da clorofila a, estresse por calor, estresse abiótico, PCA, etapa fotoquímica, Teste JIP, biocombustível.

## **Evaluation of the heat tolerance on different access of *Jatropha curcas* L.**

### **ABSTRACT**

*Jatropha curcas* L. is a plant species whose seed produces a relatively simple oil to be converted into biofuel. The tolerance to high temperatures was analyzed in nine physic nut accessions grown in plastic pots in the experimental area of the Espírito Santo University, Brazil. The chlorophyll content and chlorophyll *a* fluorescence induction kinetics were analyzed during the months of February and June/2015. It was observed in February (month with daily maximum temperatures around 35 °C), six of nine accessions had the highest chlorophyll levels. The OJIP curves of transient fluorescence of chlorophyll *a* demonstrated that three accessions had a inefficiency in the reoxidation capacity of quinone A reduced, and two accessions showed a progressive reduction of plastoquinone accumulated; and one access presented damage in photosystem I, with incapacities in reducing the "pool" of plastoquinone and plastocyanin in thylakoid membranes and  $P_{700}^+$  chlorophyll *a* during the summer. In July, month with the highest changes on day/night temperature (30 / 19 °C), one access presented inactivation of the oxygen evolution complex, two presented disconnection between the units of photosystem II; and three presented damage in the photosystem II, donor side, at the plastoquinone pool. Among the nine accessions, only one showed no inactivation of one or more steps of the transient curve OJIP chlorophyll fluorescence during the periods analyzed. The principal component analysis applied to JIP Test data showed the formation of two groups representing the data collection period indicating the changes to distinguish the behavior of these plants in February and June have occurred since the initial reactions in Photosystem II to the end of the electron transport of photochemical stage when the final electron acceptors of photosystem I is reduced. The normalization of the data obtained by the JIP test showed the performance index of PSII (PIABS) as the main parameter to identify the tolerance levels to the high temperature combined to other environmental stresses. This parameter is a multiparameter expression that combines some partial responses of the photosynthetic apparatus, including the three key properties that determine the

potential activity of Photosystem II: the density of active reaction centers, the efficiency of photochemical reactions and the ability to transfer the electron excited after reducing the Quinone A. Thus, it was possible to classify the nine physic nut accessions in relation to the tolerance for high temperature conditions: NEF10,19,21 > NEF13,15,16 < NEF12,14,17.

Considering the results presented it was possible to verify that the access analysed have differences in the mechanisms to deal with stress associated with the ability to maintain the photochemical process balance combined with daily temperature variations. At the same time, we agree that is needed further investigation of the physiological differences in the photosynthetic apparatus of *Jatropha curcas*.

Keywords: Physic nut, chlorophyll a fluorescence, heat stress, abiotic stress, PCA, photochemical step, JIP Test, biofuel.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	DO PETRÓLEO À DEMANDA POR BIOCOMBUSTÍVEIS.....	12
1.2	O PINHÃO MANSO: POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL.....	13
1.3	ESTRESSE POR ALTAS TEMPERATURAS.....	15
1.4	A FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA <i>a</i> .....	16
2.	OBJETIVOS.....	20
2.1	OBJETIVO GERAL .....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3.	MATERIAL E MÉTODOS .....	21
3.1	MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	21
3.2	CINÉTICA DE EMISSÃO DA FLUORESCÊNCIA TRANSIENTE (OJIP).....	23
3.3	TEOR RELATIVO DE CLOROFILA .....	26
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
	<b>3.4.1 Análise Do Componente Principal (PCA)</b> .....	26
4.	RESULTADOS .....	28
5.	DISCUSSÃO .....	39
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	46
7.	REFERÊNCIAS .....	47

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 DO PETRÓLEO À DEMANDA POR BIOCOMBÚSTIVEIS

As primeiras indústrias de refinamento do petróleo iniciaram suas atividades em meados do século XIX, aproximadamente 1850, desde então vários produtos surgiram como derivados e passaram a fazer parte do cotidiano das pessoas em todo o mundo. Dentre esses derivados podemos destacar plásticos, lubrificantes, pesticidas, fertilizantes, produtos de limpeza, cosméticos, asfalto e, principalmente, os combustíveis, tais como a gasolina, o óleo diesel, o GLP (gás liquefeito do petróleo) e o querosene que passaram a ser amplamente utilizados em indústrias e automóveis.

Assim, o comércio do petróleo cresceu e se consolidou no decorrer de várias décadas, até que nos anos de 1970 surgiu a notícia de que este recurso não é renovável e, portanto, devido a grande demanda, pode se esgotar em pouco tempo. Essa notícia desencadeou a chamada “grande crise do petróleo”, fazendo com que o preço dos combustíveis derivados dessa fonte sofresse flutuações, tornando-se inconstante e desfavorecendo a comercialização.

Unindo ao fato do eminente esgotamento do petróleo, pesquisadores e grupos ambientalistas passaram a exercer pressão sobre vários setores político-sociais devido à poluição gerada pelo uso indiscriminado dos combustíveis não renováveis, principalmente sobre a emissão de gases que favorecem o efeito estufa e a desintegração da camada de ozônio. Por isso, vários países começaram a financiar projetos para a descoberta de fontes renováveis de energia, os chamados biocombustíveis, provenientes de gorduras, óleos e outros produtos animais e vegetais.

Em consonância, no Brasil em 2004 foi criado o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), que incentiva, normaliza e legaliza o uso de biocombustíveis misturados aos combustíveis tradicionais, tendo como meta o aumento gradativo da quantidade de combustível renovável ao longo dos anos.

A obrigatoriedade de 5% de biodiesel no diesel de petróleo legalizada em 2010 aumentou para 7% em 2014 e, no ano de 2015, foi concedida a permissão de adição

de 20% a 30% de biocombustíveis a alguns consumidores para uso, por exemplo, em máquinas agrícolas.

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor e consumidor mundial de biocombustíveis, ficando atrás apenas dos EUA. O país tem investido em tecnologias e incentivando a produção da matéria prima em cooperativas familiares, o que favorece a agricultura familiar. Até o momento, porém, a principal matéria prima do biodiesel brasileiro é o óleo de soja, proveniente das regiões centro-oeste e sul, onde estão concentrados os maiores produtores. Contudo, um desafio que se espera alcançar é o aumento do cultivo de plantas oleaginosas não alimentícias em terras marginais inapropriadas para a agricultura.

## 1.2 O PINHÃO MANSO: POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE BIOCMBUSTÍVEL

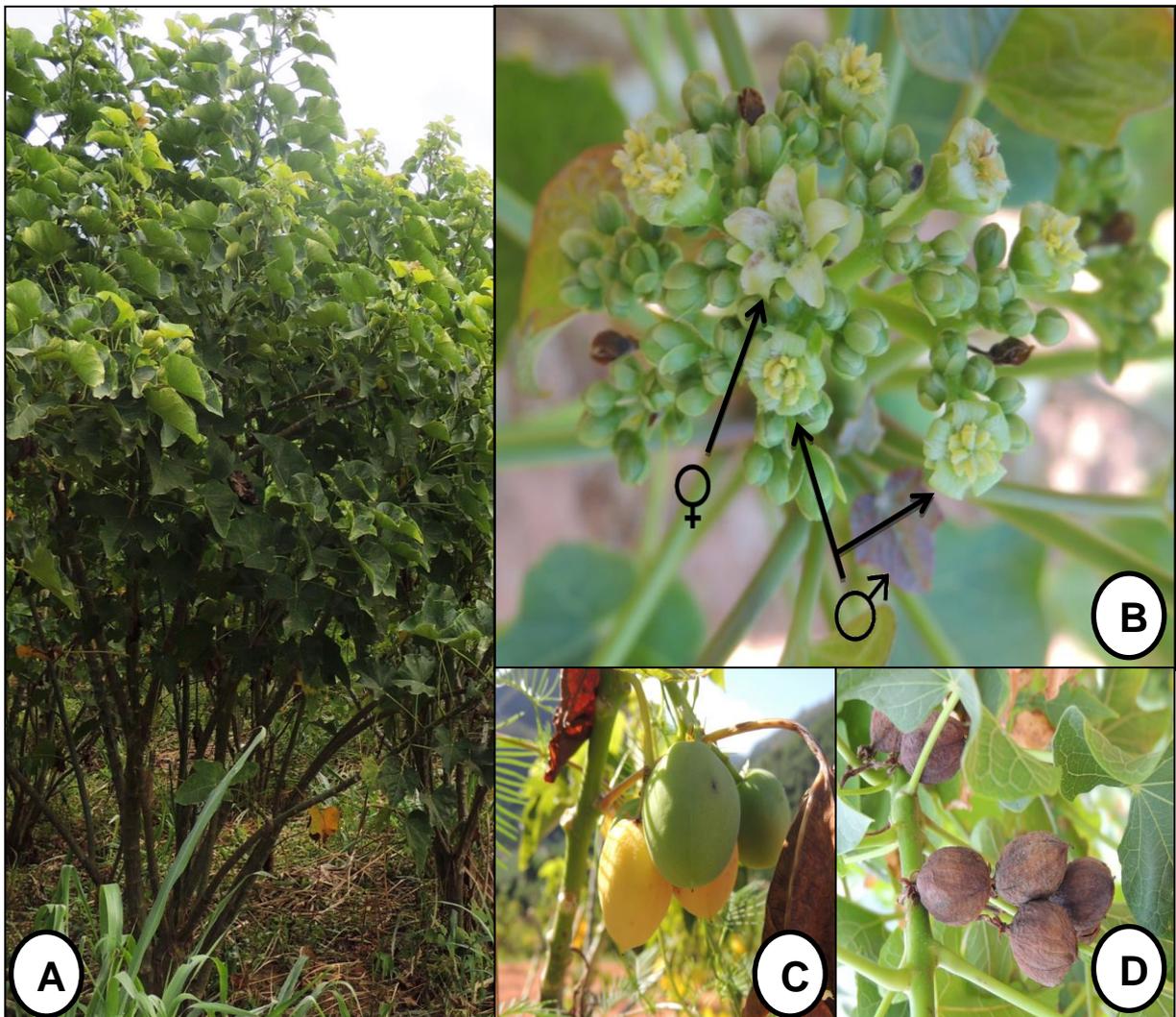
As pesquisas na área agrícola, dentro do PNPB, têm como objetivo domesticar espécies oleaginosas promissoras a fim de aumentar a produção de óleo por hectare, utilizando técnicas de seleção e melhoramento genético (SANTOS, 2008).

Das espécies conhecidas, produtoras de biocombustíveis, tais como o girassol, a mamona, a soja e o dendê, o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) destaca-se por produzir um óleo de simples conversão a biodiesel, a partir de produtos químicos ou por reações biológicas de transesterificação. Seu óleo bruto atende aos padrões de qualidade para uso dos combustíveis no Brasil, EUA e Europa (BHERING et al., 2013).

O pinhão manso é uma espécie da família Euphorbiaceae, originária do continente Americano, cujo cultivo vem sendo disseminado em diversas regiões do globo, predominantemente em regiões tropicais (ANDRADE, 2007). É um arbusto de crescimento rápido, caducifólio, que pode atingir mais de 5 m de altura (Figura 1A). Possui floração monóica, ou seja, suas inflorescências possuem flores masculinas e femininas (Figura 1B), e ocasionalmente flores hermafroditas também podem ser observadas. As flores são pediceladas, e dispostas em círculos concêntricos, com uma única flor feminina em posição central, circundada pelas masculinas (LUCENA et al., 2014). Os frutos são do tipo cápsula ovóide, com 1,5 a 3,0 cm de diâmetro, trilobular, contendo uma semente por lóculo (Figuras 1C e 1D). As sementes medem

de 1,5 a 2,0 cm de comprimento e 1,0 a 1,3 cm de largura, representando entre 53% a 79% do peso do fruto e apresentam teor de óleo variando entre 33% e 38 % (DIAS et al., 2007).

Esta espécie desenvolve-se sob condições climáticas diversas, sendo favorecida em regiões tropicais onde a precipitação anual esteja acima de 944 mm/ano (FINI et al., 2013) e a temperatura entre 18°C e 28,5°C (DALLACORT et al., 2010). Sua adoção como uma cultura potencial para atender ao PNPB, deve-se, principalmente, ao potencial de rendimento de óleo, por ser uma espécie não alimentar e seu manejo ser compatível com o perfil da agricultura familiar (LAVIOLA et al., 2011).



**Figura 1.** Plantas de *Jatropha curcas* L. cultivadas no campo experimental do Instituto Federal do Espírito Santo, *campus* Santa Teresa. A – Vista geral da planta; B – Inflorescência; C – Frutos verdes e amarelos; D – Frutos marrons, secos. Fonte: arquivo pessoal.

Devido à rusticidade, adaptabilidade a vários ambientes e a qualidade do óleo, esta planta, além de ter potencial como fonte de biodiesel, também pode ser empregada na recuperação de áreas degradadas (ANDRADE, 2007). Porém, os genótipos utilizados nos plantios são geneticamente desconhecidos, não existindo ainda cultivares melhoradas, sobre as quais se tenha informações e garantias do potencial de produção nas diversas regiões produtoras (LAVIOLA et al., 2011). Caracteres morfológicos (como, por exemplo, altura da planta desenvolvida, número de ramos totais, peso da semente, diâmetro do caule, projeção da copa), teores de óleo e outros componentes químicos variam consideravelmente entre acessos de diferentes procedências (DRUMOND et. al., 2010). A variabilidade desses constituintes é muito importante para as pesquisas de melhoramento vegetal direcionadas para a exploração econômica da espécie.

### 1.3 ESTRESSE POR ALTAS TEMPERATURAS

Em regiões tropicais, as altas temperaturas, sejam transitórias ou constantes, podem influenciar o desenvolvimento das plantas devido aos efeitos deletérios em processos vitais (SIMÕES-ARAÚJO et al., 2003), causando mudanças fisiológicas, bioquímicas e moleculares que afetam negativamente a fotossíntese, o crescimento e a produtividade.

O estresse térmico, por excesso de calor, ocorre quando a temperatura atinge um valor acima do ponto ótimo suportado durante um período de tempo suficiente para causar danos irreversíveis à planta. Portanto, o estresse térmico depende da intensidade, da duração e da taxa de incremento da temperatura, e os efeitos também variam de acordo com os períodos do dia (MARTINEZ et al., 2015).

Um dos principais processos fisiológicos afetados pelo estresse por altas temperaturas é a fotossíntese, devido à instabilidade térmica da enzima ribulose - 1,5 - bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) ativase (SHARMA et. al., 2014) e pela inibição do transporte de elétrons no fotossistema II (FSII) (MATHUR et al. 2011). O mecanismo de reparação de FSII é danificado devido à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que resulta na redução da fixação de carbono (SHARMA et al., 2012).

A tolerância de plantas a condições estressantes pode ser atribuída ao grau de adaptação dessas plantas as condições ambientais dos locais de cultivo. Cultivares e acessos introduzidos em determinada região, muitas vezes não se adaptam às novas condições ambientais e podem tornar-se mais sensíveis a fatores abióticos no novo ambiente do que uma planta, da mesma espécie, nativa daquele meio. Porém, cultivares desenvolvidas para determinado ambiente, além de atributos que são importantes para a adaptação, apresentam melhora no metabolismo primário (por exemplo, fotossíntese) através da recombinação e seleção de genes para eliminar os alelos que provocam a má adaptação (HWA E YANG, 2008).

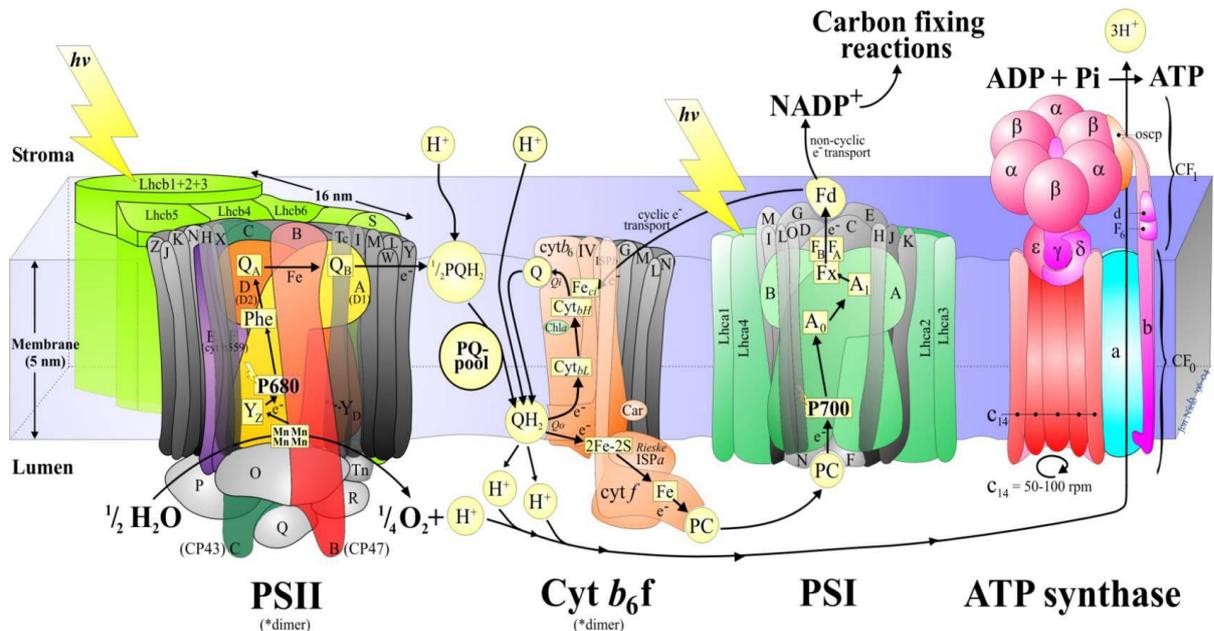
Embora os genes para o metabolismo primário devam ser geralmente benéficos na maioria dos ambientes, os genes para adaptação local não são. A fenotipagem em larga escala para a tolerância ao estresse é complicada por envolver cultivares e acessos com crescimento em diferentes regimes, ou seja, plantas que não estão adaptadas ao ambiente no qual são introduzidas podem ter um bom funcionamento do metabolismo primário (SHARMA et al., 2012).

#### 1.4 A FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a*

Em organismos que realizam a fotossíntese, a energia luminosa é absorvida pelos complexos coletores de luz, chamados de complexos antena, que formam uma complexa rede de pigmentos incorporados a proteínas (fotossistema). Dentro do fotossistema II (FSII), a energia de excitação do complexo antena é eficientemente transferido de um centro de reação ativo (CR; ou seja, com quinona A (Q<sub>A</sub>) oxidada), onde tem início a fase fotoquímica, levando a hidrólise da água, e redução de plastoquinonas (PQ-pool). Uma pequena parte da energia de excitação desse sistema é dissipada na forma de fluorescência e calor (STIRBET, 2014).

Todos os componentes a cadeia de elétrons fotossintéticos (Figura 2), e particularmente os fotossistemas II (FSII), são muito sensíveis aos estresses bióticos e abióticos, e sofrem contínuas mudanças estruturais e conformacionais, para manter a sua função em patamares ótimos em um ambiente em constante alteração (ZHANG et al., 2010; YUSUF et. al, 2010).

Por isso, a fluorescência transiente da clorofila *a* é considerada uma ferramenta rápida e não destrutiva na detecção e quantificação de danos no aparelho fotossintético. Essa técnica está, principalmente, relacionada às funções e atividades dos fotossistemas, frequentemente alteradas em condições de estresse ambiental (MATHUR et al., 2013).



**Figura 2.** Modelo esquemático da cadeia de transporte de elétrons. Abreviaturas: PSII, fotossistema II; YZ, tirosina Z; P680, molécula de clorofila do centro de reação do fotossistema II; Phe, feofitina; QA, quinona A; QB, quinona B; PQH<sub>2</sub>, plastoquinol; PQ, plastoquinona; Cyt b<sub>6</sub>f, complexo de citocromo composto por unidades B6 e ferro; PSI, fotossistema I; PC, plastocianina; P700, molécula de clorofila no centro de reação do fotossistema I; A<sub>0</sub>, molécula de clorofila; A<sub>1</sub>, molécula de filoquinona; FX, FB, FA, proteínas sulfurosas e metais ferrosos; Fd, ferredoxina (TÓTH, 2006).

Várias pesquisas demonstraram a capacidade deste método para detectar alterações na etapa fotoquímica decorrentes de fatores genéticos ou ambientais como, por exemplo, mutações e status nutricional (KALAJI et al, 2014), estresse luminoso (KALAJI et al., 2012), influências químicas (XIANG et al, 2013), calor (CHEN et al., 2016), frio (PERBONI et al., 2015), seca (OUKARROUM et al, 2009) metal pesado ou estresse salino (DEMETRIOU et al., 2007; LI E ZHANG, 2015). Galazzi (2011) encontrou diferenças marcantes nas taxas de crescimento, índice de clorofila, assimilação de CO<sub>2</sub>, eficiência e rendimento quântico da etapa fotoquímica

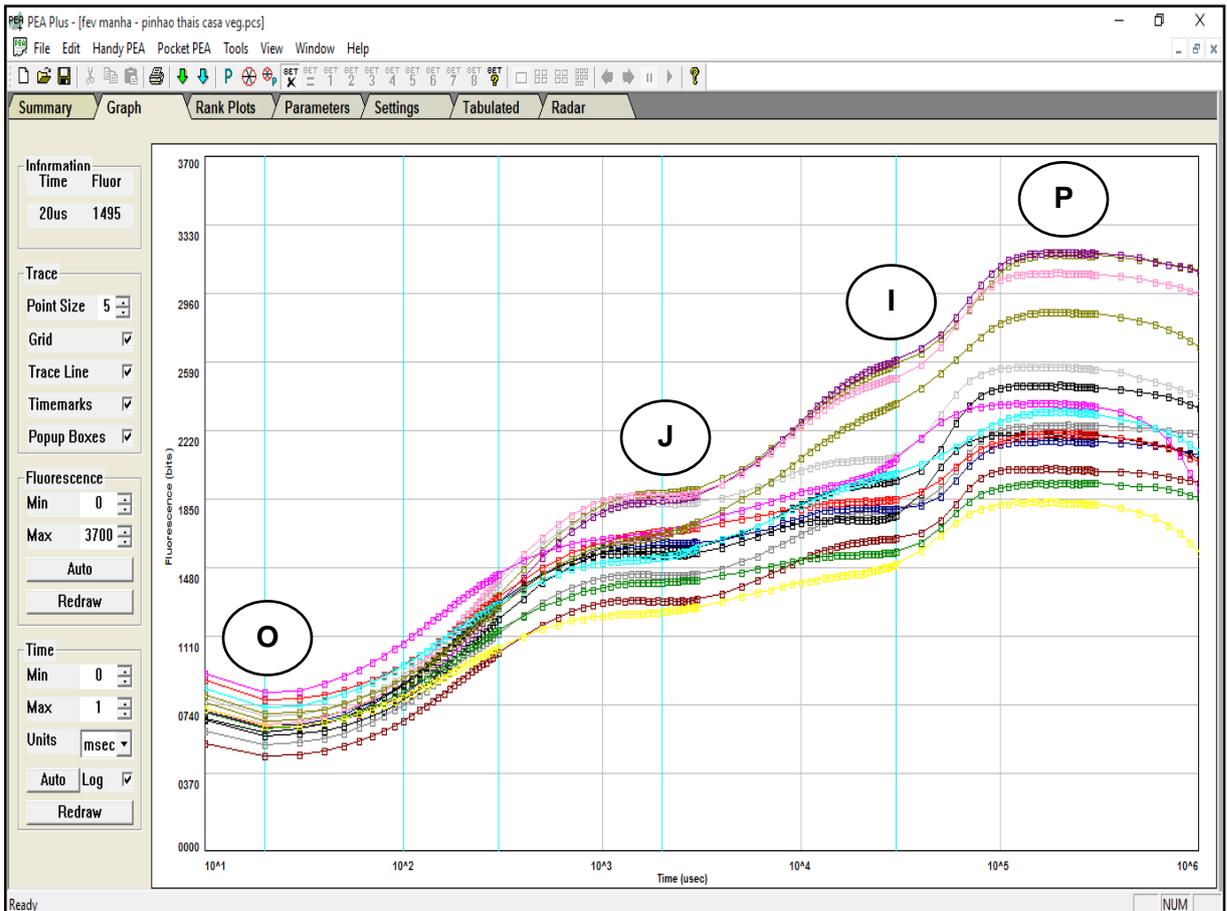
e eficiência do uso da água entre as plantas de *Jatropha curcas* L. cultivadas no litoral e no interior do estado do Espírito Santo, Brasil.

O aumento típico da curva de fluorescência transiente da clorofila *a* (Figura 3) mostra uma sequência de fases a partir do ponto inicial (Fluorescência Inicial = F0) até o máximo (Fluorescência Máxima = FM), que conhecidos como Passo O [ocorre aos 20 ms e considerado como quando todos os centros de reação (CR) estão abertos], Passo J (~ 2 ms), Passo I (~ 30 ms) e Passo P (igual a FM, considerado quando todos os CR estão fechados) (STRASSER E STRASSER, 1995).

Além destes passos, outros também aparecem em certas condições, como é o caso do Passo L (que reflete a conectividade energética das unidades do FSII), o Passo K (que esta relacionado a desativação do complexo de evolução do oxigênio - CEO), Passo G, relacionado à redução do pool de plastoquinona (PQ) (STRASSER E STRASSER, 1995, STRASSER et al., 2004; MORALES-FLORES et al.; 2013).

As alterações na forma da curva de fluorescência OJIP em diferentes situações ambientais são altamente dependentes das condições fisiológicas. Assim, para analisar a curva OJIP foi desenvolvido o teste JIP que traduz as mudanças dessas curvas em parâmetros que permitem análise quantitativa da estrutura e da conformação do aparato fotossintético (STRASSER et al, 2004, STIRBET E GOVINDJEE, 2011). Por fornecer excelentes informações da “vitalidade” das plantas *in vivo*, o Teste JIP tem sido muito usado para validar os efeitos dos estresses ambientais no processo fotossintético (CHEN et al 2016, e os demais citados neste item).

Com base nessas informações, este trabalho foi baseado na hipótese de que diferentes acessos de pinhão manso podem apresentar diferentes mecanismos de tolerância à variação de temperatura. Para sua comprovação foram utilizados nove acessos de *Jatropha curcas* L. cultivados sob alta temperatura e usando a cinética da indução da fluorescência da clorofila *a* como ferramenta para avaliar possíveis os danos no aparelho fotossintético. Além disso, também foi testado se os dados de fluorescência da clorofila *a* podem ser utilizados para distinguir os nove acessos de pinhão manso, por meio da análise de componentes principais (PCA).



**Figura 3.** Exemplo de curvas de fluorescência transiente da clorofila a mostrando uma sequência de fases a partir do ponto inicial ( $F_0$ ) até o ponto máximo ( $F_P$ ). Passo O, 20 ms. Passo J, ~ 2 ms. Passo I, ~ 30 ms. Passo P, ~300 ms. Fonte: arquivo pessoal.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a tolerância a altas temperaturas em nove acessos de pinhão manso usando como ferramenta a fluorescência transiente da clorofila *a*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os diferentes parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a* em nove acessos de pinhão manso cultivados nas mesmas condições ambientais;
- Identificar as alterações provocadas pela temperatura ambiental no desempenho fotoquímico de nove acessos de *Jatropha curcas* L. por meio do Teste JIP;
- Testar a heterogeneidade dos parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a* em nove acessos de pinhão manso cultivados nas mesmas condições ambientais usando análise de componentes principais;
- Identificar os acessos mais tolerantes aos efeitos da temperatura em condições ambientais.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Clones de dezessete acessos de *Jatropha curcas* L. (Tabela 1) foram obtidos por meio de estaquia em dez/2014, a partir de matrizes dos campos experimentais do Instituto Federal do Espírito Santo, *campi* Itapina (coordenadas geográficas: 19° 32' 22" de latitude Sul; 40° 37' 50" de longitude Oeste) e Santa Teresa (coordenadas geográficas: 19°47'57.8492" de latitude Sul; 40°40' 24.6768" de longitude Oeste). Cada acesso recebeu a sigla do Núcleo de Estudos da Fotossíntese (NEF) seguido de um número para facilitar a identificação durante o experimento.

**Tabela 1.** Identificação dos acessos utilizados neste trabalho e local de origem das estacas obtidas de plantas matrizes.

	<b>Acesso</b>	<b>Origem</b>
NEF06	CAP TSA 1501	IFES-STeresa
NEF07	CAP TSA C2/10	IFES-STeresa
NEF08	JANAUBA	IFES-STeresa
NEF09	IFT 07	IFES-Itapina
NEF10	IFT 06	IFES-Itapina
NEF11	IFT 05	IFES-Itapina
NEF12	IFT 01	IFES-Itapina
NEF13	IFT 02	IFES-Itapina
NEF14	IFT 03	IFES-Itapina
NEF15	IFT 04	IFES-Itapina
NEF16	INC 01	IFES-Itapina
NEF17	INC 02	IFES-Itapina
NEF18	INC 03	IFES-Itapina
NEF19	JFT	IFES-Itapina
NEF20	NOV /01	IFES-Itapina
NEF21	PRT	IFES-Itapina
NEF22	RPB	IFES-Itapina

As estacas foram plantadas em vasos com capacidade de 12L (Figura 4), com substrato constituído de terra e areia (2:1), na área experimental da Universidade Federal do Espírito Santo, *campus* Goiabeiras, situado no município de Vitória-ES (Lat. 20°16'S, Lon. 40°18'W).

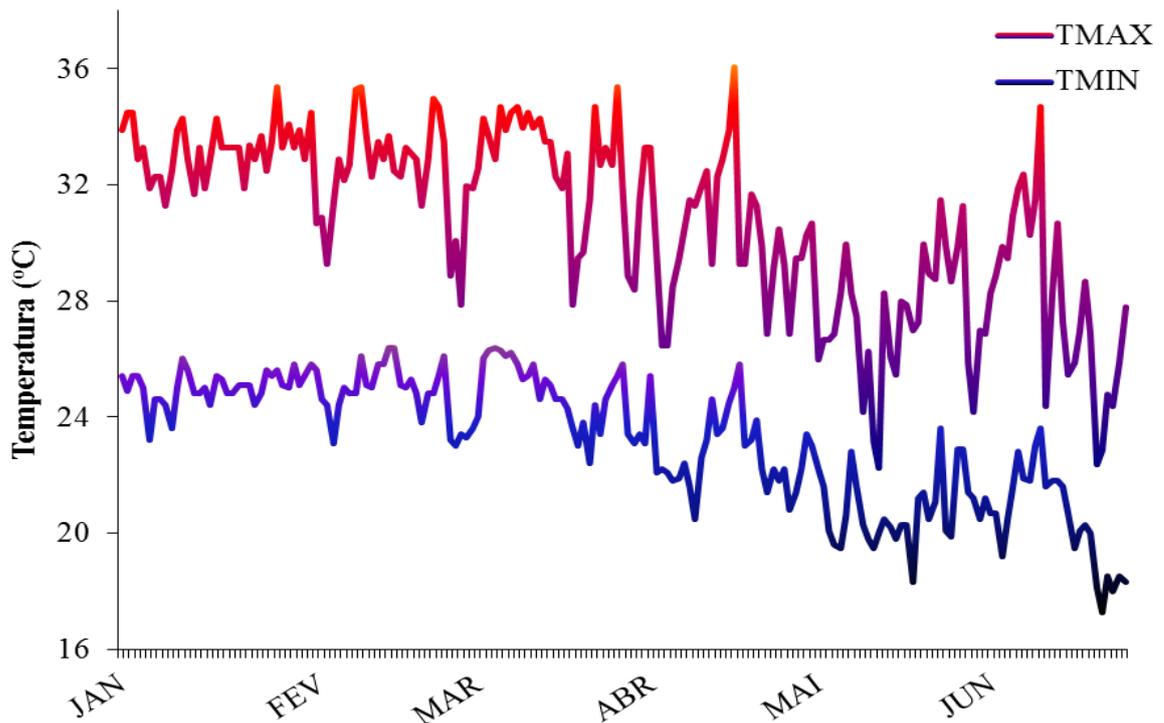
A disponibilidade de umidade foi obtida por meio de irrigação automática, duas vezes ao dia (às 5h30min da manhã e às 18h00min da tarde), com uma vazão de água de  $04 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$  durante 4 minutos, tempo suficiente para atingir a capacidade de campo dos vasos. Nos dois primeiros meses, para suprir a demanda nutricional das plantas, foram fornecidos 50 mL de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950)  $\frac{1}{2}$  força iônica, em intervalo de 15 dias.



**Figura 4.** (A) Vista geral da disposição das plantas de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) cultivadas na Área Experimental do Setor de Botânica, campus Goiabeiras, da Universidade Federal do Espírito Santo, em Vitória, ES. (B) Vaso com planta de pinhão manso mostrando o bico de irrigação.

O volume e a frequência de irrigação não variaram entre os meses em que ocorreram as coletas de dados, fevereiro e junho de 2015. Os vasos permaneceram a céu aberto durante todo o experimento.

Os dados da temperatura ambiente (Figura 5) foram obtidos diretamente do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) e do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência técnica e Extensão rural (INCAPER; Setor de Meteorologia), e correspondem aos registros da estação meteorológica OMM:83648, localizada no município de Vitória-ES (Latitude:  $20,31^{\circ}\text{S}$ ; Longitude:  $40,31^{\circ}\text{W}$ ; Altitude: 36.20 m), durante o período de cultivo e avaliação das plantas.



**Figura 5.** Temperatura máxima ( $T_{MAX}$ ) e mínima ( $T_{MÍN}$ ) nos meses de jan a junho de 2015, em Vitória, durante cultivo de pinhão manso na área experimental do Setor de Botânica da UFES, *campus* Goiabeiras, em Vitória. Estação meteorológica OMM:83648 (Latitude: 20,31°S; Longitude: 40,31°W; Altitude: 36.20 m). FONTE: INMET e INCAPER.

Entre os clones dos dezessete acessos obtidos, apenas nove foram selecionados e utilizados no experimento (NEF 10, NEF 12, NEF 13, NEF 14, NEF 15, NEF 16, NEF 17, NEF 19, NEF 21) por apresentarem bom desenvolvimento, com quantidade e tamanho de folhas satisfatórios no período da primeira medição. Os outros acessos tiveram um desenvolvimento mais lento, com início do aparecimento de folhas, aproximadamente, três meses após o plantio.

### 3.2 CINÉTICA DE EMISSÃO DA FLUORESCÊNCIA TRANSIENTE (OJIP)

Os dados de emissão da fluorescência da clorofila *a* foram determinados entre 07h00min – 09h00min da manhã, em duas folhas jovens totalmente expandidas. A medição foi feita após pré-adaptação da região a ser medida ao escuro, por 40min, período suficiente para a oxidação completa do sistema fotossintético de transporte

de elétrons, utilizando um fluorômetro portátil (Handy Pea, Hansatech Instruments Ltd., UK). Logo após, as folhas foram submetidas a um flash de luz saturante. Os resultados da cinética da fluorescência transiente foram, posteriormente, tabulados em uma planilha eletrônica com o software PEA Plus v1.10.

Para normalizar as curvas OJIP foram usados os passos O ( $F_0 = 0,02\text{ms}$ ) e P (fluorescência máxima expressa por cada acesso,  $F_M = \sim 300\text{ms}$ ), possibilitando uma base de comparação entre as diferentes curvas. Estas curvas foram expressas como a fluorescência variável relativa [ $W_{OP} = (F_T - F_0)/(F_M - F_0)$ ]. A média geral dos nove acessos foi utilizada como controle (= 0).

Ao calcular a diferença cinética entre as curvas normalizadas da fluorescência relativa da clorofila a [ $W_{OP\text{tratamento}} - W_{OP\text{controle}}$ ], evidenciou-se curvas acima (positivas) e abaixo (negativas) da média geral. As curvas positivas indicaram que houve perda (emissão) de energia sob a forma de fluorescência.

Para possibilitar a visualização da banda-L ( $\sim 0,15\text{ ms}$ ), a fluorescência relativa variável foi normalizada entre os passos O e K ( $0,3\text{ms}$ ) ( $W_{OK} = [F_T - F_0]/[F_K - F_0]$ ) e a diferença cinética foi demonstrada por meio da equação ( $\Delta W_{OK} = [W_{OK}(\text{verão}) - W_{OK}(\text{controle})]$ ). A banda-K ( $\sim 0,3\text{ ms}$ ) foi visualizada quando realizada a diferença cinética entre a fluorescência variável nos passos O e J ( $2\text{ms}$ ) ( $W_{OJ} = [F_T - F_0]/[F_J - F_0]$ ) e a diferença cinética ( $\Delta W_{OJ} = [W_{OJ}(\text{verão}) - W_{OJ}(\text{inverno})]$ ). Para análise da fase I ( $30\text{ms}$ ) e P, os dados foram normalizados como [ $W_{IP} = (F_T - F_I)/(F_P - F_I)$ ]. A banda G ( $\sim 100\text{ms}$ ) pode ser demonstrada com a equação  $\Delta W_{IP} = [W_{IP}(\text{verão}) - W_{IP}(\text{controle})]$  (MORALES-FLORES et al., 2013 ; PERBONI et al., 2015).

Os transientes OJIP foram também convertidos para parâmetros biofísicos, com base na Teoria de Fluxo de Energia em Biomembranas (STRASSER et al., 2004) e selecionados para demonstrar o transporte de elétrons na etapa fotoquímica da fotossíntese conforme Yusuf et al. (2010) e Chen et al. (2016).

**Tabela 2.** Descrição dos parâmetros do teste JIP com base em Yusuf et al. (2010) e Chen et al. (2016).

Parâmetros da fluorescência	Descrição
$F_0 = F_{20\mu s}$	Fluorescência inicial (quando todos os centros de reações do FSII estão abertos)
$F_M = F_P$	Fluorescência máxima (quando todos os centros de reações do FSII estão fechados)
$Tf_{max}$	Tempo (em ms) para atingir a intensidade máxima de $F_M$ .
$F_V = F_M - F_0$	Fluorescência variável
$V_J = (F_J - F_0)/(F_M - F_0)$	Fluorescência variável em relação à fase J
$V_I = (F_I - F_0)/(F_M - F_0)$	Fluorescência variável em relação à fase I
$\phi P_0 = TR_0/ABS = F_V/F_M$	Rendimento quântico máximo fotoquímico do FSII ( $t=0$ )
$\phi E_0 = ET_0/ABS$	Rendimento quântico do transporte de elétrons de $QA^-$ para os aceptores de elétrons do intersistema
$\delta R_0 = RE_0/ET_0$	Eficiência com que um elétron pode se mover desde os aceptores de elétrons do intersistema até os aceptores finais do FSI
$\Psi E_0 = ET_0/TR_0 = 1 - V_J$	Probabilidade (no tempo 0) que um éxciton capturado tem em mover um elétron na cadeia de transporte de elétrons de $QA^-$ para $QB$
$\phi R_0 = RE_0/ABS$	Rendimento quântico de redução dos aceptores finais de elétrons do FSI por fótons absorvidos.
$ABS/RC = (dV/dt_0/V_J) \times (1/\phi P_0)$	Fluxo de energia absorvida por RC ativo ou tamanho aparente da antena de um centro de reação ativo do FSII
$DI_0/RC = [dV/dt_0/V_J] \times [1/(F_0/F_M)]$	Fluxo de energia dissipada por RC ativo
$ET_0/CS_0 = \phi P_0 \cdot \Psi_0 \cdot (ABS/CS)$	Fluxo de transporte de elétrons de $QA^-$ para $QB$ por CS
$RE_0/CS_0 = (RE_0/ET_0) \cdot (ET_0/CS_0)$	Fluxo decaptação de energia (levando à redução de $QA$ ) por RC em $t=0$
$RE_0/RC = (RE_0/ET_0) \cdot (ET_0/RC)$	Fluxo de elétrons, por centro de reação, capaz de reduzir os aceptores finais de elétrons no lado acceptor do FSI
$dVG/dt_0$	Expressa a transferência de energia de excitação entre os RCs
$dV/dt_0$	Expressa a taxa de RCs fechados
$\gamma RC/(1 - \gamma RC) = RC/ABS$	Densidade de centros de reação ativos por absorção de clorofila
$\phi D_0 = 1 - \phi P_0 = F_0/F_M$	Rendimento quântico da energia dissipada
$PI_{ABS} = (RC/ABS) \times (\phi P_0/(1 - \phi P_0)) \times (\Psi E_0/(1 - \Psi E_0))$	Índice de desempenho do FSII
$PI_{total} = PI_{abs} \times (\delta R_0/(1 - \delta R_0))$	Índice de desempenho total (até os aceptores finais de elétrons do FSI)

### 3.3 TEOR RELATIVO DE CLOROFILA

O teor relativo de clorofila foi estimado com o uso de um clorofilômetro portátil (SPAD-502, Konica Minolta Optics, Inc.) e expresso como índice SPAD. As medições foram realizadas nas mesmas folhas utilizadas na análise da fluorescência da clorofila *a*. A cada cinco medições por folha uma média foi gerada, obtendo duas médias por planta.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os nove acessos de pinhão manso constituíram os tratamentos, que foram avaliados, seguindo delineamento inteiramente casualizado com dez repetições. Cada planta representou uma repetição.

Os parâmetros do teste JIP selecionados por PCA e os dados do índice de clorofila, obtidos nos meses de fevereiro e junho de 2015 (verão e inverno) foram sujeitos a uma análise de variância (ANOVA) e quando o teste-F foi significativo, uma comparação de médias foi realizada por meio do teste de Tukey em nível de 1% ou 5% de probabilidade com o auxílio do software Assistat, versão 7.7 beta.

#### 3.4.1 Análise do Componente Principal (PCA)

Com a finalidade de observar agrupamentos por similaridade dos acessos, e selecionar aqueles mais tolerantes à alta temperatura (KALAJI et al., 2014) e ao fotoperíodo, com os dados de fluorescência transiente foi realizada análise do componente principal (PCA). A redução da quantidade de parâmetros do teste JIP realizada com PCA pôde ser descrita conforme a Equação 1, na qual as matrizes **T** e **P** continham informações das amostras e variáveis (período de verão e inverno), respectivamente, e **E** uma matriz residual.

$$\text{Equação 1: } \mathbf{X}_{(n,m)} = \mathbf{T}_{(n,h)} \cdot \mathbf{P}_{(m,h)}^T + \mathbf{E}_{(n,m)}$$

Uma matriz de dados  $X$ , contendo 52 parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a*, foi autoescalada pela Equação 2, para não haver influência da ordem de grandeza das variáveis no modelo final. Os dados foram processados no software MATLAB 8.1.

$$x_{ij,auto} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j}$$

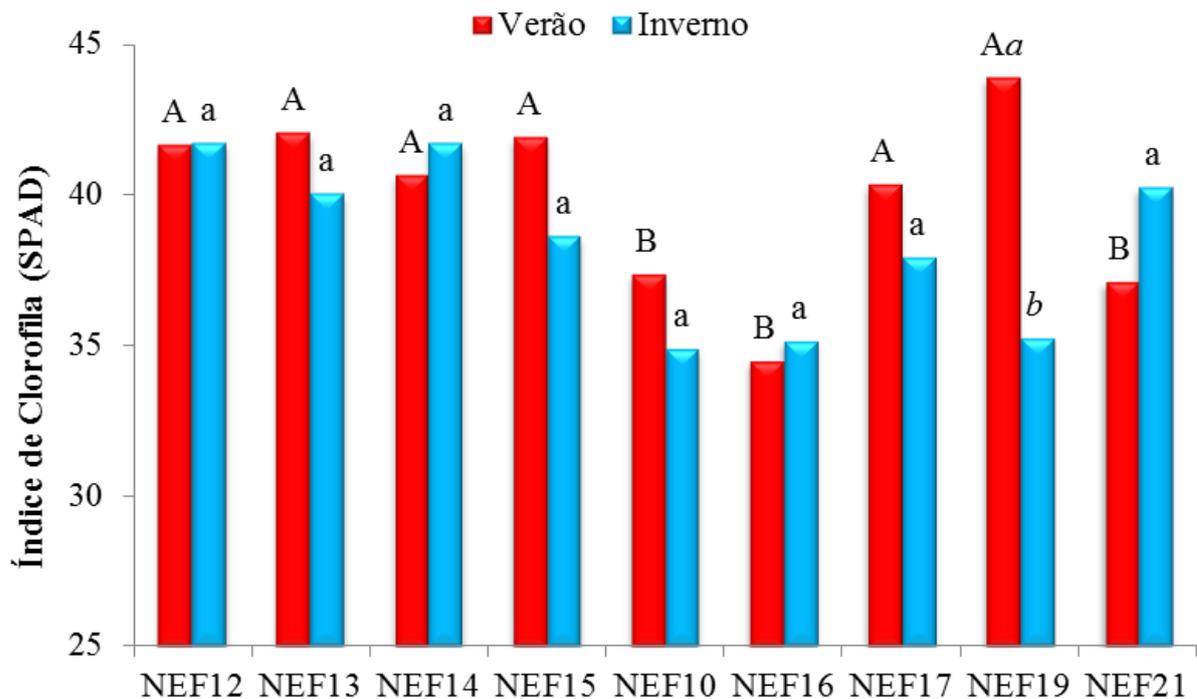
Equação 2:

Os parâmetros apontados pela PCA (fluxo de absorção de elétrons por centro de reação, transferência de energia de excitação entre os centros de reação, taxa de centros de reação 'fechados', taxa de redução dos aceptores finais de elétrons do FSI por centro de reação e por sessão transversal e fluxo de transporte de elétrons por seção transversal excitada) indicaram que as alterações para distinguir o comportamento dessas plantas nos meses de fevereiro e junho/2015 ocorreram desde as etapas iniciais no FSII até o final do transporte de elétrons da fase fotoquímica, quando os aceptores finais de elétrons do FSI são reduzidos.

#### 4. RESULTADOS

A análise do teor relativo de clorofila (unidade SPAD) revelou diferenças significativas entre os acessos de pinhão manso utilizados (Figura 6). Em fevereiro, verificou-se nas plantas dos acessos NEF 12 (41,64), NEF 13 (42,04), NEF 14 (40,64), NEF 15 (41,90), NEF 17 (40,34) e NEF 19 (43,90) os maiores teores relativos de clorofila, os menores nos acessos NEF 10 (37,34), NEF 16 (34,46) e NEF 21 (37,10). Em junho, no inverno, não houve diferenças significativas entre os acessos quanto ao teor relativo de clorofila.

Apenas o acesso NEF 19 apresentou diferença significativa no teor relativo de clorofila entre os períodos de verão (43,90 unid. SPAD) e inverno (35,24 unid. SPAD).



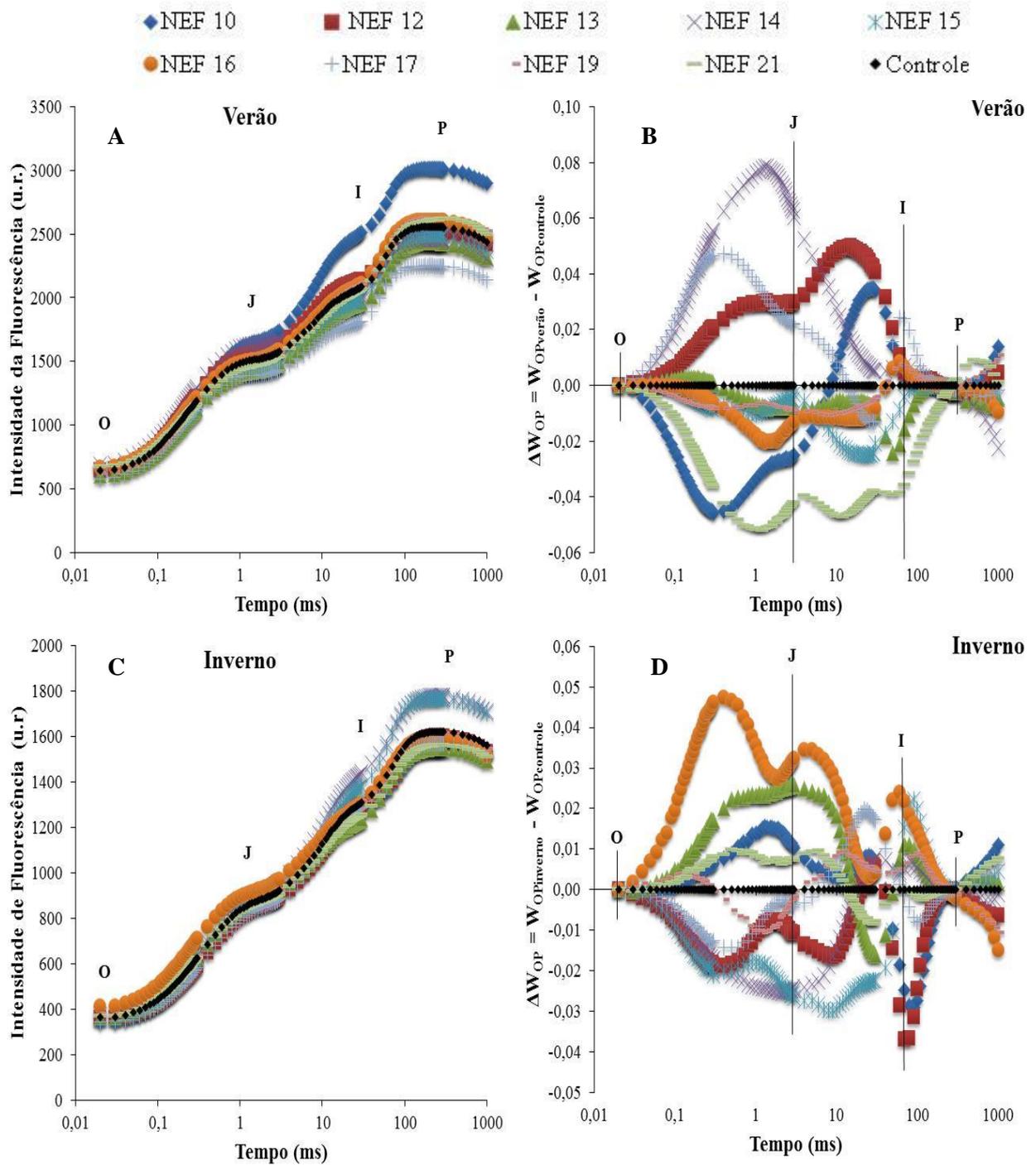
**Figura 6.** Teor relativo de clorofila de folhas jovens totalmente expandidas de nove acessos de *Jatropha curcas* L. avaliados em fevereiro e junho/2015. Médias seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. Letra maiúscula – diferenças entre os acessos durante o verão. Letra minúscula – diferenças entre os acessos durante o inverno. Letra itálica – diferença no mesmo acesso no verão e inverno. (n=10)

A Figura 7 mostra uma típica curva O-J-I-P da cinética da fluorescência da clorofila *a* para todos os acessos, o que demonstra que todos estavam fotossinteticamente ativos. Foi possível visualizar e caracterizar as fases que correspondem aos processos fotoquímicos de captura da energia de excitação e o fluxo de elétrons no aparato fotossintético dos nove acessos de *J. curcas*, em fevereiro (verão) e junho (inverno), Figuras 7A e 7C. No verão, observou-se que o acesso NEF 10, apresentou curvas de emissão de fluorescência transiente acima da média geral, enquanto que NEF 17 apresentou curvas abaixo da média. No inverno, NEF 14 e NEF 15 apresentaram curvas acima da média geral.

As diferenças entre as curvas normalizadas puderam ser analisadas por meio das diferenças cinéticas observadas no verão ( $\Delta W_{OP} = W_{OP\text{verão}} - W_{OP\text{controle}}$ ) e no inverno ( $\Delta W_{OP} = W_{OP\text{inverno}} - W_{OP\text{controle}}$ ) (Figuras 7B e 7D). Assim, na Figura 7B, os acessos NEF12 (3,1%), NEF14 (8%) e NEF17 (5%) apresentaram diferenças positivas na etapa O-J, o que evidencia a ineficiência na capacidade de reoxidação da  $Q_A^-$ ; NEF 10 (3.5%) e NEF 12 (5.0%) na etapa J-I, que se refere a uma progressiva redução do 'pool' de plastoquinona; e NEF 17 (2,5%) na etapa I-P, demonstrando uma dupla redução da plastocianina e da clorofila  $P_{700}^+$  no FSI, no verão.

Ao calcular a diferença cinética dos passos O-J ( $\Delta W_{OJ} = W_{OJ\text{verão}} - W_{OJ\text{controle}}$ ), no acesso NEF 17 foi encontrada banda K (6,5% mais positiva do que o controle), boa indicação da inativação dos complexos de evolução do oxigênio (Figura 8A). O mesmo cálculo foi realizado para os passos O-K ( $\Delta W_{OK} = W_{OK\text{verão}} - W_{OK\text{controle}}$ ), no qual foi encontrada a banda L 2,6% mais positiva do que a média geral (Figura 8C), evidenciando a desconectividade ou o desagrupamento entre as unidades do FSII.

A diferença cinética entre os passos I-P ( $\Delta W_{IP} = W_{IP\text{verão}} - W_{IP\text{controle}}$ ), evidenciou a presença da banda G nos acessos NEF 16 e 17 (5,2% e 12,2% maior que a média geral, respectivamente). Isto indica danos no lado receptor do FSII, ao nível do pool de plastoquinona, Figura 8E.



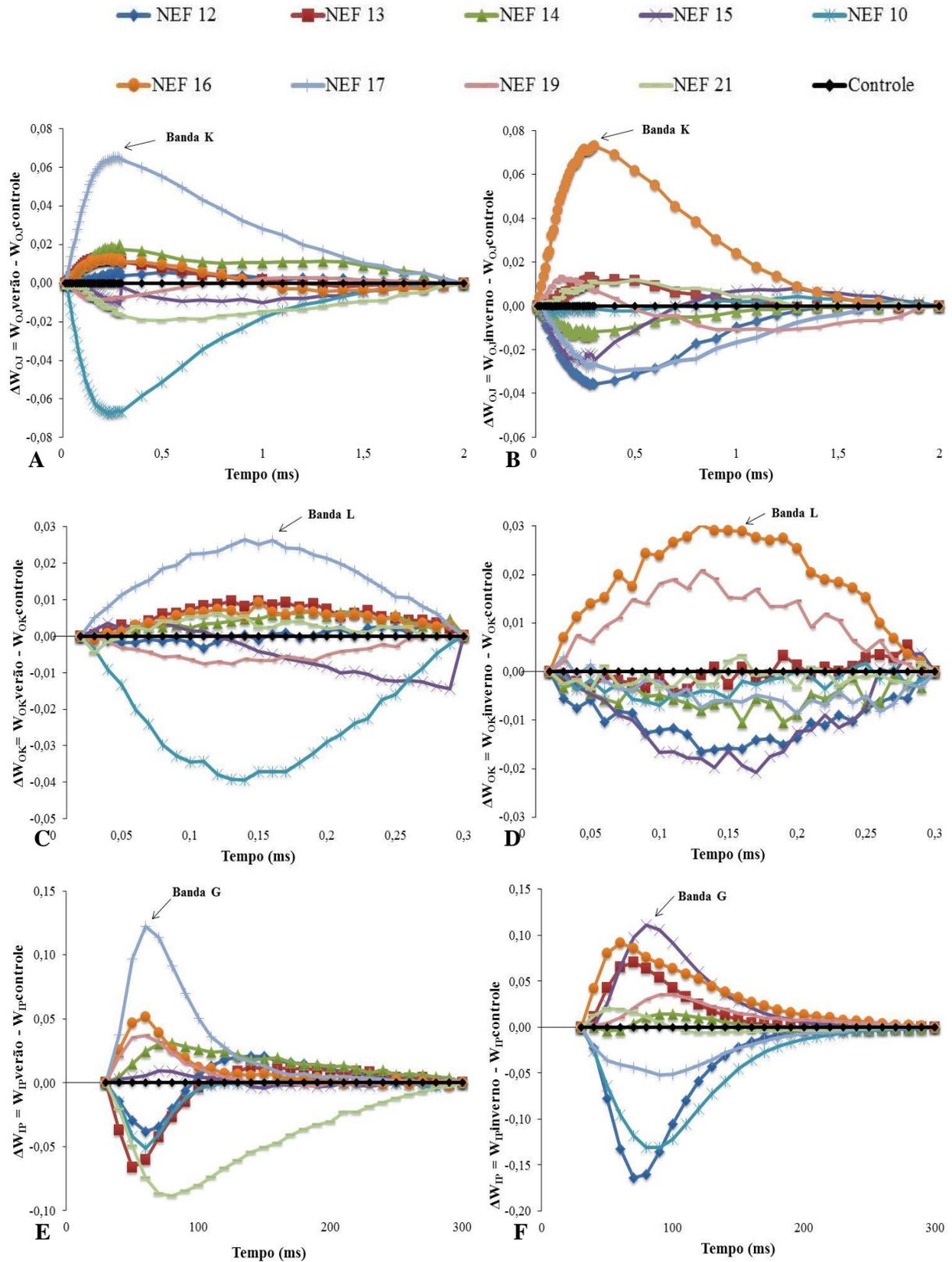
**Figura 7.** Curvas da indução rápida da fluorescência variável relativa da clorofila a (A e C); Diferenças cinéticas normalizadas observadas no verão ( $\Delta W_{OP} = W_{OP_{verão}} - W_{OP_{controle}}$ ) e no inverno ( $\Delta W_{OP} = W_{OP_{inverno}} - W_{OP_{controle}}$ ) (B e D) em nove acessos de *J. curcas*. O tempo está representado em escala logarítmica (ms). (n=10)

NEF 10 destacou-se por não apresentar bandas positivas em nenhuma etapa durante os períodos analisados, enquanto NEF 12 comportou-se de forma semelhante ao controle durante o verão e no inverno observaram-se bandas negativas para todas as etapas.

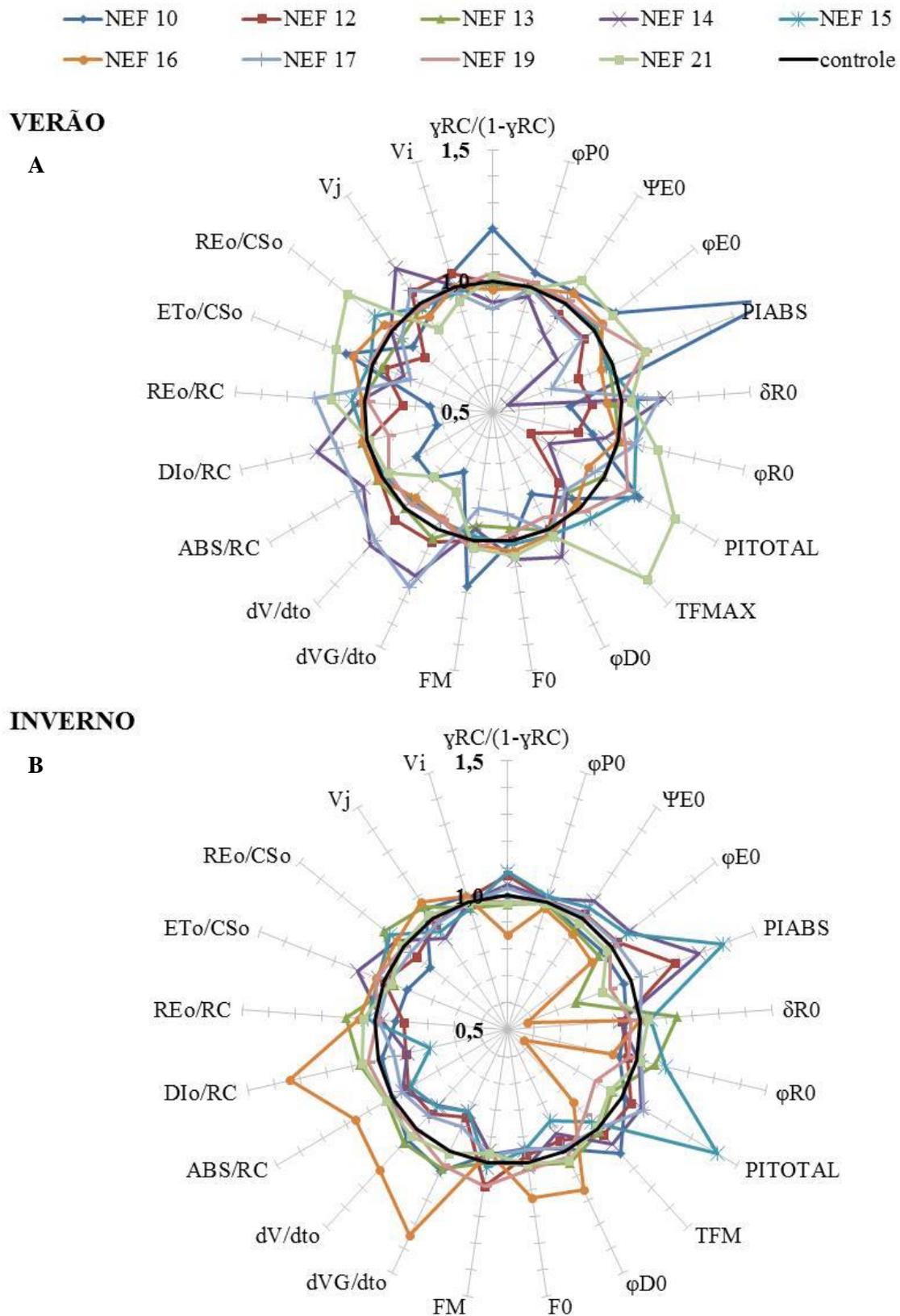
Os transientes OJIP foram também transferidos para parâmetros biofísicos (STRASSER et al., 2004): os rendimentos quânticos; atividade específica por centro de reação (RC); fluxos fenomenológicos por seção transversal (CS) e índices de performance (PI). Os valores dos parâmetros calculados foram normalizados pela média obtida pelos nove acessos. O desvio do comportamento de cada acesso comparado à média em cada período analisado demonstra o impacto da temperatura sobre cada acesso (Figura 9).

Uma análise multiparamétrica - a análise do componente principal (PCA) - foi utilizada objetivando-se a identificação dos acessos mais sensíveis ao estresse durante as variações ambientais no verão (dias longos e temperaturas elevadas) e no inverno (dias curtos e temperaturas amenas). As duas primeiras componentes principais conseguiram explicar, respectivamente, 49,81% e 18,78%, totalizando 68,59% da variância total dos dados, ou seja, a projeção das amostras nestas duas componentes representou boa parte da informação contida nos dados (Figura 10).

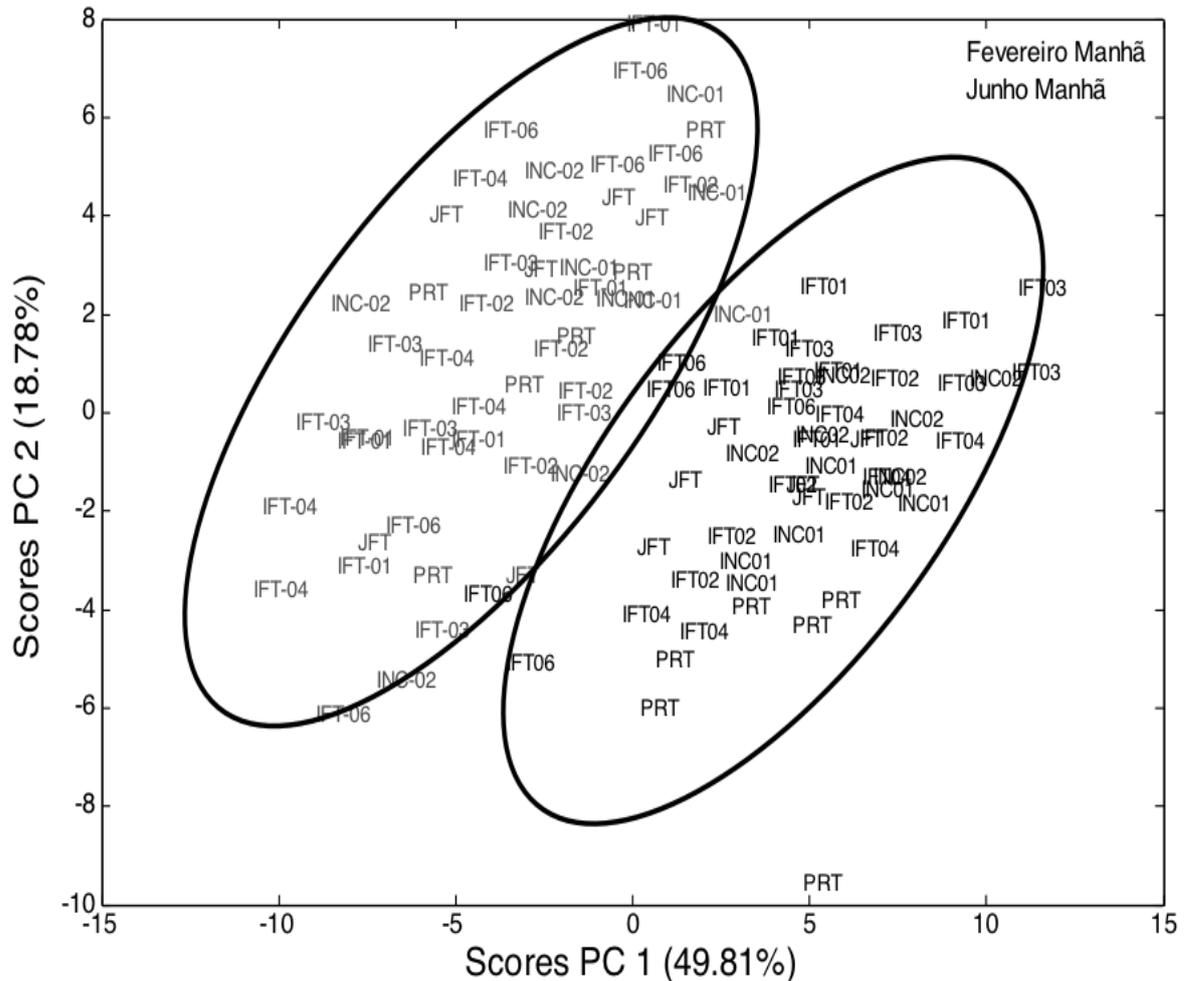
Os acessos de *J. Curcas* são plantas da mesma espécie coletadas em diferentes regiões do país, e assim podem ter expressão gênica diferente para determinadas características, apesar de possuírem muitas características fisiológicas semelhantes. Portanto, a análise com PCA revelou, no gráfico dos escores (Figura 10), a formação de dois grandes grupos representando fevereiro e junho, isto é, os nove acessos puderam ser separados pelas características reveladas pelas diferentes condições ambientais dos períodos analisados.



**Figura 8.** Diferenças cinéticas da fluorescência variável relativa evidenciando o aparecimento da banda K ( $\Delta W_{OJ} = (\Delta W_{OJ(\text{tratamento})}) - (\Delta W_{OJ(\text{controle})})$ ) - A e B; banda L ( $\Delta W_{OK} = (\Delta W_{OK(\text{tratamento})}) - (\Delta W_{OK(\text{controle})})$ ) - C e D; banda G ( $\Delta W_{IP} = (\Delta W_{ip(\text{tratamento})}) - (\Delta W_{ip(\text{controle})})$ ) - E e F - durante as análises realizadas em plantas de nove acessos de *J. curcas* no verão e no inverno. O tempo está representado em escala logarítmica (ms). (n=10)



**Figura 9.** Mudanças na forma do radar desenhado pelos valores normalizados de parâmetros do Teste JIP induzidos pela temperatura ambiente durante o verão (A) e inverno (B) em nove acessos de *J. curcas*. O controle (=1.0) representa a média dos nove acessos analisados.



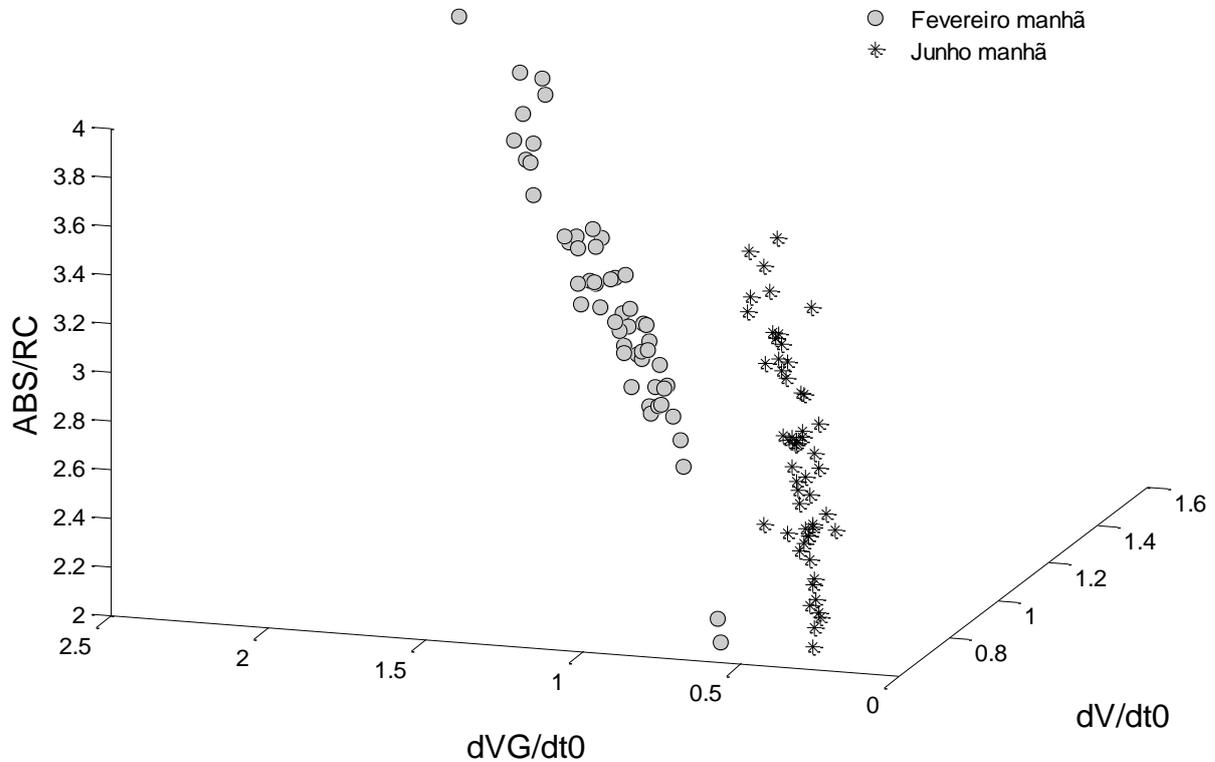
**Figura 10.** Scores da PCA para acessos de *Jatropha curcas* plotados com base nos 52 parâmetros do teste JIP avaliados durante os meses de fevereiro e junho/2015 pela manhã. IFT01 = NEF 12; IFT02 = NEF 13; IFT03 = NEF 14; IFT04 = NEF 15; IFT06 = NEF 10; INC01 = NEF 16; INC02 = NEF 17; JFT = NEF 19; PRT = NEF 21.

Assim, a discriminação dos acessos pela variação de temperatura (verão e inverno) pôde ser realizada pelos parâmetros do teste JIP que mais contribuíram para essa discriminação (Figura 11): ABS/RC (fluxo de absorção de elétrons por centro de reação),  $dVG/dt_0$  (transferência de energia de excitação entre os centros de reação),  $dV/dt_0$  (taxa de centros de reação 'fechados'),  $RE_0/RC$  (taxa de redução dos aceptores finais de elétrons do FSI no tempo zero),  $RE_0/CS_0$  (taxa de redução dos aceptores finais de elétrons do FSI por) e  $ET_0/CS_0$  (fluxo de transporte de elétrons por seção transversal excitada).

Uma vez que esses parâmetros puderam ser utilizados para separar as épocas de coletas de dados (Figura 12), os mesmos foram usados para demonstrar o comportamento das plantas em cada estação. Uma análise de variância (ANOVA)



alcançou os maiores valores (144,03 unid. relat.), em relação ao mesmo parâmetro ( $RE_0$ ) e ao fluxo de transporte de elétrons por seção transversal excitada ( $CS_0$ ), 289,49 unid. relat. (Tabela 2).



**Figura 12.** Interação entre parâmetros do teste JIP demonstrando a discriminação do período de coleta de dados, fevereiro e junho de 2015 (verão e inverno, respectivamente).

Durante o inverno, houve diferença estatística entre os acessos apenas quanto ao fluxo de absorção de elétrons por centro de reação ( $ABS/RC$ ) e a taxa de centros de reação fechados ( $dV/dt_0$ ), sendo destacado o acesso INC01, que mostrou as maiores taxas para esses parâmetros (2,92 e 1,26 unid. relat., respectivamente).

Como pela PCA não foi possível separar os acessos entre aqueles mais ou menos tolerantes às variações ambientais dos períodos estudados, optou-se por analisar essas plantas diretamente por meio dos parâmetros do teste JIP apresentados na Figura 9. No verão (Figura 9A) notou-se que o acesso NEF 10 foi o que apresentou o maior índice de desempenho do FSII ( $PI_{ABS}$ ) com o valor 66,45% maior do que a média geral controle), seguido pelos acessos NEF 19 e NEF 21, com 13,30% cada. Considerando que este parâmetro é o produto de outros três parâmetros  $\phi P_0$ ,  $\Psi E_0$  e  $\gamma RC/(1 - \gamma RC)$ , ou seja, um desbalanço em um destes pode ocasionar um maior ou

menor valor do índice. NEF 10 apresentou também valores acima da média para estes parâmetros (5,3%, 5,1% e 20%, respectivamente) e  $\varphi E_0$  (9,27%). Para estes parâmetros observou-se ainda que: ocorreu aumento em  $\Psi E_0$  para os acessos NEF 21 (10,8%) e NEF 16 (5,1); em  $\varphi E_0$ , NEF 21 aumentou 9,27%.

**Tabela 2.** Análise de variância dos parâmetros do Teste JIP mais sensíveis às altas temperaturas e ao comprimento do dia evidenciados pela análise do componente principal.

	Transferência de energia de excitação entre os centros de reação		Centros de reação fechados		Fluxo de Absorção de elétrons por centro de reação	
	Verão **	Inverno ns	Verão **	Inverno *	Verão **	Inverno **
<b>NEF 10</b>	0,98 b	0,73	0,90 d	1,09 ab	2,57 b	2,51 ab
<b>NEF 12</b>	1,35 ab	0,58	1,13 abc	0,96 ab	3,07 ab	2,34 b
<b>NEF 13</b>	1,34 ab	0,72	1,07 abcd	1,11 ab	3,11 ab	2,58 ab
<b>NEF 14</b>	1,54 a	0,57	1,28 a	0,91 b	3,29 a	2,40 b
<b>NEF 15</b>	1,24 ab	0,56	1,02 cd	0,92 ab	3,01 ab	2,30 b
<b>NEF 16</b>	1,23 ab	0,91	1,01 cd	1,26 a	3,09 ab	2,92 a
<b>NEF 17</b>	1,61 a	0,61	1,25 ab	0,97 ab	3,39 a	2,41 b
<b>NEF 19</b>	1,23 ab	0,71	1,04 bcd	1,05 ab	2,95 ab	2,56 ab
<b>NEF 21</b>	1,08 b	0,68	0,89 d	1,07 ab	2,96 ab	2,57 ab
<b>CV%</b>	18,56	28,14	11,14	17,38	9,90	9,21
	Redução dos aceptores finais de elétrons do FSI por centro de reação		Fluxo de transporte de elétrons por seção transversal excitada		Redução dos aceptores finais de elétrons do FSI por seção transversal excitada	
	Verão **	Inverno ns	Verão **	Inverno ns	Verão **	Inverno ns
<b>NEF 10</b>	0,42 d	0,44	278,22 ab	149,90	105,96 bc	61,80
<b>NEF 12</b>	0,48 cd	0,43	238,83 bcd	165,17	98,81 c	66,36
<b>NEF 13</b>	0,56 abc	0,53	240,76 bcd	158,23	112,45 bc	77,33
<b>NEF 14</b>	0,57 abc	0,47	218,27 cd	182,59	118,91 bc	72,99
<b>NEF 15</b>	0,59 ab	0,49	253,50 abc	169,37	128,21 ab	75,52
<b>NEF 16</b>	0,56 abc	0,51	271,13 ab	170,82	122,57 abc	73,21
<b>NEF 17</b>	0,67 a	0,48	211,03 d	161,82	112,38 bc	68,31
<b>NEF 19</b>	0,55 bc	0,48	253,35 abc	170,92	119,07 bc	70,70
<b>NEF 21</b>	0,63 ab	0,50	289,49 a	160,79	144,03 a	71,42
<b>CV%</b>	10,37	18,67	8,94	36,35	10,73	18,56

Foi aplicado o teste de Tukey em níveis de 1% (\*\*) e 5% (\*) de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si.

O produto de  $PI_{ABS}$  e  $\delta R_0$  gera o índice de desempenho total da etapa fotoquímica da fotossíntese ( $PI_{TOTAL}$ ), parâmetro que traz informações a cerca de todas as etapas da cadeia transportadora de elétrons. Além dele, há o parâmetro  $\phi R_0$ . Os acessos que mais se destacaram no  $PI_{TOTAL}$  foram NEF 15 e NEF 10 (ambos com valores 13,5% maior que o controle), NEF 19 (10,5%) e NEF 21 (31,51%). Este último acesso também apresentou valores de  $\phi R_0$  acima da média (15,45%). NEF 17 e NEF 14 destacaram-se no parâmetro  $\delta R_0$  com valores 14,55% superiores (Figura 9A).

Apesar de ter exibido  $PI_{TOTAL}$  13,5% acima da media, o acesso NEF 10 apresentou valores para  $\delta R_0$  e  $\phi R_0$  de 20,22% e 10,13% menores do que os valores de referência.

Para os parâmetros  $\phi D_0$  e  $T_{FM}$ , os acessos NEF 14 (11,6%) e NEF 21 (37,65%) tiveram destaque, respectivamente. Em complemento, o acesso NEF 10 destacou-se devido à taxa de eficiência de dissipação de energia 15,16% menores do que a média geral.

O acesso NEF 12 apresentou taxa de dissipação de energia igual a média geral, porém as taxas de  $PI_{ABS}$  (14,45%),  $PI_{TOTAL}$  (33,16%) e seus componentes,  $\Psi E_0$ ,  $\phi E_0$ ,  $\delta R_0$  e  $\phi R_0$ , com valores abaixo da média geral de 5,65%, 6,05%, 11,35% e 15,99%, respectivamente.

Sob as temperaturas mais amenas do inverno, os acessos apresentaram valores próximos da média para todos os parâmetros do Teste JIP (Figura 9B), com exceção do NEF 17 que apresentou os maiores valores de  $PI_{ABS}$  (37,5%) e  $PI_{TOTAL}$  (41,31%). Outro acesso que mostrou comportamento diferenciado neste período foi o NEF 16 com valores de  $PI_{ABS}$  e  $PI_{TOTAL}$  de 42,08% e 42,64% menores que a média geral, respectivamente.

## 5. DISCUSSÃO

A maioria dos acessos apresentou altos valores (42,0 unid. SPAD), com exceção dos acessos NEF 10, NEF 16 e NEF 21, os quais apresentaram 34,8, 34,6 e 37,0 unid. SPAD, respectivamente. À semelhança de Gasparini (2015), em estudo com cinco acessos de pinhão manso, nos quais verificou-se diferença significativa nas plantas do acesso NEF 6, que apresentaram o maior índice de clorofila (39,59 unid. SPAD), e nas plantas de NEF 5 constatou-se o menor índice (31,91 unid. SPAD).

As clorofilas são responsáveis pela conversão da radiação luminosa em energia, sob a forma de ATP e NADPH, por isso, estão intimamente relacionadas com a eficiência fotossintética das plantas e, conseqüentemente, ao seu crescimento e adaptabilidade a diferentes ambientes. No metabolismo vegetal as clorofilas são constantemente sintetizadas e destruídas por meio de processos bioquímicos influenciados por fatores internos e externos (QUEIROZ et al, 2012). Entretanto, Kalaji et al. (2012) sugerem que os teores de pigmentos não expressam a estrutura do aparelho fotossintético nem informam a capacidade fotoquímica das plantas. E afirmam que a fluorescência da clorofila *a* é a forma mais confiável e simples para determinar a eficiência do transporte de elétrons e, a capacidade da atividade fotoquímica das plantas.

A tolerância ao calor é adquirida como mecanismo de adaptação nas plantas que crescem em ambientes com altas temperaturas (LARKINDALE E VIERLING, 2008). Isto ocorre como forma de evitar fotoinibição, uma vez que as plantas estão sempre passando por algum estresse temporário em condições naturais por causa da luz ambiente (luz solar) que pode induzir fotoinibição leve. Quando a temperatura se desvia do ponto ótimo, o risco de fotoinibição aumenta, o que leva a uma possível associação dos efeitos da temperatura e do estresse luminoso (SHARMA et al., 2012).

Segundo Berry e Björkman (1980), o grau de tolerância ao calor do aparato fotossintético de um genótipo, em termos de termoestabilidade do FSII pode estar relacionado com o regime térmico do ambiente no qual a planta esta sendo cultivada, ou é adaptada, e varia intraespecífica quanto interespecificamente.

Blum (1986) observou variabilidade na taxa de fotossíntese em cultivares de trigo expostos a altas temperaturas sob condições controladas. Porém, Sharma et al. (2012; 2014) relatam que os efeitos do tratamento de calor podem ter sido confundidos devido as diferentes adaptações das plantas que levam a um desempenho de crescimento diferente sob condições específicas. Para evitar tais problemas, esses autores fizeram uma triagem de acessos de trigo com alta capacidade fisiológica para lidar com o estresse por calor, reduzindo, assim, os efeitos de diferenças genéticas devido à adaptação. Esta seleção foi realizada com base na capacidade fisiológica do aparato fotossintético sob calor controlado em condições de estresse utilizando  $\phi P_0$  ( $F_V/F_M$ ) e outros parâmetros da fluorescência da clorofila *a*.

As alterações na fluorescência podem mostrar a ausência ou a presença de danos no processo fotossintético (STRASSER et al., 2000). No presente estudo, um típico aumento da cinética de fluorescência rápida da clorofila *a* mostrou uma sequência de fases a partir do valor inicial ( $F_0$ ), quando todos os centros de reação (CR) estão abertos (oxidados), até o valor máximo ( $P = F_M$ ), quando todos os centros de reação estão fechados (reduzidos), que são conhecidas como passo O (~20 ms), J (~2 ms), I (~30 ms) e P (=  $F_M$ , ~300ms)(CHEN et al., 2016).

Para os nove acessos de pinhão manso cultivados sob temperatura e luz ambientes no presente estudo, o  $\phi P_0$  (rendimento quântico máximo da etapa fotoquímica) não mostrou variação significativa no verão, nem no inverno. Isso se explica pelo fato de que este parâmetro do Teste JIP tem demonstrado ser não específico (BAKER, 2008) e muitas vezes insensível (KALAJI et al., 2014) a diferentes estresses para muitas culturas.

Durante o verão ficou evidente, pela análise das diferenças cinéticas, que os acessos NEF 12, NEF 14 e NEF 17 apresentaram na fase O-J baixa atividade fotoquímica, o que significa dizer que as reações rotativas de oxirredução da quinona A nas etapas iniciais do processo fotoquímico não estavam ocorrendo de forma favorável e foram comprometidas pelas condições ambientais (como o excesso de temperatura e dias longos). Resultado semelhante foi encontrado por Chen et al. (2016) em folhas de erva-daninha resistentes a alta temperatura. Esta fase é, em grande parte, impulsionada pelas reações primárias da etapa

fotoquímica, onde os eventos de rotação para redução de QA ocorrem apenas uma vez.

As plantas do NEF 17 e NEF 14 também se destacaram por apresentar bandas K e L positivas, indicando, respectivamente, a inativação dos centros de evolução de oxigênio (CEO) e uma menor conectividade energética entre das unidades do FSII (CHEN et al., 2016).

Os resultados mostraram que o efeito principal do estresse primário por calor reside no CR, não na clorofila da antenas. Aspectos estruturais e funcionais do FSII estão interligados. No estresse por calor, o dano à maquinaria fotossintética afeta significativamente a cooperatividade energética entre as unidades de FSII. Esta hipótese é suportada pelo aparecimento da banda L positiva em alta temperatura. O aumento da banda L ocorre quando a temperatura provoca uma diminuição na conectividade energética, ou seja, a diminuição dos resultados de conectividade e uma baixa utilização da energia de excitação e menor estabilidade entre as unidades do FSII (STRASSER et al., 2004). A perda de conectividade também indica que a fração de CRs ativos também diminuiu (SHARMA et al., 2014)

O aumento da intensidade da fluorescência da clorofila *a* observada entre os passos I – P para os acessos NEF 16 e NEF 17 denota a dupla redução da plastocianina (PC)<sup>+</sup> e de P<sub>700</sub><sup>+</sup> no FSI (SILVA et al., 2011), razão porque pode-se afirmar que, cineticamente, a fase I-P mostra correlação com a atividade do FSI (CEPPI et al., 2012). A diferença cinética encontrada entre esses pontos evidenciou a banda G em ambos os acessos. Estes resultados confirmam a afirmativa de Oukarroum et al. (2009) de que tanto o estresse hídrico quanto o estresse salino podem alterar a amplitude da fase I-P. Pode-se incluir também, com o presente trabalho, que altas temperaturas alteram a amplitude da fase I-P e induzem o aparecimento da banda G.

Na etapa J-I, os acessos NEF 10 e NEF 12 apresentaram aumento na intensidade da fluorescência, o que indica a uma progressiva redução do 'pool' de PQ. Resultados semelhantes também foram encontrados por Tóth et al. (2007), em folhas de cevada submetidas a altas temperaturas.

Com a análise multiparamétrica, PCA, realizada não foi possível a identificação dos acessos mais sensíveis ao estresse durante as variações ambientais tanto no verão (dias longos e temperaturas elevadas) quanto no inverno (dias curtos e temperaturas amenas), uma vez que estas plantas são da mesma espécie coletadas em diferentes regiões e, por isso, podem possuir expressão gênica diferente para determinadas características, mas possuem muitas características fisiológicas semelhantes (LAVIOLA et al, 2011). Esse resultado difere daquele obtido por Kalaji et al. (2014) em que eles conseguiram, por meio da mesma análise, separar em grupos plantas de milho e de tomate com déficit nutricional de diferentes nutrientes (Fe, K, Mg, N, P, S, Ca).

A análise por componentes principais foi proposta por Pearson, em 1901, e desenvolvida por Hotelling 30 anos depois (1933). Consiste em uma técnica estatística utilizada para redução da dimensionalidade dos dados, facilitando assim a observação de agrupamentos de amostras por similaridade, ou seja, proximidade entre amostras em um espaço multidimensional. Amostras próximas, no espaço das componentes principais, tendem a ter características parecidas (BRO E SMILDE, 2014).

A análise com PCA para as plantas de *J. curcas* mostrou que os nove acessos puderam ser separados, pelas características reveladas pelas diferentes temperaturas do verão e do inverno. E, além disso, essa técnica também indicou os parâmetros do Teste JIP mais influentes nessa separação. Assim, esta abordagem reduziu o conjunto de 52 parâmetros medidos e evidenciou apenas os que determinam as mudanças no estado fisiológico das plantas nessas condições ambientais (KALAJI et al., 2014).

De modo geral, principalmente no verão, a cinética da fluorescência foi muito alterada ( $\Delta V/\Delta t_0$ ,  $\Delta VG/\Delta t_0$ , ABS/RC,  $RE_0/RC$ ), embora tenha afetado pouco a eficiência fotossintética ( $\Phi P_0$ ), que mais uma vez não mostrou-se sensível ao estresse submetido. Destacaram-se, com valores acima da média geral, os acessos NEF 10 e NEF 17. Resultados semelhantes obtiveram Demetriou et al. (2007) ao trabalhar com algas verdes (*Scenedesmus obliquus*) sob diferentes concentrações de sal (estresse salino). NEF 10 e NEF 21 apresentaram valores em média 20% menores dentre todos os acessos para esses parâmetros. Durante o inverno houve

diferença estatística entre os acessos apenas quanto ao ABS/RC e ao  $\Delta V/\Delta t_0$ , sendo destacado o acesso INC01 (2,92 e 1,26 unid. relat., respectivamente). Os demais acessos mantiveram-se com valores similares ao controle.

$RE_0/RC$  representa a redução final dos aceptores de elétrons no lado receptor FSI por centro de reação. Mathur et al. (2015) observaram maior proporção de  $RE_0/RC$  em folhas de trigo crescidas sob diferentes intensidade de luz ultra violeta devido ao seu menor número de centros de reação ativos, o que corrobora com os dados obtidos dos acessos NEF 14 e NEF 21.

Semelhantemente a Mathur et al. (2015), observou-se, em NEF 14 e NEF 17, que a desconexão funcional dos complexos coletores de luz do FSII e a inativação do complexo de evolução de oxigênio, fez com que o processo linear de transporte de elétrons ( $ET_0/CS$ ), fosse reduzido pelas condições das duas estações.

Estes parametros, porém, não conseguiram distinguir com clareza quais seriam os acessos com maior ou menor tolerância as condições de calor, por isso optou-se por analisar essas plantas diretamente por meio dos parâmetros do teste JIP.

NEF 10 (66,45%), NEF 19 e NEF 21 (13,30%, ambos) foram os acessos que apresentaram os maiores índice de desempenho do FSII ( $PI_{ABS}$ ). NEF 12, NEF 17 e NEF 14 apresentaram valores abaixo da média para este parâmetro, mas durante o inverno recuperaram-se. Essa diminuição do  $PI_{ABS}$  sob altas temperatura também foi encontrada por Jedmowski et al. (2014) em mudas de acessos *Hordeum spontaneum* KOCH submetidos ao estresse por seca.

O  $PI_{ABS}$  foi introduzido com um termo para expressar toda a atividade do FSII, sendo composto por  $\phi P_0$ ,  $\Psi E_0$  e  $\gamma RC/(1 - \gamma RC)$ , ou seja, um desbalanço em um destes pode ocasionar um maior ou menor valor para esse índice. Este índice foi utilizado por Chen et al. (2016) para quantificar a sensibilidade ao calor de plantas expostas a 40°C. O  $PI_{ABS}$  foi utilizado como um indicador de vitalidade da planta, o que permitiu a classificação das populações estudadas de erva-daninha com base em seus níveis de tolerância ao calor, à medida que o  $PI_{ABS}$  dessas plantas declinou durante o tratamento de estresse térmico.

Com base no trabalho destes autores, podemos classificar os nove acessos de pinhão manso em relação às condições de calor (verão) como tolerantes, aqueles que se encontram acima da média geral (NEF 10, NEF 19 e NEF 21); intolerantes, aqueles abaixo da média geral (NEF 12, NEF 14 e NEF 17); e neutros, os que não diferiram da média (NEF 13, NEF 15 e NEF 16). Sob as condições de inverno, porém, temos a classificação como tolerantes os acessos NEF 12, NEF 14 e NEF 15; como intolerantes, NEF 16 e NEF 13; e neutros NEF 10, NEF 17, NEF 19 e 21.

Durante o verão, os acessos intolerantes, além de apresentarem valores dos componentes de  $PI_{ABS}$  abaixo da média controle, ainda foram observados valores superiores de fluxo de energia dissipada por RC ativo ( $DI_0/RC$ ). Estas plantas possivelmente passaram por uma fotoinibição dinâmica durante os períodos mais quentes do dia anterior, mas apesar não terem alcançado valores de  $PI_{ABS}$  acima da média, os parâmetros do FSI mostraram que continuavam ativos. Assim, podemos inferir que houve fotoinibição dinâmica, que ocorre no horário de maior radiação e temperatura provocando uma redução na eficiência fotoquímica e um desvio do excesso de energia para a dissipação de calor. Essas não podem ser caracterizadas como dano, mas sim como um mecanismo de proteção que permite a dissipação do excesso de energia e a manutenção do FSI (GASPARINI, 2015).

Enquanto no inverno, os acessos intolerantes apresentaram fotoinibição crônica ao se analisar os parâmetros mais sensíveis: ( $F_V/F_M = \phi P_0$ ,  $F_0$ ,  $F_M$ ,  $T_{f_{max}}$ ,  $DI_0/RC$ ,  $PI_{abs}$  e  $PI_{total}$ ) (OHADA et al., 2011; SCHANSKER et al, 2014). Principalmente o acesso NEF 16, que apresentou valores abaixo da média para os parâmetros fluorescência máxima, tempo máximo para atingir a fluorescência máxima e índices de desempenho; e altos valores de fluorescência inicial e fluxo de energia dissipada por RC ativo. Gasparini (2015) encontrou resultados semelhantes para plantas do acesso NEF 01 de *J. curcas*.

Essas plantas demonstraram danos tanto no FSII quanto no FSI. Quanto ao FSII, a exposição prolongada a altas temperaturas causou fotoinibição crônica pela redução da eficiência fotoquímica devido a degeneração da proteína D1 (DOS SANTOS et al., 2013). A recuperação desse processo se dá por exposição prolongada à baixa radiação e temperatura, uma vez que a ausência de luz impossibilita a síntese de ATP necessária para a regeneração da proteína D1 (KALAJI et al., 2014). Quanto

ao FSI, este é dificilmente danificado, pois os seus centros de reação ativos são eficientemente protegidos, porém, quando são atingidos, a sua recuperação é extremamente lenta (TIKKANEN et al., 2014).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados da fluorescência transiente OJIP, seguida da análise com o teste JIP, permitiu a quantificação de parâmetros fotossintéticos que deram uma ampla visão sobre as mudanças funcionais e estruturais ocorridas nos FSI e FSII. Observamos diferenças claras na resposta com relação às variações ambientais no verão e no inverno.

A análise das curvas mostrou que o efeito principal do estresse por calor causou, primeiramente, danos no centro de reação, não na clorofila da antenas. Nesse tipo de estresse, o dano à maquinaria fotossintética afetou significativamente a cooperatividade energética entre as unidades de FSII.

A análise com PCA para as plantas de *J. curcas* mostrou que os nove acessos puderam ser separados, pelas diferentes respostas as condições ambientais do verão e do inverno. E, além disso, essa técnica também indicou os parâmetros do teste JIP mais influentes nessa separação.

Com base nos parâmetros do teste JIP e, principalmente, no índice de  $PI_{ABS}$  foi possível a classificação dos nove acessos de pinhão manso em relação às condições de calor (verão) como tolerantes (NEF 10, NEF 19 e NEF 21); intolerantes (NEF 12, NEF 14 e NEF 17); e neutros (NEF 13, NEF 15 e NEF 16). Sob as condições de inverno, porém, observou-se um comportamento diferente nos nove acessos, sendo classificados como tolerantes os acessos NEF 12, NEF 14 e NEF 15; como intolerantes, NEF 16 e NEF; e neutros NEF 10, NEF 17, NEF 19 e NEF 21.

Após a análise dos resultados deste trabalho, confirmou-se o índice de  $PI_{ABS}$ , como parâmetro bastante preciso na avaliação à tolerância ao estresse térmico, conforme verificado previamente por Chen et al. (2016).

Sugere-se realização de novos estudos para agregar mais informação a cada acesso, na tentativa de defini-los como cultivares promissoras, ou não, a cada região objetivando o alto rendimento de óleo biocombustível.

## 7. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, G.A. **Temperatura mínima letal e delimitação das áreas de baixo risco de geadas para o cultivo do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) no estado do Paraná.** 2007. 57 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.
- BAKER N.R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 659–668, 2008.
- BERRY, J.; BJÖRKMAN, O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 31, p. 491–543, 1980.
- BHERING, L.L.; BARRERA, C.F.; ORTEGA, D.; LAVIOLA, B.G.; ALVES, A.A.; ROSADO, T.B.; CRUZ, C.D. Differential response of *Jatropha* genotypes to different selection methods indicates that combined selection is more suited than other methods for rapid improvement of the species. **Industrial Crops and Products**, 41ed, p. 260– 265, 2013.
- BLUM. The effect of heat-stress on wheat leaf and ear photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 37, p. 111–118, 1986.
- BRO, R.; SMILDE, A. K. Principal component analysis. **analytical methods**, v. 6, p. 2812–2831, 2014.
- CEPPI, M.G.; OUKARROUM, A.; ÇIÇEK, N.; STRASSER, R.J.; SCHANSKER, G. The IP amplitude of the fluorescence rise OJIP is sensitive to changes in the photosystem I content of leaves: a study on plants exposed to magnesium and sulfate deficiencies, drought stress and salt stress. **Physiologia plantarum**, v. 144, n. 3, p. 277-288, 2012.
- CHEN, S.; YANG, J.; ZHANG, M.; STRASSER, R. J.; QIANG, S. Classification and characteristics of heat tolerance in *Ageratina adenophora* populations using fast chlorophyll a fluorescence rise OJIP. **Environmental and Experimental Botany**, v. 122, p. 126-140, 2016.
- DALLACORT, R.; MARTINS, J. A.; INOUE, M. H.; FREITAS, P. S. L.; KRAUSE, W. Aptidão agroclimática do pinhão-manso na região de Tangará da Serra, MT. **Revista Ciência Agrônômica**, v.41, p. 333-379, 2010.
- DEMETRIOU, G.; NEONAKI, C.; NAVAKOUDIS, E.; KOTZABASIS, K. Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus: The protective role of polyamines. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1767, p. 272–280, 2007.
- DOS SANTOS, C.M.; VERISSIMO, V.; FILHO, H.C.L.W.; FERREIRA, V.M.; CAVALCANTE, P.G.S.; ROLIM, E.V.; ENDRES, L. Seasonal variations of photosynthesis, gas exchange, quantum efficiency of photosystem II and biochemical responses of *Jatropha curcas* L. grown in semi-humid and semi-

arid areas subject to water stress. **Industrial Crops and Products**. v.41, p.203-213, 2013.

DRUMOND, M. A.; SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R. D.; MARTINS, J. C.; ANJOS, J. B. D.; EVANGELISTA, M. R. V. Desempenho agrônômico de genótipos de pinhão manso no Semiárido pernambucano. **Ciência Rural**, v. 40, p. 44-47, 2010.

FINI, A.; BELLASIO, C.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M.; FERRINI, F. Water relations, growth, and leaf gas exchange as affected by water stress in *Jatropha curcas*. **Journal of Arid Environments**, v.89, p.21-29, 2013.

GALAZZI, E.B. **Desempenho fotossintético de plantas de *Jatropha curcas* L. cultivadas no estado do Espírito Santo**. 2011. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 2011.

GASPARINI, X.S.S. **Efeitos da radiação e da temperatura em cinco acessos de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.): crescimento, fluorescência da clorofila a e floração**. 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, 2015.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California Agricultural Experiment Station**, v. 347, p. 1-32, 1950.

HOTELLING, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. **Journal of Educational Psychology**, 1933, 24, p. 417-441.

HWA, C.M.; YANG, X.C. Fixation of hybrid vigor in rice: opportunities and challenges. **Euphytica**, v. 160, p. 287–293, 2008.

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

KALAJI, H.M.; GOLTSEV, V.; BOSA, K.; ALLAKHVERDIEV, S.I.; STRASSER, R.J.; Govindjee. Experimental in vivo measurements of light emission in plants: a perspective dedicated to David Walker. **Photosynthesis Research**, v.114, n.2, p.69-96, 2012.

KALAJI, H.M.; SCHANSKER, G.; LADLE, R.J.; GOLTSEV, V.; BOSA, K.; ALLAKHVERDIEV, S.I.; BRESTIC, M.; BUSSOTTI, F.; CALATAYUD, A.; DA BROWSKI, P.; ELSHEERY, N.I.; FERRONI, L.; GUIDI, L.; HOGEWONING, S.W.; JAJOO, A.; MISRA, A.N.; NEBAUER, S.G.; PANCALDI, S.; PENELLA, C.; POLI, D.B.; POLLASTRINI, M.; ROMANOWSKA-DUDA, Z.B.; RUTKOWSKA, B.; SERÔDIO, J.; SURESH, K.; SZULC, W.; TAMBUSI, E.; YANNICCARI, M.; ZIVACK, M. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. **Photosynthesis Research**, v.122, n.2, p. 121-158, 2014.

- LARKINDALE, J.; VIERLING, E.; Core genome responses involved in acclimation to high temperature. **Plant Physiology**, v., 146, p. 748–761, 2008.
- LAVIOLA, B.G.; BHERING, L.L.; MENDONÇA, S.; ROSADO, T.B.; ALBRECHT, J.C. Caracterização morfo-agronômica do banco de germoplasma de pinhão manso na fase jovem. **Bioscience Journal**, v. 27, p. 371-379, 2011.
- LAZÁR, D. Simulations show that a small part of variable chlorophyll a fluorescence originates in photosystem I and contributes to overall fluorescence rise. **Journal of Theoretical Biology**, v. 335, p. 249-264, 2013.
- LI, X.; ZHANG, L. Endophytic infection alleviates Pb<sup>2+</sup> stress effects on photosystem II functioning of *Oryza sativa* leaves. **Journal of Hazardous Materials**, v. 295, p. 79–85, 2015.
- LUCENA, A. M. A.; VASCONCELOS, G. C. L.; MEDEIROS, K. A. A. L.; MEDEIROS, N. I.; MEDEIROS, O. S.; ARRIEL, N. H. C. Características morfológicas de peças reprodutivas de acessos de *Jatropha curcas* L. **Scientia Plena**. v. 10, n. 4 (A), 2014.
- MARTINEZ, C.A.; OLIVEIRA, E.A.D. DE.; MELLO, T.R.P.; MARIN, A.L.A. Respostas das plantas ao incremento atmosférico de dióxido de carbono e da temperatura. **Revista Brasileira de Geografia Física**. v. 08, p. 635-650, 2015.
- MATHUR, S.; JAJOO, A.. Investigating deleterious effects of ultraviolet (UV) radiations on wheat by a quick method. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 6, p. 1-7, 2015.
- MATHUR, S.; JAJOO, A.; MEHTA, P.; BHARTI, S. Analysis of elevated temperature induced inhibition of photosystem II using chlorophyll a fluorescence induction kinetics in wheat leaves (*Triticum aestivum*). **Plant Biology**, v. 13, p. 1–6, 2011.
- MORALES-FLORES, F.; AGUILAR, M.I.; KING-DÍAZ, B.; LOTINA-HENNSEN, B. Derivatives of diterpen labdane-8a, 15-diol as photosynthetic inhibitors in spinach chloroplasts and growth plant inhibitors. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.125, p.42-50, 2013.
- OHADA, I.; BERG, A.; BERKOWICZ, S.M.; KAPLAN, A.; KEREN, N. Photoinactivation of photosystem II: is there more than one way to skin a cat?. **Physiologia Plantarum**, v.142, p.79-86, 2011.
- OUKARROUM, A.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R.J. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl a I fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. **Physiologia Plantarum**, v. 137, p. 188–99, 2009.
- PEARSON, K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. **Philosophical Magazine**. v. 2, p. 559-572, 1901.
- PERBONI, A.T.; MARTINAZZO, E.G.; SILVA, D.M.; BACARIN, M.A. Baixas temperaturas sobre a fluorescência da clorofila a em plantas de diferentes híbridos de canola. **Ciência Rural**, v. 45, p. 215-222, 2015.

- QUEIROZ, N.L.; ROCHA, M.S.; ROCHA, M.S.; BELTRÃO, N.E.M., MENDES, B.S.S. Teor De Pigmentos Fotossintetizantes Nas Folhas Em Seis Linhagens De Algodoeiro Herbáceo. CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA. 5º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS & I FÓRUM CAPIXABA DE PINHÃO MANSO, 2012, Guarapari. Desafios e Oportunidades: **Anais...** Campina grande: Embrapa Algodão, p. 194, 2012.
- SANTOS, C.M. **Fenologia e capacidade fotossintética do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) em diferentes épocas do ano no estado de Alagoas.** 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia; Produção Vegetal; Proteção de Plantas). Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.
- SCHANSKER, G.; THÓT, S.Z.; HOLZWARATH, A.R.; GARAB, G. Chlorophyll a fluorescence: beyond the limits of the QA model. **Photosynthesis Research**, v.120, p.43-58, 2014.
- SHARMA D. K.; ANDERSEN S. B.; OTTOSEN C. O.; ROSENQVIST E. Phenotyping of wheat cul-tivars for heat tolerance using chlorophyll a fluorescence. **Functional Plant Biology**, v. 39, n. 11, p. 936-947, 2012.
- SHARMA, D. K.; FERNÁNDEZ, J. O.; ROSENQVIST, E.; OTTOSEN, C. O.; ANDERSEN, S. B. Genotypic response of detached leaves versus intact plants for chlorophyll fluorescence parameters under high temperature stress in wheat. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 8, p. 576-586, 2014.
- SILVA, D.M.; DOS SANTOS, K.T.; DUARTE, M.M. Eficiência fotoquímica em folhas do mamoeiro (*Carica papaya* L.) cv. golden durante o estágio reprodutivo e caracterização da ontogenia dos frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.4 p.1066-1073, 2011.
- SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; RUMJANEK, N.G.; MARGIS-PINHEIRO, M. Small heat shock proteins genes are differentially expressed in distinct varieties of common bean. **Braz. J. Plant Physiol**, v. 15, p. 33-41, 2003.
- 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, p. 236-257, 2011.
- STIRBET, A.; RIZNICHENKO, YU G.; RUBIN, A. B.; GOVINDJEE. Modeling Chlorophyll a Fluorescence Transient: Relation to Photosynthesis. **Biochemistry**. vol. 79, n. 4, 2014.
- STRASSER R.J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples, In: Yunus, M.; Pathre, U; Mohanty, P. (Eds), **Probing Photosynthesis: Mechanism, regulation and adaptation**. Taylor and Francis, London, UK, p. 443-480, 2000.

- STRASSER, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the fluorescence transient **In**: Papageorgiou, G. C.; Govindjee (eds.), **Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis**. Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Springer: Dordrecht, p. 321-362, 2004.
- STRASSER, B.J.; STRASSER, R.J. Measuring fast fluorescence transient to address environmental questions: the JIP-test. **In**: MATHIS, P. (Ed.). **Photosynthesis: from light to biosphere**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, p. 977-980, 1995.
- TIKKANEN, M.; MEKALA, N.R.; ARO, E.M. Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1837, p. 210–215, 2014.
- TÓTH, S. Z. **Analysis and Application of the Fast Chl a Fluorescence (OJIP): Transient Complemented with Simultaneous 820 nm Transmission Measurements**. 2006. 170 f. Tese N° 3741 (Doutorado em Ciências, menção em Biologia) – Faculdade de Ciências, Seção Biologia, Departamento de Botânica e Biologia Vegetal. Universidade de Geneva, Switzerland. Disponível em <http://www.unige.ch/cyberdocuments/theses2006/TothSZ/meta.html>. 2006.
- XIANG, M; CHEN, S.; WANG, L.; DONG, Z.; HUANG, J.; ZHANG, Y.; STRASSER, R. J. Effect of vulculic acid produced by *Nimbya alternantherae* on the photosynthetic apparatus of *Alternanthera philoxeroides*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 65, p. 81-88, 2013.
- YUSUF, M.A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SARIN, N.B. Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics**, v.1797, p.1428-1438, 2010.
- ZHANG, M.P.; ZHANG, C.J.; YU, G.H.; JIANG, Y.Z.; STRASSER, R.J.; YUAN, Z.Y.; CHEN, G.X. Changes in chloroplast ultra-structure, fatty acid components of thylakoid membrane and chlorophyll a fluorescence transient in flag leaves of a super-high-yield hybrid rice and its parents during the reproductive stage. **Journal of plant physiology**, v. 167, p. 277-285, 2010.