

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**



**Seleção de porta-enxertos de citros para tolerância à seca**

ANDRESSA RODRIGUES DE OLIVEIRA SOUSA

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL

Fevereiro de 2017

ANDRESSA RODRIGUES DE OLIVEIRA SOUSA

## **Seleção de porta-enxertos de citros para tolerância à seca**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração:  
Genética e Melhoramento Vegetal

Orientador:  
Dr. Abelmon da Silva Gesteira  
Coorientadores:  
Dr. Mauricio Antonio Coelho Filho  
Dr<sup>a</sup>. Fabienne Florence Lucienne Micheli

S725

Sousa, Andressa Rodrigues de Oliveira.

Seleção de porta-enxertos de citros para tolerância à seca / Andressa Rodrigues de Oliveira Sousa, Ilhéus, BA: UESC, 2017.

ii, 77f. :il.

Orientador: Abelmon da Silva Gesteira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências.

1. Frutas cítricas. 2. Metabólitos. 3. Plantas - metabolismo. 4. Porta-enxertos. 5. Planta – efeito da seca. I. Título.

CDD 634.304

ANDRESSA RODRIGUES DE OLIVEIRA SOUSA

SELEÇÃO DE PORTA-ENXERTOS DE CITROS PARA TOLERÂNCIA À SECA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração:  
Genética e Melhoramento Vegetal

APROVADA: 21 de Fevereiro de 2017

---

Dr. Marcelo Schramm Mielke  
(UESC)

---

Dr<sup>a</sup>. Dayse Drielly Souza Santana  
Vieira  
(UNINASSAU)

---

Dr. André Dias de Azevedo Neto  
(UFRB)

---

Dr. Abelmon da Silva Gesteira  
(EMBRAPA/UESC – Orientador)

*Aos meus pais, minha irmã e meu namorado  
pelo amor e cuidado,*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À DEUS, pelo dom da vida, por me iluminar e guiar nesta trajetória.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGGBM) pela oportunidade e todo suporte.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura, ao Laboratório de Ecofisiologia e ao Laboratório de Biologia Molecular pelo espaço físico para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Laboratório de Metabolômica do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) pelas análises realizadas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) concessão da bolsa.

Ao meu orientador amigo, Dr. Abelmon da Silva Gesteira, pelo apoio, orientação, conselhos e principalmente pela confiança.

Ao Dr. Maurício Coelho, pelas valiosas considerações e ensinamentos.

À Dr<sup>a</sup>. Fabienne Micheli, pela coorientação e colaboração nas análises metabolômicas.

Ao Dr. Walter dos Santos, pelos conselhos, ensinamentos e orientações.

À Dr<sup>a</sup>. Dayse Drielly, pelas orientações na condução do experimento.

À toda a equipe da Embrapa Mandioca e Fruticultura, principalmente ao Dr. Carlos Ledo, Tibério Martins, Mabel Ribeiro, Andresa Priscila e Sr. Santana, pelo suporte e auxílio na condução dos experimentos.

Aos meus pais, Manoel Messias e Vanilda, pelo amor incondicional, por ser meu alicerce, me apoiando nos momentos difíceis. Á minha irmã, Lara, pela amizade, cuidados e apoio em qualquer circunstância. Ao meu amor, Jota, pelo carinho, compreensão e conselhos que me motivaram a não desistir. Eu amo vocês!

Aos colegas de pós-graduação e amigos que me ajudaram e apoiaram nesse processo, em especial Angra Paula Bonfim.

À todos da “Família Gesteira” pela ajuda durante a realização do trabalho, especialmente Eliana Souza, Luciana Almeida e Diana Matos.

À Liziane Marques, pela parceria, cuidado e dedicação. Amizade que levo para a vida.

Aos meus irmãos do coração, Matheus Carvalho e Elaine Cruz, pela linda convivência, pelo apoio, amizade, incentivo... Por tudo! Irmandade que transcende a ciência.

Enfim, agradeço à todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, meu muito obrigada

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.  
Muito, nos aproxima.”

*Louis Pasteur*

## ÍNDICE

EXTRATO.....	I
ABSTRACT.....	II
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3.1 Citros – Histórico e aspectos gerais.....	4
3.2 Citricultura no Brasil.....	5
3.3 Interação copa/porta-enxerto.....	6
3.4 Diversificação de porta-enxertos.....	9
3.5 Déficit hídrico.....	10
3.6 Fisiologia do estresse por deficit hídrico.....	11
3.7 Metabolômica.....	16
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	18
5. CAPÍTULO I: Respostas fisiológicas de genótipos de citros para tolerância à seca baseada na competição entre dois genótipos.....	24
6. CAPÍTULO II: Perfil metabolômico de genótipos de citros para tolerância à seca....	56
RESUMO.....	57
ABSTRACT .....	58
6.1 INTRODUÇÃO.....	59
6.2 MATERIAL E MÉTODO .....	61
6.2.1 Material vegetal.....	61
6.2.2 Aplicação do déficit hídrico.....	62
6.2.3 Potencial hídrico foliar.....	62
6.2.4 Análise metabolômica.....	62
6.2.5 Análise estatística.....	64
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
6.4 CONCLUSÃO.....	73
6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	74
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77



## EXTRATO

SOUSA, Andressa Rodrigues de Oliveira, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Fevereiro de 2017. **Seleção de porta-enxertos de citros para tolerância à seca.** Orientador: Prof. Dr. Abelmon da Silva Gesteira. Co-orientadores: Dr. Maurício Antonio Coelho Filho e Dr<sup>a</sup>. Fabienne Florence Lucienne Micheli.

Os citros se destacam como uma das principais fruteiras do mundo, com grande importância econômica, social e cultural em nossa sociedade. Contudo, as plantas cítricas estão sujeitas a uma série de estresses bióticos e abióticos limitando a produção. O déficit hídrico é o estresse ambiental que causa mais prejuízos às plantas. Dependendo da intensidade e da duração do estresse imposto à planta, os processos fisiológicos e moleculares são afetados. O porta-enxerto utilizado na citricultura pode acarretar em diversos comportamentos frente à deficiência hídrica, visto que estes induzem alterações nas relações hídricas, taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>, transpiração e eficiência no uso da água das plantas. Estes possuem mecanismos distintos de proteção para o estresse hídrico que vão desde alterações fisiológicas, à ativação de vias bioquímicas que conduzem à produção de compostos defensivos e tolerância melhorada. O objetivo deste trabalho foi selecionar genótipos de citros tolerantes ao déficit hídrico. Foram utilizadas laranjeira 'Valencia' enxertada em três genótipos de porta-enxertos: limoeiro 'Cravo Santa Cruz' (LCR), tangerineira 'Sunki Maravilha' (TSKMA) e tangerineira 'Sunki Tropical' (TSKTR) nos tratamentos (i) controle, onde as plantas foram mantidas permanentemente irrigadas; (ii) sob deficiência hídrica, onde as plantas foram submetidas à suspensão completa da irrigação e (iii) reidratada, onde as plantas foram submetidas à suspensão completa da irrigação e reidratadas para capacidade de vaso. Deste modo, foram avaliadas respostas fisiológicas e perfil metabolômico. Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que as combinações entre genótipos podem ser promissoras visando uma tolerância superior aos genótipos conhecidos e favorecendo crescimento e produtividade, mesmo sob condições limitantes. Durante a seca, o acúmulo de metabólitos pode evidenciar uma sinalização eficiente para tolerância/sobrevivência à seca, podendo ser diferenciada de acordo com o genótipo utilizada apontando diferentes mecanismos das plantas para aclimação a condições de estresse.

**Palavras-chave:** Citros, metabolômica, processos fisiológicos, tolerância à seca.

## ABSTRACT

SOUSA, Andressa Rodrigues de Oliveira, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, February 2017. **Selection of citrus rootstocks for drought tolerance** Advisor: Prof. Dr. Abelmon da Silva Gesteira. Committee Members: Dr. Maurício Antonio Coelho Filho e Dr<sup>a</sup>. Fabienne Florence Lucienne Micheli.

Citrus stands out as one of the main fruit trees in the world, with great economic, social and cultural importance in our society. However, citrus plants are subject to a series of biotic and abiotic stresses that limit productivity. The water deficit is the environmental stress that causes more damage to the plants. Depending on the intensity and duration of plant stress, both physiological and molecular processes are affected. Rootstocks used in citrus cultivation may lead to different behaviors in the face of water deficit, since such rootstocks induce changes in hydric relations, rate of CO<sub>2</sub> assimilation, transpiration and efficiency in the use of water of the plants. These plants have distinct mechanisms of protection against water stress, ranging from physiological changes to the activation of biochemical pathways that might lead to the production of defensive compounds and improved tolerance. The aim of this study was to select genotypes of citrus tolerant to water deficit. 'Valencia' orange tree grafted to three rootstock genotypes were used: Rangpur Lime (RL), 'Sunki Maravilha' (SM) and 'Sunki Tropical' tangerine '(ST) were used in treatments (i) control, where the plants were kept permanently irrigated; (ii) under water deficiency, where plants were submitted to complete irrigation suspension and (iii) rehydrated, where plants were submitted to complete irrigation suspension and subsequently rehydrated to the capacity of the pot. In this way, physiological responses and metabolomic profile were evaluated. The results obtained in this study show that the combinations between genotypes might be promising while aiming at a superior tolerance to the known genotypes and favoring growth and productivity, even under limiting conditions. Also, during the dry season, the accumulation of metabolites shall show efficient signaling for drought tolerance/survival and might be differentiated according to the genotype used, pointing out to different plant mechanisms for acclimatization to stress conditions.

**Key words:** Citrus, metabolomics, physiological processes, drought tolerance.

## 1. INTRODUÇÃO

Os citros são as frutas mais consumidas no país e no mundo, estando presentes na mesa de famílias de todas as classes sociais (Oliveira et al., 2008). Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a citricultura é uma das mais destacadas agroindústrias brasileiras e com um setor organizado e competitivo. São colhidas, anualmente no Brasil, mais de 18 milhões de toneladas de laranja ou cerca de 30% da safra mundial da fruta. O Brasil é, notadamente, um país voltado para o agronegócio, sendo o maior produtor mundial de suco de laranja concentrado (Carvalho, 2010) e a Bahia se destaca como o segundo maior produtor, sendo a produção voltada para frutas *in natura*, expondo o potencial do país para o mercado.

Contudo, a produção de citros no Brasil é afetada pela irregularidade de chuvas que ocorrem em algumas regiões do país (Schafer et al., 2001) agravada pela ocorrência destas chuvas em condições de distribuição, tempo e intensidade, limitando a demanda e uso da água existente (Zarch et al., 2015). Isso ocorre, devido a grande diversificação agroclimática e de condições particulares de cultivo, compreendendo uma multiplicidade de ambientes (Cerqueira et al., 2004). Os estresses abióticos representam desafios cada vez maiores para as plantas em todo o mundo e a seca destaca-se dentre os estresses comumente encontrados em plantas causando inúmeras perdas econômicas (Osakabe et al., 2014; Smekalova et al., 2014; Vicente-Serrano, 2007). As áreas afetadas aumentaram substancialmente desde meados do século 20 e como resultado, plantas sofrem um crescente estresse hídrico, por déficit, em muitas regiões do mundo que impõe sérios riscos à citricultura (Gray; Brady, 2016; Dai, 2011).

As plantas estão expostas frequentemente as condições adversas do ambiente e dependem de uma rede de sinalização robusta para ajustar o seu crescimento e desenvolvimento de acordo com uma ampla gama de respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares para percepção, reação e adaptação permitindo sobrevivência e reprodução (Osakabe et al., 2014; Smekalova et al., 2014). O estresse provoca alterações no comportamento vegetal cuja irreversibilidade vai depender da duração, da severidade, do estágio de desenvolvimento e da capacidade genética das plantas em responder às mudanças do ambiente (Santos; Carlesso, 1998; Chaves, 1991).

A deficiência hídrica gera vários efeitos sobre o crescimento, um dos quais é a limitação da expansão foliar, que por ser proporcional à fotossíntese, poderá ocasionar

alterações na mesma. Salienta-se que, em determinadas plantas, o déficit hídrico limita não apenas o tamanho, mas também o número de folhas, estimulando também a abscisão foliar, aprofundamento das raízes em direção às porções de solos mais úmidos e as respostas estomáticas como mecanismo responsivo ao fator de estresse (Taiz; Zeiger, 2004). Assim, quando as plantas são expostas a situações de déficit hídrico exibem, frequentemente, respostas fisiológicas que resultam, de modo indireto, na conservação da água na planta (Santos; Carlesso, 1998). Sob deficiência hídrica, a interação entre porta-enxerto e copa pode se tornar mais significativa. Aliás, as diferenças na capacidade do sistema radicular dos porta-enxertos em absorver água podem ser responsáveis pelas variações no grau de tolerância à seca da cultivar copa (Carbonneau, 1985).

O limoeiro 'Cravo' é o porta-enxerto mais usado no Brasil, principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste, sob condições de clima tropical e subtropical (Oliveira et al., 2008; Stuchi et al., 2004). Seu amplo uso é devido às suas excelentes características hortícolas como: conferir maior vigor; boa produtividade e longevidade às copas; ser indicado para todas as cultivares copa, bem como por ter boa tolerância à seca (Oliveira et al., 2008; Azevêdo, 2003). Já as tangerineiras 'Sunki Maravilha' e 'Sunki Tropical' são genótipos identificados e avaliadas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, os quais são apontados como alternativas viáveis em programas de diversificação de porta-enxertos, considerando-se condições ambientais e combinações com variedades-copa em relação às quais a tangerina 'Sunki' apresenta bom comportamento agrônomo (Soares Filho et al, 2003).

Diante da relevância do estresse e as consideráveis perdas, torna-se fundamental a compreensão dos mecanismos de respostas das plantas, a fim de elucidar as estratégias utilizadas por estas em condições limitantes, bem como permitir o desenvolvimento de novas formas de cultivo e perspectivas para produção de citros no país.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar os mecanismos fisiológicos e o perfil metabolômico de genótipos de citros tolerantes à seca sob diferentes regimes hídricos.

### **2.2 Específicos**

- Caracterizar as respostas da deficiência hídrica nos diferentes porta-enxertos de citros;
- Avaliar os efeitos da competição de genótipos, com padrões de respostas contrastantes, no comportamento fisiológico;
- Analisar as alterações no perfil metabolômico.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Citros – Histórico e aspectos gerais**

O gênero *Citrus*, da subfamília Aurantioidae e da família Rutaceae, compreende muitas espécies produtoras de algumas das melhores e mais cultivadas frutas do mundo, sendo as mais consumidas no país e estando presente na mesa de famílias de todas as classes sociais (Oliveira et al., 2008; Gomes, 2007). São originárias da Ásia meridional, cultivada nos pomares e jardins da Babilônia, das Hespérides e da Palestina há milhares de anos. Os registros mais antigos sobre os citros procedem da China, ao qual parece existir o maior repositório genético de rutáceas em nível mundial. O comércio entre as nações e as guerras ajudaram a expandir o cultivo dos citros e por volta de 1500, na expedição de Cristóvão Colombo, onde as mudas de frutas cítricas foram trazidas para o continente americano (Passos et al., 2013; Neves et al., 2010; Gomes, 2007).

A história da citricultura brasileira está intimamente ligada à própria história do Brasil, visto que poucos anos após a descoberta do país, a partir de 1530, os portugueses introduziram as primeiras sementes de laranja doce nos estados da Bahia e São Paulo (Passos, 1990). Fora do habitat original, as plantas cítricas encontraram condições melhores para vegetar e produzir, sendo as mais favoráveis na faixa subtropical, mas foi na faixa tropical que se verificou a maior evolução da cultura, expandindo-se por todo o território (Passos et al., 2013; Neves et al., 2010; Moreira, 1980). Naturalmente, com o aumento da população e do consumo, foram sendo plantadas em pequenos pomares caseiros e comerciais. Atualmente, todos os estados e territórios brasileiros produzem citros, sejam em maior ou menor escala. Em todo Brasil são mais de 3.000 municípios onde a cultura está presente (Neves et al., 2010; Moreira, 1980).

O centro-sul do país ganhou destaque, graças também ao estabelecimento de grandes núcleos populacionais, onde a citricultura encontrou afinal, seu principal centro de desenvolvimento (Moreira, 1980). O estado de São Paulo é o maior produtor nacional, liderando a produção das três principais frutas cítricas produzidas no país (laranja, limão e tangerina) (Santos Filho et al., 2005), com um pomar atual de 180.199.273 plantas cítricas, formado por 56.701 talhões, segundo a Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (2016).

Na Bahia, as primeiras notícias sobre o cultivo dos citros datam de 1549. Os primórdios da citricultura, no estado, estão no bairro do Cabula, em Salvador, onde foram feitas as primeiras enxertias de citros no Brasil, no século 19, e posteriormente em Alagoinhas, ao norte do Recôncavo. Sendo difundida por microrregiões homogêneas do agreste de Alagoinhas, litoral norte e concentrada no Recôncavo, estendendo-se desde o município de Rio Real, na fronteira com Sergipe, até Amargosa, a sudoeste do Recôncavo, abrangendo cerca de 30 municípios. A localização da maioria dos pomares é favorecida pela proximidade aos maiores centros consumidores, bem como pela maior precipitação pluvial (Cunha Sobrinho et al., 2013; Cunha Sobrinho, 1980). A produção está em crescente avanço no estado, aliás, a área da citricultura da Bahia e de Sergipe quase dobrou de tamanho desde o início da década de 1990 (Neves et al., 2010).

### **3.2 Citricultura no Brasil**

O Brasil é, notadamente, um país voltado para o agronegócio: é o maior produtor mundial de suco de laranja, café e cana-de-açúcar. A laranja e a maçã são as frutas mais desejadas em sabores de sucos e néctares, representando 35% e 16% da preferência, respectivamente (Carvalho, 2009) e a cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são produzidos nas fábricas brasileiras. O país detém 50% da produção mundial de suco de laranja e exporta 98% do que produz, sendo a Europa o principal destino das exportações brasileiras (Neves et al., 2010).

Entre os produtos cítricos, a área de laranja representa cerca de 55%, o que consolida essa cultura como a principal na citricultura e a mais produzida e consumida, no Brasil (Neves et al., 2010; Santos Filho et al., 2005). O produtor nacional especializou-se na produção de cultivares destinadas ao suco, diante da produção de suco concentrado de laranja destinado ao mercado externo, dando menor ênfase às cultivares de mesa (Santos Filho et al., 2005). Segundo Gomes (2007), os brasileiros preferem laranjas muito doces, enquanto os europeus gostam de encontrar uma certa acidez. Os brasileiros preferem também Laranja Lima desprovida de ácido, que os europeus não apreciam. Sendo assim, as laranjas de exportação, além de terem certo ácido, embora pouco, necessitam ter bom aspecto, tamanho médio ou pequeno e grande resistência ao transporte.

O Brasil reafirmou sua posição como principal produtor e exportador mundial de laranja e suco concentrado e congelado, com produção de 17.549.536 toneladas,

equivalentes a 430.136 caixas de 40,8 kg. Apesar de mostrar dados invejáveis, o setor citrícola nacional, principalmente o voltado para a exportação de suco, enfrenta dificuldades severas desde 2006 e, um dos motivos foi à crise de consumo mundial do suco de laranja, aliado à crise econômica americana de 2009. As novas opções de bebidas, tais como energéticas e isotônicas, a preços mais em conta que os sucos, mudaram o padrão de consumo mundial. A Bahia, segundo maior produtor e com produção voltada para frutas *in natura*, sofreu com a estiagem, fazendo com que a produção decrescesse 4,1%. Os pomares foram reduzidos em 3,0% e o rendimento médio reduzido em 1,1%. Rio Real, o maior produtor baiano, encontra-se em quinto lugar no ranking geral dos maiores produtores nacionais, com produção de 357.000 toneladas ou 8.750 caixas de 40,8kg (IBGE, 2013).

Mesmo a citricultura brasileira sendo líder mundial, ainda há um declínio de sua produção no país. Segundo dados do IBGE, em 2015, a laranja apresentou variação percentual negativa de 4,9% na estimativa de produção em relação ao ano anterior (IBGE, 2016). Vale reforçar que, entre os anos de 1988 e 2014, um mapeamento realizado com base em imagens de satélite, mostrou a expansão da cana-de-açúcar em detrimento da diminuição das áreas ocupadas pela citricultura em São Paulo, sendo um dos principais motivos à baixa lucratividade no setor nos últimos tempos. Entretanto, o Brasil não é o único país a enfrentar dificuldades na citricultura. A Califórnia, maior produtor de citros do estado americano, vem sofrendo efeito de um dos maiores períodos de seca da história. A estiagem prolongada ameaçou o ritmo da produção, mas devido à alta quantidade de áreas irrigadas na região, há a perspectiva de um crescimento de 8% no volume colhido, mesmo diante ao cenário complicado. E na Flórida, enfrenta-se a menor safra de sua história, nos últimos dez anos. Tanto a produção de laranja na Flórida, quanto a demanda pelo suco, nos Estados Unidos, vêm registrando retração (CITRUSBR, 2016).

### **3.3 Interação copa/porta-enxerto**

Na produção de citros, a enxertia é o método mais utilizado por apresentar algumas vantagens, entre as quais se pode citar a uniformidade das mudas, pelo uso de porta-enxertos poliembriônicos, precocidade no início de produção e aumento na produtividade, além de obter-se mudas praticamente idênticas à planta-mãe (Oliveira et al., 2008; Andrade; Martins, 2003). Isto ocorre, visto que a enxertia é um processo de propagação dos vegetais superiores que tem por finalidade a associação entre



indivíduos geneticamente diferentes e, conseqüentemente, com sistemas fisiológicos, bioquímicos e anatômicos distintos, que diante deste, constitui um único indivíduo vegetal produtivo e longevo (Pompeu Junior, 2005; César, 1996; Amaral, 1994).

Estudos científicos apontam que o uso da enxertia em alguns casos pode dar maior resistência a adversidades climáticas, como baixas temperaturas, aumentar a tolerância à seca e salinidade do solo, controlar desordens fisiológicas, aumentar o vigor da planta e controlar doenças bem como aumentar a produção, fazendo com que os produtos melhorem em qualidades gustativas, melhorar o aspecto externo dos frutos, dentre outros (Goto et al., 2003; Cunha Sobrinho et al., 1980).

Os porta-enxertos afetam mais de 20 características hortícolas e patológicas dos citros, destacando dentre eles: absorção, síntese e utilização de nutrientes; transpiração e composição química das folhas; resposta a produtos de abscisão de folhas e de frutos; porte, precocidade de produção e longevidade das plantas; maturação, peso e permanência de frutos na planta; coloração da casca e do suco; teores de açúcares, ácidos e de outros componentes do suco; tolerância a pragas, doenças e fatores abióticos, como frio, salinidade e seca; conservação pós-colheita; produtividade; e qualidade da frutas (Pompeu Junior, 1980). Um porta-enxerto deve reunir algumas características mínimas para o seu favorecimento. Uma característica importante é ter alta taxa de poliembrionia para produzir um grande número de descendentes com as mesmas características genéticas, visto que todas as copas receberão influência idêntica de cada porta-enxerto utilizado, propiciando um melhor manejo e um pomar bastante uniforme, mas a principal vantagem é a manutenção das características desejadas de um porta-enxerto conhecido (Carlos et al., 1997).

Outra característica desejada aos porta-enxertos é a abundância de sementes que facilita muito a operacionalidade do processo de extração incrementando a eficiência do mesmo. Deve-se também ter características desejáveis à enxertia como imunidade à doença que se pretende controlar, vigor e rusticidade, boa afinidade, alta produtividade e qualidade dos frutos, dentre outras (Peil, 2003; Carlos et al., 1997). O conhecimento das características dos porta-enxertos e a racional utilização delas permite maior produtividade, quer pelo aumento da produção, quer pelo adiantamento ou atraso na maturação dos frutos (Pompeu Junior, 1980).

O limoeiro ‘Cravo’, também conhecido pelos nomes Rosa, Bravo, Vinagre, Vermelho, Francês, Galego, dentre outros, tem origem indiana, onde é há muito tempo usado como porta-enxerto (Cunha Sobrinho et al., 2013; Donadio et al., 1995; Pompeu

Junior, 1980). É tolerante à tristeza, mas não a algumas doenças importantes, tais como exocorte, xiloporose e declínio. Adapta-se bem a vários tipos de solos. A qualidade dos frutos apenas regular é um dos seus defeitos, compensado pela boa tolerância à seca e a salinidade (Pompeu Junior, 1980). No Brasil, o limoeiro ‘Cravo’ se tornou o principal porta-enxerto, exceção feita aos estados de Sergipe, com o qual o limoeiro ‘Cravo’ divide com o limoeiro ‘Rugoso’ a sustentação dos pomares, com predominância do primeiro, e no Rio Grande do Sul, onde prevalece o emprego do Trifoliata (Cunha Sobrinho et al., 2013). Além do Brasil, é também empregado na Argentina, Texas e Índia, porém em menor frequência (Pompeu Junior, 1980). Contudo, é de se supor que o uso generalizado destes para as mais variadas copas e tipos de solo não atenda às necessidades de todos os genótipos (Pompeu Junior, 1980). Na Flórida, por exemplo, o limoeiro ‘Cravo’ não mostrou vantagens substanciais comparadas ao limoeiro ‘Rugoso’ (Castle et al., 1993).

A tangerineira ‘Sunki’ é uma espécie de microtangerina, de origem do sul da China. Até o momento, tem mostrado tolerância ao declínio, uma das razões da sua indicação para alguns locais. Suas características de comportamento são parecidas às da tangerineira ‘Cleópatra’, em solos argilosos e arenosos induz às copas nela enxertadas maior produção de frutos e entrada mais cedo em produção que essa última, sua maior limitação é a alta suscetibilidade à podridão causada por *Phytophthora* spp., produzindo também poucas sementes por frutos (Cunha Sobrinho et al., 2013; Pompeu Junior, 1980).

Duas seleções de tangerineiras ‘Sunki’ foram identificadas e caracterizadas na Embrapa Mandioca e Fruticultura, com os nomes de ‘Sunki Maravilha’ e ‘Sunki Tropical’. A tangerineira ‘Sunki Maravilha’ produz cerca de oito sementes por frutos, mais que o dobro observado em seleções comuns dessa cultivar, no qual produz cerca de três sementes. Ainda tem como vantagem a taxa de poliembrionia que chega a cerca de 100% e tem ainda moderada resistência à gomose causada por *Phytophthora* (Cunha Sobrinho et al., 2013; Soares Filho et al., 2003). A tangerineira ‘Sunki Tropical’ é uma possível mutação natural de origem nucelar da tangerineira ‘Sunki’ comum. Tem boa potencialidade como porta-enxerto em viveiros comerciais, em função da resistência à podridão causada por *Phytophthora* spp., bom número médio de sementes por frutos, cerca de dezenove sementes, boa tolerância a seca e ao declínio dos citros, boa compatibilidade e indução de alta produtividade a diversas copas cítricas comerciais como laranjeira ‘Pera’ e limeira ácida ‘Tahiti’. Possui ainda

uma elevada porcentagem de poliembrionia, ao redor de 100% (Cunha Sobrinho et al., 2013; Soares Filho et al., 2002).

### **3.4 Diversificação de porta-enxertos**

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja (IBGE, 2013). Todavia, estas plantas enxertadas encontram-se em um número reduzido de porta-enxertos, sendo o limoeiro ‘Cravo’ o principal utilizado no Brasil com maior incidência nas regiões Sudeste e Nordeste. Ressalta-se que mesmo havendo outros porta-enxertos resultantes de experimentos que possibilitem a diversificação das combinações copa/porta-enxerto, o citricultor ainda insistia no uso excessivo do limoeiro ‘Cravo’, devido as suas características hortícolas desejáveis. No entanto, há o risco do surgimento de outras doenças ou distúrbios que possam torná-lo vulnerável dificultando seu uso e gerando grandes perdas, como é o caso da susceptibilidade do limoeiro ‘Cravo’ ao declínio, à morte súbita, ao nematoide dos citros, à exocorte, à xiloporose e à verrugose (Oliveira et al., 2008; Andrade; Martins, 2003; Azevêdo, 2003; Schafer et al., 2001).

Atualmente, o limoeiro ‘Cravo’ ainda corresponde a 50% da produção dos viveiros, no entanto o genótipo vem perdendo espaço nos últimos anos. “Hoje, o produtor busca diversificar os porta-enxertos. A procura pelo citrumelo ‘Swingle’ cresceu e já representa 40% da produção de mudas. O restante se refere os demais genótipos, como as tangerineiras ‘Cleópatra’ e ‘Sunki’, a laranjeira ‘Caipira’ e o Trifoliata”, afirma o presidente da Organização Paulista de Viveiros de Mudas Cítricas (Vivecitrus), Ricardo Krauss. Em algumas fazendas como em Santa Cruz do Rio Pardo (SP), o limoeiro ‘Cravo’ não é mais utilizado como porta-enxerto há seis anos. Em seu lugar estão citrumelo ‘Swingle’, ‘Sunki’ e ‘Cleópatra’, que duram até dez anos a mais no pomar (FUNDECITRUS, 2013).

Nesse âmbito, a tangerineira ‘Sunki’ vem ganhando maior destaque. Esta foi empregada na produção de 9,3% das mudas, no período entre 2004 a 2007, superior à sua utilização de 1999 a 2004, quando participou com apenas 1,8% (Cunha Sobrinho et al., 2013). E, atualmente, a tangerineira ‘Sunki Tropical’ vem se destacando entre as mais promissoras dentre os porta-enxertos lançados recentemente (FUNDECITRUS, 2013).

A utilização de um único porta-enxerto constitui um ponto de grande vulnerabilidade da citricultura brasileira, tornando necessária a realização de um programa de diversificação em nível nacional (Cunha Sobrinho et al., 1980).

### **3.5 Déficit hídrico**

Desde os antigos povos sumérios, o homem tem procurado uma alternativa mais efetiva do aproveitamento da água para superar os efeitos do déficit hídrico às plantas (Santos; Carlesso, 1998). Contudo, as áreas afetadas pela seca aumentaram substancialmente desde meados do século 20, diante das mudanças climáticas. Como resultado, plantas sofrerão um crescente estresse hídrico, por déficit, em muitas regiões do mundo (Gray; Brady, 2016; Dai, 2011).

No Brasil há uma grande diversificação agroclimática e de condições particulares de cultivo, compreendendo uma multiplicidade de ambientes (Cerqueira et al., 2004). Em algumas regiões do país há uma distribuição irregular de chuvas, com meses com as quantidades exigidas ou excessivas e outros com deficiência de água, afetando diretamente algumas culturas como é o caso do citros (Cunha Sobrinho; Passos, 2004; Schafer et al., 2001; Montenegro, 1980). No nordeste brasileiro, a expressão socioeconômica da citricultura é incontestável. No entanto, a produtividade é baixa, devido, principalmente, ao déficit hídrico que ocorre de modo mais acentuado, nos meses mais quentes do ano, de novembro a fevereiro (Cruz et al., 2003).

A má distribuição das chuvas impõe sérios riscos à citricultura, em razão de 70 a 75% das chuvas estarem concentradas em 5 a 6 meses contínuos (abril a setembro, com maior frequência de junho a agosto) nessas regiões (Cunha Sobrinho et al., 2013). O requerimento hídrico para uma boa produção de frutos em citros é cerca de 900 a 1.200 mm por ano e varia com a demanda evapotranspirométrica, solo, copa e com o porta-enxerto utilizado (Donato et al., 2007). Na Bahia, a faixa citrícola apresenta volume de chuvas em torno de 1.100 mm que é considerado quase ideal. No entanto, é mal distribuído e de intensidade irregular, principalmente nos períodos críticos de floração e frutificação (Cunha Sobrinho; Passos, 2004).

O estresse hídrico por déficit pode ser definido como todo o conteúdo de água de um tecido ou célula que está abaixo do conteúdo de água no estado de maior hidratação. A água é o principal constituinte protoplasmático, compondo de 80 a 95% da massa de tecidos vegetais em crescimento, exercendo uma diversidade de funções fisiológicas. De todos os recursos de que a planta necessita para crescer e funcionar, a

água é o mais abundante e, ao mesmo tempo, o mais limitante para a produtividade agrícola, se tornando fato pelo qual existem práticas de irrigação de culturas (Pimenta, 2004; Taiz; Zeiger, 2004). Qualquer limitação na disponibilidade de água afeta quase todas as funções da planta, incluindo a capacidade de folhas de assimilar dióxido de carbono e a absorção de nutrientes pelas raízes (Schulze, 1991). Salienta-se a importância deste recurso, por exemplo, para o desenvolvimento do fruto na citricultura no qual, observa-se um aumento de 1,5 cm<sup>3</sup> para cada 2,5 mm de água, e um ganho de 4,0 cm<sup>3</sup> para cada 25,0 mm de lâmina d'água (Santos Filho et al., 2005).

O déficit hídrico é o estresse ambiental que causa mais prejuízos às plantas, afetando sensivelmente seu desenvolvimento pela paralisação do crescimento celular, tanto em expansão do volume quanto em número de células, além de inibir a síntese de proteínas. Dependendo da intensidade e da duração do estresse imposto à planta, todos os processos fisiológicos são afetados (Castro Neto, 2013). Como forma de sobreviver às condições adversas de estresse, as plantas acionam seus mecanismos de percepção de sinais externos e respondem ativando mudanças moleculares e fisiológicas específicas para minimizar os danos (Zandalinas et al, 2016; Dos Reis et al., 2012).

### **3.6 Fisiologia do estresse por déficit hídrico**

A maioria das plantas cresce em ambientes que não são favoráveis para o seu desenvolvimento, estando frequentemente expostas ao estresse ambiental, e em consequência, elas têm desenvolvido numerosas adaptações a fim de garantir a sobrevivência, o crescimento e a produtividade (Taiz; Zeiger, 2004; Boyer, 1982). Na agricultura, o sucesso reprodutivo é medido não apenas pela capacidade de deixar descendentes em períodos de cultivo, mas também pela produtividade. Assim, as forças evolutivas são arranjadas de forma diferente seja para a sobrevivência ou produtividade, levando a pressões de seleção provocadas pelo homem para garantir uma agricultura bem sucedida (Boyer, 1982).

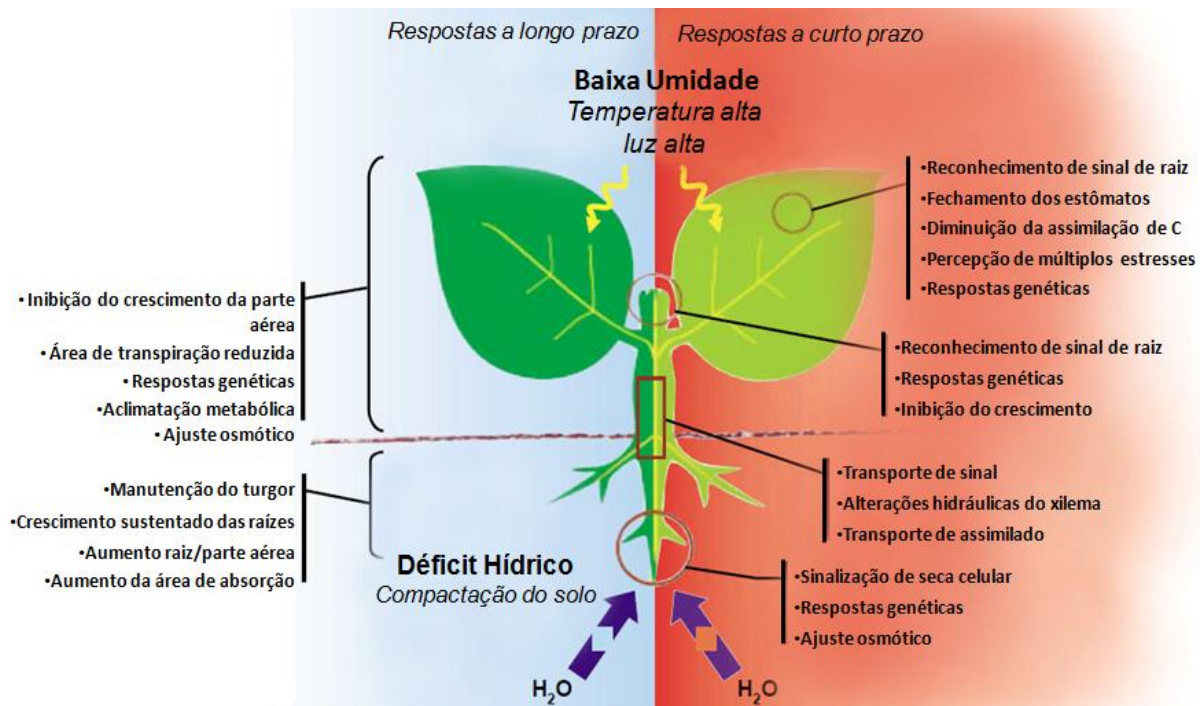
Em se tratando de citricultura, para produzir economicamente, torna-se necessário satisfazer a fisiologia do vegetal, fornecendo à planta, no momento preciso, a quantidade de água suficiente para que ela se desenvolva normalmente e alcance o máximo de seu rendimento (Oliveira; Coelho, 1980). Logo, a produtividade da planta depende da quantidade de água disponível deste recurso e da eficiência do seu uso pelo organismo (Taiz; Zeiger, 2004). A depender da fase onde ocorrer o déficit hídrico, este pode acarretar danos ao fruto, limitando sua produção, mudando o seu

padrão de tamanho e peso, assim como interferindo na sua qualidade (Castro Neto, 2013).

As plantas são muito responsivas às alterações ambientais, sendo em teoria, os melhores indicadores de disponibilidade de água no ambiente, afinal elas automaticamente integram os fatores atmosféricos e do solo afetando assim o seu estado. Como exemplo, muitas plantas apresentam sintomas de murcha temporária ao meio-dia e fechamento parcial de estômatos em dias ensolarados, mesmo quando crescendo em solo úmido. No entanto, se elas mostram evidências de estresse ao amanhecer, a água do solo provavelmente está se tornando limitante (Kramer; Boyer, 1995).

As plantas cítricas apresentam uma dinâmica de crescimento que está relacionada ao meio ambiente. Durante seu desenvolvimento, verificam-se mudanças no tamanho, na área foliar e no sistema radicular, todas acompanhadas de alterações ou substituições no sistema vascular da planta, sob influência do ambiente (Castro Neto, 2013). Diversos estudos vêm sendo realizados a fim de elucidar os mecanismos pelos quais as plantas respondem as adversidades climáticas, principalmente no âmbito da seca.

A deficiência hídrica provoca alterações na resposta da planta, cuja irreversibilidade vai depender da cultura, da duração, severidade do estresse, e do estágio de desenvolvimento da planta (Santos; Carlesso, 1998). No ambiente, as plantas podem ser sujeitas a escassez de água lentamente, durante o desenvolvimento (dentro de dias a semanas ou meses) ou enfrentam déficits de água de curto prazo (horas a dias). No caso de déficits de água que se desenvolvem lentamente, as plantas podem escapar da desidratação ao encurtar seu ciclo de vida ou otimizar seu ganho de recursos a longo prazo por meio de respostas de aclimação. No caso de desidratação rápida, as plantas reagem minimizando a perda de água ou exibindo proteção metabólica (induzida ou constitutiva) contra os efeitos prejudiciais da desidratação e co-desenvolvimento do estresse oxidativo (Chaves et al, 2003) (Fig. 1). A seca é independente da planta, então ela pode ser uniformemente aplicada a qualquer genótipo ou espécie presente num ambiente. Assim, a resposta da planta pode mudar drasticamente de acordo com o genótipo e o ambiente (Gilbert; Medina, 2016; Chaves et al, 2003).



**Figura 1:** Respostas de plantas inteiras ao Déficit Hídrico. Respostas à esquerda, a longo prazo ou de aclimação; Direita, respostas de curto prazo. Adaptado de Chaves et al., 2003 (Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant/*Functional Plant Biology*)

As plantas podem suportar condições de seca evitando a desidratação dos tecidos, mantendo o potencial hídrico destes o mais alto possível ou tolerando o baixo potencial hídrico. A evasão de desidratação é comum a plantas anuais e perenes e está associada a uma variedade de características adaptativas. Estes envolvem minimizar a perda e maximizar a absorção de água (Chaves et al, 2003), logo plantas capazes de obter mais água ou com maior eficiência no seu uso irão tolerar melhor à seca (Taiz; Zeiger, 2004). Os danos inerentes ao estresse podem ser reversíveis ou irreversíveis e, em resposta a esses desvios de condições, ocorre aclimação ou adaptação (Gilbert; Medina, 2016).

O fechamento estomático reduz a evaporação foliar e é uma das primeiras linhas de defesa contra a dessecação, uma vez que é um processo mais rápido e flexível do que alternativas como mudanças no ciclo de vida, crescimento radicular ou foliar, que são mais adequadas à longo prazo (Chaves, 1991).

Durante o início da seca, a diminuição da condutância estomática leva a menor influxo de CO<sub>2</sub> para os cloroplastos, reduzindo as taxas fotossintéticas, principalmente por essa restrição da difusão de CO<sub>2</sub>, e contribuindo para o menor acúmulo de biomassa para a manutenção do desenvolvimento vegetal (Verslues et al, 2006;

Chaves, 1991). Quando o estresse torna-se severo a desidratação de células do mesófilo inibe a fotossíntese, o metabolismo do mesófilo é prejudicado e a eficiência do uso da água decresce (Taiz; Zeiger, 2004).

Sob seca ou alta salinidade, o ácido abscísico (ABA) parece ser um importante hormônio de sinalização de estresse (Finkelstein, 2013), e está envolvido na regulação do fechamento dos estômatos, síntese de osmolitos compatíveis e aumento da regulação de genes que levam a respostas adaptativas (Zandalinas et al, 2016). Outros hormônios, além de ABA, provavelmente estarão envolvidos na regulação da abertura estomática, isoladamente ou atuando em conjunto com ABA. Vale-se ressaltar que, uma vez que a condutância estomática é controlada em grande parte por ABA, medições de perda de água da folha é muitas vezes mais útil como um indicador de acumulação de alterada ou sensibilidade ao ABA (Verslues et al., 2006). Além do ABA, o ácido salicílico (SA) também está envolvido na regulação das respostas de seca. Bandurska e Stroiński (2005) obtiveram a primeira confirmação da acumulação deste composto em estresse hídrico, por déficit, no qual notou-se um significativo aumento de SA em raízes de cevada, entretanto o mesmo não foi observado nas folhas. Isso indica que este acúmulo foi ocasionado pelo contato direto com o fator de estresse não sendo transportada para as folhas.

Quando a evolução do déficit é lenta, acarreta em vários efeitos sobre o desenvolvimento da planta, uma das quais é a limitação da expansão foliar (Taiz; Zeiger, 2004). Schurr et al. (2000) constataram que o estresse hídrico, por déficit, afetou o crescimento das folhas de *Ricinus communis* quando comparadas a folhas de plantas bem irrigadas, estas sob estresse tiveram folhas em tamanho menor. Outra resposta causada pelo déficit hídrico é a abscisão foliar. A perda de folhas mais velhas contribuem para economizar água, permitindo a realocação de nutrientes armazenados em folhas mais velhas para o tronco ou folhas mais jovens. Durante a senescência induzida pela seca, algumas proteases são induzidas, são específicas à seca e não ocorrem sob envelhecimento natural, como é o caso de algumas formas de cisteína proteases (Chaves et al., 2003; Khanna-Chopra et al., 1999), ao qual tiveram expressão significativa quando verificadas em brócolis após colheita sob condições de seca (Coupe et al, 2003).

A área foliar e a condutância estomática são os principais fatores que afetam as taxas transpiratórias e, com isso, a sua diminuição permite que o potencial hídrico aumente ou se mantenha dentro dos limites que possibilitem o desenvolvimento



vegetal (Verslues et al., 2006). Como forma de tolerância em casos de deficiência hídrica severa, com a diminuição da transpiração, as plantas promovem o influxo de água, através do acúmulo de solutos na célula, que reduz o potencial osmótico, em processo denominado ajustamento osmótico (Zhang et al., 1999).

Nessas condições de estresse, o crescimento da raiz é muitas vezes mantida ou pode até mesmo ser estimulado em resposta a deficiência hídrica como mecanismo de obtenção de água no solo nas camadas mais profundas (Gray; Brady, 2016; Xu et al, 2010). Moumeni et al. (2011) observaram que em situação de déficit hídrico, houve a ativação de genes responsáveis pelo crescimento e alongamento na ponta das raízes de espécies de arroz tolerante a seca. Todavia, em seca extrema do solo, não há aumento da relação raiz/parte aérea, o que implica supor que há um limite de umidade do solo em resposta a alocação de biomassa das plantas ao estresse hídrico (Xu; Zhou, 2005). Corroborando, Chaves et al. (2003) afirmaram que se o estresse tornar-se severo, a planta não é mais capaz de manter um equilíbrio entre a absorção de água e a perda, sendo necessário mecanismos adicionais para manter as funções da planta.

Outro mecanismo associado à sobrevivência da planta diante ao estresse é a produção de compostos osmorreguladores, como a prolina. Ocorre uma indução da síntese deste aminoácido e inibição da sua degradação, sendo que a concentração deste, nessas condições, varia entre as espécies vegetais e depende do nível do estresse ao qual foram expostas (Delauney; Verma, 1993). O estresse pela seca promove também a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que pode ser prejudicial às proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos por serem extremamente reativos, resultando em estresse oxidativo (Smirnoff, 1993). Porém, um aumento de ROS durante a pré-seca pode ser revertida na sequência da reposição de água. Um estudo constatou que houve uma diminuição acentuada na  $H_2O_2$ , da taxa fotossintética líquida e taxa de transpiração em plantas reidratadas após 70 dias de deficiência hídrica severa (Sofa, 2005).

É válido ressaltar que, no campo, uma planta pode sofrer vários estresses abióticos distintos simultaneamente ou em diferentes momentos da estação de crescimento e um estresse pode diminuir a capacidade de uma planta para resistir a um segundo estresse (Tester; Bacic, 2005), causando a possibilidade de outras respostas fisiológicas e moleculares. Zandalinas et al. (2016), observaram estas influências em citros, no qual estabeleceram condições de estresse térmico e hídrico, separadamente e

conjuntamente, e observaram que a combinação de estresse propiciou diferentes respostas, como a análise do teor relativo de água (TRA) no qual houve uma redução significativa deste quando os estresses eram simultâneos, provavelmente porque a seca induz perda de água e a temperatura elevada condiciona o aumento da transpiração.

### **3.7 Metabolômica**

Oliver et al. (1998) foram os primeiros a mencionar o conceito de metaboloma, descrevendo estes como pequenas moléculas sintetizadas pelo organismo. Desde então, vários pesquisadores tentam definir e explicar a metabolômica. Hall (2006) define metaboloma como a composição de todas as pequenas moléculas presentes em um organismo, e então seria nesse âmbito a tecnologia voltada para o fornecimento de uma visão geral, compreensiva, qualitativa e quantitativa dos metabólitos presentes em tecidos e órgãos.

O conceito de que um gene - um RNAm - uma proteína - um produto - está em colapso. Há muito mais proteínas do que genes em células, assim os organismos produzem muito mais metabólitos do que genes, visto que são capazes de produzir múltiplos RNAm por um único gene (Schwab, 2003). Neste contexto, o estudo da metabolômica é o mais recente e está em fase exponencial de crescimento, sendo usado para se referir ao conjunto de todos os metabólitos que são produzidos e/ou modificados pelo organismo (Villas-Bôas; Gombert, 2006). Logo, seus objetivos são catalogar e quantificar as inúmeráveis pequenas moléculas encontradas em fluidos biológicos em diferentes condições, no estudo de como o perfil metabólico de um sistema biológico complexo muda em resposta a estresses como doenças, exposição a substâncias tóxicas, ou mudança na dieta (Krastanov, 2010).

Os metabólitos, como substratos, produtos ou cofatores nas reações bioquímicas, desempenham um papel muito importante na conexão das diferentes vias metabólicas que operam dentro de uma célula viva. O nível destes representa uma informação integrativa da função celular em nível molecular, definindo assim o fenótipo de uma célula ou tecido em resposta a alterações ambientais ou genéticas. O metaboloma de uma célula ou tecido tem a capacidade de responder rapidamente a qualquer alteração ambiental e/ou genética, sendo inclusive capaz de caracterizar mutações ditas silenciosas (Villas-Bôas; Gombert, 2006).

A metabolômica de plantas é a área que está mais avançada e vem sendo estudada para diversos âmbitos, por exemplo, para controle de qualidade de alimentos

e para identificação de produtos contendo organismos geneticamente modificados (OGM's) (Villas-Bôas; Gombert, 2006).

Os metabólitos secundários podem representar importância econômica na agricultura e melhoramento de plantas, com a finalidade de selecionar genótipos que proporcionem bons rendimentos juntamente com alta qualidade, resistência a patógenos e estresses ambientais (Wink, 1988).

Um grande desafio da metabolômica é que muitos intermediários metabólicos possuem um tempo de vida muito curto dentro das células o que dificulta a sua detecção. Outra dificuldade está em sua análise, visto que diferente da genômica, da transcriptômica e proteômica, a metaboloma é menos estável e possui uma gama de compostos que compreendem desde espécies iônicas a carboidratos hidrofílicos, alcoóis e cetonas voláteis, aminoácidos e ácidos orgânicos, lipídeos hidrofóbicos e produtos naturais complexos (Villas-Bôas; Gombert, 2006). Para caracterizar e quantificar estes compostos é necessário à utilização de metodologias e equipamentos específicos, de acordo com as características de cada classe. Portanto, a metabolômica engloba diversas tecnologias analíticas, que necessitam ser cuidadosamente selecionadas, de acordo com os metabólitos e a via metabólica de interesse, ou com a questão biológica a ser respondida (Abdelnur, 2011).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNUR, P. V. Metabolômica e espectrometria de massas. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011.

AMARAL, J.D. Os citrinos. Clássica Editora, 1994.

ANDRADE, R.; MARTINS, A.B.G. Propagação vegetativa de porta-enxertos para citros. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 134-136, 2003.

AZEVEDO, C.L.L. Sistema de produção de citros para o Nordeste. Embrapa Mandioca e Fruticultura: Cruz das Almas, BA. Sistema de Produção, 16. Versão eletrônica, 2003.

BANDURSKA, H; STROINSKI, A. The effect of salicylic acid on barley response to water deficit. Acta physiologiae plantarum, v. 27. n. 3B. 379-386, 2005.

BOYER, J. S. Plant Productivity and Environment. Science, v. 218, p. 443-448, 1982.

CARLOS, E.F.; STUCHI, E.S.; DONADIO, L.C. Porta-enxertos para a citricultura paulista. Jaboticabal: FUNEP, 47 p. (Boletim Citrícola, 1), 1997.

CARVALHO, A. Mercado Global de Bebidas. TetraPak, 2010. Disponível em: <<http://www.valor.com.br/sites/default/files/alexandre.pdf>>

CASTLE, W.S.; TUCKER, D.R.H.; KREZDORN, A.H.; YOUTSEY, C.O. Rootstocks for Florida citrus: Rootstock selection the first step to success. Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, 1989.

CASTRO NETO, M. T. de. Fisiologia. In: CUNHA SOBRINHO, A. P.; MAGALHÃES, A. F. de J.; SOUZA, A. da S.; PASSOS, O.S; SOARES FILHO, W. dos S. (Ed.). Cultura dos citros. Brasília, DF: Embrapa, 2013.

CERQUEIRA, E.C. et al. Resposta de porta-enxertos de citros ao déficit hídrico. Rev. Bras. Frutic. vol.26 no.3 Jaboticabal, 2004.

CÉSAR, H. P. Manual prático do enxertador: e criador de mudas de árvores frutíferas e dos arbustos ornamentais. 15º ed. São Paulo - SP: Nobel, 1996.

CHAVES, M.M. Effects of water deficits on carbon assimilation. Journal of Experimental Botany. v. 42, 1-16, 1991.

CHAVES, M.M.; MAROCO, J.P; PEREIRA J.S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. Functional Plant Biology, v. 30, 239-264, 2003.

CITRUSBR, Por mais Laranja no mundo. CitrusBR. São Paulo - SP: Ano 2, n. 7, 2016.

COUPE S.A., SINCLAIR B.K., WATSON L.M., HEYES J.A., EASON J.R. Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets. *Journal of Experimental Botany*, v. 54, n. 384: 1045-1056, 2003.

CRUZ, J. L.; PELACANI, C. R.; SOARES FILHO, W. S.; CASTRO NETO, M. T.; COELHO, E. F.; DIAS, A. T.; PAES, R. A. Produção e partição de matéria seca e abertura estomática do limoeiro 'Cravo' submetido a estresse salino. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 25, n. 3, p. 528-531, 2003.

CUNHA SOBRINHO, A. P. Aspectos da citricultura no norte e nordeste brasileiro. In: Rodriguez O.; Viégas F.C.P. (Eds). *Citricultura Brasileira*. Campinas: Fundação Cargill, 1980.

CUNHA SOBRINHO, A. P.da; PASSOS, O. S. Exigências Climáticas. In: MAGALHÃES, A. F. de J. *Cultivo dos citros*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2004.

CUNHA SOBRINHO, A. P; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S. Cultivares porta-enxerto. In: CUNHA SOBRINHO, A. P.; MAGALHÃES, A. F. de J.; SOUZA, A. da S.; PASSOS, O.S; SOARES FILHO, W. dos S. (Ed.). *Cultura dos citros*. Brasília, DF: Embrapa, 2013.

CUNHA SOBRINHO, A.P; SOARES FILHO, W.S; PASSOS, O.S.Porta-enxertos para citros. EMBRAPA – CNPMF. Cruz das Almas – BA, 1980.

DAI, A. Drought under global warming: a review. *Advanced Review*, v. 2, 45-65, 2011.

DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, v. 4, 215-223, 1993.

DONADIO, L. C.; FIGUEIREDO, J. O.; PIO, R. M. Variedades cítricas brasileiras. Jaboticabal: FUNEP. 228p, 1995.

DONATO, S.L.R. et al. Respostas de combinações de variedades copa e porta-enxerto de citros à deficiência hídrica. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.42, n.10, p.1507-1510, out. 2007.

DOS REIS, S. P., LIMA, A. M.; DE SOUZA, C. R. B. Recent molecular advances on downstream plant responses to abiotic stress. *International journal of molecular sciences*, v. 13, n. 7, 8628-8647, 2012.

FINKELSTEIN, R. Abscisic Acid Synthesis and Response. *The Arabidopsis Book*, 2013.

FUNDECITRUS. Diversificar porta-enxertos traz vantagens ao citricultor. *Citricultor*. Ano V, n. 22, p. 14-15, 2013.

GILBERT, M. E.; MEDINA, V. Drought adaptation mechanisms should guide experimental design. *Trends in Plant Science*, v. ;21, n. 8, :639-47, 2016.

GOMES, P. *Fruticultura brasileira*. 13.ed. São Paulo: Nobel, 2007.

GOTO, R; SANTOS, H.S.; CAÑIZARES, K. A. L. *Enxertia em hortaliças*. Editora UNESP. São Paulo-SP, 2003.

GRAY S.B., BRADY S.M. Plant developmental responses to climate change. *Developmental Biology*, v.419, n.1: 64-77, 2016.

HALL, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist*, Cambridge, v. 169, p. 453-468, 2006.

IBGE. 2013. *Produção Agrícola Municipal. Culturas Temporárias e Permanentes*. Rio de Janeiro - RJ, v.40, p. 1-102, 2013.

IBGE. 2016. *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola*. Rio de Janeiro - RJ, v. 29, n.9, p. 1-79 setembro, 2016.

KHANNA-CHOPRA, R; SRIVALLI, B.; AHLAWAT, Y. S. Drought induces many forms of cysteine proteases not observed during natural senescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 255, n. 2, 1999.

KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. *Water. Relations of Plants and Soils*. San Diego: Academic Press, 1995.

KRASTANOV, A. Metabolomics - the state of art. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 24, n. 1, p. 1537-1543, 2010.

MONTENEGRO, H.W.S. *Clima e Solo*. In: Rodriguez O.; Viégas F.C.P. (Eds). *Citricultura Brasileira*. Campinas: Fundação Cargill, 1980.

MOREIRA, C.S. *Melhoramento de citros*. In: Rodriguez O.; Viégas F.C.P. (Eds). *Citricultura Brasileira*. Campinas: Fundação Cargill, 1980.

MOREIRA, S. *História da citricultura no Brasil*. In: Rodriguez O.; Viégas F.C.P. (Eds). *Citricultura Brasileira*. Campinas: Fundação Cargill, 1980.

MOUMENI, A.; SATOH, K.; KONDOH, H.; ASANO, T.; HOSAKA, A.; VENUPRASAD, R.; SERRAJ, R.; KUMAR, A.; LEUNG, H; KIKUCHI, S. Comparative analysis of root transcriptome profiles of two pairs of drought-tolerant and susceptible rice near-isogenic lines under different drought stress. *BMC Plant Biology*, v. 11, n. 174, 2011.

NEVES, M. F.; KALAKI, R. B.; TROMBIN, V. G.. *O Retrato da Citricultura Brasileira*, CitrusBR. 2010.

- OLIVEIRA, R. P. et al. Porta-enxertos para citros. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. (Documentos, 226). 2008.
- OLIVEIRA, S. L. de; COELHO, Y. da S. Evapotranspiração dos citros em Cruz das Almas, Bahia. Cruz das Almas, Embrapa/CNPMPF, 1980.
- OLIVER, S.; WINSON, M. K.; KELL, D. B.; BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. Trends in Biotechnology, v. 16, p 373 -378, 1998.
- OSAKABE Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K.; TRAN L.-SP. ABA control of plant macrolelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. New Phytologist, v. 202 , p.35-49, 2014.
- PASSOS, O. S. A citricultura no mundo e no Brasil. EMBRAPA – CNPMPF. Cruz das Almas – BA, 1990.
- PASSOS, O.S; SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da Origem, classificação botânica e distribuição geográfica. In: CUNHA SOBRINHO, A. P.; MAGALHÃES, A. F. de J.; SOUZA, A. da S.; PASSOS, O.S; SOARES FILHO, W. dos S. (Ed.). Cultura dos citros. Brasília, DF: Embrapa, 2013.
- PEIL, R. M. A enxertia na produção de mudas de hortaliças. Ciência Rural, Santa Maria, v. 33, n. 6, p. 1169-1177, 2003.
- PIMENTA, J. A. Relações Hídricas. In: KERBAUY, G. B. Fisiologia Vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos para citros. In: Rodriguez O; Viégas FCP (Eds). Citricultura Brasileira. Campinas: Fundação Cargill 1: 1980.
- POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). Citros. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. p. 61-104. 2005.
- SANTOS FILHO, H. P.; MAGALHÃES, A. F. de J.; COELHO, Y.da S. (Ed.). Citros: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Série - Coleção 500 perguntas, 500 respostas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005.
- SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 2, n.3, 287- 294, 1998.
- SÃO PAULO (Estado). Secretaria da Agricultura e Abastecimento. Dados da Citricultura do Estado de São Paulo. Consolidado da Citricultura. São Paulo, 2016.
- SCHAFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A.L.C. Porta-enxertos utilizados na citricultura. Ciência Rural, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 723-733, 2001.

SCHULZE, E. D. Water and Nutrient Interactions with Plant Water Stress. In: MOONEY, H. A.; WINNER, W. E.; PELL, E. J. Response of Plants to Multiple Stresses. San Diego, California: Academic Press, Inc., 1991.

SCHURR, U., HECKENBERGER, U., HERDEL, K., WALTER, A., FEIL, R. Leaf development in *Ricinus communis* during drought stress: dynamics of growth processes, of cellular structure and of sink-source transition. *Journal of Experimental Botany*, v. 51, n. 350, 2000.

SCHWAB, W. Metabolome diversity: Too few genes, too many metabolites? *Phytochemistry*, v. 62, p. 837-849, 2003.

SMEKALOVA, V.; DOSKOCILOVÁ, A.; KOMIS, G.; SAMAJ, J. Crosstalk between secondary messengers, hormone and MAPK modules during abiotic stress signaling in plants. *Biotechnology Advances*, v. 32, p. 2–11, 2014.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, v. 125, 27-58, 1993.

SOARES FILHO, W. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S.; MOITINHO, E. D. B. 'Maravilha': uma nova seleção de tangerina 'Sunki'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 25, n. 2, pp. 268-271, 2003.

SOARES FILHO, W. S.; DIAMANTINO, M. S. A. S.; MOITINHO, E. D. B.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S. 'Tropical': uma nova seleção de tangerina 'Sunki'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 24, n. 1, pp. 127-132, 2002.

SOFO, A.; TUZIO, A. C.; DICHIO, B., XILOYANNIS, C. Influence of water deficit and rewatering on the components of the ascorbate–glutathione cycle in four interspecific *Prunus* hybrids. *Plant Science* v. 169, 403–412, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3. ed. Artmed: Porto Alegre, 2004.

TESTER, M.; BACIC, A. Abiotic Stress Tolerance in Grasses. From Model Plants to Crop Plants. *Plant Physiology*, v. 137, 2005

VERSLUES, P. E., AGARWAL, M., KATIYAR-AGARWAL, S., ZHU, J.; ZHU, J. K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, v. 45, n. 4, 523-539, 2006.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma: Uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. *Biociência*, Ano IX, v. 36, p. 58-69, 2006.

WINK, W. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivore. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 75, p. 225-233, 1988.



XU, Z-Z; ZHOU, G-S. Effects of water stress and nocturnal temperature on carbon allocation in the perennial grass, *Leymus chinensis*. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*, v.123: 272–280, 2005.

ZANDALINAS, S.I; RIVERO, R.M; MARTÍNEZ, V; GÓMEZ-CADENAS, A; ARBONA, V. Tolerance of citrus plants to the combination of high temperatures and drought is associated to the increase in transpiration modulated by a reduction in abscisic acid levels. *BMC Plant Biology*, v.16, n.105, 2016.

ZHANG, J.; NGUYEN, H. T.; BLUM, A. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *Journal of Experimental Botany*, n. 50, 291–302, 1999.

## **CAPÍTULO I**

**Evaluation of drought tolerance in citrus based on water competition in the soil by  
rootstocks**

(Artigo submetido à revista *PLOS ONE*)

***Evaluation of drought tolerance in citrus based on water competition in the soil by rootstocks***

Andressa Rodrigues de Oliveira Sousa<sup>1</sup>; Maurício Antônio Coelho Filho<sup>2</sup>; Liziane Marques dos Santos<sup>3</sup>; Matheus de Carvalho Silva<sup>1</sup>; Elaine Silva da Cruz<sup>1</sup>; Carlos Alberto da Silva Ledo<sup>2</sup>; Walter dos Santos Soares Filho<sup>2</sup>; Marcio Gilberto Cardoso Costa<sup>1</sup>; Fabienne Micheli<sup>1</sup>; Abelmon da Silva Gesteira<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Jorge Amado, km 16, 45662-900, Ilhéus, BA, Brazil

<sup>2</sup> Embrapa Mandioca e Fruticultura

<sup>3</sup> Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia 44380-000, Brazil

\*Corresponding author: [abelmon.gesteira@embrapa.br](mailto:abelmon.gesteira@embrapa.br)

## ABSTRACT

Brazil is a country focused on its agribusiness, and is the world's largest producer of orange juice. However, citrus production in the world is affected by irregular rainfall in certain regions, imposing drought stress conditions and causing behavioral changes in plants to ensure survival, growth and productivity. In this context, the objective of this work was to assess a methodology for the selection of rootstocks of citrus tolerant to drought when exposed to water deficit. This work was conceived with prior knowledge of responses to drought tolerance of rootstocks: Rangpur Lime (RL), Sunki Tropical (ST) and Sunki Maravilha (SM). The study was carried out with Valencia Orange (VO) scion variety grafted on these three rootstocks. Two plants were conditioned per pot forcing competition for available water in the soil and all combinations were exposed to three different water regimes (irrigated, under water deficiency and rehydrated), and the hydric and physiological relationships were then evaluated. The results showed that in addition to the availability of water, the association between genotypes in the same pot caused different physiological responses. Due to the contrasting strategies of survival/tolerance adopted by these genotypes in response to water deficit, the combination of these allowed a higher tolerance to the RL, showing less water extraction, lower leaf water potential and relative water content, as well as an increase of the photosynthetic parameters when combined mainly with SM. The methodology used is a promising and more effective by the possibility of a superior tolerance tool for analyses of citrus plants under drought stress conditions.

## **Introduction**

The production of citrus in Brazil has global importance, and the country is the largest producer of orange juice worldwide, holding 50% of the global production and exporting 98% of its production primarily to Europe [1]. Citrus include the most consumed fruit in the country and in the world, and is widely consumed by families of all income levels [2]. Nevertheless, agriculture faces a decline in water availability, a reduction of arable land and a sharply increasing demand for harvested products [3]. Citrus cultivation is affected by the irregularity of rainfall occurring in the main producing regions of the world. This results from the great edaphoclimatic variability and the particular conditions of cultivation, comprising a multiplicity of environments [4]. Long or short periods of drought cause abiotic stresses to plants and are common events in agriculture [5] and is aggravated by the occurrence of rainfall under conditions of distribution, time and intensity, limiting the demand and use of the available water [6].

Areas affected by drought have increased substantially since the mid-20th century and as a result, plants suffer from increased water stress due to deficits, in many regions of the world [7, 8]. These are often exposed to adverse environmental conditions and adjust their growth and development according to a wide range of physiological, biochemical and molecular responses that allow them to survive and reproduce [5]. Environmental stress causes behavioral changes that may be either reversible or irreversible, and which condition the plant strategies for acclimatization or adaptation, influenced by factors such as severity and duration of stress, stage and age of the plant as well as by competition with neighboring plants [9, 10].

Citrus plants have growth dynamics related to the influence of the environment, having a physiological apparatus that, under limiting conditions, can prepare and protect the plant from such disturbances. Under dry conditions, several changes are observed such as: reduction in the rate of cell division and expansion, reduction in leaf size, stem elongation and root proliferation, the reduction of nutrient ratios and the efficiency of water use, as well as crop productivity [11]. One of the main signs is stomatal closure that can cause changes in transpiration and photosynthesis, generating additional stress in terms of leaf temperature and plant growth [12]. In this study, the use of stomatal conductance is a very efficient mechanism to control the loss of water in the plant under conditions of water deprivation, making it a potential indicator for drought tolerance [13, 14]. It is worth noting that, under conditions of long water deficit, plants can lose their ability to balance water absorption and loss, and leaf water potential decreases with a reduction in the rates of photosynthesis, transpiration and stomatal conductance, confirmed in studies with different citrus genotypes [15-17].

The selection of tolerant rootstocks is an efficient strategy to mitigate the effects of water deficit for many crops [18-20]. Several studies have sought to select high-potential genotypes by understanding the mechanisms related to water deficit survival/tolerance [14, 15, 21-24], in order to maintain and improve the citrus production chain. In this context, there is a type of investment in genotypes that can at least maintain acceptable productivity levels under lower availability of water [3].

It is fundamental to select potentially tolerant genotypes, for which several works have been carried out both in confined conditions and in the field, in order to allow the study of water demands and strategies of tolerance to stress. Studies have shown different ways of dealing with water limitation in citrus varieties [15, 22-24]. Nevertheless, further and more detailed analyses are required, as these plants may be in different

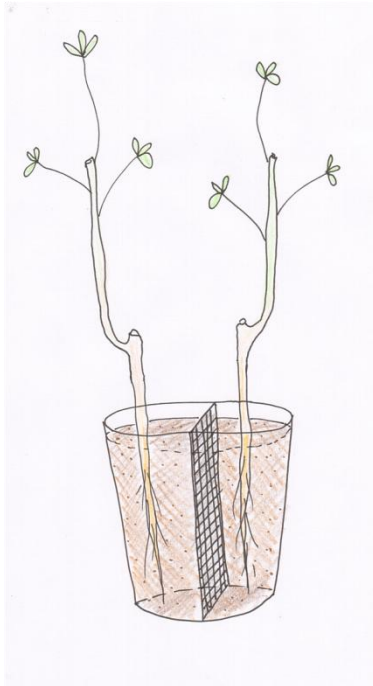
conditions of the soil matrix potential and may lead to misinterpretations about their strategies and mechanisms of response to stress. In light of this, it is possible that the association between genotypes with contrasting responses allows certain influences on these mechanisms, as well as providing results that are more consistent with those observed in the field, given the same conditions imposed on plants during stress.

Understanding the responses of plants to water deficit is highly relevant, mainly due to the considerable losses caused by droughts. It is essential to understand the mechanisms of plant responses in order to elucidate the strategies used by these plants under limiting conditions, as well as to allow the development of new forms of cultivation and prospects for citrus production in the country. In light of this, the objective of this work was to assess a methodology for the selection of rootstocks of citrus tolerant to drought when exposed to water deficit.

## **Materials and methods**

### *Plant material*

Three varieties of rootstock: 'Cravo Santa Cruz' (RL), 'Sunki Maravilha' mandarin and 'Sunki Tropical' mandarin, which exhibit different drought response mechanisms [15, 22-24], were used in combination with the Valencia Orange variety (VO). After grafting, the plants were transferred to 45 L pots containing yellow red latosol from the region of Cruz das Almas, state of Bahia, in Brazil. There were two plants per pot divided by a screen (Fig. 1) to avoid contact between the roots and provide the same water conditions to them both. All combinations of rootstocks were employed in different pots, totaling nine different associations (Table 1), with three replicates for each association.



**Fig. 1:** Schematic design of the arrangement of potted plants used in the experiment.

**Table 1:** Associations between the rootstocks used in the experiment.

Scion	Rootstocks		Abbreviations
	Main	Associated	
VO	RL	RL	RL <sup>RL</sup>
		SM	RL <sup>SM</sup>
		ST	RL <sup>ST</sup>
	SM	SM	SM <sup>SM</sup>
		RL	SM <sup>RL</sup>
		ST	SM <sup>ST</sup>
		ST	ST <sup>ST</sup>
	ST	RL	ST <sup>RL</sup>
		SM	ST <sup>SM</sup>

VO: Valencia Orange; RL: Rangpur lime; SM: Sunki Maravilha; ST: Sunki Tropical.



### *Imposing stress*

The plants were kept in anti-aphid screen with daily irrigation. Frequent pruning and application of NPK fertilizers and micronutrients were carried out every two weeks until the plants reached one year of age. The plants were subsequently divided into three groups: (i) control, where the plants were kept under permanent irrigation; (ii) plants kept under continuous water deficiency, wherein they were exposed to complete suspension of irrigation and (iii) rehydrated, wherein the plants were exposed to complete irrigation suspension and rehydrated to pot capacity.

The experiment lasted for seven days and the level of stress was gradually increased as the soil water content decreased. Soil moisture was monitored on interleaved days using a time domain reflectometry (TDR) probe for each plant of the pot. When the water potential in the plant leaf reached values below -2.0 MPa, these were defined as being under severe stress conditions and the physiological analyses were performed. Then, the rehydrated treatment plants were irrigated and after 24 hours, the photosynthetic parameters were analyzed for both the control and rehydration treatments.

### *Water extraction profile*

The control treatment was used to sum up the differences in initial ( $\theta_i$ ) and final ( $\theta_f$ ) soil moisture throughout the experimental period to calculate the extraction of water with each new irrigation. Under water deficit conditions, the fraction of water evapotranspired from the soil (FWEt) by the current moisture ( $\theta_a$ ) and measured by leaf water potential in the range of -2.0 to -3.5 MPa was calculated according to Sinclair and Ludlow (1986) [25], following the equation:

$$\text{FWEt: } \theta_a - \theta_f$$

$$\theta_i - \theta_f$$

### *Leaf water potential*

The leaf water potential ( $\Psi_L$ ) was determined before dawn (pre-dawn leaf water potential) using a Scholander pressure chamber (M670, PMS Instrument Co., Albany, OR, USA). The determinations occurred with leaves sectioned on the petiole using a scalpel blade, and immediately placed in the pressure chamber for reading. The plants were defined as under severe stress when they reached  $\Psi_L \leq -2,0$  MPa.  $\Psi_L$  was also measured for plants after 48 hours of rehydration and in control conditions.

### *Relative water content*

The relative water content (RWC) in the leaf was determined at the end of each water treatment and for each plant, according to Barrs and Weatherley (1962) [26]. Three leaves of each plant were removed and 10 leaf discs were made with a 2cm metal cylinder for each sample pool. Immediately thereafter, the leaf discs were weighed to determine their fresh weight (FW). The disks were then stored in distilled water at 4°C for 24 hours and weighed the next day to determine their turgid weight (TW). Subsequently, the leaf discs were dried at 70°C and the dry weight (DW) was then determined.

The RWC was calculated according to:

$$\text{RWC (\%)} = \frac{\text{FW} - \text{DW}}{\text{TW} - \text{DW}} * 100$$

### *Photosynthetic parameters*

The net photosynthesis rate (A), stomatal conductance (gs) and transpiration (E) were estimated at the end of each treatment in fully expanded mature leaves, located between the first and fifth leaves after the branch apex. Measurements of gaseous exchanges (A, gs and E) were performed using the IRGA portable LCpro-SD (ADC biotech-scientific Limited, UK) with photosynthetically active radiation (PAR) in  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and leaf temperature, air humidity and  $\text{CO}_2$  concentration were those determined by the environment. Once the readings had stabilized, measurements were performed between 8 hours and 11 hours on one leaf of each plant. Measurements of gas exchange in the rehydrated plants were performed within 24 hours of hydration.

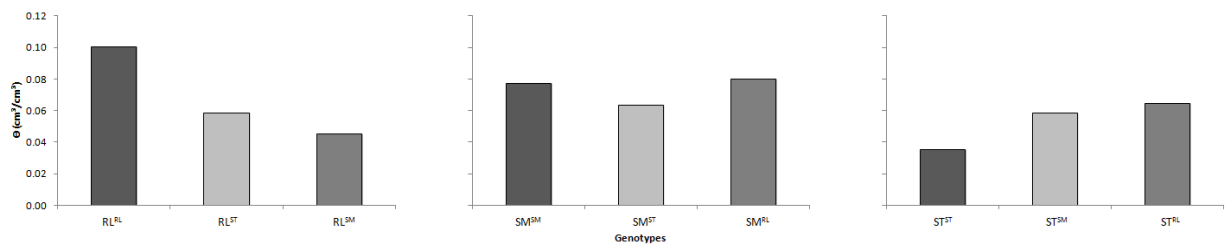
### *Statistical analysis*

The experiment was carried out in a completely randomized design (CRD), including three replicates for each combination between genotypes per water regime group. Three different statistical analyses were carried out in order to allow more information and insight about the influence of the water competition in the soil by rootstocks, namely: E1 - genotypes per pot; E2 - each genotype with corresponding associations; E3 - genotype associated with each other (*per se*). The analysis of variance (ANOVA) and Scott-Knott's test were performed for each analysis using Sisvar software to detect differences between the genotype combinations and across water regimes, in addition to the interaction between the association of genotypes and water regimes, with *P* value <0.05.

## Results

### Water extraction profile

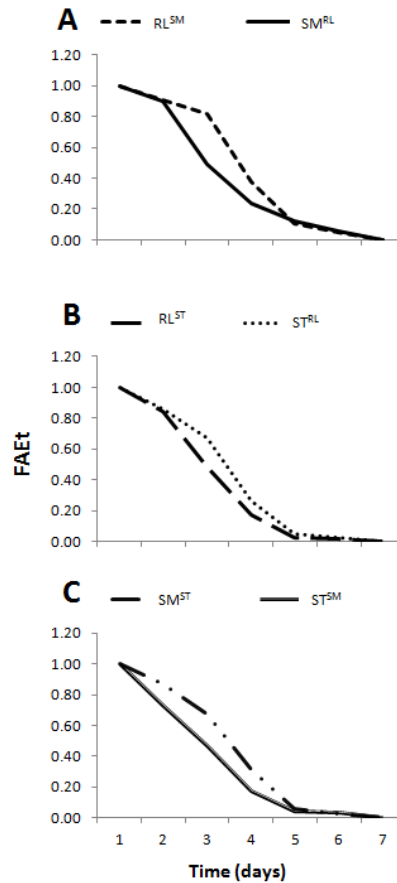
The genotypes present distinct extraction of water from the soil, even within the control conditions. The RL<sup>RL</sup> is the combination with the greatest extraction of water during the experiment. However, when associated with other genotypes, there is a decrease in water extraction, and combination RL<sup>SM</sup> shows less extraction of water from the soil among the RL combinations. There were no major changes in the water extraction profile for SM. However, the water competition in the soil by rootstocks led to greater extraction of water for ST, which is the combination *per se* with the lowest level of water extraction among the combinations (Fig. 2).



**Fig. 2:** Profile for water extraction from the soil, among genotypes and in control conditions during the duration of the experiment.

In order to understand the different responses of the genotypes to the water deficit, the fraction of water evapotranspiration (FWEt) was evaluated for plants in different combinations and exposed to drought stress conditions. Within the RLxSM combination, RL<sup>SM</sup> presented a more pronounced curve, thus extracting more water. However, there is a gradual reduction in consumption by the genotype, with a sharp drop between days 3 and 4, similar to the extraction profile for SM<sup>RL</sup>. Within the RLxST combination, ST<sup>RL</sup> showed greater extraction than RL<sup>ST</sup>; and within the SMxST combination, ST<sup>SM</sup> showed less extraction than SM<sup>ST</sup>. However, in both cases, during

exposure to stress, there was a similar behavioral tendency of these genotypes in the use of water (Fig. 3).

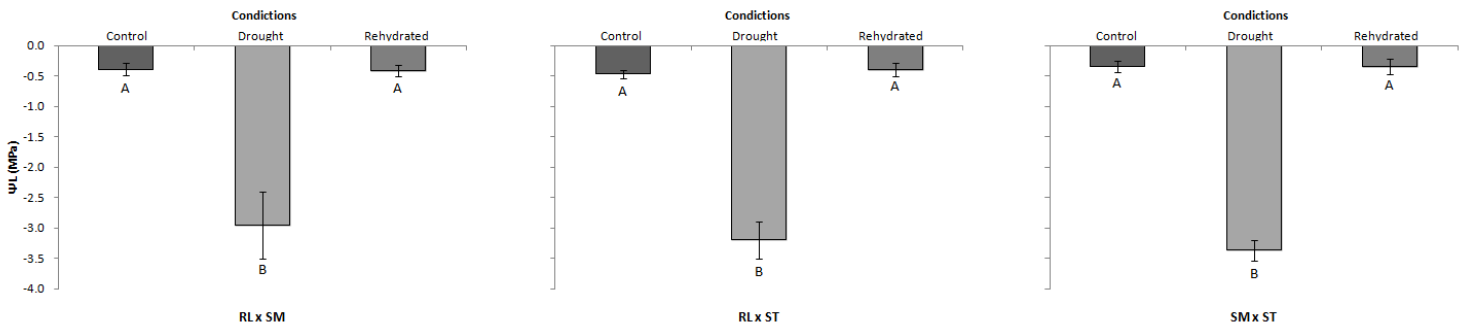


**Fig. 3:** Fraction of water evapotranspired (FWEt) among associated genotypes, exposed to water deficit conditions for the duration of the experiment. (A) RLxSM; (B) RLxST; (C) SMxST.

### *Leaf Water Potential ( $\Psi_L$ )*

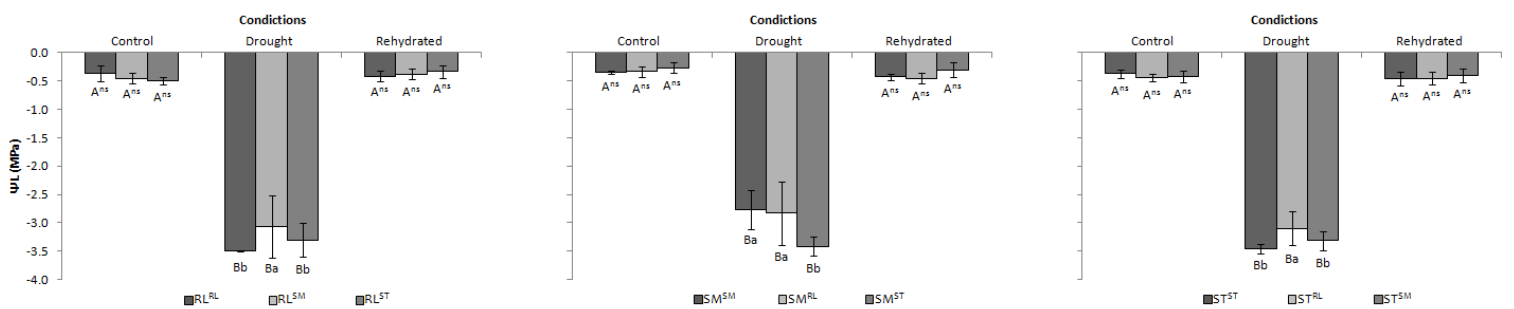
All the statistics carried out (E1, E2 and E3) have shown differences between the water regimes, in which irrigated conditions (control and rehydrated), with  $\Psi_L \geq -0.5$  MPa, differ from those exposed to stress conditions, in which all the plants reached  $\Psi_L \leq -2.0$  MPa, characterizing severe water deficit for all plants exposed to this treatment (Figs. 4, 5 and 6). Fig. 4 shows that there was no interaction between treatments or differences between genotypes of the same pot for statistic E1. Both E2 and E3 statistics show

interaction between water treatments and the combination between genotypes (Figs. 5 and 6).



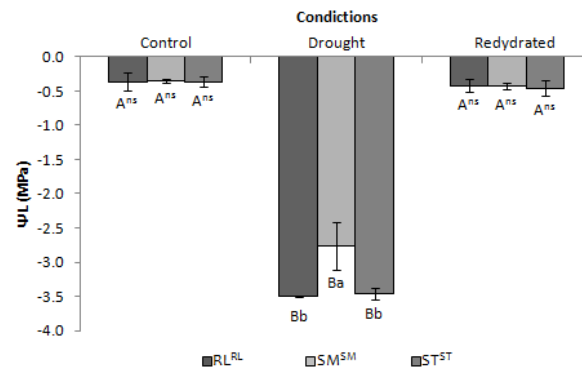
**Fig. 4:** E1 – Leaf water potential ( $\Psi_L$ ) for genotypes associated by pot and under three different conditions of water availability: control ( $\Psi_L \geq 0.5$ ); severe drought stress ( $\Psi_L \leq -2.0$ ) and 48 hours after rehydration. The bars indicate the standard deviation, according to the Scott-Knott test ( $p \leq 0.05$ ).

When exposed to water deficit, the E2 statistic showed that combinations  $RL^{SM}$ ,  $SM^{SM}$ ,  $SM^{RL}$  and  $ST^{RL}$  presented higher  $\Psi_L$  values when compared to the other combinations. And regarding the E3 statistic, the  $SM^{SM}$  combination displayed significantly lower  $\Psi_L$ .



**Fig. 5:** E2 - Leaf water potential ( $\Psi_L$ ) for associated genotypes and under three different conditions of water availability: control ( $\Psi_L \geq 0.5$ ); severe drought stress ( $\Psi_L \leq -2.0$ ) and 48 hours after rehydration. The bars indicate the standard deviation. Different uppercase letters indicate significant differences between water regimes within each genotype and different lowercase letters indicate significant differences between genotypes within each water regime.

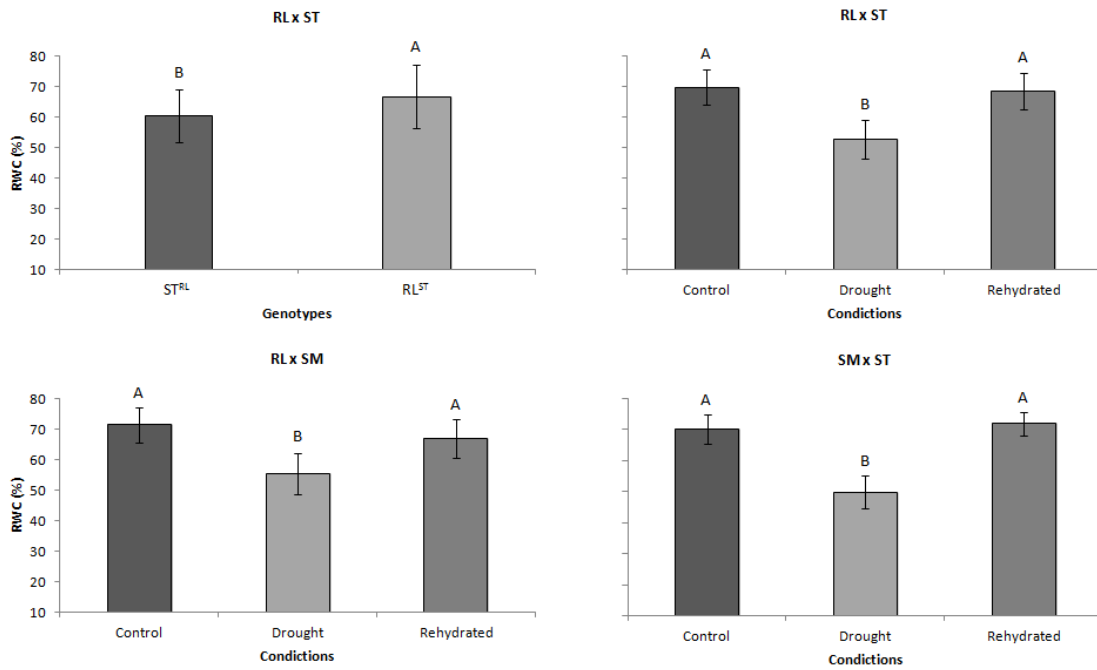
differences between genotypes within each water regime. NS: Not significant, according to the Scott-Knott test ( $p \leq 0.05$ ).



**Fig. 6:** E3 - Leaf water potential ( $\Psi_L$ ) for genotypes in *per se* combination under three different conditions of water availability: control ( $\Psi_L \geq 0.5$ ); severe drought stress ( $\Psi_L \leq -2.0$ ) and 48 hours after rehydration. The bars indicate the standard deviation. Different uppercase letters indicate significant differences between water regimes within each genotype and different lowercase letters indicate significant differences between genotypes within each water regime. NS: Not significant, according to the Scott-Knott test ( $p \leq 0.05$ ).

#### *Relative Water Content (RWC)*

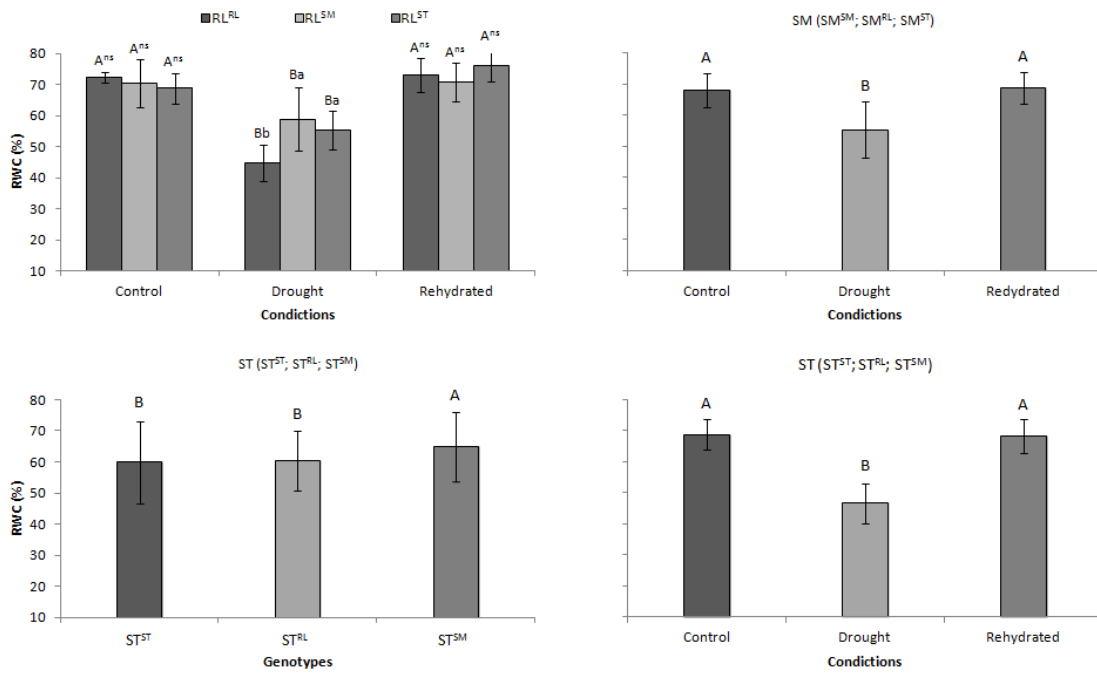
All plants showed a decrease in their RWC during drought conditions. The plants in control conditions showed values similar to those observed in the rehydrated plants, with no significant differences. Regarding the E1 statistic, all combinations showed significant differences between the water regimes, and there were also significant differences for the water competition in the soil by rootstocks for the RLxST combination, among which RL<sup>ST</sup> showed the greatest hydration independent on the availability of water (Fig. 7).



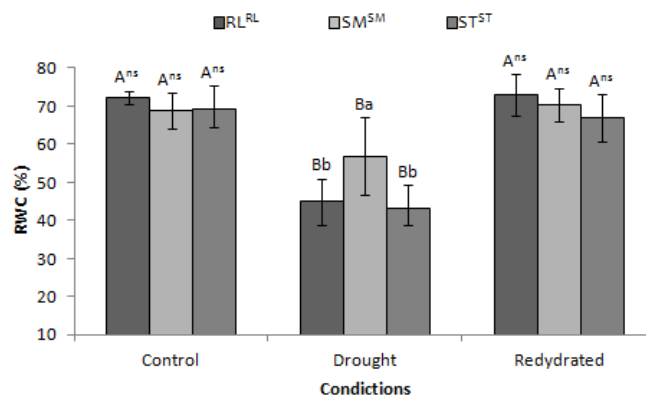
**Fig. 7:** E1 - Relative water content (RWC) for associated genotypes per pot and under three different conditions of water availability. The bars indicate the standard deviation. RL: Rangpur lime; SM: Sunki Maravilha; ST: Sunki Tropical, according to the Scott-Knott test ( $p \leq 0.05$ ).

Regarding the E2 statistic, only the RL relationship showed interaction between water regimes and genotype combinations, presenting lower values under stress conditions in which RL<sup>RL</sup> exhibited the lowest RWC. There was no interaction for ST, however ST<sup>SM</sup> was significantly superior when compared to the other combinations of its relation (Fig. 8). Regarding the E3 statistic, as in  $\Psi_L$ , combination SM<sup>SM</sup> presented the highest values for RWC (Fig. 9).





**Fig. 8:** E2 - Relative water content (RWC) for associated genotypes and under three different conditions of water availability. The bars indicate the standard deviation. Different uppercase letters indicate significant differences between water regimes within each genotype and different lowercase letters indicate significant differences between genotypes within each water regime. NS: Not significant, according to the Scott-Knott test ( $p \leq 0.05$ ).

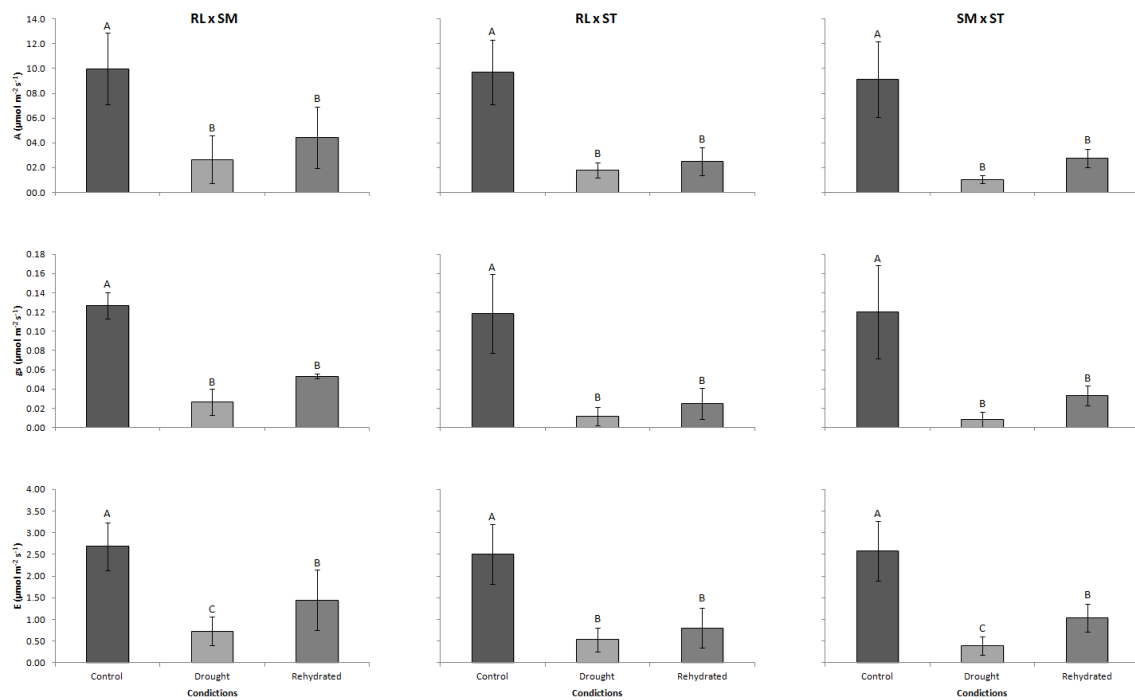


**Fig. 9:** E3 - Relative water content (RWC) for genotypes in *per se* combination under three different water availability conditions. The bars indicate the standard deviation. Different uppercase letters indicate significant differences between water regimes within each genotype and different lowercase letters

indicate significant differences between genotypes within each water regime. NS: Not significant, according to the Scott-Knott test ( $p \leq 0.05$ ).

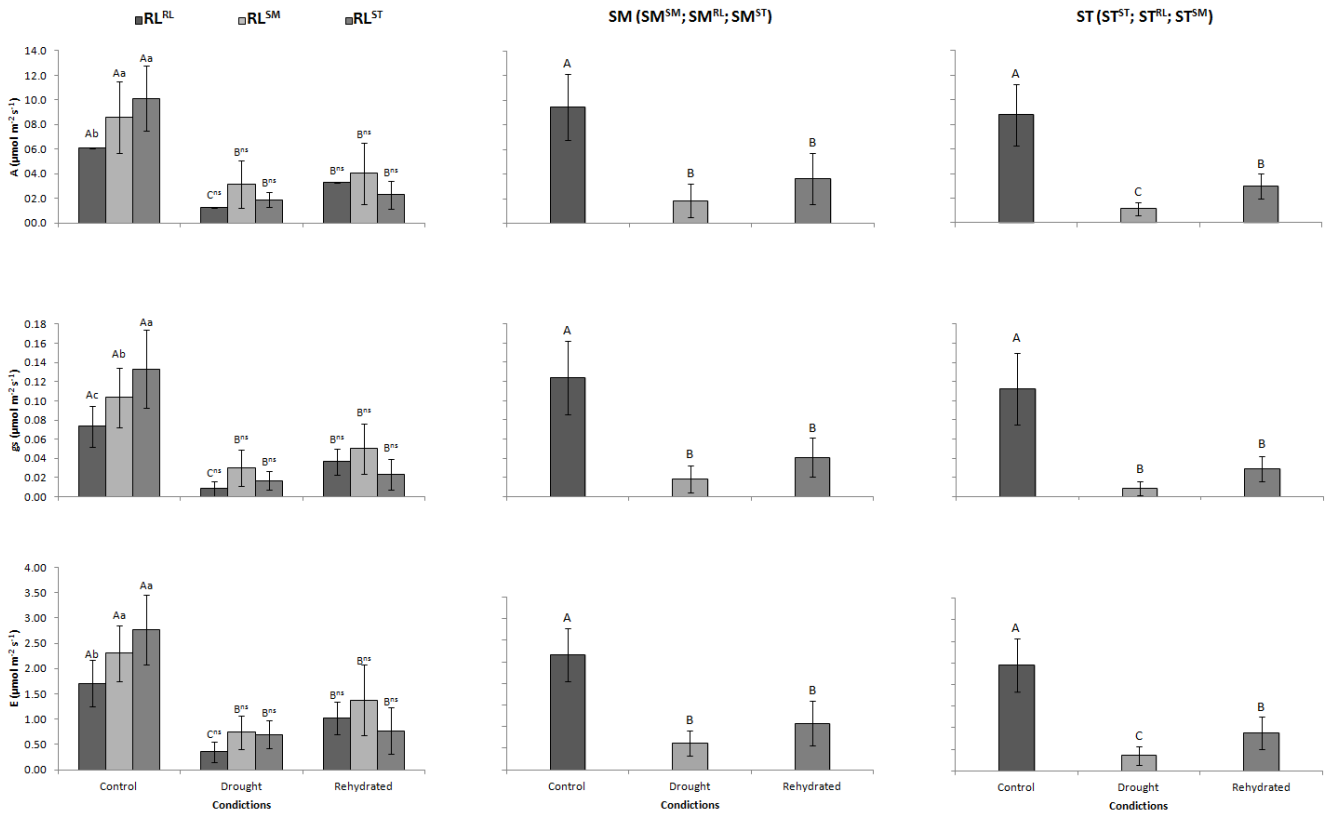
### *Photosynthetic parameters*

When it comes to the E1 statistic, there was no interaction between the water treatments and the genotype combinations. However, significant differences were observed among the water regimes. Parameters A and  $g_s$  have shown no difference between the water deficit values and those observed after 24 hours of rehydration for all pots, and those were different from those observed under the control conditions. Significant differences were observed for parameter E among the three water regimes for combinations RLxSM and SMxST (Fig. 10).



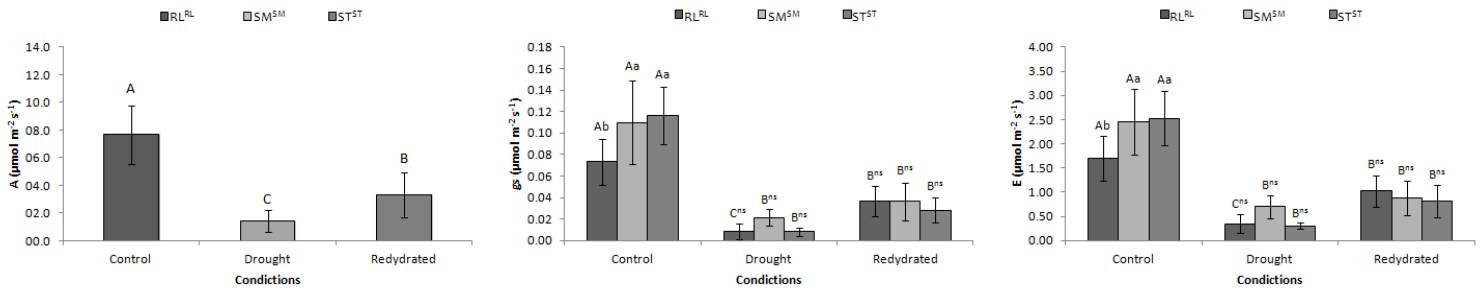
**Fig. 10:** E1 - Photosynthesis (A), stomatal conductance ( $g_s$ ) and transpiration (E) for associated genotypes per pot and under three different conditions of water availability. The bars indicate the standard deviation, according to the Scott-Knott test ( $p \leq 0.05$ ).

Regarding the E2 statistic, only the RL combination relationships showed interactions of water treatments and combinations of genotypes (Fig. 11). Among them, parameters A and E were similar, indicating that there were significant differences for  $RL^{RL}$  in all three water treatments; in the control conditions, it showed the lowest values for these two parameters. When it comes to gs,  $RL^{RL}$  again showed difference between all water regimes, and there was significant difference for the three analyzed combinations within the control conditions, in which  $RL^{ST}$  showed the highest values. In the analysis of the combinations of MS and TS, the authors have noted that there was no interaction between treatments. However, differences are observed between the employed water regimes. Regardless of the combination, the values of A, E and gs indicate that the highest values were observed in the control treatment for SM, unlike the drought and rehydration conditions, which did not present significant differences. The same behavior was observed in TS for the gs parameter but for A and E, the highest values were observed within the control conditions, followed by rehydration and subsequent, drought.



**Fig. 11:** E2 - Photosynthesis (A), stomatal conductance (gs) and transpiration (E) for associated genotypes and under three different conditions of water availability. The bars indicate the standard deviation. Different uppercase letters indicate significant differences between water regimes within each genotype and different lowercase letters indicate significant differences between genotypes within each water regime. NS: Not significant, according to the Scott-Knott test ( $p \leq 0.05$ ).

Regarding the E3 statistic, there was interaction for parameters E and gs, which have shown similar results (Fig. 12). RL<sup>RL</sup> presented differences between all water regimes and between combinations within the control conditions. For A, there was difference only between the water treatments, regardless of the combination, with significant differences in the three conditions of water availability.



**Fig. 12:** E3 - Photosynthesis (A), stomatal conductance (gs) and transpiration (E) for genotypes in combination per se under three different conditions of water availability. The bars indicate the standard deviation. Different uppercase letters indicate significant differences between water regimes within each genotype and different lowercase letters indicate significant differences between genotypes within each water regime. NS: Not significant, according to the Scott-Knott test ( $p \leq 0.05$ ).

## Discussion

### *Water relations*

All plants showed a decrease in  $\Psi_L$  and RWC after water restriction, evidencing that they were affected by the drought conditions. The differences observed between the water regimes are correlated with the exhaustion of the available water in the soil. In the evaluation methodology E1, there was no significant difference between the genotypes, possibly because they were in the same conditions in the pot, as there was sharing of water between the recipients favoring a possible competition, thus providing similarity between the foliar responses to stress. This fact was also observed by the relation of FW<sub>Et</sub> (Fig. 3), in which there is an approximation of the water loss profile, regardless of the genotypes in the pot, during the exposure to stress conditions.

However, there was also a significant difference between the genotype responses in the RL<sup>RL</sup>xST<sup>ST</sup> combination for RWC. RL<sup>ST</sup> presented the highest hydration level independent of the water regime (Fig. 7). Likewise, regarding FW<sub>Et</sub>, there was a smaller loss of water during the progression of the water deficit for this combination, when compared to ST<sup>RL</sup>. Therefore, the association of these genotypes in the same pot provided a

benefit for  $RL^{ST}$ , even under control conditions, since it shows greater conservation of water when compared to the *per se* combination (Fig. 2).

The combination of RL with other genotypes was crucial for differentiation between the RL responses under water restriction. In the evaluation methodology E2,  $RL^{SM}$  maintained the highest  $\Psi_L$  among the associations, and this better response comes from the relation with the SM genotype. Since  $SM^{SM}$  has higher  $\Psi_L$  and RWC among the *per se* combinations (Figs. 6 and 9), and that the  $RL^{SM}$  combination clearly exhibits better water use among the RL combinations under control conditions (Fig. 2). It is assumed that as the SM genotype has slower absorption and lower extraction capacity [15, 24], there is a greater availability of water in this compartment, allowing the use of RL, which shows a high capacity to extract water from the soil.  $RL^{RL}$  has lower water status during stress compared to other RL associations (Figs. 5 and 8), demonstrating high water extraction capacity in the soil, even under control conditions (Fig. 2). This result reinforces the benefits of the associations between genotypes contrasting with RL in order to allow greater availability of water in drought and thus conditioning less intensity or delay of the beginning of the stress in the plant.

Interestingly,  $ST^{RL}$  exhibited the highest values for  $\Psi_L$  when compared to the *per se* combination or to  $ST^{SM}$ , indicating that in this case RL favored lower stress conditions for ST. Nevertheless, when it comes to for RWC it was  $ST^{SM}$  that maintained higher water status levels independent of the water regime, and better use of water under control conditions when compared to  $ST^{RL}$ . On the other hand, SM remains conservative whether in *per se* conditions or associated with RL. However, this pattern is not maintained in the  $SM^{ST}$  combination. It showed lower  $\Psi_L$  values during water restriction and greater extraction of water under control conditions. In view of the above, it is worth noting that the ST response to water use can be influenced and

directed by the combined genotype as well as by the imposed water condition. Therefore, further studies should be carried out to better elucidate the behavior and mechanisms of ST responses in conditions of water availability or restriction.

Among the three genotypes in *per se* combination, ST<sup>ST</sup> and RL<sup>RL</sup> have shown similar behavior for both  $\Psi_L$ , as found by Gonçalves et al. (2016) [27] and RWC (Figs. 6 and 9). This result indicates a similarity between both genotypes in the level of hydration of the plant either during water availability or drought.

After rehydration, all the plants showed a rapid recovery of the water status with the ability to recover foliar turgescence, thus equating to the control conditions.

#### *Photosynthetic parameters*

The progressive water deficit resulted in significant reductions in the physiological variables, when compared to the control treatment and for all evaluated citrus combinations. The results were similar for different citrus fruits under dry conditions [15, 24]. Due to the water restriction, the stomata close by changes in leaf water potential [28] causing reductions in A, g<sub>s</sub> and E, and consequently causing inhibition of plant growth.

The sharing of water and the probable competition of the genotypes in the same pot may have influenced the similar response among the associated genotypes, with no statistical difference between them. However, it can be observed that there was a rapid recovery of E after 24h of rehydration in combinations RLxSM and SMxST, even though they did not equate the control conditions. It is suggested that, due to the similarity in the response of the water relations between RL and ST observed in this work, the combination of these genotypes in the same pot did not favor the better reestablishment of E after rehydration. It is worth noting that several authors reinforce the hypothesis of

slow recovery after water stress among citrus [4, 29-31] resuming physiological activity very close to the control conditions. This recovery time depends on several factors such as environmental conditions, type of soil, plant stage and variety and imposed stress conditions, among others.

In the evaluation system E2, only RL showed interaction between water regimes and genotype combinations. The association with other genotypes favored the substantial increase of A, E and gs under the control conditions. As different varieties of a species may present different abilities in stomatal regulation [32] it can be inferred that there is interaction between the plants in the pot causing behavioral changes between these genotypes in the presence of physical proximity. On the other hand, after rehydration, it was observed that RL<sup>RL</sup> has better recovery, significantly increasing its levels related to severe stress, according to data presented by other studies in confined conditions [15, 4], and in the field [16]. Equivalent results were found at E3 for E and gs. RL<sup>RL</sup> showed the greatest variation in stomatal control, probably in order to favor greater adaptation.

The plants may have isohydric or anhydrous behavior depending on the use of water. Isohydric plants are those that reduce the stomatal conductance as necessary to limit the perspiration both when water is abundant and under conditions of drought, which allows the plant to maintain  $\Psi_L$  within constant intervals. In contrast, anhydrous plants have a greater variation of  $\Psi_L$  by maintaining their open stomata and high photosynthetic indices for longer periods, even when the water content of the soil decreases, due to their low stomatal control capacity [33]. These can alternate according to climatic conditions, water treatments, soil and leaf water potential [34]. Therefore, it is inferred that the association between genotypes can cause behavioral changes. After all, RL<sup>RL</sup> has a tendency towards isohydric responses and when associated with the contrasting



genotypes, it changes to an anhydrous profile in order to maintain the physiological activities and consequent growth.

#### *Interaction between genotypes*

It is undeniable that the water competition in the soil by rootstocks conditioned different physiological responses, especially for RL. It is possible that the physical proximity between genotypes has allowed competition to occur that may limit or favor the survival, growth and/or reproduction of at least one of the competing individuals involved. It is assumed that there is a signal propagation by the root system of plants that allows changes in physiological responses, even molecular, of different genotypes in the same pot. It should be noted that processes of allelopathy may occur among plants, and in this case, it is believed that there is production and release of biomolecules such as root exudates, providing a biochemical interaction between plants through water stress signaling. These can affect physiological responses such as water relations, stomata movement, pigment synthesis, photosynthesis and respiration, as well as molecular responses inducing changes in DNA and RNA [35]. In this sense, the data presented herein assume a possible competition, causing changes in the performance of genotypes in relation to stress. This can be a promising tool to condition or increase the tolerance of certain varieties to environmental stress, aiming at new forms of management and citrus planting systems.

In citrus cultivation, genotypes that present diversity in responses to water stress are excellent materials to be used in breeding programs [36]. Several authors stress the importance and tolerance of RL as a reference rootstock for Brazilian citriculture, mainly because it maintains productivity under limiting conditions [15]. However, there are advantages conferred to other rootstocks by the diversity of signaling strategies

related to drought tolerance/survival among citrus [15, 21, 23, 24, 27]. Notably in this work, RL presented changes in the behavioral profile when associated with other genotypes. Among the genotypes associated with this, the combination with SM was the one that allowed for the best results. However, due to the stress severity, it was not possible to verify changes in the photosynthetic parameters among the genotypes during water restriction. It is believed that in mild or moderate drought conditions, RL<sup>SM</sup> would have a greater capacity to maintain physiological activities, considering the results presented by this combination in this study, as well as the higher survival rate and vigor in conditions of prolonged and recurrent water disability (Supplementary Figs. S1 and S2).

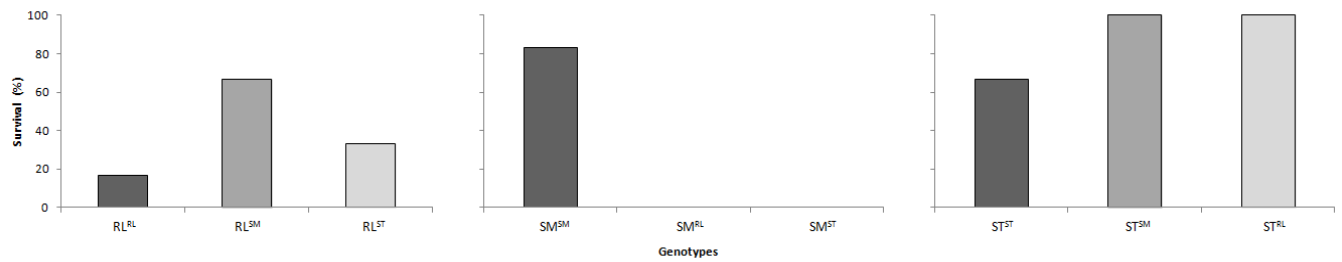
On the other hand, SM is characterized by a conservative water profile, which allows for survival strategies under severe drought conditions. In view of the above, it was verified that this genotype has the capacity to interact with other genotypes and lead them to behavioral changes when in physical proximity. Nevertheless, the association with other genotypes would imply in their probable death in these conditions (Supplementary Fig. S1), possibly as a result from the competition. Although genetically similar, SM and ST do not exhibit similar behavior under stress conditions. Gonçalves et al. (2016) [27] believe that there are points of similarity and discrepancy between RL and ST responses during water limitation, and this work presents similar situations for both RL and SM in relation to TS. Therefore, it is worth noting that TS has adaptive behavior to the conditions imposed or to proximity genotypes, and is able to be more or less tolerant under these conditions. Differently from SM that albeit a conservative genotype in terms of water use, cannot maintain survival associated with another genotype under prolonged and recurrent drought conditions, TS can maintain a high level of survival in *per se* conditions, and has the capacity of increasing when

associated to other genotypes, thus exhibiting a survival rate of up to 100% after extreme stress conditions (Supplementary Fig. S1). These data prove the versatility of ST depending on the conditions, not showing a single fixed pattern for responses under drought conditions.

Admittedly, RL-grafted plants are more tolerant to drought than other rootstock-grafted plants such as SM [24, 30]. Nevertheless, there is a difference between genotypes in terms of water use, even in favorable water conditions (Fig. 2), so there are disparities between moments of stress. And this may lead to erroneous interpretations on the tolerance of genotypes to drought. Certainly, under the same water conditions, both RL and SM would show a degree of stress tolerance due to water deficit. It is observed that, when in separate pots, the two genotypes exhibit different responses either to water regimes or to photosynthetic parameters (Figs. 6, 9 and 12). The use of two plants of different genotypes in the same container favors their evaluation in similar soil matrix potential. Further work should be carried out in larger containers so that water restriction occurs more gradually and similarly, as under field conditions. In this way, we will have more reliable information in pot conditions than in the field. This demonstrates how the methodology used herein is a viable technique to conduct new work in order to verify the relationships between genotypes and compare their strategies under equivalent conditions of stress.

The present work shows that the combination of genotypes can be promising for a tolerance superior to the known genotypes and favoring growth and productivity, even under limiting conditions.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL



**Fig. S1:** Survival rate of citrus plants grafted on contrasting genotypes submitted to two prolonged and recurrent water deficits. RL: Rangpur lime; SM: Sunki Maravilha; ST: Sunki Tropical.



**Fig. S2:** Morphological changes in citrus plants grafted on contrasting genotypes, in association by pot, rehydrated after two prolonged and recurrent water deficits. RL: Rangpur lime; SM: Sunki Maravilha; ST: Sunki Tropical.

## Reference

1. Neves, M. F.; Kalaki, R. B.; Trombin, V. G. O Retrato da Citricultura Brasileira, CitrusBR; 2010.

2. Oliveira, R. P.; Soares Filho, W. S.; Passos, O. S.; Scivittaro, W. B.; Rocha, P. S. G. Porta-enxertos para citros. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. (Documentos, 226); 2008
3. Tardieu, F. Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario. *Journal of Experimental Botany*. 2012; 63 (1): 25-31.
4. Cerqueira, E.C.; Castro Neto, M.T.; Peixoto, C.P. Resposta de porta-enxertos de citros ao déficit hídrico. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2004; 26 (3): 515-519.
5. Osakabe, Y.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K.; Tran L.-Sp. ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. *New Phytologist*. 2014; 202: 35–49.
6. Zarch, M. A. A; Sivakumar, B.; Sharma, A. Droughts in a warming climate: A global assessment of Standardized precipitation index (SPI) and Reconnaissance drought index (RDI). *Journal of Hydrology*. 2015; 526: 183–195.
7. Gray S.B., Brady S.M. Plant developmental responses to climate change. *Developmental Biology*. 2016; 419 (1): 64-77.
8. Dai, A. Drought under global warming: a review. *Advanced Review*. 2011; 2: 45-65.
9. Gilbert, M. E.; Medina, V. Drought adaptation mechanisms should guide experimental design. *Trends in Plant Science*. 2016; 21 (8): 639-47.
10. Zhao, S.; Guo, Y.; Sheng Q.; Shyr, Y. Heatmap3: an improved heatmap package with more powerful and convenient features. *BMC Bioinformatics*. 2014; 15: 16-17.

11. Farooq, M.; Hussain, M.; Wahid, A. E.; Siddique, K.H.M. Drought Stress in Plants: Na Overview. *Plant Responses to Drought Stress*. 2012; 1-33.
12. Martin-Stpaul, N.; Delzon, S.; Cochard, H. Plant resistance to drought relies on early stomatal closure. *Biorxiv*. 2017; p.099531.
13. Ullah, A.; Sun, H.; Yang, X.; Zhang, X. Drought coping strategies in cotton: increased crop per drop. *Journal Plant Biotechnology*. 2017.
14. Pedroso, F.K.J.V., Prudente, D.A., Bueno, A.C.R., Machado, E.C., Ribeiro, R.V. Drought tolerance in citrus trees is enhanced by rootstock-dependent changes in root growth and carbohydrate availability. *Environmental and Experimental Botany*. 2014; 101: 26-35.
15. Santana-Vieira, D.D.S; Freschi, L.; Almeida, L.A.H.; Moraes, D.H.S.; Neves, D.M.; Santos, L.M. et al. Survival strategies of citrus rootstocks subjected to drought. *Scientific Reports*. 2016; 6: 1-12.
16. Sampaio, A. H. R.; Coelho Filho, M. A.; Coelho, E. F.; Daniel, R. Indicadores fisiológicos da lima ácida ‘tahiti’ submetida à irrigação deficitária com secamento parcial de raiz. *Irriga*. 2014; 19 (2): 292-301.
17. Romero, P.; Navarro, J.M.; Perez-Perez, J.; García-Sánchez, F.; Gómez-Gómez, A.; Porras, I. et al. Deficit irrigation and rootstock: their effects on water relations, vegetative development, yield, fruit quality and mineral nutrition of *Clemenules mandarin*. *Tree Physiology*. 2006; 26: 1537–1548.
18. López-Marín, J.; Gálvez, A.; Amor, F. M. D.; Albacete, A.; Fernández, J.; Egea-Gilabert, C. et al. Selecting vegetative/generative/dwarfing rootstocks for improving fruit yield and quality in water stressed sweet peppers. *Scientia Horticulturae*. 2017; 214: 9–17.

19. Tworkoski, T.; Fazio, G.; Glenn, D. M. Apple rootstock resistance to drought. *Scientia Horticulturae*. 2016; 204: 70–78.
20. Berdeja M.; Nicolas, P.; Kappel, C.; Daí, Z. W.; Hilbert, G.; Peccoux, A. et al. Water limitation and rootstock genotype interact to alter grape berry metabolism through transcriptome reprogramming. *Horticulture Research*. 2015; 2:1-13.
21. Dutra-Souza, J; Silva, E. M. A.; Coelho-Filho, M. A.; Morillon, R.; Bonatto, D.; Micheli, F et al. Different adaptation strategies of two citrus scion/rootstock combinations in response to drought stress. *PlosOne*. 2017; 12 (5): e0177993.
22. Santos, I.C; Almeida, A. A. F.; Pirovani, C. P.; Costa, M. G. C.; Silva, M. F. G. F.; Bellete, B. S. et al. Differential accumulation of flavonoids and phytohormones resulting from the canopy/rootstock interaction of citrus plants subjected to dehydration/rehydration. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2017.
23. Oliveira, T.M.; Silva, F. R.; Bonatto, D.; Neves, D. M.; Morillon, R.; Maserti, B. E et al. Comparative study of the protein profiles of Sunki mandarin and Rangpur lime plants in response to water deficit. *BMC Plant Biology*. 2015; 15 (69): 1-16.
24. Neves, D.M.; Coelho Filho, M. A.; Bellete, B.S.; Silva, M. F. G. F.; Souza, D. T.; Soares Filho, et al. Comparative study of putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase and abscisic acid accumulation in the responses of Sunki mandarin and Rangpur lime to water deficit. *Molecular Biology Reports*. 2013; 40 (9): 5339-5349.
25. Sinclair, T.R.; Ludlow, M. M. Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grain legumes. *Australian Journal of Plant Physiology*. 1986; 13: 329–341.

26. Barrs, H.D.; Weatherley, P.E. (1962). A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*. 1962; 15: 413-428.
27. Gonçalves, L. P.; Alves, T. F. O.; Martins, C. P. S.; Sousa, A. O.; Santos, I. C.; Pirovani, C. P. et al. Rootstock-induced physiological and biochemical mechanisms of drought tolerance in sweet orange. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2016; 38 (174): 1-12.
28. Fang, Y; Xiong, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015; 72 (4): 673-689.
29. Gomes, M. M. A.; Lagôa, A. M. M. A.; Medina, C. L.; Machado, E. C.; Machado, M. A. Interactions between leaf water potential, stomatal conductance and abscisic acid content of orange trees submitted to drought stress. *Brazilian Journal Plant Physiology*. 2004; 16 (3): 155-161.
30. Machado, E.C.; Medina, C.L.; Gomes, M.M.A.; Habermann, G. Variação sazonal da fotossíntese, condutância estomática e potencial de água nas folhas de laranjeira 'Valência'. *Scientia Agrícola*. 2002; 59: 53-58.
31. Medina, C. L.; Machado, E. C.; Gomes, M. M. Condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranja 'Valência' sob deficiência hídrica. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Brasília*. 1999; 11 (1): 29-34.
32. Wan, J.; Ths, R.G.; Ying, J.; Mccourt, P; Huang, Y. Development of Drought-Tolerant Canola (*Brassica napus L.*) through Genetic Modulation of ABA-mediated Stomatal Responses. *Crop Science*. 2009; 49: 1539-1554.



33. Sade, N; Gebremedhin A, Moshelion M. Risk-taking plants: anisohydric behavior as a stress-resistance trait . *Plant Signaling and Behavior*. 2012; 7: 767-770.
34. Hugalde, I.P; Vila, H.F. Comportamiento isohídrico o anisohídrico en vides ¿Una controversia sin fin?. *RIA*. 2014; 40 (1): 75-82.
35. Rizvi, S.J.H.; Rizvi, V. Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. In: Rizvi, S.J.H.; Rizvi, H. (Eds.) *Allelopathy: Basic and applied aspects*. London, Chapman & Hall. 1992; 443-472.
36. Nogueira, R. J. M. C.; Moraes, J. A. P. V.; Burity, H. A. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleira submetidas a déficit de água. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 2001; 13: 75-87.

## **CAPÍTULO II**

**Perfil metabólico de genótipos de citros para tolerância à seca**

## RESUMO

O Brasil é um país voltado ao agronegócio, sendo o maior produtor mundial de suco de laranja. Contudo, na cadeia citrícola brasileira, perdas acentuadas são observadas pela irregularidade de chuvas, em algumas regiões do país, impondo condições de estresse por seca. A seca provoca alterações comportamentais, que podem ser reversíveis ou irreversíveis e condicionam a planta estratégias para aclimatação ou adaptação, a fim de garantir sobrevivência, crescimento e produtividade. Em resposta ao estresse de seca, as plantas são direcionadas para a ativação de vias bioquímicas que conduzem à produção de compostos defensivos e tolerância melhorada. Inúmeros metabólitos podem se acumular em diferentes plantas, dependendo da espécie, severidade do estresse e variando em tolerância à seca. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil metabolômico, diferentemente expresso, em folhas e raízes de plantas cítricas. Foram usadas laranjeira 'Valencia' enxertada em três genótipos de porta-enxertos: limoeiro 'Cravo Santa Cruz' (LCR), tangerineira 'Sunki Maravilha' (TSKMA) e tangerineira 'Sunki Tropical' (TSKTR) nos tratamentos (i) controle, onde as plantas foram mantidas permanentemente irrigadas; (ii) sob deficiência hídrica, onde as plantas foram submetidas à suspensão completa da irrigação e (iii) reidratada, onde as plantas foram submetidas à suspensão completa da irrigação e reidratadas para capacidade de vaso. O estudo da metabolômica ocorreu através da utilização do GC x GC-TOF/MS realizado pelo Laboratório de Metabolômica no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em Campinas-SP. Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam a detecção de diversos compostos, sendo 53 metabólitos em folha e 62 em raiz. Em folhas, observou-se uma maior tendência de diferentes genótipos serem agrupados mais intensamente, de acordo aos regimes hídricos impostos do que pelos mesmos genótipos em diferentes condições hídricas. Em raízes, constatou-se um agrupamento de todos os porta-enxertos em déficit hídrico, no entanto em condições controle e reidratada, houve uma associação dos dois regimes hídricos de acordo com os genótipos, indicando comportamentos mais específicos de cada genótipo. As observações obtidas neste estudo sugerem que os genótipos apresentam diferentes estratégias de sobrevivência ao déficit hídrico e a sinalização pelo acúmulo de diversos metabólitos pode vir a determinar a sua maior ou menor tolerância ao estresse.

**Palavras-chave:** citros, metabólitos, porta-enxertos, tolerância à seca.

## ABSTRACT

Brazil is a country focused on agribusiness, being the main producer of orange juice in the world. However, in the Brazilian chain of citrus production, accentuated losses are observed due to irregular rainfall, in some regions of the country, imposing conditions of drought stress. Drought causes behavioral changes that might be reversible or irreversible and conditions to the plant strategies for acclimatization or adaptation in order to ensure survival, growth and productivity. In response to drought stress, plants activate biochemical pathways that lead to the production of defensive compounds and improved tolerance. Numerous metabolites might accumulate in different plants, depending on the species, severity of stress and varying in tolerance to drought. Thus, the present study aimed to evaluate the metabolomic profile, differently expressed, in leaves and roots of citrus plants. We used 'Valencia' orange tree grafted on three rootstock genotypes: lemon tree : Rangpur Lime (RL), 'Sunki Maravilha' (SM) and 'Sunki Tropical' (ST) in treatments (i) control, where the plants were kept permanently irrigated; (ii) under water deficiency, where plants were submitted to complete irrigation suspension; and (iii) rehydrated, where plants were submitted to complete irrigation suspension and subsequently rehydrated to the capacity of the pot. The study of the metabolomics occurred through the use of GC x GC-TOF/MS carried out at the Metabolomics Laboratory in the National Center for Research in Energy and Materials (CNPEN), Campinas-SP. The results obtained in this study evidence the detection of several compounds, being 53 leaf metabolites and 62 from roots. In leaves, we observed a greater tendency of different genotypes to be grouped more intensely according to the imposed water regimes than by the same genotypes under different hydric conditions. In roots, it was verified a grouping of all rootstocks under water deficit. However, under controlled and rehydrated conditions, there was an association of the two water regimes according to the genotypes, indicating more specific behaviors of each genotype. The observations obtained in this study suggest that the genotypes present different survival strategies to water deficit and the signaling by the accumulation of several metabolites may determine their greater or lesser tolerance to stress.

**Key words:** citrus, metabolites, rootstocks, drought tolerance.

## 6.1 INTRODUÇÃO

De origem asiática, as plantas cítricas encontraram no território brasileiro condições favoráveis para o seu desenvolvimento. No país, a produção de citros representa importante segmento econômico, estando entre as culturas frutíferas de maior destaque no Brasil e no mundo, tanto por seu expressivo valor de produção, quanto por sua importância na geração de empregos diretos e indiretos (Neves et al., 2010). No entanto, as plantas estão frequentemente expostas a diversos estresses ambientais, que podem limitar a sua produtividade (Taiz; Zeiger, 2004).

A habilidade das plantas em tolerar a limitação hídrica é de grande importância para o desenvolvimento do agronegócio do país e o conhecimento dos indicadores de adaptabilidade às condições hídricas tende a auxiliar na busca de estratégias mais seguras para as tomadas de decisões (Queiroz, 2010; Martorano, 2007). Sendo assim, tornou-se evidente a percepção e a resposta rápida das plantas às alterações na disponibilidade hídrica, através de uma série de eventos fisiológicos, celulares e moleculares que ocorrem em sequência ou em paralelo (Chaves et al., 2009)

De acordo com Komatsu et al. (2013), as plantas respondem às condições de estresse por meio de mudanças nos perfis das “ômicas”, incluindo transcriptômica, proteômica e metabolômica. Hall (2006) define metaboloma como a composição de todas as pequenas moléculas presentes em um organismo. A metabolômica é considerada uma poderosa ferramenta para fornecer um instantâneo da fisiologia de uma célula (Putri et al., 2013). Em condições de restrição hídrica no solo, vários processos metabólicos nas plantas podem ser influenciados, como o fechamento estomático, o declínio na taxa de crescimento, o acúmulo de solutos e antioxidantes e a expressão de genes específicos de resposta ao estresse (Silva et al., 2002). Outro mecanismo que as plantas adotaram para lidar com situações de estresse por seca consiste em ajustes metabólicos para mobilizar metabólitos para a síntese de compostos protetores vitais para ajuste osmótico. Esses ajustes metabólicos envolvem a acumulação líquida de osmolitos na célula para reter ou mesmo promover a captação de água para a célula por osmose para manter a pressão de turgescência (Jorge et al., 2015).

O estresse abiótico induz mudanças no metabolismo primário e secundário. Quanto ao metabolismo primário, as variações na acumulação de carboidratos, aminoácidos e poliaminas são as principais respostas observadas em plantas submetidas a diferentes estresses abióticos. Os metabólitos secundários são produzidos em

quantidades mínimas e que não são essenciais para a sobrevivência, tendo várias funções dependendo sua estrutura química e propriedades (Arbona et al., 2017). Estes produtos naturais são sintetizados pelas espécies de plantas especificadas e seu nível de concentração é precisamente regulado pelo estágio de desenvolvimento, condições ambientais e processos de adaptação. Entretanto, a função dos metabólitos secundários na tolerância ao estresse abiótico das plantas é relativamente menos compreendida hoje em dia. Sendo assim, a metabolômica constitui uma importante ferramenta envolvida no processo de seleção de plantas resistentes às mudanças climáticas (Rodziewicz et al., 2014)

Neste contexto, o presente trabalho visou identificar o perfil metabolômico de genótipos de citros sob diferentes regimes hídricos, a fim de identificar as alterações ocasionadas nos diferentes estados de hidratação e genótipos das plantas cítricas, permitindo futura compreensão de rotas metabólicas envolvidas nas respostas fisiológicas à seca.

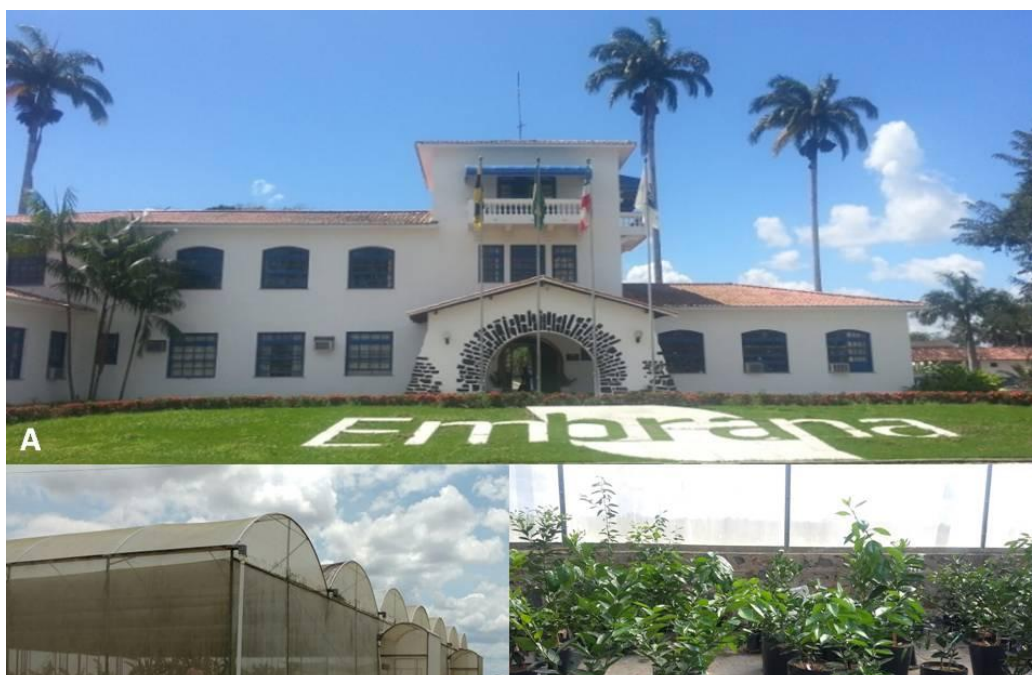
## 6.2 MATERIAL E MÉTODO

### 6.2.1 Material vegetal

O estudo foi realizado em telado nas instalações da Embrapa Mandioca e Fruticultura situada no município de Cruz das Almas, Recôncavo Baiano, nas coordenadas geográficas 12°40'39" de latitude sul e 39°06'23" de longitude oeste, com altitude de 226 m (Fig. 1A e B), entre fevereiro de 2015 à junho de 2016. Foram selecionadas 108 plantas de laranjeira 'Valência' (*Citrus sinensis* L. Osb.) de aproximadamente um ano de idade, enxertadas sobre três diferentes porta-enxertos: limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osb.), tangerineira 'Sunki Tropical' (*C. sunki* Hort. ex. Tan.) e tangerineira 'Sunki Maravilha' (*C. sunki* Hort. ex. Tan), obtidos pelo Programa de Melhoramento Genético de Citros. As plantas foram transplantadas para vaso plástico (45 L) contendo latossolo vermelho amarelo oriundo da região, onde permaneceram por todo o período experimental (Fig. 1C). O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com 3 tratamentos hídricos (irrigado, deficiência hídrica e reidratação) e 6 repetições por tratamento.

### 6.2.2 Aplicação do déficit hídrico

As plantas foram mantidas em telado antiafídeo com irrigação diária. Foram



**Figura 1:** Localização da área experimental. (A) Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA. (B) Telado de citros. (C) Plantas laranjeira 'Valência' enxertadas sobre limoeiro 'Cravo', tangerineira 'Sunki Tropical' e tangerineira 'Sunki Maravilha' utilizadas no experimentos

realizadas podas frequentes e aplicação de fertilizantes NPK e micronutrientes a cada duas semanas até as plantas atingirem um ano de idade. Posteriormente, as plantas foram divididas em três grupos: (i) controle, onde as plantas foram mantidas permanentemente irrigadas; (ii) sob deficiência hídrica, onde as plantas foram submetidas à suspensão completa da irrigação e (iii) reidratada, onde as plantas foram submetidas à suspensão completa da irrigação e reidratadas para capacidade de vaso.

O experimento teve duração de sete dias com o estresse desenvolvido gradualmente à medida que o conteúdo de água no solo diminuía. A umidade do solo foi monitorada em dias intercalados utilizando uma sonda reflectometria no domínio do tempo (TDR) para cada planta do vaso. Quando o potencial da água na folha das plantas atingiu valores menores que  $-2,0$  MPa, estas foram definidas em condição de estresse severo e realizada coleta de material vegetal. Em seguida, as plantas do tratamento reidratado, foram irrigadas e após 48h foram realizadas coleta deste material vegetal.

### **6.2.3 Potencial hídrico foliar**

O potencial hídrico foliar ( $\Psi_L$ ) foi determinado antes do amanhecer (antemanhã) usando uma câmara de pressão Scholander (M670, PMS Instrument Co., Albany, OR, EUA). As determinações ocorreram com folhas seccionadas no pecíolo, com auxílio de uma lâmina de bisturi e, imediatamente colocadas na câmara de pressão para a realização da leitura. As plantas foram definidas em estresse severo quando atingiram  $\Psi_L \leq -2,0$  MPa.  $\Psi_L$  também foi medido para as plantas após 48 h de reidratação e em condição controle.

Com base nos dados de  $\Psi_L$  foram determinados os momentos de coletas para obtenção das amostras de folhas e raiz do grupo das plantas em condição controle, sob deficiência hídrica e reidratada. O material vegetal foi destacado e imediatamente congelado com nitrogênio líquido até serem armazenadas no freezer  $-80^\circ\text{C}$ , para posteriores análises.

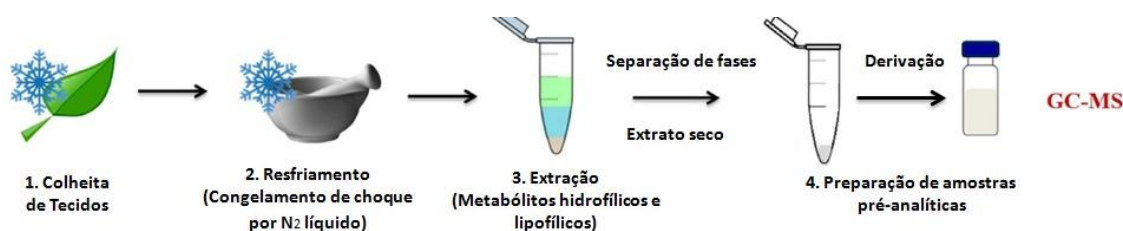
### **6.2.4 Análise metabolômica**

As análises foram realizadas pelo Laboratório de Metabolômica no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em Campinas-SP.

Os metabólitos foram extraídos a partir de 6 replicatas biológicas. Foram usados 5 e 10 mg do extrato liofilizado para o tecido foliar e radicular, respectivamente, para a extração de MTBE: metanol: água 3: 1: 1 (v / v / v), descrito por Giavalisco et al.



(2011). Os 150 uL da fase orgânica foi seca e derivatizado, tal como descrito em Roessner et al. (2001). Analisaram-se 1 µl das amostras derivatizadas em um autoamplificador Combi-PAL (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Alemanha) acoplado a um cromatógrafo de gases Agilent 7890 acoplado a um espectrômetro de massa de tempo de voo Leco Pegasus 2 (LECO, St. Joseph, MI, EUA) como descrito por Weckwerth et al. (2004). Além disso, as amostras foram medidas divididas, considerando a diluição 1:30 e 1:40 para folha e raiz, respectivamente (Fig 2). Os cromatogramas foram exportados do software Leco ChromaTOF (versão 3.25) para o software R. A detecção de pico, o alinhamento do tempo de retenção e a correspondência de bibliotecas foram realizadas usando o pacote Target Search R (Cuadros-Inostroza et al., 2009).



**Figura 2:** Preparo de amostras usada em estudos metabolômicos de plantas. Adaptado de Jorge et al. (2015) (Typical sample preparation workflow used in plant metabolomics studies / Mass Spectrometry Reviews)

Os metabólitos foram quantificados pela intensidade de pico de uma massa seletiva. As intensidades de metabólitos foram normalizadas dividindo-se o peso fresco, seguido pela soma da contagem total de íons e da substituição global de outliers, conforme descrito anteriormente (Giavalisco et al., 2011; Huege et al., 2011). Análise de componentes principais foi realizada utilizando métodos de pacote PCA bioconductor (Stacklies et al., 2007).

### **6.2.5 Análise estatística**

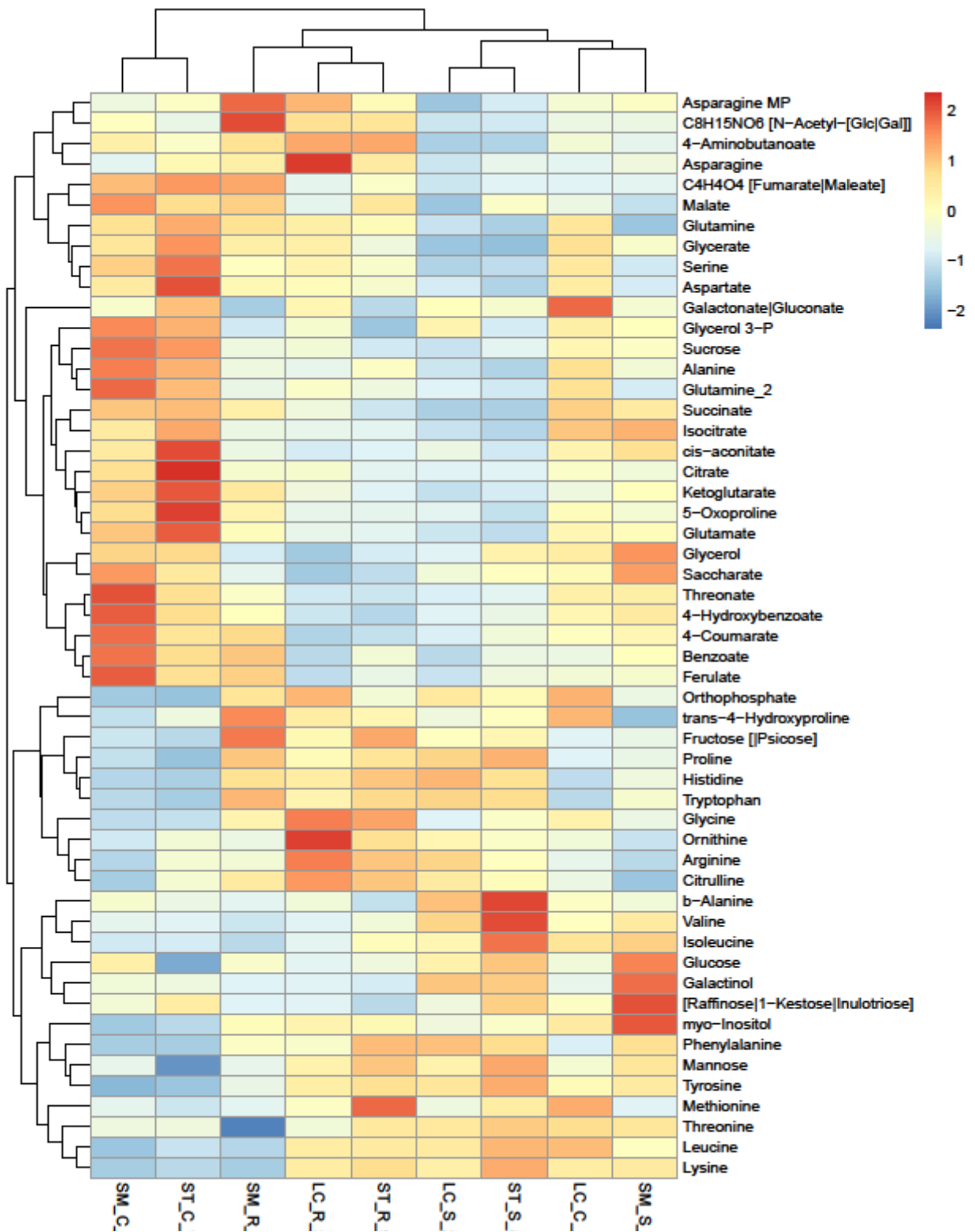
A significância dos metabólitos foi testada comparando todos os genótipos num dado tecido pelo teste de Tukey ou comparando os tratamentos em cada ponto de tempo. Heatmap foi realizado usando o pacote R d3heatmap.

### 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificou-se um total de 53 metabólitos em folha e 62 em raiz, sendo 48 metabólitos comuns a ambos, para as três genótipos de citros em condições irrigáveis e não irrigáveis (Fig 3 e 4). Em condição de déficit hídrico verificou-se que a maior quantidade de metabólitos acumulados foram detectados em raiz, indicando a primeira via de percepção do estresse. Entre os genótipos analisados, sabe-se que o LCR tem um padrão de maior extração de água, diferente do TSKTR e TSKMA que são mais conservadores no uso da água. Estes genótipos têm mecanismos distintos de proteção para o estresse hídrico apontando para tal, diferenças na expressão de metabólitos como forma de sinalizar as condições limitantes e permitir que a planta consiga se aclimatar. Visto que, as plantas desenvolvem diversas estratégias e uma gama de recursos bioquímicos para garantir sua sobrevivência sob condições ambientais adversas (Arbona et al., 2017; Rodziewicz et al., 2014).

As respostas das plantas às condições de estresse abiótico são direcionadas para a ativação de vias bioquímicas que conduzem à produção de compostos defensivos e tolerância melhorada (Arbona et al., 2017). Diferentes tipos de metabólitos podem se acumular em resposta ao estresse de seca em diferentes espécies de plantas, dependendo de espécies de plantas variando em tolerância à seca e gravidade do estresse de seca em diferentes estudos (Du et al., 2012). O estresse abiótico induz mudanças na composição de metabólitos primários e secundários. Quanto ao metabolismo primário, as variações na acumulação de carboidratos, aminoácidos e poliaminas são as principais respostas observadas em plantas submetidas a diferentes estresses abióticos. Os metabólitos secundários são produzidos em quantidade mínima e não são essenciais para a sobrevivência (Arbona et al., 2017).

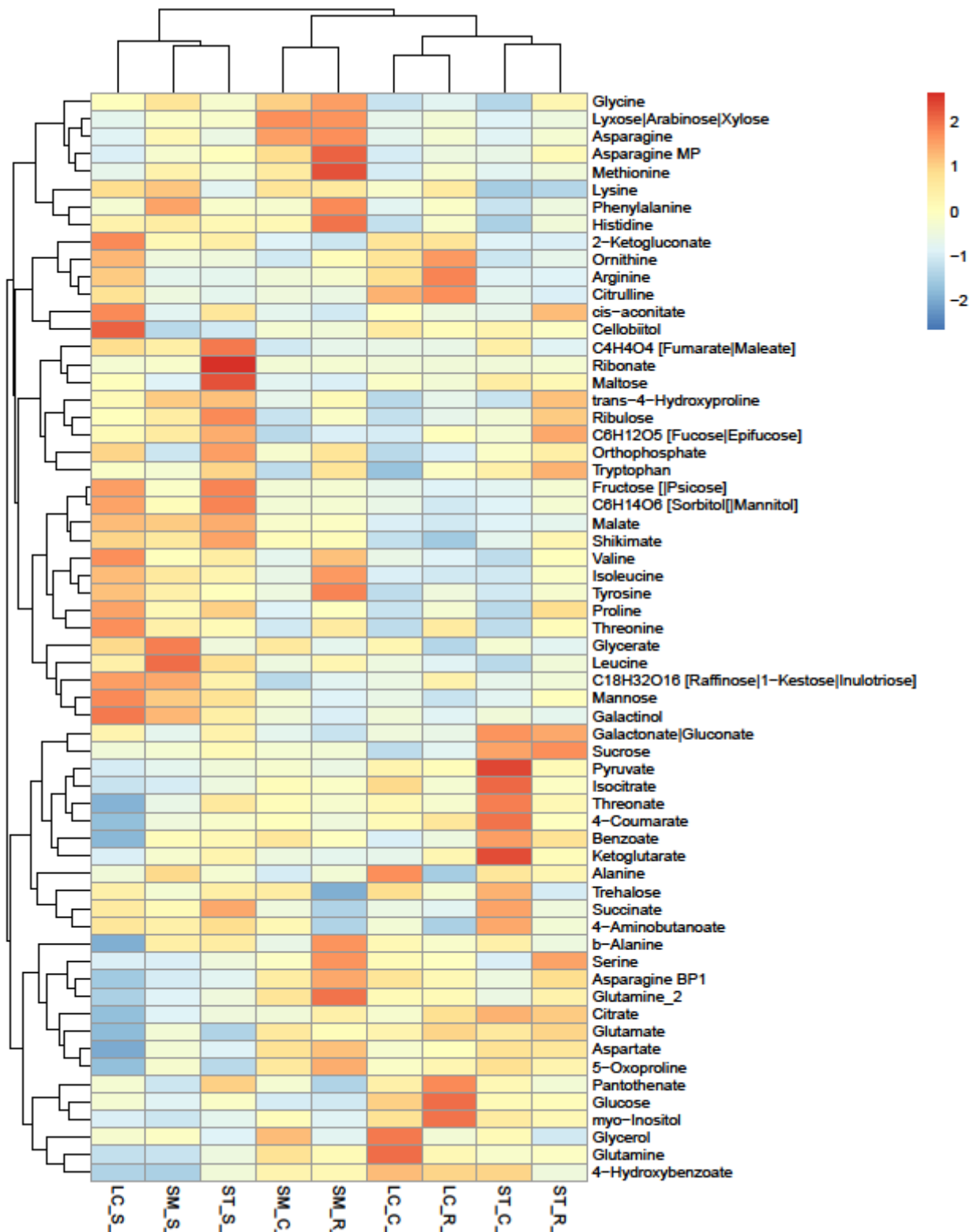
Uma das respostas das plantas amplamente descritas ao déficit hídrico é o ajustamento osmótico, que requer a acumulação de solutos compatíveis, como os aminoácidos bem como hidratos de carbono, polióis e compostos de amônio quaternário (Rodziewicz et al., 2014). Entretanto, a acumulação de osmólitos comuns na célula vegetal é conhecida por ser importante não só para manter o turgor de células por ajuste osmótico e estabilizar as enzimas, mas também conferir proteção contra oxidação por redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) para, conseqüentemente, ajudar a restabelecer o equilíbrio redox celular (Arbona et al., 2017).



**Figura 3:** *Heatmap* do perfil metabólico e agrupamento de folha de genótipos de citros sob diferentes regimes hídricos. SM: Sunki Maravilha; ST: Sunki Tropical; LC: Limão Cravo; C: Controle; S: Estresse Severo e R: Reidratado

Os aminoácidos serina (Ser) e isoleucina (Ile) foram detectados em ambos materiais vegetais analisados. Constatou-se queda evidente nos níveis de Ser para todos os genótipos em condições de estresse. Em folhas, observou-se maior expressão do metabólito em condições controle, principalmente para o genótipo TSKTR, havendo queda acentuada em deficiência hídrica voltando a apresentar aumento após reidratação. Corroborando com o encontrado por Du et al., (2012), com o qual verificaram que há uma queda deste aminoácido no início do estresse, então de acordo ao observado neste trabalho, com o progresso da seca, a Ser continua sinalizando o estresse, principalmente em folhas. Yamada et al. (2005) também observaram uma queda significativa para concentração de Ser em folhas de petúnia sob déficit hídrico mais prolongado, evidenciando uma possível sinalização contínua com a progressão do estresse. Heing et al. (2004) detectaram a presença de várias serina proteases em folhas de feijão que são diretamente afetadas pelo déficit hídrico, demonstrando uma relação entre a tolerância a seca e uma atividade serina proteinase e sugerindo que a função foi associada com um mecanismo de proteção contra a senescência prematura induzida por secas. Para os autores, o fato de que não se observar aumento da atividade da serina proteinase foi correlacionado a cultivares mais tolerantes. Os resultados obtidos neste estudo apontam que em condições hídricas limitantes há uma menor acúmulo para o genótipo LCR, seguido pelo TSKMA e TSKTR, confirmando vias de mecanismos da maior tolerância do LCR.

Neste trabalho, não houve uma queda gradual para os níveis de Ile, diferentemente do achado por Du et al, (2012). Aliás, observou-se que tanto em folhas quanto em raízes, este aminoácido em condições de estresse, foi mais expressivo em folhas de TSKTR e após reidratação persistiu com altas concentrações em raízes de TSKMA. Em restrição hídrica, Charlton et al. (2008) detectaram a presença de Ile em folhas de ervilha, contudo este metabólito estava em menor concentração em relação aos outros metabólitos encontrados e Rizhsky et al., (2004) não detectaram a presença deste aminoácido. Yamada et al. (2005) constataram que durante o estresse hídrico houve aumento nos níveis de Ile em folhas, sendo superior ao tratamento controle. Em detrimento com o estudo de Du et al. (2012), estes autores analisaram a expressão destes aminoácidos em condições de estresse mais prolongado. O conhecimento sobre a relação destes aminoácidos com o déficit hídrico, ainda é escasso, mas certamente, a redução na concentração de Ile, ocorre nos momentos iniciais do estresse.



**Figura 4:** Heatmap do perfil metabólico e agrupamento de raiz de genótipos de citros sob diferentes regimes hídricos. SM: Sunki Maravilha; ST: Sunki Tropical; LC: Limão Cravo; C: Controle; S: Estresse Severo e R: Reidratado.

O ajuste osmótico é feito por acumulação de aminoácidos livres, prolina e açúcares nas raízes e parte aérea. O aumento nos níveis de prolina (Pro) é uma resposta generalizada da planta aos estresses ambientais, incluindo baixo potencial de água (Mohammadkhani; Heidari, 2008). Vários autores vêm demonstrando o importante papel da Pro para sinalização de estresse hídrico. Neste estudo, observa-se claramente o aumento nos níveis de Pro na imposição do estresse para todos os genótipos. Em raízes, há uma expressão mais significativa para o LCR e uma maior redução após reidratação. Como este porta-enxerto tem comportamento de maior extração de água em condições limitantes e a raiz tem efeito direto na detecção do decréscimo hídrico, provavelmente este genótipo torne-se mais responsivo ao estresse e tenha uma rápida recuperação após a limitação hídrica. Em folhas, a maior expressão de Pro foi verificada no genótipo TSKTR, sugerindo que este tenha uma rápida sinalização para parte aérea.

Os níveis de glutamato (Glu), precursor da Pro, tanto em folha quanto em raiz, decresceu em condições de seca, bem como constatado por Yamada et al. (2005). De acordo com Delaunay e Verma (1993), a Pro pode ser sintetizada tanto pelo Glu quanto pela Ornitina (Orn), sendo a síntese por Glu a via predominante em condições de estresse. Roosens et al. (1995) analisaram a expressão de Pro em plantas jovens e adultas de *Arabidopsis thaliana* e verificaram que em plantas adultas, a via preferencial foi pelo Glu, porém em plantas jovens observou-se que as duas vias conjuntamente desempenharam papel importante para o aumento da Pro em condições de estresse salino. Diante ao exposto e aos resultados obtidos neste estudo, sugere-se que o aumento dos níveis de Pro foi ocasionado conjuntamente pela síntese via Glu e Orn, principalmente devido ao estágio das plantas.

A metionina (Met), em raízes, não seguiu um padrão, havendo diferenças nas concentrações em todas as condições hídricas. No geral, o TSKMA foi o genótipo que expressou maiores concentrações nos três regimes hídricos, sendo que em condições de reidratação houve maior teor do metabólito. Em folhas, a Met foi responsável por maior concentração em controle, somente para o genótipo LCR. Em condição de seca e após reidratação houve um aumento mais acentuado somente no genótipo TSKTR. A Met possivelmente é um metabólito de sinalização de início de estresse e por isso não houve uma correlação positiva da progressão do estresse e concentração do metabólito. Alterações na manose e a Met poderiam refletir respostas metabólicas precoces ao estresse de seca leve ou de curto prazo (Du et al., 2012).

Em deficiência hídrica, algumas plantas permanecem com os estômatos abertos e alta condutividade hidráulica para permitir que ocorra a fotossíntese e fornecimento de nutrientes para a parte aérea, com o custo da perda de turgor (Sade et al. 2012), sendo o metabolismo e acumulação de carboidratos é ligado ao desempenho fotossintético (Arbona et al., 2017). Então como estratégia, uma das respostas primárias ao estresse nessas plantas é a inibição do crescimento, reduzindo as demandas metabólicas da planta para mobilizar metabólitos para a síntese de compostos protetores necessários para o ajuste osmótico (Bhargava; Sawant, 2012).

Em raízes, a concentração de manose aumentou em condições de estresse por seca, sendo o genótipo LCR com maior expressão do metabólito. Em condições controle e reidratada, a expressão do metabólito era menor, contudo no porta-enxerto TSKTR em condições reidratadas apresentou concentrações elevadas de manose em comparação aos outros genótipos (Fig. 4). Em folhas, as expressões do metabólito foram mais brandas, havendo a maior diferença na expressão para os tratamentos controle e estresse severo no genótipo TSKTR. Em condição de reidratação, não há um decréscimo tão acentuado, somente o TSKMA tem maior redução em comparação aos demais genótipos (Fig 3). Em ambos materiais vegetais, observou-se que o genótipo TSKTR teve uma redução menor do metabólito do tratamento severo para o reidratado, indicando haver ainda respostas para o estresse, mesmo em condições irrigáveis, provavelmente por uma recuperação mais lenta. Segundo Rizhsky et al. (2004), houve um aumento significativo nos níveis de manose detectado em folhas de *Arabidopsis thaliana* submetidas a déficit hídrico. Os resultados deste trabalho indicam uma concentração mais acentuada em raízes, possivelmente por ser receber os efeitos primeiramente e diretos da seca, contudo pode haver diferenças na expressão deste carboidrato, visto que são genótipos diferentes e podendo haver discrepância na severidade e duração do estresse, afinal a manose foi verificada em níveis de estresse mais brandos por Du et al. (2012).

Estudos apontam o aumento de açúcares sob estresse hídrico por seca. Nos açúcares solúveis (incluindo a sacarose, glicose, frutose), o aumento pode vêm principalmente de degradação do amido a partir de cloroplastos, logo em geral, os açúcares solúveis tendem a aumentar, enquanto o teor de amido diminui (Chaves et al., 2009; Chaves, 1991 ). Açúcares como glicose e frutose apresentaram aumento em seus níveis quando comparados ao controle, seguindo o encontrado por Du et al. (2012), em condições mais severas de estresse. O aumento da glicose foi detectado em folhas em



todos os genótipos, com maior expressão na TSKMA, neste trabalho, e todos os genótipos tiveram reduções deste açúcar após reidratação, corroborando com resultados apresentados por Santana-Vieira et al. (2016). A frutose teve expressão tanto em folhas quanto em raízes, sendo o aumento mais significativo em raízes e nos genótipos LCR e TSKTR (Fig. 4). Tanto para folha quanto para raiz, a expressão de frutose foi diferente do observado por Santana-Vieira et al. (2016), no qual não houve diferenças significativas para LCR em condição de estresse e controle, em ambos materiais vegetais, já neste trabalho observou-se uma tendência de aumento para LCR em condições de estresse. Para TSKMA, as maiores concentrações foram encontradas em plantas reidratadas e o no trabalho de Santana-Vieira et al. (2016), maior nível deste açúcar foram encontrados sob estresse severo. Estas diferenças observadas entre os trabalhos podem estar relacionadas às condições do experimento, duração do estresse e estágio da planta.

Corroborando com Santana-Vieira et al. (2016) observou-se um aumento nos níveis de rafinose em raízes em restrição hídrica, entretanto não houve diferenças na expressão de TSKMA e LCR, como observado pelos autores, ao qual houve maior nível em TSKMA. Neste trabalho, dentre os genótipos somente TSKTR teve uma menor expressão do metabólito. A trealose também foi detectada neste estudo, todavia somente em raízes, e diferentemente dos autores, não houve tendência de diferenças na expressão do metabólito. Tanto a rafinose, quanto a trealose são metabólitos nem sempre detectáveis, devido as amostras usadas e condições impostas.

Em condições de reidratação, alguns açúcares apresentaram maior nível de expressão quando comparadas a condição de estresse, como por exemplo, TSKMA e TSKTR que tiveram acréscimo nos níveis de frutose e TSKMA com acréscimo de glicose, após reidratação. Supõe-se que os processos relacionados a transporte podem ser responsáveis, por meio da manutenção após reidratação, este evento foi observado em alguns metabólitos por Pinheiro et al. (2004).

Os resultados obtidos, em folha, exibem uma tendência de diferentes genótipos serem agrupados mais intensamente, de acordo com a semelhança na expressão dos metabólitos, pelos regimes hídricos impostos do que pelos mesmos genótipos em diferentes condições hídricas. Isto indica que há uma possível correlação entre a expressão dos metabólitos com o estado de hidratação dos tecidos (Fig. 3). Entretanto, observa-se que, houve um agrupamento entre o genótipo LCR em condições controle com o TSKMA em condição de estresse. Sugere-se que este resultado possa ter sido

ocasionado, visto que esses genótipos têm diferentes estratégias e sinalização sobreviver à seca.

Em raízes, observa-se um agrupamento de todos os genótipos em déficit hídrico, no entanto há um agrupamento maior entre os genótipos TSKMA e TSKTR, sugerindo que as respostas de ambos sejam semelhantes devido a proximidade genética destes porta-enxertos. Nos tratamentos controle e reidratado, houve uma associação dos dois regimes hídricos de acordo com os genótipos, indicando que possivelmente após a reidratação haja uma rápida sinalização do estado hídrico da planta, fazendo a mesma retornar a condições ótimas (Fig. 4).

Considerando as relações existentes entre folha e raiz, sugere-se que as respostas específicas de cada genótipo sejam mais expressas nas raízes. Há um maior número de metabólitos encontrados em raízes, possivelmente devido ao primeiro contato com o estresse, sinalizando a condição limitante e conseqüentemente impulsionando respostas específicas de cada genótipo para estabelecer estratégias para tolerar a limitação hídrica.

## 6.4 CONCLUSÃO

- O maior número de metabólitos foi encontrado em raízes, possivelmente por ser o primeiro órgão vegetal a perceber o estresse;
- De modo geral, alguns dos metabólitos detectados foram aminoácidos e carboidratos;
- Em folhas, houve uma maior tendência de diferentes genótipos serem agrupados mais intensamente por ao regime hídrico. Nas raízes, constatou-se maior agrupamento entre genótipos indicando uma tendência de sinalização específica.

## 6.5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ARBONA, V., MANZI, M., ZANDALINAS, S.I., VIVES-PERIS, V., PÉREZ-CLEMENTE, R.M., GÓMEZ-CADENAS, A. Physiological, metabolic, and molecular responses of plants to abiotic stress. *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective*. v. 2, p 1-35, 2017

BRARGAVA, S.; SAWANT, K. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding* v. 132, p. 21–32, 2013

CHARLTON, A.J., J.A. DONARSKI, M. HARRISON, S.A. JONES, J. GODWARD, S. OEHLISCHLAGER, J.L. ARQUES, M. AMBROSE, C. CHINOY, P.M.MULLINEAUX, C. DOMONEY. Responses of the pea (*Pisum sativum* L.) leaf metabolome to drought stress assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics* 4:312–327, 2008

CHAVES, M. M. Effects of Water Deficits on Carbon Assimilation. *Journal of Experimental Botany*, v. 42 (234), p. 1-16, 1991

CHAVES, M.M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, v.103, p.551-560, 2009.

CUADROS-INOSTROZA A, et al. TargetSearch - a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. *BMC Bioinformatics* p.10:12, 2009.

CUADROS-INOSTROZA, A., CALDANA, C., REDESTIG, H., KUSANO, M., LISEC, J., PENA-CORTES, H., WILLMITZER, L., AND HANNAH, M. A., TargetSearch--a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data: *Bmc Bioinformatics*, v. 10, p. 428, 2009.

DU, H.; WANG, Z.; YU,W.; HUANG, B. Metabolic Responses of Hybrid Bermudagrass to Short-term and Long-term Drought Stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. v.137(6) p:411–420. 2012.

GIAVALISCO P, et al. Elemental formula annotation of polar and lipophilic metabolites using (13)C, (15)N and (34)S isotope labelling, in combination with high-resolution mass spectrometry. *Plant J*. v.68(2), p.364-376, 2011.

GIAVALISCO, P., LI, Y., MATTHES, A., ECKHARDT, A., HUBBERTEN, H. M., HESSE, H., SEGU, S., HUMMEL, J., KOHL, K., AND WILLMITZER, L., Elemental formula annotation of polar and lipophilic metabolites using (13) C, (15) N and (34) S isotope labelling, in combination with high-resolution mass spectrometry: *Plant J.*, 2011

HALL, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist*, Cambridge, v. 169, p. 453-468, 2006.

HIENG, B., K. UGRINOVI, J. SUSTAR-VOZLIC, AND M. KIDRIC. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. *Journal Plant Physiol.* 161:519–530, 2004.

HUEGE, J., KRALL, L., STEINHAUSER, M.C., GIAVALISCO, P., RIPPKA, R., TANDEAU DE MARSAC, N. AND STEINHAUSER, D. Sample amount alternatives for data adjustment in comparative cyanobacterial metabolomics. *Anal. Bioanal. Chem.* v.399, p.3503–3517, 2011.

JORGE, T. F.; RODRIGUES, J. A.; CALDANA, C; SCHMIDT, R; DONGEN, J.T.V; THOMAS-OATES, J.; ANTONIO, C. Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress. *Mass Spectrometry Reviews*, 2015

KOMATSU, S.; SHIRASAKA N, SAKATA K. ‘Omics’ techniques for identifying flooding–response mechanisms in soybean. *Journal of proteomics.* v.10, p. 1016-1026, 2013.

MARTORANO, L.G. Padrões de resposta da soja a condições hídricas do sistema solo-planta-atmosfera, Observados no campo e simulados no sistema suporte a decisão dssat. 2007. 151 f. Tese (Doutorado) - Curso de Fitotecnia, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2007.

MOHAMMADKHANI, N; HEIDARI, R. Drought-induced Accumulation of Soluble Sugars and Proline in Two Maize Varieties. *World Applied Sciences Journal* v. 3 (3), p. 448-453, 2008

NEVES, M. F.; KALAKI, R. B.; TROMBIN, V. G. O Retrato da Citricultura Brasileira, CitrusBR. 2010.

PINHEIRO, C; PASSARINHO, J.A.; RICARDO, C.P. Effect of drought and rewatering on the metabolism of *Lupinus albus* organs. *Journal of Plant Physiology.* v. 161, p. 1203–1210, 2004

PUTRI, S.P. et al. Current metabolomics: Practical applications. *Journal of Biosciences and Bioengineering*, v.x, p.1-10, 2012.

QUEIROZ, R.J.B. Resposta fisiológica e molecular de dois genótipos de milho à limitação hídrica. 2010. 154f. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em Agronomia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2010

RIZHSKY, L., H.J. LIANG, J. SHUMAN, V. SHULAEV, S. DAVLETOVA, R. MITTLER. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology.* 134:1683–1696, 2004.

ROESSNER, U., LUEDEMANN, A., BRUST, D., FIEHN, O., LINKE, T., WILLMITZER, L., AND FERNIE, A. R., Metabolic profiling allows comprehensive

phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems: *Plant Cell*, v. 13 (1), p. 11-29, 2001

RODZIEWICZ,P; SWARCEWICZ,B; CHMIELEWSKA,K; WOJAKOWSKA,A; STOBIECKI,M. Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta Physiologiae Plantarum*. v.36, p. 1–19, 2014

ROOSENS NH, THU TT, ISKANDAR HM, JACOBS M. Isolation of the ornithine-delta-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana* . *Plant Physiology*. v. 117, p.263-271.

SADE, N; GEBREMEDHIN A, MOSHELION M. Risk-taking plants: anisohydric behavior as a stress-resistance trait . *Plant Signaling and Behavior*. v. 7, p. 767-770

SANTANA-VIEIRA, D.D.S; FRESCHI, L.; ALMEIDA, L.A.H.; MORAES, D.H.S.; NEVES, D.M.; SANTOS, L.M.; BERTOLDE, F.Z.; SOARES FILHO, W.S.; COELHO FILHO, M.A.; GESTEIRA, A.S. Survival strategies of citrus rootstocks subjected to drought. *Scientific Reports*. v. 6, p. 1-12

SILVA, S.R.S.; Demuner, A.J.; Barbosa, L.C.A.; Casali, V.W.D.; Nascimento, E.A.; Pinheiro, A.L. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. *Acta Scientiarum, Maringá*, v. 24, n. 5, p.1363-1368, 2002.

STACKLIES, W., REDESTIG, H., SCHOLZ, M., WALTHER, D., AND SELBIG, J., *pcaMethods* a bioconductor package providing PCA methods for incomplete data: *Bioinformatics*, v. 23(9), p. 1164-1167, 2007

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3. ed. Artmed: Porto Alegre, 2004.

YAMADA, M.; H. MORISHITA; K. URANO; N. SHIOZAKI; K. YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. SHINOZAKI; Y. YOSHIBA. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *Journal of Experimental Botany*. v 56, p. 1975–1981, 2005

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A combinação entre plantas em mesmo vaso pode ocasionar mudanças nas respostas dos genótipos à condição de seca, podendo ser uma excelente ferramenta para condicionar maior tolerância a genótipos;
- A combinação LCR<sup>TSKMA</sup> é promissora e direcionada a uma nova forma de manejo e de sistema de plantio de citros pode garantir maior rendimento em progressões de déficit hídrico;
- A sinalização pelo acúmulo de diversos metabólitos pode vir a determinar maior ou menor tolerância ao estresse.