

**VERÓNICA LORENA DOVIS**

**BALANÇO DE CARBOIDRATOS E NITROGÊNIO NA PLANTA:  
EFEITO DA CARGA DE FRUTOS E SUA RELAÇÃO COM O  
DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO EM LARANJEIRA  
'VALÊNCIA'**

**CAMPINAS**

**2012**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**VERÓNICA LORENA DOVIS**

**“Balanço de carboidratos e nitrogênio na planta: efeito da carga de  
frutos e sua relação com o desenvolvimento reprodutivo em  
laranjeira ‘Valência’”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*VERONICA LORENA DOVIS*  
*Eduardo C. Machado*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Doutor em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Caruso Machado

**CAMPINAS**  
**2012**

## FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

D751e	<p>Dovis, Verónica Lorena, 1976- Balço de carboidratos e nitrogênio na planta: efeito de carga de frutos e sua relação com o desenvolvimento reprodutivo em laranja 'Valência' / Verónica Lorena Dovis. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Eduardo Caruso Machado. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Alternância de safras. 2. <i>Citrus</i>. 3. Florescimento - Inibição. 4. Remobilização de reservas. 5. Fotossíntese. I. Machado, Eduardo Caruso. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	---

### Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Carbohydrate and nitrogen balance in plant: effects of fruit load and their relationship with reproductive development of sweet orange 'Valencia'

**Palavras-chave em Inglês:**

Alternate bearing

*Citrus*

Flowering - Inhibition

Reserves mobilization

Photosynthesis

**Área de concentração:** Biologia Vegetal

**Titulação:** Doutor em Biologia Vegetal

**Banca examinadora:**

Eduardo Caruso Machado [Orientador]

Rafael Vasconcelos Ribeiro

Dirceu de Mattos Junior

Ricardo Ferraz de Oliveira

João Alexio Scarpere Filho

**Data da defesa:** 24-07-2012

**Programa de Pós Graduação:** Biologia Vegetal

Campinas, 24 de julho de 2012.

**BANCA EXAMINADORA**

Dr. Eduardo Caruso Machado (Orientador)



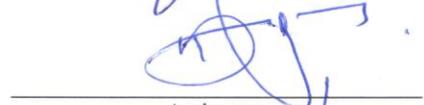
Assinatura

Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro



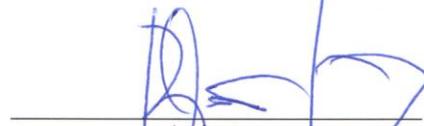
Assinatura

Dr. Dirceu de Mattos Junior



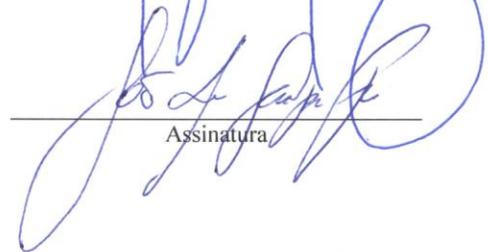
Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira



Assinatura

Prof. Dr. João Alexio Scarpate Filho



Assinatura

Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato

\_\_\_\_\_

Assinatura

Dra. Norma de Magalhães Erismann

\_\_\_\_\_

Assinatura

Prof. Dr. Rafael Silva Oliveira

\_\_\_\_\_

Assinatura

*...Aqueles que passam por nós não vão  
sós. Deixam um pouco de si, levam um  
pouco de nós...*

ANTOINE DE SAINT-EXUPÉRY

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar sempre o meu caminho;

- Ao Dr. Eduardo Caruso Machado, por me oferecer esta oportunidade, pela dedicada e paciente orientação e ensinamentos;

- À minha família, pelo amor e apoio incondicional, fonte da minha fortaleza;

- Ao Juliano Q. Silva, pelo amor e conforto, pelas sugestões e correções, companheiro de todas as horas;

- Aos colegas da Fisiologia Vegetal do IAC, pelo indispensável auxílio nas longas jornadas na casa de vegetação: Carlos Marcos dos Santos, Cristina Sales, José Rodrigues, Leandro da Silva, Paulo Marchiori, Ricardo Machado, Sarita Rossi, Thiago Duarte; e em especial ao Severino Nogueira, pelas ideias e empenho no trabalho;

- Ao Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro pelas sugestões, ensinamentos e auxílios no desenvolvimento do trabalho e durante a pré-banca;

- Ao Dr. Milton Massao Shimizu e Dra. Rose Marry Gondim Thomaz pelo auxílio nas análises enzimáticas;

- Aos colegas e amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal 'Coaracy M. Franco' do Instituto Agrônomo (IAC): Fernanda Castro, Daniela Machado e Karina Silva pela amizade e auxílio nas análises bioquímicas;

- Ao Instituto Agrônomo pela oportunidade e infraestrutura disponibilizada;

- Ao Centro APTA Citros 'Sylvio Moreira' do IAC pela concessão do espaço e equipamentos para a execução deste trabalho, em especial aos técnicos Luis Fernando e Vanderlei;

- Ao Instituto de Biologia Vegetal da Unicamp pela oportunidade e em especial ao Dr Paulo Mazzafera que disponibilizou os meios e infraestrutura para a realização das análises;

- Ao Dr. Dirceu de Mattos Júnior pelas sugestões durante o decorrer do experimento e durante a pré-banca e ao Dr. Rodrigo Boaretto pelas sugestões durante o decorrer do experimento,

- Ao Dr Camilo Lázaro Medina, pelo auxílio e sugestões no decorrer do experimento,

- À Dra Simone Rodrigues da Silva pela pelas sugestões durante a pré-banca,

- À Régia Alvarez e Márcia Silva por terem me acolhido nos momentos difíceis e a todos aqueles que de uma forma ou outra me acompanharam neste caminho;

- À Secretaria de Pós Graduação e em especial à secretária Maria Roseli de Melo pelo auxílio ao longo do curso;
- À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos;
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto, processo FAPESP n° 05/57862-8.

## SUMÁRIO

Resumo .....	9
Abstract.....	11
Lista de figuras .....	13
Lista de tabelas .....	18
Lista de abreviaturas.....	19
1. Introdução .....	21
2. Revisão da literatura .....	25
2.1. Crescimento das plantas .....	26
2.2. Brotação e floração.....	30
2.2.1. Fatores do ambiente e floração.....	32
2.2.2. Carboidratos e sua relação com a floração.....	33
2.2.3. Hormônios e inibição da floração .....	34
2.3. Frutificação.....	35
2.4. Metabolismo do carbono .....	38
2.4.1. Assimilação de CO <sub>2</sub> .....	38
2.4.2. Reservas: armazenamento e remobilização .....	39
2.5. Metabolismo de nitrogênio.....	41
3. Material e Métodos .....	45
3.1. Material vegetal e tratamentos.....	45
3.2. Métodos .....	48
3.2.1 Medidas de trocas gasosas .....	48
3.2.2 Coletas de plantas e amostragens.....	48
3.2.3 Avaliações das brotações .....	51

3.2.4	Análises bioquímicas .....	52
3.2.5	Preparação dos extratos e avaliação das atividades enzimáticas .....	55
3.2.6	Delineamento experimental e análise estatístico dos dados.....	57
4.	Resultados e Discussão .....	59
4.1.	Ambiente na casa de vegetação .....	59
4.2.	Brotação: floração e crescimento vegetativo.....	61
4.3.	Variação sazonal das trocas gasosas.....	67
4.4.	Crescimento das plantas .....	71
4.4.1.	Frutos.....	73
4.4.2.	Folhas .....	73
4.4.3.	Ramos.....	75
4.4.4.	Raízes .....	76
4.5.	Teores de carboidratos.....	77
4.5.1.	Carboidratos nas folhas .....	77
4.5.2.	Carboidratos nos ramos.....	83
4.5.3.	Carboidratos nas raízes .....	87
4.6.	Teores de nitrogênio e compostos associados .....	93
4.6.1.	Nitrogênio total em folhas e raízes.....	93
4.6.2.	Compostos nitrogenados protéicos e não protéicos .....	97
4.6.3.	Enzimas do metabolismo do nitrogênio .....	100
4.7.	Balanco global de carbono e nitrogênio .....	104
5.	Conclusões .....	109
6.	Referências bibliográficas.....	111
7.	Anexos .....	125

## RESUMO

### **Balço de carboidratos e nitrogênio na planta: efeito da carga de frutos e sua relação com o desenvolvimento reprodutivo em laranja ‘Valência’**

As hipóteses deste estudo foram: a presença de frutos nas variedades de laranja tardia e as variações sazonais no ambiente afetam o desenvolvimento reprodutivo, o metabolismo de carbono e nitrogênio e o acúmulo e remobilização de reservas nos órgãos da planta; cada estágio fenológico tem necessidades nutritivas específicas, que afetariam a assimilação de CO<sub>2</sub> e o metabolismo de carboidratos e nitrogênio. Estas hipóteses foram testadas em plantas que sofreram ou não desbaste total de frutos com o intuito de induzir variações na demanda de assimilados. O experimento foi executado em Cordeirópolis (SP) em plantas de laranja ‘Valência’ de 2,5 anos de idade, crescidas em vasos de 100 L. Em maio de 2009, a metade das plantas foi completamente desbastada de frutos. A partir de julho e ao longo do ciclo produtivo avaliaram-se a dinâmica de assimilação de CO<sub>2</sub>, carboidratos e compostos nitrogenados, e a atividade de enzimas da assimilação de nitrogênio. O experimento foi inteiramente casualizado com três ou quatro repetições, segundo o parâmetro avaliado, o tratamento estatístico dos dados foi como parcelas subdivididas no tempo. Em relação à primavera a fotossíntese é reduzida no inverno e no verão, como consequência da ocorrência de temperaturas mais baixas e mais altas, respectivamente. Porém, a condição fisiológica da planta também afeta a assimilação de CO<sub>2</sub>, a qual é incrementada pela alta demanda de carboidratos antes e durante a floração, mesmo sob baixa temperatura. A presença de frutos inibe parcialmente a brotação e floração visto que plantas desbastadas têm sete vezes mais flores; fixam 31% mais frutos e eles são 6% maiores. A floração é o processo de maior consumo de assimilados, e quanto mais intensa, maior o consumo de amido. Floração e frutificação são os únicos estágios nos quais se observaram diferenças entre os tratamentos; plantas com maior quantidade de flores têm maior consumo de assimilados. O amido continua a ser consumido até o fim da queda fisiológica dos frutos no verão, quando atinge o teor mínimo. Ramos e raízes maiores que 1 mm de diâmetro aportam amido durante o desenvolvimento das brotações e dos frutos. Entre o desbaste e a frutificação há aumento no teor de nitrogênio total nas folhas do último fluxo, ramos e raízes, ainda com baixa temperatura, resultado da maior demanda. O aumento no metabolismo induz maior síntese de proteína nas folhas e raízes menores que 1 mm de diâmetro. A enzima redutase do nitrato (RN) tem a menor

atividade quando comparada com o sistema glutamina sintetase/glutamato sintase, sugerindo ser a que limita a taxa de assimilação de  $\text{NO}_3^-$ . Nas folhas a atividade in vitro da RN incrementa até a frutificação, e segue o padrão de variação sazonal observado na fotossíntese; nas raízes sua atividade é constante ao longo do ano.

**Palavras chave:** alternância de safra; fotossíntese; citros, inibição do florescimento, remobilização de reservas.

## ABSTRACT

### **Carbohydrate and nitrogen balance in plant: effect of fruit load and their relationship with reproductive development in 'Valencia' sweet orange**

The hypotheses of the study are that seasonal variations in environmental conditions affect the assimilation rate of resources while there is accumulation and remobilization of reserves in all the organs of plant to attend variations in nutrients demand. Each phenological stage has different needs, which would affect CO<sub>2</sub> assimilation rate and metabolism of carbohydrates and nitrogen. To analyze these hypotheses the objective was to evaluate the photosynthesis, flowering and fruit production, accumulation and remobilization of carbohydrates during of production cycle, in plants with and without fruit. Also it was objective to evaluate the annual dynamics of nitrogenous compounds and activity of enzymes of nitrogen assimilation. The study was conducted in Cordeirópolis (SP) in plants 'Valencia' orange of 2.5 years old, grown in pots of 100 L. In may 2009, at the start of the trial, half of plants was completely defruit, and starting from july and throughout the production cycle were evaluated photosynthesis, budding, flowering and fruit production, status of reserves of sugars, nitrogen compounds and enzymatic activities. The experimental design was completely randomized with three or four replications, with three or four repetitions, depending on the variable assessed, with split plots in time. It is observed that photosynthesis decreased in winter and summer, consequence of low and high temperature and radiation, respectively. However, the physiological condition of plant also affects the uptake, inducing an increase in photosynthesis prior to flowering, even at low temperatures. The largest demand of plants with fruits results in an increase on efficiency of energy use which comes of the assimilation and reserves. The presence of fruits partially inhibits the sprouting and blooming, even with high leaves starch content, defruited plants have seven times more flowers, fruit set is 31% higher and they are 6% greater. The flowering has the greater consumption of all phenological stages, when it is more intense, largest starch consumption. The flowering and fruiting are the only stages with differences between the treatments; plants with the more fruits and demand have more assimilates consumption. Starch is consumed until the end of june drop, in summer, when it reaches minimum content. Starch for development of flowers and fruits can be contributed by younger shoots, shoots older than one year and roots larger than

1 mm across. From the defruited plants until fruiting the total nitrogen content increases in mature leaves, shoots and roots, even at low temperatures, as result of the higher demand. Soluble protein is accumulated in mature leaves and roots smaller than 1 mm across as a result of increased metabolism. The nitrate reductase enzyme has the lowest activity when compared with the system glutamine synthetase/glutamate synthase, which would indicate that nitrate reductase activity controls the assimilation rate of  $\text{NO}_3^-$ . Nitrate reductase *in vitro* activity in leaves is increased until fruiting, and has seasonal variations similar like was observed in photosynthesis. Nitrate reductase *in vitro* activity in roots is constitutive throughout the year.

**Key words:** alternate bearing, photosynthesis; citrus; flowering inhibition; reserves remobilization.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema do ciclo produtivo anual dos citros. Os retângulos acima representam os principais processos que determinam a produção. As curvas representam a evolução do número de estruturas reprodutivas (----) e o incremento na massa individual dos frutos (—). Adaptado de Goldschmidt & Monselise, 1978; apud Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996..... 26
- Figura 2: Laranjeiras ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’: 24 de março de 2009, antes da aplicação dos tratamentos de desbaste de frutos (A), e em 3 de julho de 2010, antes da data da última medida e amostragem de plantas (B). Foto: V.L. Dovis. .... 46
- Figura 3: Fotografias ilustrativas da classificação das folhas e ramos da brotação de primavera-verão de 2008-2009 para a separação durante a amostragem. .... 50
- Figura 4: Estruturas reprodutivas, sendo os tipos 1 a 10 considerados botões, 11 a 13 considerados flores e 14 considerado chumbinho. Foto: V.L.Dovis. .... 51
- Figura 5: Ambiente dentro da casa de vegetação durante o período experimental de janeiro de 2009 até julho de 2010. Temperatura média, máxima média e mínima média (A) e radiação solar diária recebida em MJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> (B), média de seis dias. Letras e setas acima do gráfico indicam as datas aproximadas do desbaste (D) e dos estádios fenológicos de plena floração (PFl), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica (FQ), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A)..... 60
- Figura 6: Número de nós do último fluxo de crescimento brotados a cada 100 nós (A), número de folhas iniciadas a cada 100 nós (B), proporção de brotações reprodutivas (Br repr) em relação com as vegetativas (Br veg) em ramos do último fluxo de crescimento (C) em laranjeiras ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD). .... 61
- Figura 7: Número de estruturas reprodutivas formadas a cada 100 nós em ramos do último fluxo de crescimento, em laranjeiras ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e sem desbaste de frutos (PSD): botões florais (A), flores (B) e frutos (C).. .... 64

- Figura 8: Diâmetro dos frutos em laranjeiras ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD) desde o início da frutificação até a colheita. Retas indicam taxas de incremento do diâmetro desde plena floração, estimadas para cada tratamento. Fase I de divisão celular, Fase II de alongamento celular e Fase III de amadurecimento dos frutos. .... 67
- Figura 9: Assimilação diária de CO<sub>2</sub> (Ad) em laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD). .... 68
- Figura 10: Produção de massa seca de frutos acumulada nas duas florações (A-B), massa seca das folhas maduras e novas (C-D), massa seca dos ramos do último fluxo e velhos (E-F) e massa seca das raízes (G-H) em laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD em A, C, E, G) e plantas sem desbaste de frutos (PSD em B, D, F, H). Avaliações realizadas no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: plena floração (PFI), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A). .... 72
- Figura 11: Área de folhas velhas, do último fluxo e novas acumulada em laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD em A) e plantas sem desbaste de frutos (PSD em B). Avaliações realizadas no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: plena floração (PFI), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A). .... 74
- Figura 12: Raízes das plantas retiradas dos vasos, logo após a lavagem e remoção da terra e substrato, 26 de agosto de 2009 no estádio fenológico de plena floração em PCD. A) Vista frontal, B) Vista inferior. Foto: V.L. Dovis. .... 77
- Figura 13: Concentração de carboidratos em folhas de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’, coletadas as 13:00 h no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: repouso vegetativo aparente (R), plena floração (PFI), máxima frutificação, (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos + brotação (Cl+B), crescimento linear dos frutos (Cl) e amadurecimento dos frutos (A); em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem

- desbaste de frutos (PSD). Açúcares totais (AT em A), açúcares redutores (AR em B), sacarose (SAC em C) e amido (*Am* em D). ..... 79
- Figura 14: Relação de açúcares redutores/sacarose nas folhas de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ coletadas as 13:00 h em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e sem desbaste de frutos (PSD). Avaliações no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: repouso vegetativo aparente (R), plena floração (PFl), máxima frutificação (MFr), fim da queda fisiológica frutos (FQ), crescimento linear dos frutos+Brotação (Cl+B), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento (A). ..... 82
- Figura 15: Concentração de carboidratos em ramos do último fluxo de crescimento (A, C, E e G) e ramos velhos (B, D, F e H), coletados as 09:00 h em laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’. Avaliados no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: plena floração (PFl), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A); em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste (PSD). Açúcares totais (A-B), açúcares redutores (C-D), sacarose (E-F) e amido (G-H). ..... 85
- Figura 16: Relação açúcares redutores/sacarose nos ramos do último fluxo de crescimento (A) e nos ramos velhos (B) coletados as 09:00 h em laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’, com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e sem desbaste de frutos (PSD). Avaliados no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: plena floração (PFl), máxima frutificação (MFr), final queda fisiológica de frutos (FQ), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos(A). ..... 86
- Figura 17: Teor de açúcares totais (A, C e E) e açúcares redutores (B, D e F) em raízes de distinto diâmetro de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’, coletadas as 13:00 h; em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste (PSD). Avaliadas no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: plena floração (PFl), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A). Raízes de primeira ordem (A-B), raízes entre 1 mm e 5 mm (C-D) e raízes de 10 mm ou mais (E-F). ..... 89
- Figura 18: Teor de sacarose em raízes de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ coletadas as 13:00 h, em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de

2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD). Avaliadas no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: máxima floração (MFl), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A).. ..... 90

Figura 19: Teor de amido em raízes de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ coletadas as 13:00 h em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD). Avaliadas no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: plena floração (PFl), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A). Raízes menores a 1 mm diâmetro (A), raízes maiores a 1 mm de diâmetro (B)..... 92

Figura 20: Teor de nitrogênio total (NT) em folhas do último fluxo (A), raízes de primeira ordem (B) e raízes maiores a 10 mm de diâmetro (C) de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’, coletadas as 13:00 h em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD). Avaliações realizadas no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: repouso vegetativo aparente (R), plena floração (PFl), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos + brotação (CL+Br), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A)..... 94

Figura 21: Teor de proteínas totais (A e B), aminoácidos livres totais – N- $\alpha$ NH<sub>2</sub> (C e D) e N-NO<sub>3</sub>- solúvel (E e F) em folhas (A, C e E) e raízes de primeira ordem (B, D e F) em laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’, coletadas as 13:00 h em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD). Avaliações realizadas no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: repouso vegetativo aparente (R), plena floração (PFl), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos + brotação (CL+B), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A)..... 98

Figura 22: Atividade de enzimas do metabolismo do nitrogênio em folhas (A, C e E) e raízes de primeira ordem (B, D e F) de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ coletadas as 13:00 h em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD). Avaliações realizadas no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: repouso vegetativo aparente (R), plena

floração (PFI), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos + brotação (CL+B), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A). Enzimas avaliadas: redutase do nitrato (RN em A, B), glutamine sintetase (GS em C, D) e glutamato sintase (GOGAT em E, F). ..... 102

Figura 23: Remobilização de açúcares totais metabolizáveis (AT) no período entre plena floração (PFI) e fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), nos distintos órgãos da planta (A), e massa seca acumulada nos distintos órgãos, produzida no período entre o desbaste (D) e o amadurecimento dos frutos (A) em julho de 2010 (B); em plantas de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste (PSD). ..... 105

Figura 24: Partição do conteúdo de carboidratos totais metabolizáveis (AT) nos distintos órgãos avaliados, raízes (Rz) e ramos (Rm) no momento de amadurecimento dos frutos, em plantas de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste (PSD). ..... 106

Figura 25: Conteúdo de nitrogênio acumulado em raízes (Rz), ramos (Rm), folhas e frutos de plantas de laranjeira 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo' com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste (PSD). Quantificações realizadas no desbaste e no estágio de amadurecimento dos frutos (Amad), em julho de 2010. .... 107

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Características químicas da mistura areia/composto orgânico/terra contida nos vasos no início do experimento, em maio de 2009..... 46
- Tabela 2: Desenvolvimento das estruturas reprodutivas e produção de frutos das plantas de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD). Média de 10 plantas  $\pm$  erro padrão. .... 62
- Tabela 3: Valores de assimilação de CO<sub>2</sub> e condutância estomática observados as 11:00 h (horário de máxima) em plantas de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’, com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste (PSD). No desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: repouso vegetativo aparente (R), plena floração (PF1), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos + brotação (CL+Br), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A)..... 69

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A</i>	Estádio BBCH 84 de frutos maduros
<i>A<sub>n</sub></i>	Assimilação de CO <sub>2</sub> (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
<i>ABA</i>	Ácido abscísico
<i>ACC</i>	1-amino-ciclopropano-1-carboxílico
<i>A<sub>d</sub></i>	Assimilação diária de CO <sub>2</sub> por m <sup>2</sup> de área foliar (mmol m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )
<i>Am</i>	Amido
<i>AR</i>	Açúcares redutores
<i>AT</i>	Açúcares totais
<i>ATP</i>	Adenosina trifosfato
<i>C<sub>i</sub></i>	Concentração intercelular de CO <sub>2</sub> (μmol mol <sup>-1</sup> )
<i>CL</i>	Estádio BBCH 76 de crescimento linear dos frutos
<i>CL+Br</i>	Estádio BBCH 75 de crescimento linear dos frutos + Brotação
<i>D</i>	Desbaste
<i>DFFF</i>	Densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
<i>E</i>	Transpiração (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ),
<i>FQ</i>	Estádio BBCH 74 de fim queda fisiológica
<i>GOGAT</i>	Glutamato sintase (glutamina amida-2-oxoglutarato aminotransferase)
<i>g<sub>s</sub></i>	Condutância estomática (mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
<i>GS</i>	Glutamina sintetase (L-glutamato-ammonia ligase)
<i>IAF</i>	Índice de área foliar
<i>MFr</i>	Estádio BBCH 71 de máxima frutificação
<i>NADH</i>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo de piridina fosfato reduzida
<i>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-NH<sub>3</sub></i>	Amônia
<i>N-NH<sub>2</sub></i>	Aminoácidos livres totais
<i>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></i>	Nitrato solúvel
<i>N<sub>T</sub></i>	Nitrogênio total
<i>PCD</i>	Plantas com desbaste
<i>PFl</i>	Estádio BBCH 65 de plena floração
<i>PSD</i>	Plantas sem desbaste
<i>R</i>	Estádio BBCH 00 de repouso vegetativo aparente
<i>RN</i>	Redutase do nitrato
<i>RNi</i>	Redutase do nitrito
<i>SAC</i>	Sacarose
<i>TF</i>	Temperatura foliar (°C)



## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, em 2010, as exportações agrícolas representaram 28% do valor total das exportações, sendo que os frutos cítricos e seus subprodutos representaram o equivalente a 6,7%. Neste período, o volume das exportações de laranja superou em mais de duas vezes as exportações dos Estados Unidos, que é o segundo maior exportador mundial (FAO, 2012). O cultivo de cítricos na safra 2008/2009 ocupou 41% da superfície cultivada com frutíferas no país, sendo que 89% desta área corresponde ao cultivo de laranjas doces. Nos 837 mil hectares foram produzidos 17,4 milhões de toneladas de cítricos, com uma produção média de 20,8 t ha<sup>-1</sup>. No contexto brasileiro, a produção está concentrada no Estado de São Paulo que possui 70% da área cultivada com cítricos (Neves *et al.*, 2010).

Dentre as variedades disponíveis a laranjeira ‘Valência’ é a segunda mais cultivada no Estado de São Paulo, sendo a maior parte delas enxertadas sobre limoeiro ‘Cravo’. Essa variedade de copa, que se caracteriza por ser de maturação tardia, com colheita concentrada do fim de agosto até dezembro, representava em 2004 até 33% das mudas em formação nos viveiros. Possui boa produtividade e qualidade dos frutos, e se adapta a todos os tipos de comercialização: exportação de fruta fresca, mercado interno e suco concentrado congelado (Pio *et al.*, 2005).

A produtividade dos citros é resultado de uma complexa cadeia de eventos que inclui: crescimento vegetativo, indução e diferenciação das gemas, floração e fecundação, fixação e crescimento dos frutos e finalmente o amadurecimento destes. Cada uma destas etapas tem requerimentos climáticos diferentes, sendo que a resposta é dependente da variedade (Davies & Albrigo, 1994; Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996). Em climas subtropicais a floração é induzida, por efeito de baixas temperaturas e deficiência hídrica ou uma combinação de ambos, enquanto em climas tropicais é a deficiência hídrica o principal fator indutor da floração (Ribeiro *et al.*, 2006). Independentemente do fator, é a indução da floração que dá início ao ciclo produtivo. Sendo que em variedades de colheita tardia há inibição da floração pelos frutos ainda presentes na planta (García-Luis *et al.*, 1995; Yahata *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2007).

A laranjeira ‘Valência’ adulta, quando cultivada em clima temperado no hemisfério norte, pode produzir até 80.000 flores numa floração, mas no máximo 2% delas serão colhidas como frutos (Monselise, 1985). No estado de São Paulo a mesma variedade, em plantas de 15 anos de

idade, pode fixar entre 3% e 18% das estruturas generativas produzidas, dependendo da intensidade de floração e combinação copa/enxerto (Ribeiro *et al.*, 2008). A massiva abscisão de flores e frutos pequenos é um mecanismo de regulação da carga, controlado por ajustes da planta à necessidade e ao suprimento de assimilados. Assim a fixação dos frutos será resultado da interação entre fatores endógenos e exógenos à planta (Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996; Goldschmidt, 1999). Em anos de alta produção, pode haver exaustão das reservas que são consumidas durante a fixação e crescimento dos frutos quando a demanda não consegue ser satisfeita pela produção diária de assimilados (Sanz *et al.*, 1987; Iglesias *et al.*, 2003).

Além do maior consumo de carboidratos em anos de alta produção, na maioria das variedades de laranjeira doce, durante o período de indução das gemas ainda há carga de frutos da floração do ano anterior. Estes dois fatores têm sido mencionados como as principais causas da alternância de safra que se verifica na maioria das espécies de cítricos, sendo menos habitual em variedades sem sementes e especialmente importante em plantas de tangerinas, de tangores e de tangelos. Esta alternância de safra é definida como variações cíclicas na produção de frutos, que em condições hídricas e nutricionais adequadas, é consequência primária da alternância na floração (Monselise & Goldschmidt, 1982). O número de frutos fixados e a produção dependem da quantidade de flores formadas, logo, quando o número de flores por planta é pequeno ocorre baixa produção limitada pela quantidade de flores. Quando a floração é intermediária, a produção é mais ou menos constante e independente do número de flores, e a carga de frutos é controlada pela taxa de abscisão. Quando a floração é intensa, a competição é muito alta e há redução da produção pela alta abscisão de flores (Guardiola *et al.*, 1984; Guardiola & García-Luis, 2000; Agustí, 2003). Em alguns cultivares de laranja tipo Bahia e tangerineiras há produção máxima quando a intensidade de floração é de 20 flores/100 nós, aproximadamente (Guardiola & García-Luis, 2000). Assim, num ano de alta produção pode haver inibição da floração e o início do ciclo de alternância.

Entre os fatores envolvidos na alternância são citados o balanço de carboidratos, alterações metabólicas na nutrição nitrogenada e alteração do balanço hormonal e nutricional (Agustí, 2003). Experimentos realizados com aplicação de reguladores de crescimento, anelamento, desbaste de frutos e outras formas de controle da relação fonte/dreno fornecem evidências que a intensidade da floração estaria relacionada mais com a atividade dos hormônios endógenos (García-Luis *et al.*, 1988; Yamanishi, 1994; García-Luis *et al.*, 1995; Yahata *et al.*,

2004; Prado *et al.*, 2007; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010). Porém, independentemente dos carboidratos terem ou não um papel regulador na floração dos citros, sua exigência é alta, representando de 10% a 20% dos carboidratos investidos na produção dos frutos (Bustan & Goldschmidt, 1998; Yahata *et al.*, 2004).

O número de frutos fixados e seu tamanho potencial são dependentes quase exclusivamente da disponibilidade de assimilados, e as reservas de carboidratos em folhas são intensamente consumidas entre a frutificação e o fim da queda fisiológica dos frutos (Sanz *et al.*, 1987; Goldschmidt, 1999; Iglesias *et al.*, 2003). Além das folhas, foi observado que também os ramos das plantas frutíferas podem acumular reservas de amido (Goldschmidt & Golomb, 1982), as que podem ser consumidas durante a brotação e floração (Jones & Steinacker, 1951; Sanz *et al.*, 1987, Li *et al.*, 2003b; Park, 2011). Contudo, pouco se sabe sobre as variações ao longo do ciclo produtivo. Já a contribuição das raízes foi menos estudada ainda, sabe-se que também podem acumular amido (Goldschmidt & Golomb, 1982; Eissenstat & Duncan, 1992; Bueno *et al.*, 2011), mas em citros não foi estudada a dinâmica sazonal.

As plantas perenes são submetidas a grande variação sazonal na temperatura, umidade e radiação, determinando o crescimento em pelo menos duas épocas muito diferentes: primavera e inverno. Na primavera as temperaturas são consideradas ótimas, a radiação suficiente e há boa disponibilidade hídrica. No inverno, as condições são restritivas para o crescimento, com temperaturas que reduzem a assimilação de CO<sub>2</sub> e radiação e disponibilidade hídrica baixas (Ribeiro & Machado, 2007). Isto limita a oferta de assimilados durante o período de indução das gemas e desenvolvimento das flores (Ribeiro *et al.*, 2012).

Poucos trabalhos foram realizados sobre a influência das condições do ambiente sobre a fisiologia e a ocorrência dos estádios fenológicos, em associação com a produção de frutos e a alternância de safra ao longo de todo ciclo produtivo; além disso, a maior parte dos trabalhos realizados foi conduzida nas regiões citrícolas localizadas no hemisfério norte.

Sabendo que as variações sazonais nas condições do ambiente afetam a produção fotossintética, as hipóteses do presente trabalho são que neste contexto, há acúmulo e remobilização de reservas em todos os órgãos da planta para atender as variações na demanda de carboidratos como resultado da ocorrência dos distintos estádios fenológicos na planta. Além disso, as necessidades específicas em cada fase fenológica afetariam a assimilação de CO<sub>2</sub> e o

metabolismo de carboidratos e de nitrogênio, sendo regulada pela presença de frutos. Estas hipóteses foram testadas em plantas que sofreram ou não desbaste total de frutos com o intuito de induzir variações na demanda de assimilados. Avaliando se o efeito da presença de frutos sobre o desenvolvimento do subsequente ciclo reprodutivo e sobre a dinâmica sazonal de carboidratos e compostos nitrogenados.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Dentro da família *Rutaceae* o gênero *Citrus* é o de maior importância econômica, sendo todas as espécies pertencentes a ele originárias de áreas úmidas tropicais e subtropicais da China e leste e sudeste da Ásia (Monselise, 1986; Donadio *et al.*, 2005), incluindo as ilhas das Filipinas e Indonésia (Reuther, 1973). O número de espécies que pertencem ao gênero *Citrus* varia segundo distintos autores, de 16 a 157 espécies (Monselise, 1986; Donadio *et al.*, 2005). Isto ocorre pela facilidade com que acontecem hibridações entre as distintas espécies, que por sua vez são perpetuadas por embriões nucelar. Há relatos da presença e do uso de espécies cítricas desde o ano 1000 a.C., no entanto no Brasil foi introduzida a partir do ano 1530 pelos colonizadores portugueses e expandiu-se rapidamente pelo litoral, encontrando aqui ótimas condições para produção (Donadio *et al.*, 2005). As plantas cítricas são cultivadas entre os paralelos 44° N e 41° S, mas as principais regiões produtoras atualmente encontram-se em regiões subtropicais entre os 20° e 40° de latitude (Davies & Albrigo, 1994; Agustí, 2003). No Brasil, desde o início do século XX a citricultura tem se expandido e crescido desde o Rio Grande do Sul até Sergipe. No Estado de São Paulo a citricultura tem o seu primeiro período de auge na década de 1930, mas a consolidação definitiva da citricultura paulista e brasileira veio na década de 1960 quando passou a ocupar o lugar de maior exportador mundial de suco concentrado e congelado (Donadio *et al.*, 2005).

A produção comercial de citros depende da intensidade de floração e da fixação dos frutos, que são devidas à complexa cadeia de eventos que ocorrem durante o desenvolvimento da planta e que está relacionada às variações ambientais, metabolismo do carbono e do nitrogênio e balanço hormonal (Davies & Albrigo, 1994; Goldschmidt, 1999). O clima condiciona o desenvolvimento da cultura em todas suas etapas, afetando as fases fenológicas, o crescimento vegetativo e reprodutivo, as características físicas e químicas dos frutos, assim como a maturação e especialmente o potencial de produção (Reuther, 1973). A produção envolve uma série de processos dinâmicos que podem ser separados em fases fenológicas, com requerimentos diferentes e que podem ser representados segundo o esquema da figura 1.

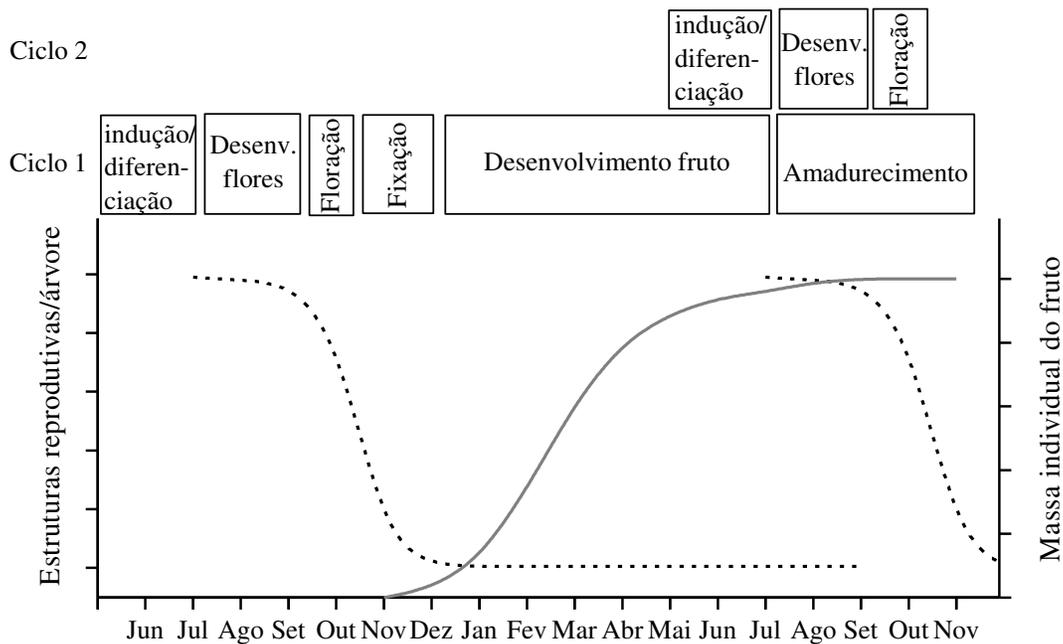


Figura 1: Esquema do ciclo produtivo anual dos citros. Os retângulos acima representam os principais processos que determinam a produção. As curvas representam a evolução do número de estruturas reprodutivas (-----) e o incremento na massa individual dos frutos (—). Adaptado de Goldschmidt & Monselise, 1978; apud Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996.

A laranjeira cv ‘Valência’ é de origem incerta, acredita-se que foi introduzida na Flórida pelos ingleses no fim do século XIX e finalmente levada para a Espanha, onde são cultivadas diferentes variedades que se diferenciam na época de maturação, sendo a ‘Valência Late’ a mais tardia (Agustí, 2003). No Brasil acredita-se que foi introduzida pelos portugueses, sendo atualmente uma variedade de destaque pela boa qualidade e produtividade, produzindo frutas frescas adequadas à exportação e consumo interno; e à produção de suco concentrado e congelado, principalmente para exportação (Pio *et al.*, 2005). É uma variedade de maturação tardia de ampla adaptação climática (Reuther, 1973).

## 2.1. CRESCIMENTO DAS PLANTAS

Em citros, assim como em todas as plantas frutíferas perenes, há crescimento vegetativo e reprodutivo simultâneos ou alternados na forma de fluxos de brotações ao longo do ano. As plantas cítricas apresentam de dois a cinco fluxos de brotações anuais em condições subtropicais

ou podem brotar continuamente nos trópicos sempre que houver disponibilidade de água (Reuther, 1973; Davies & Albrigo, 1994; Medina *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2010). No Estado de São Paulo, assim como em outras regiões subtropicais, há dois fluxos de brotações principais; um de primavera (entre setembro e outubro) mais abundante em produção de estruturas reprodutivas e outro de verão (entre dezembro e fevereiro). Este último, com poucos brotos longos e vigorosos, determina o crescimento em tamanho das plantas, carrega a maior parte das novas folhas, e quase não produz estruturas reprodutivas (Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996; Prado *et al.*, 2007; Sekita, 2008, Ramos *et al.*, 2010). Quanto mais longo o período quente (temperaturas entre 25 e 30 °C) maior será o crescimento dos ramos e mais nós serão formados, sendo que nesses ramos serão iniciadas as flores no próximo ciclo reprodutivo (Monselise & Goldschmidt, 1982; Davies & Albrigo, 1994). Em um pomar de laranjeira ‘Hamlin’ cultivado no município de Limeira, SP; foi observado que na primavera, com temperaturas entre 12 e 31 °C houve 30% mais brotações que no verão, quando as temperaturas foram entre 18 e 32 °C. Porém, no verão o alongamento diário dos ramos foi 2,5 a 5 vezes maior e foram formadas três vezes mais folhas que na primavera (Ramos *et al.*, 2010).

O desenvolvimento das brotações é sensível à umidade do solo e à temperatura aérea e radicular. O alongamento de ramos e raízes ocorre quando a temperatura supera os 13 °C e incrementa-se linearmente dos 18 °C, alcançando o máximo entre 25 e 31 °C para a temperatura da parte aérea e de 25 a 26 °C para a temperatura radicular. Porém, há grande variabilidade entre espécies, variedades e entre combinações com porta-enxerto (Reuther, 1973; Davies & Albrigo, 1994; Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996; Medina *et al.*, 2005).

Em laranjeira tipo Bahia cv ‘Frost’ foi observado que a temperatura do solo afeta positivamente a intensidade da brotação, enquanto a temperatura do ar determina a proporção de brotações vegetativas/reprodutivas. Temperatura do solo de 25 °C induziram o dobro de brotações que a 15 °C, quando a temperatura do ar foi entre 25 e 35 °C (Khairi & Hall, 1976). A redução da temperatura radicular reduz a absorção de água e afeta o potencial hídrico, reduzindo a fotossíntese (Machado *et al.*, 2010; Magalhães Filho *et al.*, 2009) e a síntese e o transporte de citocininas e giberelinas da raiz (Khairi & Hall, 1976; O’Hare & Turnbull, 2004; Veselova *et al.*, 2005). Já, a temperatura da parte aérea afeta positivamente o desenvolvimento de brotações vegetativas, induzindo maior crescimento e mais folhas (Khairi & Hall, 1976; Hall *et al.*, 1977).

A expansão foliar começa ainda quando o ramo encontra-se em alongamento e alcança seu tamanho máximo entre um e dois meses de idade, com porcentagem de massa seca das folhas jovens de 29% alcançando 45% MS após um ano de idade (Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996). Estas folhas somente tornam-se exportadoras de assimilados depois da sua completa expansão, que ocorre depois da quarta ou sexta semana após a brotação. Os valores máximos de fotossíntese são registrados entre os quatro e seis meses de idade e logo depois, declinam (Davies & Albrigo, 1994; Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996; Dovic *et al.*, 2009). No entanto, elas podem permanecer metabolicamente ativas por dois ou mais anos (Davies & Albrigo, 1994; Medina *et al.*, 2005).

As folhas caracterizam-se pela baixa condutância estomática e transpiração com, a fotossíntese dificilmente superando os 12 a 13  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  em temperaturas ótimas de 25 °C a 30 °C. Ao mesmo tempo, a saturação por luz acontece a baixas intensidades de densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (*DFFF*) de 750 a 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , que representa menos da metade da radiação máxima num dia de verão (Davies & Albrigo, 1994; Machado *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2005; Pimentel *et al.*, 2007; Ribeiro & Machado, 2007).

Apesar dos citros serem sempre verdes há contínua reposição de folhas ao longo do ano, com os períodos mais intensos de queda no outono, especialmente nos climas mais frios e secos; e na primavera, durante a floração quando há insuficiência de nutrientes e remobilização (Medina *et al.*, 2005). Independentemente da abscisão foliar, em condições normais, a taxa de iniciação sempre é maior que a perda; e em função destas características as plantas de citros desenvolvem rapidamente uma densa folhagem, chegando, em condições de clima temperado no hemisfério norte, a índice de área foliar (IAF) de 12 (Davies & Albrigo, 1994) ou até de 15 para plantas de laranja 'Valência' (Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996). No entanto, Ribeiro (2006) observou no Estado de São Paulo, para laranja 'Valência' de 15 anos de idade em espaçamento de 8x5 m um IAF máximo de 3. Medina *et al.* (2005) afirma que as plantas em regiões tropicais mostram tendência a ser mais esparsas, o que poderia ser ocasionado pelas altas temperaturas no verão, que induzem maior alongamento dos ramos (Ramos *et al.*, 2010). Finalmente, como consequência do alto IAF em plantas adultas as folhas expostas a luz solar direta representam aproximadamente 20% da área foliar, enquanto a parte interna da copa não recebe mais que 10% da *DFFF* disponível (Ribeiro & Machado, 2007). Isto determina que praticamente toda brotação e produção de frutos ocorra na parte externa da planta. No entanto, se durante o verão houver

uma carga grande de frutos, a brotação e o crescimento vegetativo são pequenos ou mesmo ausentes, sugerindo prioridade no crescimento dos frutos (Prado *et al.*, 2007).

O sistema radicular dos citros esta constituído por uma raiz pivotante profunda que em pomares comerciais, devido ao manuseio das mudas e do plantio no campo, é substituído por raízes pioneiras de grande porte que se ramificam numerosas vezes em raízes laterais (Medina *et al.*, 2005). A raiz principal e as ramificações maiores apresentam crescimento secundário, enquanto as raízes menores, que não apresentam crescimento secundário, são as mais importantes na absorção de água e nutrientes (Reuther, 1973). As raízes jovens em ativo crescimento e envolvidas na absorção são reconhecidas pela sua cor branca, e ao envelhecerem adquirem uma coloração marrom-amarelado (Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996). Os citros têm reduzida quantidade de raízes absorventes, as que por sua vez são superficiais (Reuther, 1973), ao mesmo tempo, em condições de baixas temperaturas, observaram-se limitações à absorção de água e nutrientes. Isto seria devido ao efeito do frio sobre a atividade das aquaporinas, proteínas de membrana responsáveis pela abertura de canais de entrada da água (Tournaire-Roux *et al.*, 2003), sendo nestas condições reduzida a condutividade hidráulica (Khairi & Hall, 1976; Davies & Albrigo, 1994; Veselova *et al.*, 2005; Magalhães Filho *et al.*, 2009; Santos, 2010).

As raízes podem crescer sempre que a temperatura for superior a 13 °C e haja umidade no solo, aumentando linearmente até 26 °C; temperaturas acima de 36 °C inibem-o (Bevington & Castle, 1985; Davies & Albrigo, 1994; Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996; Medina *et al.*, 2005). No entanto, o crescimento radicular alterna sempre com o crescimento da parte aérea na primavera e verão, e fica paralisado durante a maior parte do inverno, devido às baixas temperaturas (Bevington & Castle, 1985; O'Hare & Turnbull, 2004). Além disso, o processo é extremamente sensível a umidade no solo e o alongamento torna-se nulo com o potencial do solo inferior a 50 kPa (Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996). Esta alternância no crescimento sugere a existência de algum sincronismo entre a parte aérea e a radicular, que poderia ser resultado do balanço hormonal, especialmente das auxinas produzidas nos ramos em crescimento. As raízes são um centro de síntese de giberelinas e citocininas as quais são transportadas para a parte aérea aonde exercem seu efeito (Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996). A carga de frutos pode afetar também o crescimento radicular, devido a que as raízes têm a capacidade de estocar grandes quantidades de amido como reserva (Goldschmidt & Golomb, 1982), o que pode ser remobilizado para atender a demanda da parte aérea, em particular o crescimento dos frutos

(Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996). Intensa remobilização de amido do sistema radicular pode provocar morte das raízes mais novas e finas que são os drenos mais fracos (Medina *et al.*, 2005). Há algumas pesquisas reportando a capacidade das raízes para armazenar amido (Goldschmidt & Golomb, 1982; Li *et al.*, 2003a, b; Bueno *et al.*, 2011; Park, 2011), mas ainda há pouca ou nenhuma informação sobre a dinâmica sazonal destas reservas e sua contribuição no ciclo produtivo.

## **2.2. BROTAÇÃO E FLORAÇÃO**

A brotação é controlada por fatores endógenos e ambientais, principalmente temperatura e disponibilidade hídrica. Em condições tropicais há fluxos regulares de brotação, sendo possível achar numa mesma planta frutos de até oito florações diferentes (Reuther, 1973), acarretando em dificuldades no planejamento do manejo cultural, nutricional e fitossanitário. Já em condições subtropicais, as brotações são condicionadas a um repouso vegetativo aparente que ocorre no inverno (Reuther, 1973; Monselise, 1985). Nestas condições, a queda da temperatura causa uma redução do metabolismo da parte aérea e como consequência há uma paralisação do crescimento, que habitualmente é chamado de ‘repouso’ ou ‘dormência’, termos utilizados normalmente para frutíferas de hábito decidual. No entanto, estes termos não são apropriados, principalmente, para plantas sempre verdes, que ainda no inverno e com o crescimento aparentemente paralisado, assimilam CO<sub>2</sub> e realizam uma série de transformações metabólicas associadas com o desenvolvimento reprodutivo (Machado *et al.*, 2002; Medina *et al.*, 2005; Ribeiro & Machado, 2007).

No entanto, antes das gemas serem induzidas elas devem ser capazes de responder ao estímulo. Em limeira ácida, limoeiro e tangerineira satsuma mantidas em casa de vegetação em temperaturas acima de 20 °C durante todo o ano, a aplicação de tratamentos de baixa temperatura por 30 dias a intervalos regulares, somente induziu a floração quando aplicado no fim do inverno e no começo do verão (Nebauer *et al.*, 2006). Segundo os autores isto indica que há uma condição interna, uma capacidade intrínseca das gemas para perceber a indução e responder, não sendo possível induzir a floração em qualquer momento do ano.

Em gemas que estão aptas para serem induzidas há fatores ambientais que regulam o tempo, a quantidade de flores formadas e sua distribuição dentro das árvores. A floração é produzida sobre ramos do último ano de crescimento, preferencialmente formados durante o

fluxo do verão, mas pode se desenvolver sobre ramos mais velhos que um ano (Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996). No entanto, a brotação desenvolvida sobre ramos de mais de um ano de idade tem uma forte tendência de ser somente vegetativa (Prado *et al.*, 2007). A floração geralmente é avaliada quando a diferenciação morfológica das flores é reconhecível ou ainda na antese, porém o desenvolvimento inicia-se muito tempo antes; com a indução das gemas que ocorre durante o inverno, entre os meses de maio e julho (Monselise & Goldschmidt, 1982; Monselise, 1985; Davies & Albrigo, 1994; Agustí, 2003; Pereira *et al.*, 2003). A indução ocorre até um mês antes de haver evidências histológicas do desenvolvimento das flores (Reuther, 1973; Nishikawa *et al.*, 2007; 2009).

Logo que as gemas foram induzidas começa, ainda no inverno, a diferenciação e iniciação dos órgãos florais, que implica em mudanças histológicas e morfológicas visando a conversão em meristemas florais, e que finaliza na primavera com a antese (Monselise, 1986; Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996; Nishikawa *et al.*, 2007, 2009). A organogênese se inicia com a formação dos primórdios das sépalas e assim que estes forem formados a condição da gema não poderá ser revertida (Monselise, 1986). Este período coincide com o início da brotação ou “bud break” (Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996; Agustí, 2003). O período de desenvolvimento das flores pode durar entre dois e três meses, e tanto o desenvolvimento como a própria antese são dependentes do acúmulo de unidades de calor, em climas mais quentes há uma floração mais breve e concentrada (Reuther, 1973; Davies & Albrigo, 1994; Yamanishi, 1994; Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996; Bustan & Goldschmidt, 1998). Uma vez ocorrida a indução dos meristemas florais a temperatura mínima para o desenvolvimento das flores é de 9,4 °C (Monselise, 1986), no entanto, temperaturas entre 25/30 °C produzem uma floração mais concentrada (Davies & Albrigo, 1994; Yamanishi, 1994).

Existem cinco tipos de brotações classificadas de acordo com o número de flores e folhas presentes: i) brotos multiflorais ou ramos de flor (mais de uma flor e sem folhas), ii) ramos mistos (folhas e flores no mesmo ramo), iii) flor solitária (uma flor sem folhas), iv) brotos companheiro (quando há várias folhas e só uma flor terminal) e v) brotos ou ramos vegetativos (somente folhas). O número de flores e folhas finalmente formadas depende do número de primórdios presentes na gema e da abscisão ou falta de desenvolvimento de alguns deles (Agustí, 2003).

### 2.2.1. Fatores do ambiente e floração

A temperatura e a deficiência hídrica são os principais fatores que condicionam a floração em condições subtropicais, e há uma relação quantitativa entre a duração da exposição ao frio e/ou o estresse hídrico e a intensidade da floração (Reuther, 1973; Hall *et al.*, 1977; Monselise, 1985; Southwick & Davenport, 1986; Davies & Albrigo, 1994; Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996; Agustí, 2003; Nebauer *et al.*, 2006; Prado *et al.*, 2007); porém, ainda há dúvidas de como estes fatores operam e qual sua associação com os fatores endógenos da planta. Neste sentido, foi observado em limeira ácida ‘Tahiti’ após duas semanas a 18/10 °C que 45% das brotações foram reprodutivas, quando comparadas com plantas mantidas a 29/24°C, nas quais 100% das brotações foram vegetativas. Quando o tratamento de frio aumentou de duas para oito semanas à baixa temperatura, a intensidade da brotação aumentou 2,5 vezes e foram formadas cinco vezes mais flores por planta (Southwick & Davenport, 1986). Similarmente, em pomeleiro em regime de temperatura de 15/10 °C formaram-se mais inflorescências, sendo a maioria sem folhas, que a 20/15 °C (Yamanishi, 1994). Finalmente, temperaturas acima de 30 °C somente produzem brotações vegetativas (Yamanishi, 1994; Davies & Albrigo, 1994), entanto com temperaturas intermediárias (24/19 °C) produzem menos inflorescências, porém mistas (Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996). Em tangerineira satsuma durante o inverno ocorre aumento da expressão do gene *CiFT* (Nishikawa *et al.*, 2007; 2009), homólogo do *FLOWERING LOCUS T* que em *Arabidopsis* controla a indução floral, e os genes *CsLFY* e *CuSEP* de citros, cujos homólogos regulam o desenvolvimento das gemas em *Arabidopsis*, aumentando sua expressão no começo da primavera, coincidentemente com a iniciação das gemas (Nishikawa *et al.*, 2009).

Menos estudada têm sido a interação entre a temperatura do ar e da raiz, com a brotação e a floração. Como foi mencionada com anterioridade, a intensidade da brotação é positivamente correlacionada com a temperatura do solo (Khairi & Hall, 1976; Hall *et al.*, 1977). Já o número de flores iniciadas, é negativamente correlacionado com o aumento da temperatura do ar (Hall *et al.*, 1977).

O efeito da deficiência hídrica na indução da floração é dependente da intensidade do estresse. Southwick e Davenport (1986) em limeira ácida ‘Tahiti’ de um e dois anos de idade observaram 12 vezes mais flores após duas semanas de estresse hídrico severo (-2,0 MPa) que com cinco semanas de estresse moderado (-1,0 MPa). Já Koshita e Takahara (2004) em

tangerineira satsuma de três anos observaram que estresse severo provoca intensa abscisão de folhas e redução da brotação e floração quando comparadas com estresse moderado, porém houve diferenças entre os porta-enxertos e variedade de copa utilizados nos experimentos. Devido à queda de folhas, sugere-se que estas possam ter alguma função no mecanismo da indução. A variação do fotoperíodo entre 8:00 e 15:00 h não parece ter efeito sobre a indução da floração, nem sobre o desenvolvimento das flores até antese (Reuther, 1973; Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996; Nebauer *et al.*, 2006).

No Estado de São Paulo, o clima caracteriza-se por um período úmido, quente e com alta disponibilidade de energia solar, entre novembro e fevereiro; e outro período de inverno seco com temperaturas mais baixas, nos meses de junho até agosto. No entanto, a variabilidade climática observada dentro do Estado proporciona condições ambientais adequadas para a produção citrícola de qualidade. Assim, nas regiões centro-norte do Estado a indução ocorre por deficiência hídrica, já nas regiões centro-sul ocorre devida principalmente a baixa temperatura e finalmente na região central a indução ocorre por efeito aditivo dos dois fatores (Ribeiro *et al.*, 2006).

### **2.2.2. Carboidratos e sua relação com a floração**

Tem sido sugerido que o conteúdo de carboidratos na planta tem uma função na regulação da floração, mas a evidência para afirmar isto é indireta. Foi observado que há um intenso consumo de carboidratos desde as folhas, em especial de amido, no decorrer do desenvolvimento das gemas; desde a brotação ou 'bud break' até a antese (Jones & Steinacker, 1951; Sanz *et al.*, 1987; García-Luis *et al.*, 1988; Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996; Ribeiro, 2006; Prado *et al.*, 2007; Park, 2011). Goldschmidt *et al.* (1985) relata que no inverno o teor de carboidratos nas folhas é alto, superior a 100 mg g<sup>-1</sup> MS, e que plantas com maiores teores de amido produzem mais flores. No entanto, em plantas de laranjeira e tangerineira satsuma no campo mesmo com conteúdo de amido nas folhas menor que 50 mg g<sup>-1</sup> MS durante o inverno, apresentaram indução e floração (García-Luis *et al.*, 1995; Yahata *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2007). O tratamento de baixas temperaturas tem demonstrado incrementar o número de flores, mas sem afetar o teor de amido no mesmo sentido (Goldschmidt *et al.*, 1985; Yamanishi, 1994). Plantas sometidas a regime de temperatura 20/15 °C e 30/15 °C tiveram a mesma quantidade de flores, porém, com menor temperatura diurna o teor de amido foliar foi o dobro (Yamanishi, 1994).

Estes resultados não deixam evidente a participação dos carboidratos no florescimento dos citros, permanecendo ainda a dúvida se desempenham papel regulador específico na floração ou se representam apenas um limiar energético mínimo desses compostos para o desenvolvimento das flores (Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996). Independentemente do papel na floração dos citros, a exigência de carboidratos durante este período é alta, representando entre 10% a 20% do total dos carboidratos investidos na produção de frutos (Bustan & Goldschmidt, 1998). Poucos trabalhos exploram o papel que as reservas de carboidratos nos diversos órgãos da planta poderiam ter. Em ramos de até 5 mm de diâmetro em laranjeira e tangerineira foi observada diminuição da concentração de amido com o desenvolvimento das brotações (Jones & Steinacker, 1951; Sanz *et al.*, 1987; Li *et al.*, 2003b). Em raízes de tangerineira, também menores que 5 mm de diâmetro, foi observado consumo de amido durante a floração (Li *et al.*, 2003a, b). Em caquizeiro foi relatado que todos os órgãos da planta, até a madeira velha, podem contribuir para a floração e crescimento dos frutos (Park, 2011).

### **2.2.3. Hormônios e inibição da floração**

Do grande número de compostos reguladores, somente as giberelinas provaram um efeito consistente na indução da floração. A inibição da floração por giberelinas tem sido observada em outras espécies frutíferas e perenes (Monselise, 1985; Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996). Evidências disto foram encontradas mediante tratamentos com colheita antecipada de frutos, ou desbaste total de plantas logo depois do fim da queda fisiológica. Este procedimento ocasiona, por um lado a remoção de uma fonte natural de giberelinas (as sementes) e por outro elimina um dreno, permitindo maior acúmulo de assimilados.

Foi observado que plantas de caquizeiro que permaneceram cinco meses sem frutos acumularam amido em folhas, ramos e raízes, finalmente na primavera seguinte apresentaram uma floração com diferente intensidade reflexo do aumento nos teores de amido (Park, 2011). Em laranjeira e tangerineira satsuma foi observado que a colheita antecipada ou diferenças na carga de frutos provocaram pequenos aumentos nos teores de amido, mas com grande efeito sobre a brotação e floração (García-Luis *et al.*, 1995; Yahata *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2007). Em outro trabalho, a aplicação de giberelina provocou inibição da floração e brotação que foi parcialmente recuperada pelo anelamento, mas ficou claro que o efeito inibidor da giberelina foi maior que do anelamento (Goldschmidt *et al.*, 1985).

Koshita *et al.* (1999) observaram que, ramos vegetativos de tangerineira satsuma, tiveram durante a indução três vezes mais GA<sub>1/3</sub> e que este teor não foi modificado pelo anelamento. Ramos vegetativos tem até 200 vezes mais atividade de substâncias tipo giberelinas que os ramos mistos ou reprodutivos (Monselise, 1985). García-Luis *et al.* (1988) trabalhando com tratamentos de desfolha e aplicação de giberelina obtiveram evidências de que as reservas não são críticas para a indução floral, e que como consequência da desfolha há redução no tamanho das inflorescências. Martínez-Fuentes *et al.* (2010) observaram em laranjeira ‘Valência’ que o efeito inibitório dos frutos começa a se manifestar quando o mesmo alcança 80% do tamanho final, sendo o efeito independente do teor de açúcares nas folhas.

### **2.3. FRUTIFICAÇÃO**

O processo que determina que uma flor se desenvolva em fruto denomina-se frutificação e depende da fixação ou estabelecimento das estruturas reprodutivas. A fixação depende do reinício do crescimento do ovário paralisado durante a antese, sendo que o crescimento é regulado por fatores endógenos e exógenos (Agustí, 2003). O período de abscisão se estende desde algumas semanas antes da antese até 14 semanas após a mesma (Monselise, 1985) e pode ser dividido em dois períodos: um período inicial que se estende da floração até por três ou quatro semanas após, quando há queda de flores e frutos ‘mais fracos’ ou com ovários defeituosos. Num segundo período de queda, chamado de queda fisiológica, que ocorre entre novembro e dezembro no hemisfério sul, implica na queda de frutinhos (Davies & Albrigo, 1994).

A abscisão na primeira etapa encontra-se controlada pela atividade hormonal, porém nem todas as espécies e variedades respondem da mesma forma (Davies & Albrigo, 1994; Guardiola & García-Luis, 2000; Ruiz *et al.*, 2001). O efeito da aplicação de giberelina e benziladenina sobre a fixação foi maior na antese e provocou aumento na divisão celular e no diâmetro dos vasos do sistema vascular (Guardiola *et al.*, 1993). A presença ou não de folhas no ramo afeta o estabelecimento (Davies & Albrigo, 1994; Gómez-Cadenas *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2001), o que poderia estar associado com a produção de hormônios (Monselise, 1985). Outro fator que afeta a fixação neste período é a temperatura, quando inferior a 13 °C dificulta o crescimento do tubo polínico (Agustí, 2003) e temperaturas acima de 40 °C provocam massiva abscisão (Davies & Albrigo, 1994). A umidade do ambiente e o estresse hídrico podem também provocar incremento na abscisão (Monselise, 1986; Agustí, 2003).

Na segunda etapa, desde novembro até dezembro, a abscisão esta relacionada com a competição entre os órgãos em crescimento e provoca a queda dos frutos entre 5 e 20 mm de diâmetro (Davies & Albrigo, 1994). Durante esta etapa, o teor de amido apresenta uma relação inversa com crescimento do ovário, o que determina a força de dreno destes e a intensidade da queda. A intensidade da abscisão nesta etapa estaria associada com a disponibilidade de carboidratos, água, hormônios e outros metabólitos (Davies & Albrigo, 1994; Ruiz *et al.*, 2001; Agustí, 2003; Léchaudel *et al.*, 2005). A competição por carboidratos têm demonstrado afetar intensamente o estabelecimento dos frutos, sendo os menores teores nas folhas observados no fim deste período (Sanz *et al.*, 1987; García-Luis *et al.*, 1988; Guardiola & García-Luis, 2000; Ruiz *et al.*, 2001). A abscisão provocada pela competição por carboidratos é precedida por aumento no teor de ácido abscísico e de ácido aminociclopropano e reduzida pela aplicação de giberelinas (Gómez-Cadenas *et al.*, 2000). Altas temperaturas e déficit hídrico ocasionam fechamento estomático e redução da assimilação de CO<sub>2</sub>, e com isto aumento da abscisão (Monselise, 1986; Davies & Albrigo 1994). Durante esta etapa de crescimento linear dos frutos há continuo incremento de sua força como dreno e desta forma aumento da demanda por assimilados. Quando esta demanda excede a capacidade de fornecimento de assimilados pela planta, atúa um mecanismo de autorregulação que ajusta continuamente a carga à disponibilidade, utilizando as reservas (García-Luis *et al.*, 1988; Guardiola & García-Luis, 2000; Iglesias *et al.*, 2003). A maioria dos trabalhos sobre remobilização de carboidratos para a fixação e crescimento dos frutos são focados nas folhas (Sanz *et al.*, 1987; Ruiz *et al.*, 2001; Iglesias *et al.*, 2003; Léchaudel *et al.*, 2005), sendo poucos os estudos relacionados com a remobilização dos ramos (Monselise, 1986; Park, 2011) e menos ainda das raízes.

Embora poucos estudos tenham considerado a variação nos teores de nutrientes minerais ao longo do desenvolvimento dos frutos, mas tem sido observada uma redução do teor de nitrogênio em folhas durante o desenvolvimento da gemas até floração, com posterior recuperação até o fim da queda fisiológica, sugerindo que em condições normais de nutrição o suprimento de elementos minerais não é limitante (Sanz *et al.*, 1987; García-Luis *et al.*, 1988; Ruiz *et al.*, 2001).

O crescimento dos frutos segue um modelo sigmoidal que pode ser dividido em três fases: 1ª fase de crescimento exponencial, esta etapa estende-se desde a antese até o final da queda fisiológica dos frutos, é caracterizada por extensa divisão celular. O aumento de tamanho ocorre

por engrossamento da casca e, no fim deste período, encontram-se já formadas no interior dos lóculos as vesículas de suco (Spiegel-Roy & Golschmidt, 1996; Agustí, 2003). Também ocorre a formação do sistema vascular o que potencialmente regulará a capacidade de transporte de nutrientes, afetando o tamanho potencial do fruto (Guardiola *et al.*, 1993; Guardiola & García-Luis, 2000). Durante esta fase é determinado o tamanho potencial do fruto, e no final dela ocorre máxima competição entre os frutinhos (Guardiola & García-Luis, 2000; Agustí, 2003). A 2ª fase de crescimento linear, estende-se do fim da queda fisiológica até pouco antes do início da mudança da cor da casca. A duração desta etapa é a que mais varia entre as variedades dos distintos grupos de maturação, ocorrendo o enchimento das vesículas de suco até alcançar a máxima expansão. A divisão celular nesta fase é quase nula (Spiegel-Roy & Golschmidt, 1996; Agustí, 2003) e é também nela que são formadas as glândulas produtoras de óleo (Spiegel-Roy & Golschmidt, 1996). A 3ª fase é o amadurecimento, no qual quase não há crescimento (Guardiola & García-Luis, 2000), ocorrendo mudanças associadas com a maturação, havendo degradação das clorofilas e síntese de carotenóides, aumento no conteúdo de açúcares solúveis enquanto a acidez se reduz (Spiegel-Roy & Golschmidt, 1996; Agustí, 2003). Este modelo aplica-se ao crescimento da maioria dos frutos dos citros, porém tempo e duração destas etapas variam entre espécies, variedades e climas (Spiegel-Roy & Golschmidt, 1996).

Os frutos crescem sem interrupção logo depois de finalizada a queda fisiológica, sendo esta etapa muito dependente do fornecimento de carboidratos, com evidências de que técnicas que permitam aumento na disponibilidade de assimilados, como anelamento ou raleio de frutos, incrementam o tamanho final do fruto (Monselise, 1986; Yamanishi, 1994; Golschmidt, 1999; Guardiola & García-Luis, 2000; Agustí, 2003). Foi observado que conforme há aumento no teor de açúcares nos frutos há consumo das reservas foliares de amido (Ruiz *et al.*, 2001). A temperatura tem uma relação positiva com o crescimento dos frutos, sendo evidentemente mais intenso o efeito das temperaturas noturnas. O crescimento do fruto é ótimo entre 20 °C e 25 °C, temperaturas iguais ou maiores que 30 °C provocam redução do crescimento (Reuther, 1973). Assim, a precocidade das variedades está associada com o requerimento de unidades de calor (Spiegel-Roy & Golschmidt, 1996).

## 2.4. METABOLISMO DO CARBONO

Ao longo do ciclo produtivo há uma sazonalidade tanto na produção quanto no consumo de carboidratos. Sendo que a assimilação de CO<sub>2</sub> encontra-se afetada por variações sazonais na disponibilidade de energia, água e nutrientes. Por outro lado, há também sazonalidade nos requerimentos, consequência da variação da demanda por nutrientes nos distintos estádios fenológicos. Sendo o balanço de carbono determinado pelos ajustes na produção e no consumo ao longo do ciclo produtivo (Goldschmidt, 1999; Machado *et al.*, 2002).

### 2.4.1. Assimilação de CO<sub>2</sub>

O processo fotossintético representa a única via de captação e transformação de energia solar em energia química, sendo incorporada desta forma aos processos biológicos de crescimento e manutenção das plantas. Os citros fixam carbono ao longo de todo o ano, mas as variações sazonais nas condições do ambiente condicionaram o desenvolvimento de adaptações no mecanismo fotossintético. Sempre que estes fatores afetam a fotossíntese haverá um provável efeito sobre o crescimento e produção (Ribeiro, 2006; Ribeiro & Machado, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009). Porém, também há efeito da demanda dos drenos por assimilados, indicando desta forma uma regulação da fotossíntese pela demanda (Iglesias *et al.*, 2002; Syversten *et al.*, 2003; Urban *et al.*, 2004; Dovis *et al.*, 2009; Sekita, 2008; Ribeiro *et al.*, 2012)

A variação dos fatores ambientais afeta à capacidade de assimilação de CO<sub>2</sub> (Davies & Albrigo, 1994; Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996; Machado *et al.*, 2005; Pimentel *et al.*, 2007). A temperatura ótima para a fotossíntese em laranjeira ‘Valência’ é ao redor de 25 °C (Machado *et al.*, 2005), acima deste valor observa-se queda na condutância estomática, na eficiência de carboxilação da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase (devido a maior atividade oxigenase da Rubisco), assim como aumento de drenos alternativos de elétrons (Machado *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2009). Isto acontece mesmo em condições de boa disponibilidade hídrica devido ao aumento do déficit de pressão de vapor (DPV) em função do aumento da temperatura do ar, causando o fechamento estomático (Machado *et al.*, 2002, 2005; Jifon & Syvertsen, 2003).

No inverno, que caracteriza-se por meses mais frios, há redução da assimilação de CO<sub>2</sub> (Davies & Albrigo, 1994; Machado *et al.*, 2002; Ribeiro & Machado, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009) e nestas condições as limitações parecem ser mais de origem não estomática, associada com menor atividade de carboxilação e regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato (Ribeiro *et al.*, 2009).

Porém, há também efeito do frio sobre os fatores estomáticos (Davies & Albrigo, 1994; Magalhães Filho *et al.*, 2009; Machado *et al.* 2010; Santos *et al.*, 2012) e, neste sentido foi observada redução significativa da condutância estomática e da assimilação de CO<sub>2</sub> após a ocorrência de noites frias (Machado *et al.*, 2010). Considerando estas limitações ambientais no Estado de São Paulo, as melhores condições para a fotossíntese e crescimento dos citros são registradas na primavera, entre os meses de setembro e dezembro. Nestes meses, as temperaturas são moderadas e há disponibilidade de água e a radiação não é limitante (Ribeiro, 2006; Ribeiro & Machado, 2007).

Por outro lado, também têm sido estudado o efeito da condição fisiológica e a demanda de assimilados sobre a produção fotossintética, observando-se que quando há redução da demanda por carboidratos pode ocorrer acúmulo de açúcares metabolizáveis nas folhas e com isto uma redução na assimilação de CO<sub>2</sub> (Iglesias *et al.*, 2002; Syvertsen *et al.*, 2003; Urban *et al.*, 2004; Léchaudel *et al.*, 2005). Já um aumento da demanda, por exemplo, ocasionada pelo desenvolvimento das brotações, poderia induzir aumento na fotossíntese, mesmo em condições de temperatura consideradas não ótimas (Sekita, 2008; Dovis *et al.*, 2009; Dovis *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012).

#### **2.4.2. Reservas: armazenamento e remobilização**

Ao longo do ciclo produtivo os distintos estádios fenológicos geram períodos com requerimentos diferentes de energia e nutrientes. Por outro lado, foi observado também que as condições do meio ambiente determinam variações na capacidade de produção de assimilados e absorção de nutrientes. Neste contexto, as plantas têm desenvolvido a capacidade de armazenar energia, geralmente na forma de carboidratos, e outros nutrientes a fim de equilibrar a oferta e a demanda ao longo do ciclo produtivo (Davies & Albrigo, 1994; Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996). Vários trabalhos estudaram a dinâmica dos carboidratos nas folhas e sua associação com os processos de brotação, floração e desenvolvimento dos frutos (Jones & Steinacker, 1951; Goldschmidt & Golomb, 1982; Sanz *et al.*, 1987; García-Luis *et al.*, 1995; Ruiz *et al.*, 2001; Prado *et al.*, 2007; Sekita, 2008; Park, 2011).

Alguns autores mencionam que os teores mais altos de açúcares nas folhas são observados na saída do inverno, pouco tempo antes da floração (Sanz *et al.*, 1987, García-Luis *et al.*, 1995; Prado *et al.*, 2007). Neste estágio fenológico a combinação das baixas temperaturas que limitam a

fotossíntese e o rápido aumento da demanda para o desenvolvimento das brotações conduz à redução nos teores foliares de açúcares metabolizáveis das reservas, especialmente o amido (Jones & Steinacker, 1951; Sanz *et al.*, 1987; García-Luis *et al.*, 1995; Ruiz *et al.*, 2001; Ribeiro, 2006; Sekita, 2008; Park, 2011). Após a plena floração, durante a frutificação e até o fim da queda fisiológica dos frutos há contínuo consumo de carboidratos, em muitos casos alcançando os menores teores de reservas durante o verão (Jones & Steinacker, 1951; Sanz *et al.*, 1987; Iglesias *et al.*, 2003; Léchaudel *et al.*, 2005; Prado *et al.*, 2007; Sekita, 2008).

Jones e Steinacker (1951) estudaram a dinâmica de açúcares totais e amido em ramos de ‘Valência’ e observaram que há quase tanto amido quanto nas folhas, e ao mesmo tempo mostraram redução no teor como consequência da brotação. Goldschmidt e Golomb (1982) verificaram que plantas adultas de tangerineira que não carregavam frutos, acumularam ao longo de um ano até 2 kg de amido nos ramos velhos e no tronco, enquanto as raízes acumularam 6 kg de amido. Em caquizeiro foi observado acúmulo de carboidratos associado negativamente com a carga de frutos, dando preferência para o armazenamento nas raízes (Choi *et al.*, 2010b; Park, 2011). Park (2011) observou que até a ‘madeira velha’ acumula e exporta carboidratos segundo as necessidades da planta. Casos extremos de utilização das reservas podem ser observados em plantas de tangor ‘Murcott’ quando em anos de alta intensidade de floração e fixação excessiva de frutos pode ocorrer total exaustão das reservas e colapso geral da planta (Davies & Albrigo, 1994). Nesta mesma espécie Li *et al.* (2003a, b) observaram, como resultado de alterações no balanço de carbono, mudanças no padrão de expressão de 11 genes associados com o metabolismo do amido. As determinações de teores de carboidratos e expressão gênica foram realizadas nas folhas, casca e raízes. Seis desses genes codificam proteínas que têm uma função na síntese de amido e sua expressão é aumentada em folhas e casca que mostraram incremento no teor de amido (Li *et al.*, 2003a, b).

Apesar de existirem vários estudos sobre a dinâmica do acúmulo e remobilização de reservas nas folhas (Jones & Steinacker, 1951; Sanz *et al.*, 1987; García-Luis *et al.*, 1995; Ruiz *et al.*, 2001; Iglesias *et al.*, 2003; Léchaudel *et al.*, 2005; Ribeiro, 2006; Prado *et al.*, 2007; Sekita, 2008; Park, 2011), poucos deles fazem referência ao ciclo produtivo completo, desde o período indutivo até o amadurecimento dos frutos. Além disso, a contribuição de açúcares dos ramos e raízes nos vários estádios fisiológicos das laranjeiras tem sido pouco explorada.

## 2.5. METABOLISMO DE NITROGÊNIO

Assim como relatado para os carboidratos, nas plantas perenes foi observado que o nitrogênio e compostos associados presentes nas folhas e em outros órgãos sofrem variação sazonal, ocasionada por diferenças na intensidade de absorção e atividade metabólica durante o ano (Gallo *et al.*, 1960; Moreno & García-Martínez, 1983; 1984; Sanz *et al.*, 1987; Legaz *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2009). A absorção de nitrogênio do solo é realizada, predominantemente, na forma de  $\text{NO}_3^-$  e ocorre graças a transportadores específicos (Taiz & Zeiger, 2009). Sendo um mecanismo ativo, a temperatura e umidade do solo condicionam a eficiência de absorção, mostrando uma correlação linear positiva entre taxa de absorção e a temperatura entre 16 e 26 °C, com temperatura base de 10 °C (Scholberg *et al.*, 2002). Baixas temperaturas provocam alterações no balanço hídrico na planta, mesmo em condições de boa disponibilidade de água, reduzindo a transpiração (Machado, 2009; Magalhães Filho *et al.*, 2009) e prejudicando a absorção de  $\text{NO}_3^-$  do solo (Fidalski & Auler, 2007).

As folhas são um dos órgãos concentradores de nitrogênio e seu conteúdo pode representar entre 18% e 45% do total presente na planta (Dasberg, 1987; Legaz *et al.*, 1995; Boaretto *et al.*, 2010). Os teores de nitrogênio nas folhas afetam o crescimento e desenvolvimento das plantas; quando altos podem produzir excessivo vigor e crescimento vegetativo, em detrimento da produção de flores. Porém, valores muito baixos podem conduzir a alta produção de flores e reduzida fixação de frutos (Davies & Albrigo, 1994). O fruto é o principal órgão exportador; em caquizeiro até 43% do nitrogênio é colhido com os frutos (Choi *et al.*, 2010b), enquanto que os frutos de citros extraem entre 6% e 32% do nitrogênio total, dependendo da variedade, idade da planta e condição de adubação (Dasberg, 1987; Legaz *et al.*, 1995).

Estudos em folhas de citros têm mostrado que o período de desenvolvimento das brotações até a fixação dos frutos é altamente exigente em nitrogênio, havendo remoção deste composto das folhas durante o inverno e primavera (Gallo *et al.*, 1960; Moreno & García-Martínez, 1984; Sanz *et al.*, 1987; Legaz *et al.*, 1995). Esta remobilização foi atribuída à limitação da absorção do nitrogênio do solo por causa das baixas temperaturas nos meses mais frios (Sanz *et al.*, 1987). No entanto, quando há presença de frutos, a demanda exercida por eles pode induzir aumento na eficiência de absorção de nitrogênio do solo (Mattos Jr. *et al.*, 2003a; Choi *et al.*,

2010b). Em cafeeiro foi também observado que, conforme os frutos crescem e acumulam nitrogênio, há redução proporcional no teor de nitrogênio nas folhas (Reis *et al.*, 2009).

Estudos em raízes de diferentes diâmetros mostraram que há uma correlação entre o teor de nitrogênio total e a atividade metabólica. Pregitzer *et al.* (1998) em *Acer saccharum* observaram que raízes de 0,5 até 10 mm de diâmetro, apresentaram teores de nitrogênio de 7 a 8 g kg<sup>-1</sup> enquanto a taxa respiratória máxima foi 4 nmol CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Nas raízes menores que 0,5 mm de diâmetro houve de 16 a 18 g kg<sup>-1</sup> MS de nitrogênio e as taxas respiratórias foram de duas a quatro vezes maiores. Em raízes de *Quercus serrata*, Makita *et al.* (2009) também observaram uma correlação entre teor de nitrogênio, diâmetro, comprimento específico (m g<sup>-1</sup>) e respiração em raízes. A concentração de nitrogênio está associada à maior concentração de proteínas que são necessárias para assimilação dos nutrientes e manutenção do gradiente iônico. Apesar das raízes mais finas terem maior teor de N que raízes mais grossas, estas representam uma porção pequena da massa radicular e observa-se pouca remobilização durante os processos dependentes destas reservas (Legaz *et al.*, 1995).

A raiz é também um órgão de reserva de nitrogênio, entre 10% e 45% do total da planta pode estar armazenado nelas (Dasberg, 1987; Legaz *et al.*, 1995; Mattos Jr. *et al.*, 2003b, Boaretto *et al.*, 2010). Em trabalhos com nitrogênio marcado em adubações na primavera e no verão observaram-se que a recuperação é maior na primavera, sendo que 40% do nitrogênio é incorporado nas raízes, seguindo em importância as folhas novas e os frutos. Já, no verão as raízes incorporaram mais de 50% do nitrogênio, 24% nas folhas e menos de 10% nos frutos (Boaretto *et al.*, 2010).

O NO<sub>3</sub><sup>-</sup> absorvido pela planta desde o solo por meio de transporte ativo, pode ser acumulado no vacúolo, porém para sua utilização no metabolismo deve ser reduzido e incorporado em moléculas orgânicas. A primeira reação é a incorporação de 2 elétrons para a redução em NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, que com mais 6 elétrons é rapidamente convertido em NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-NH<sub>3</sub> (Taiz & Zeiger, 2009; Silveira *et al.*, 2010). Neste processo participam duas enzimas, a redutase do nitrato (RN) localizada no citoplasma das células, que pode usar NADH ou NADPH como doador de H<sup>+</sup>, e a redutase do nitrito (RNi) dentro dos cloroplastos nas folhas e nos plastídeos das raízes, que utiliza ferredoxina reduzida como doador de e<sup>-</sup>. Como NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-NH<sub>3</sub> é altamente tóxico deve ser rapidamente convertido e incorporado em compostos aminados, isto acontece por ação de mais

duas enzimas a glutamina sintetase (L-glutamato-ammonia ligase [ADP]) ou GS, e a glutamato sintase (glutamina amida-2-oxoglutarato aminotransferase [NADH]) ou GOGAT. A GS tem duas isoformas: uma presente nos plastídeos e outra nos cloroplastos, esta segunda tem função de reassimilação da  $\text{NH}_4^+$ - $\text{NH}_3$  originado na fotorrespiração (Taiz & Zeiger, 2009; Silveira *et al.*, 2010). Esta enzima incorpora a  $\text{NH}_4^+$ - $\text{NH}_3$  numa molécula de glutamato, resultando na síntese de glutamina com consumo de ATP. A GS forma o complexo GS/GOGAT, no sistema a GOGAT transfere um grupo amina da glutamina para uma molécula de 2-oxo-glutarato para regenerar duas moléculas de glutamato. Existem duas formas de GOGAT, uma que recebe elétrons do NADH localizada nos plastídeos que participa do metabolismo do nitrogênio absorvido, e outra dentro dos cloroplastos que recebe elétrons da ferredoxina ( $\text{FED}^-$ ) e reassimila o nitrogênio da fotorrespiração (Taiz & Zeiger, 2009; Silveira *et al.*, 2010).

Como pode ser observado, a assimilação do nitrogênio depende da disponibilidade de moléculas aceptoras (glutamato, 2-oxo-glutarato) e de energia (NADH, ATP,  $\text{FED}^-$ ) fornecidos pelos fotossistemas em presença de luz. Como consequência destas necessidades há uma forte ligação com o metabolismo dos carboidratos e especialmente com a fotossíntese. Isto determina que a atividade deste complexo enzimático seja muito afetada pelos mesmos fatores que afetam a assimilação de  $\text{CO}_2$  (Kato & Kubota, 1982; Xu & Zhou, 2006; Reis *et al.*, 2009). Há forte controle do nível de ativação da RN pela luz e pela presença de substrato (Bar-Akiva & Sternbaum, 1965; Reis *et al.*, 2009). Além disso há efeito da idade do tecido, tecidos mais novos tem metabolismo mais ativo e maior atividade (Bar-Akiva & Sagiv, 1967; Min *et al.*, 1998).

A RN é a enzima chave no metabolismo do nitrogênio por ser a ‘porta de entrada’ do  $\text{NO}_3^-$  na planta. Em citros foi observada atividade numa diversidade de órgãos, desde folhas, ramos e raízes até o flavedo dos frutos (Bar-Akiva & Sagiv, 1967; Hippler *et al.*, 2011). Em tangerineira satsuma foi observado que no inverno a atividade é apenas 30% da observada no verão, tanto em folhas quanto em raízes (Kato & Kubota, 1982). Em folhas de cafeeiro foi observado que a atividade da RN decresceu entre janeiro e junho, durante o desenvolvimento dos frutos, sugerindo que há um efeito da redução da demanda sobre a atividade, somado ao envelhecimento e senescência foliar (Reis *et al.*, 2009). Há pouca informação sobre as respostas no metabolismo de absorção e incorporação do nitrogênio nos distintos estádios fenológicos, dando lugar há incertezas e ampliando um leque de pesquisas futuras.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” (IAC), no município de Cordeirópolis, São Paulo (22° 27' 40" S - 47° 24' 4" O; 639 m de altitude) em um telado (30 m de largura x 40 m de comprimento x 5 m de altura) de nylon com malha de 2 mm (Clarite, Equipisca-Campinas-SP). Dentro do telado as condições ambientais foram monitoradas com sensores de temperatura e de radiação solar (Li 200, Li-Cor Inc, Lincoln, USA) e os dados de temperatura máxima, mínima, média e de bulbo úmido, e a radiação solar total foram registradas continuamente em (Li 1200, Li-Cor Inc, Lincoln, USA).

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL E TRATAMENTOS

Foram utilizadas mudas de laranjeira ‘Valência’ [(*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)] enxertadas sobre limoeiro ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck) com 16 meses de idade que foram transplantadas em janeiro de 2007 para vasos de 100 L de capacidade. Os vasos estavam dispostos no sentido norte-sul com um espaçamento de 3,0 m entre linhas por 2,0 m entre plantas. O substrato para o crescimento das plantas foi um composto de ¼ de areia, ¼ composto orgânico e ½ de terra, com as correções necessárias para o desenvolvimento de plantas saudáveis e sem deficiência nutricional. Na tabela 1 são apresentados os resultados da análise do substrato realizada no começo do experimento. Utilizou-se uma dose de 230 g N planta<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> como Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ou Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, divididas em 8 aplicações iguais em intervalos regulares entre os meses de agosto até abril. Em intervalos de 60 dias realizaram-se aplicações de micronutrientes, com 3,5 g planta<sup>-1</sup> do produto comercial ‘Hydro cocktail’ (B 2,0%; Cu, 0,8%; Fe 5,6%; Mn 3,2%; Mo 0,32%; Zn 2,0%) diluído e aplicado no vaso.

A irrigação foi feita por meio de um sistema automático com gotejamento tipo ‘espaguete’ com vazão de 2 L h<sup>-1</sup> de água. A irrigação foi feita diariamente e a quantidade de água aplicada foi calculada com base nas medidas de transpiração obtidas às 09:00 h e 13:00 h realizadas quincenalmente e considerando a área foliar das plantas. Foi feita a reposição diária da água perdida na transpiração a fim de manter o potencial hídrico na pré-manhã entre -0,3 e -0,4 MPa. Na Figura 2 são apresentadas fotos das plantas em 24 de março de 2009, com 42 meses de idade e em 3 de julho de 2010, com 58 meses de idade.

Tabela 1: Características químicas da mistura areia/composto orgânico/terra contida nos vasos no início do experimento, em maio de 2009.

Nutriente	Unidade	Valor	Padrão classificação (GPACC, 1994)
P resina	mg/dm <sup>3</sup>	86,0	Alto
K	mmol/dm <sup>3</sup>	2,9	Alto
Mg		8,0	Alto
Saturação bases	%	85	Alto
S	mg/dm <sup>3</sup>	16,2	Alto
B		0,35	Médio
Cu		7,0	Alto
Mn		23,5	Alto
Zn		81,5	Alto

A fim de avaliar o efeito da presença dos frutos sobre a indução e floração seguinte as plantas foram induzidas a florescer tardiamente, entre janeiro e fevereiro de 2009. Com isto pretendeu-se obter frutos que atingiriam pleno crescimento durante o outono/inverno, coincidentemente com o período indutivo da florada seguinte. Assim, em 14 de maio de 2009, quando os frutos encontravam-se com 30-40 mm de diâmetro, no estágio 74 da escala fenológica BBCH (Agustí *et al.*, 1995) que indica o final da queda fisiológica dos frutos; foram estabelecidos os dois tratamentos: 1) plantas com desbaste total de frutos (PCD) realizado em 14 de maio de 2009 e 2) plantas sem desbaste de frutos (PSD).



Figura 2: Laranjeiras ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’: 24 de março de 2009, antes da aplicação dos tratamentos de desbaste de frutos (A), e em 3 de julho de 2010, antes da data da última medida e amostragem de plantas (B). Foto: V.L. Dovis.

Após o desbaste, durante o mês de julho de 2009 (do dia 6 até o dia 17) as plantas foram submetidas a um estresse hídrico com o objetivo de induzir uma floração abundante e uniforme. Para isto a irrigação foi reduzida, repondo-se somente 67% da água evapotranspirada diariamente, impondo um estresse gradativo e controlando o potencial hídrico foliar na pré-manhã até chegar a -1,0 MPa (Southwick & Davenport, 1986), medido com câmara de pressão tipo Scholander (modelo 3005, Soil Moisture Equipment Corp., USA). Foram efetuadas avaliações dos efeitos dos tratamentos no momento do desbaste dos frutos e em mais sete estádios dentro do ciclo produtivo anual da laranjeira, a saber:

- I. DESBASTE (D): imediatamente depois do estabelecimento dos tratamentos (14 de maio de 2009).
- II. Estádio fenológico 00 na escala BBCH, de REPOUSO (R): período de crescimento não aparente da parte aérea: não há observação de crescimento aparente da parte aérea, mas as folhas encontram-se ativas e realizando fotossíntese e os processos envolvidos na diferenciação de gemas e desenvolvimento das flores que virão continuam ativos (Reuther, 1973),
- III. Estádio fenológico 65 na escala BBCH, de PLENA FLORAÇÃO (PFI): quando aproximadamente 50% das flores encontravam-se em antese,
- IV. Estádio fenológico 71 na escala BBCH, de MÁXIMA FRUTIFICAÇÃO (MFr): durante o desenvolvimento do fruto, quando aproximadamente 50% dos estigmas das flores caíram, no começo do crescimento do ovário (iniciou-se a queda de chumbinhos).
- V. Estádio fenológico 74 na escala BBCH, de FIM DE QUEDA FISIOLÓGICA DOS FRUTOS (FQ): quando os frutos atingiram, aproximadamente, 40% do tamanho final, que também é o momento final da queda fisiológica dos frutos,
- VI. Estádio fenológico 75 na escala BBCH, de CRESCIMENTO LINEAR DOS FRUTOS + BROTAÇÃO (CL+B): quando os frutos estavam com, aproximadamente, 50% do tamanho final. Logo após o final da queda fisiológica dos frutos, quando estão em fase linear de crescimento e ocorre um novo fluxo de brotação, principalmente vegetativa que é responsável pelo crescimento do dossel da planta,
- VII. Estádio fenológico 76-77 da escala BBCH, de CRESCIMENTO LINEAR DOS FRUTOS (CL): no final do verão antes da diminuição da temperatura de outono (março), e quando os frutos estavam com 60% a 70% do tamanho final,

VIII. Estádio fenológico 85 da escala BBCH, de AMADURECIMENTO (A): quando os frutos estavam maduros para serem colhidos.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1 Medidas de trocas gasosas

Nos estádios I a VIII foram realizadas avaliações de trocas gasosas com um analisador portátil de fotossíntese por radiação infravermelha (LI-6400 Li-Cor Inc., Lincoln-NE, USA) operando em sistema aberto. O aparelho estava equipado com uma fonte de luz modelo LI-6400-02B LED (Li-Cor Inc., Lincoln-NE, USA) que foi utilizada para a fixação de *DFFF*. As variáveis medidas foram: assimilação de CO<sub>2</sub> ( $A_n$ ) e condutância estomática ( $g_s$ ). As medidas foram feitas em três folhas por planta. Estas folhas, expostas ao sol, estavam inseridas na parte mediana da copa e, na terceira ou quarta posição em ramos sem frutos, em quatro plantas por tratamento (repetições). As medidas foram feitas durante o período diurno em intervalos de duas horas, começando a partir das 7:30 h até 17:30 h no inverno e 7:00 h até 17:30 h no verão. Imediatamente antes de cada avaliação foi medida a *DFFF* com o quantômetro do analisador portátil de fotossíntese e fixada esta intensidade com uso da fonte de luz, neste horário de medida. Integrando-se as medidas de  $A_n$  ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) instantânea durante o dia foi calculada a assimilação diurna de CO<sub>2</sub> por m<sup>2</sup> [ $A_d$  ( $\text{mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ )].

No mesmo dia da realização da curva diurna, às 13:00 h foram coletadas 12 folhas por planta, semelhantes às utilizadas nas avaliações de trocas gasosas. As folhas foram imediatamente congeladas (-70 °C, em gelo seco) e posteriormente a metade foi seca em estufa com circulação forçada (MA-035/5, Marconi, Brasil) a 52 °C até massa constante e armazenadas para análise de carboidratos. A outra metade permaneceu armazenada a -80 °C, para determinação da atividade enzimática.

### 3.2.2 Coletas de plantas e amostragens

Após o desbaste (D) e nos estádios de plena floração (PF1), de máxima frutificação (MFr), de fim de queda dos frutos (FQ), de crescimento linear de frutos (CL) e de amadurecimento (A), três plantas por tratamento foram retiradas dos vasos para quantificação das

massas de raízes, ramos, folhas e frutos (quando presentes) e coletado material para análises bioquímicas.

Na coleta destrutiva, as folhas foram separadas em novas, com idade entre seis meses e um ano, provenientes da brotação da primavera-verão de 2008-2009 e folhas velhas, com mais de seis meses, provenientes de brotações anteriores (Figura 3). Para a separação dos ramos utilizou-se o mesmo critério. Assim, foram chamados de ramos do último fluxo aqueles entre seis meses e um ano de idade, desenvolvidos na primavera-verão do ciclo anterior e que carregavam as folhas novas. Como ramo velho, foi classificado todo o material com mais de um ano de idade, incluindo o tronco (Figura 3).

Com paquímetro digital foi medido o diâmetro do tronco 8 cm acima da enxertia, foram tomadas duas medidas transversais, por planta. Para cada categoria de ramos foi tomada uma amostra aleatória e representativa na qual foi mensurado: o comprimento de cada segmento e o número de nós presentes. Em seguida foi determinada a massa fresca e a massa seca em estufa a 52 °C. Com essas variáveis estimou-se o número de nós por planta:

$$NN_{pl} = (NN_A * MST_R) / MSA_R,$$

onde  $NN_{pl}$  é o número estimado de nós por planta,  $NN_A$  é o número de nós na amostra,  $MST_R$  é massa seca total dos ramos e  $MSA_R$  é massa seca da amostra de ramos.

Entre as 9:00 h e 10:00 h foram coletadas amostras de ramos das duas categorias e congeladas a -70 °C em gelo seco, para posterior análise bioquímica.

Logo após a coleta dos ramos, os vasos foram abertos ao meio e as raízes expostas, e entre as 13:00 h e 14:00 h foram coletadas amostras de quatro categorias de raízes: raízes de primeira ordem, correspondem às raízes fibrosas, que geralmente têm até 0,5 mm de diâmetro (Pregitzer *et al.*, 1998; Eissenstat & Achor, 1999), raízes finas (>1 e ≤3 mm), raízes intermediárias (>3 e ≤5 mm) e raízes grossas (> 10 mm). Estas amostras foram lavadas manualmente, secas com papel absorvente e congeladas em gelo seco à -70 °C. Finalmente o restante de material radicular foi lavado com água pressurizada até a eliminação total da terra e substrato.

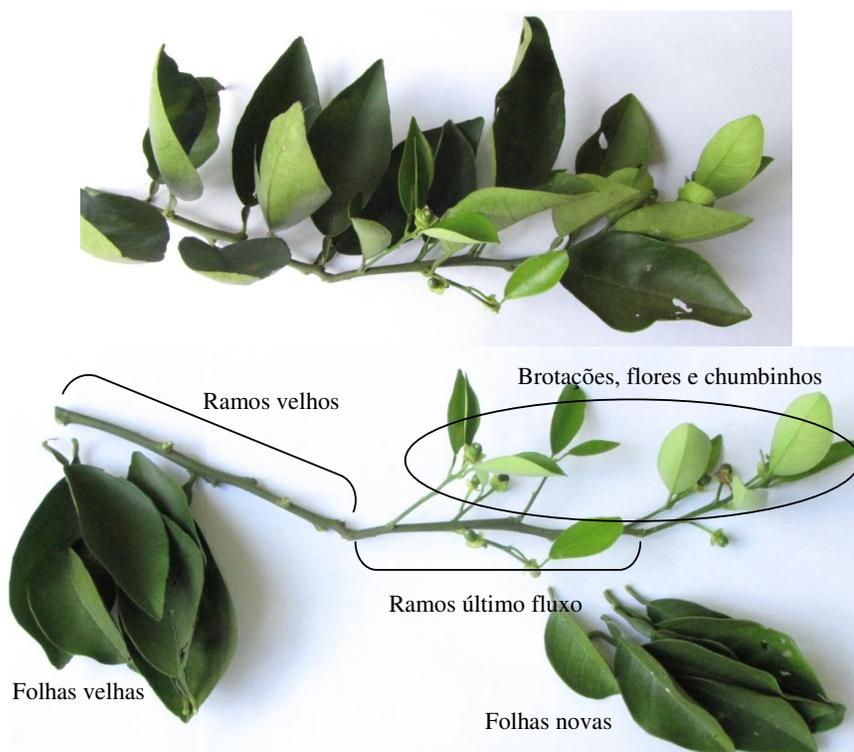


Figura 3: Fotografias ilustrativas da classificação das folhas e ramos da brotação de primavera-verão de 2008-2009 para a separação durante a amostragem.

Determinou-se a massa fresca da totalidade de cada órgão da planta separadamente. Separou-se uma amostra que foi seca em estufa com circulação forçada a 65 °C até massa constante (MA-035/5, Marconi, Brasil). A estimativa da massa seca total de cada órgão foi feita pela relação:

$$MST_X = MFT_X * (MS_{SAX}/MF_{SAX}),$$

onde:  $MST_X$ , massa seca do órgão X;  $MFT_X$ , massa fresca do órgão X,  $MS_{SAX}$ , massa seca da subamostra do órgão X,  $MF_{SAX}$  massa fresca da subamostra do órgão X, onde X pode representar folhas, raízes, ramos ou frutos.

Nas amostras das folhas das duas idades, previamente à secagem, foi medida a área foliar em integrador de área foliar (Li-3100, Li-Cor, Lincoln-NE, USA) e realizado o cálculo da área foliar específica ( $m^2 \text{ kg}^{-1} \text{ MS}$ ). Das amostras de folhas do último fluxo e raízes de primeira ordem coletadas e congeladas em gelo seco, a metade foi seca em estufa até massa constante, moídas e

armazenadas para análises de carboidratos. Outra metade ficou armazenada a -80 °C para quantificação da atividade enzimática. Nos outros órgãos a totalidade da amostra foi seca em estufa.

### 3.2.3 Avaliações das brotações

Em agosto de 2009, três meses após o desbaste de frutos e antes do início das brotações, foram selecionados e marcados cinco ramos por planta. Cada ramo continha entre 20 e 50 nós em ramos do último fluxo e 10 a 20 nós em ramos velhos totalizando entre 100 e 250 nós do último fluxo por planta e de 50 até 100 nós em ramos velhos. As avaliações começaram em 20 plantas por tratamento e finalizou-se com 10 plantas por tratamento devido às coletas destrutivas. Semanalmente foram contabilizados: número de nós brotados e número de brotações, classificando-as como vegetativas (apresentando apenas folhas), reprodutivas (apenas com estruturas reprodutivas) e mistas (com estruturas reprodutivas e folhas). Em cada brotação identificaram-se: botões florais (desde botão branco, estágio 56 até 59 na escala BBCH), flores (desde a abertura da primeira pétala até a queda do pistilo e estigma), frutos (número e diâmetro) e número de folhas formadas (Figura 4).



Figura 4: Estruturas reprodutivas, sendo os tipos 1 a 10 considerados botões, 11 a 13 considerados flores e 14 considerado chumbinho. Foto: V.L.Dovis.

Com essas avaliações foram calculados:

- porcentagem de nós brotados =  $(n^{\circ} \text{ nós brotados no ramo} / \text{nós totais no ramo}) * 100$ ;
- porcentagem brotação reprodutiva =  $(\text{brotações reprodutivas} + \text{brotações mistas}) * 100 / \text{nós brotados no ramo}$ ;

- n° estruturas (botões, flores, chumbinhos) /100 nós = (n° estruturas\*100)/n° nós totais no ramo;
- n° folhas/100 nós = (n° folhas\*100)/n° nós totais.

### **3.2.4 Análises bioquímicas**

Amostras de folhas secas em estufa foram moídas em almofariz e amostras secas de ramos e raízes foram moídas em moinho analítico (A11 Basic, Ika) e armazenadas em frascos de vidro até as análises. Para quantificação de açúcares solúveis totais, sacarose, aminoácidos livres totais e nitrato utilizaram-se técnicas colorimétricas e os extratos foram obtidos pelo método do MCW (Bieleski & Turner, 1966). O amido foi quantificado com o método descrito por Amaral *et al.* (2007) com extração em etanol, digestão enzimática e leitura colorimétrica. O nitrogênio total foi quantificado com o método de Kjeldahl descrito por Nelson e Sommers (1973); e as proteínas solúveis segundo o método de Bradford (1976) nos extratos de avaliação das atividades enzimáticas.

#### **3.2.4.1 Preparação dos extratos MCW**

Os extratos foram obtidos pelo método do MCW, descrito por Bieleski e Turner (1966). Em tubos com tampa de rosca foram colocados 75 mg de amostra com 3 mL de solução MCW (metanol/clorofórmio/água) preparada na proporção 12:5:3 v/v, agitou-se e manteve-se em refrigeração por dois dias. Adicionou-se 1,8 mL de clorofórmio e 1,2 mL de água e após separação das fases, coletou-se o sobrenadante que em seguida foi concentrado em banho-maria (50 °C), para evaporação do metanol e resíduos de clorofórmio. Os extratos foram armazenados em freezer (-20 °C) até o momento da quantificação.

#### **3.2.4.2 Quantificação de aminoácidos livres totais**

Os aminoácidos livres totais foram quantificados segundo o método de Yemm e Cocking (1955) no extrato obtido pelo método do MCW. Em tubo de ensaio adicionou-se 50 µL do extrato (diluído 2,5 vezes), 950 µL de água, 500 µL de tampão citrato de sódio 200 mM, pH 5, 200 µL de ninhidrina 5% em metilcelusolve (etilenoglicol-monometil- éter, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) e 1 mL de KCN 2% (v/v) de uma solução 10 mM de KCN em metilcelusolve. Os tubos foram agitados, vedados e mantidos por 20 min no banho-maria a 100 °C. Após resfriamento foi adicionado 1 mL de etanol 60% (v/v) e feita a leitura em espectrofotômetro a 570 nm. Foi construído uma reta padrão de leucina com concentrações entre 20 e 100 nmol mL<sup>-1</sup>.

### 3.2.4.3 Teor de carboidratos

A relação entre as distintas frações de carboidratos foram calculadas como a seguir:

- Açúcares totais ( $AT$ ) = açúcares solúveis ( $AS$ ) + amido ( $Am$ )
- Açúcares solúveis ( $AS$ ) = açúcares redutores ( $AR$ ) + sacarose ( $SAC$ )

#### Açúcares solúveis ( $AS$ )

A quantificação de açúcares solúveis foi feita pelo método do fenol-sulfúrico descrito por Dubois *et al.* (1956). Em tubo de ensaio adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de extrato MCW e 490  $\mu\text{L}$  de água destilada, 500  $\mu\text{L}$  de solução de fenol 5% e 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Agitou-se, e após esfriar, fez-se a leitura de absorvância em espectrofotômetro a 490 nm. As concentrações de açúcares solúveis foram calculadas a partir da reta padrão de glicose com concentrações entre 10 e 160  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### Sacarose ( $SAC$ )

A sacarose foi quantificada usando o método descrito por Handel *et al.* (1968) e a dosagem feita pelo método do fenol-sulfúrico. Em tubo de ensaio adicionaram-se 40  $\mu\text{L}$  de extrato, 460  $\mu\text{L}$  de água destilada e 500  $\mu\text{L}$  de solução de KOH 30%, sendo a solução levada ao banho-maria 100 °C por 10 minutos. Em seguida adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de solução de fenol 5% e 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, agitou-se, e após esfriar, fez-se a leitura de absorvância em espectrofotômetro a 490 nm. As concentrações de sacarose foram calculadas a partir da reta padrão obtida com sacarose com concentrações entre 10 e 160  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### Amido ( $Am$ )

Para quantificação de amido utilizou-se o método descrito por Amaral *et al.* (2007). Em uma amostra de 10 mg de material vegetal foram feitas quatro extrações com 500  $\mu\text{L}$  de etanol 80% a 80 °C (em banho-maria) por 20 min, para extração de açúcares, pigmentos, fenóis e outras substâncias. O precipitado foi seco a temperatura ambiente até completa evaporação do resíduo (12 h). Quando seco, o precipitado foi incubado duas vezes a 75 °C por 30 min com 500  $\mu\text{L}$  da enzima termoestável  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1) (120 U  $\text{mL}^{-1}$ ) de *Bacillus licheniformis* (cód. E-ANAAM, MEGAZYME, Irlanda) diluída em tampão MOPS 10 mM e pH 6,5. Logo depois, foi incubado duas vezes com 500  $\mu\text{L}$  de amiloglicosidase (EC 3.2.1.3), (30 U  $\text{mL}^{-1}$ ) de *Aspergillus niger* (cód. E-AMGPU, MEGAZYME, Irlanda) diluída em tampão acetato de sódio 100 mM e

pH 4,5; por 30 min em banho-maria a 50 °C. Para parar a reação e precipitar as proteínas foram acrescentados 100 µL de HClO<sub>4</sub> 0,8 M. A dosagem da glicose liberada foi feita em eppendorf contendo 30 µL de extrato, 20 µL de água destilada e 750 µL do reagente PAP Liquiform (Labtest Diagnóstica S.A.), levado a banho-maria a 37 °C por 15 min e a absorvância foi quantificada em leitor de microplacas em comprimento de onda de 490 nm. As concentrações foram calculadas a partir da reta padrão de glicose com concentrações entre 10 e 60 µg mL<sup>-1</sup>.

#### **3.2.4.4 Quantificação de nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)**

Foi quantificado segundo o método do ácido salicílico descrito por Cataldo *et al.* (1975) com a fração aquosa do MCW. Em tubo de ensaio adicionaram-se 50 µL do extrato, 50 µL de água e 200 µL do reagente de ácido salicílico 5% em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Após agitação a solução foi mantida por 20 min em temperatura ambiente. Adicionaram-se lentamente 4,75 mL de NaOH 2 N, agitou-se e após resfriamento fez-se leitura em espectrofotômetro a 410 nm. As concentrações foram calculadas a partir da reta padrão de KNO<sub>3</sub> entre 1 e 10 µmol mL<sup>-1</sup>.

#### **3.2.4.5 Quantificação de nitrogênio total**

A determinação de nitrogênio total foi realizada pelo método descrito por Nelson e Sommers (1973). Amostras de 200 mg de material vegetal seco e moído foram transferidas para tubos de digestão, contendo 2 g de mistura digestora (10 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 g de CuSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O e 1 g de Se) e 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, em cada bloco digestor foram incluídos para controle uma amostra padrão e um branco. Os tubos foram colocados em bloco digestor e aquecidos lentamente até 380 °C e as amostras foram digeridas ao ponto de ebulição da mistura por aproximadamente 60 min, até a obtenção de um extrato incolor. Após resfriamento a temperatura ambiente acrescentou-se 15 mL de água destilada em cada tubo.

No destilador a amostra foi alcalinizada com 20 mL de NaOH 50%. O destilado obtido foi recolhido em 30 mL de ácido bórico 4% com 10 gotas de mistura indicadora mista (0,066 g de verde de bromocresol + 0,132 g de vermelho de metila + 200 mL de etanol). A titulação do amônio formado foi realizada com solução de HCl 0,1 N e o teor de nitrogênio vegetal foi determinado pela fórmula:

$$\text{Nitrogênio total (\%)} = 100 \times 0,014 \times (V_a - V_b) \times F_c \times N/P$$

onde  $V_a$  = volume de HCl 0,1 N gasto na titulação;  $V_b$  = volume de HCl 0,1 N gasto na prova do branco;  $F_c$  = fator de correção da solução de HCl 0,1 N;  $N$  = normalidade do HCl (0,1 N) e  $P$  = massa da amostra em gramas.

### 3.2.5 Preparação dos extratos e avaliação das atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas foram quantificadas dando às respectivas enzimas *in vitro* as condições ótimas no meio de reação e sem limitação de substrato. Em consequência estas atividades representam apenas a capacidade potencial de redução de  $N-NO_3^-$  nas plantas em cada tratamento, e nem sempre é reflexo da atividade *in vivo*. Para a avaliação das atividades enzimáticas foram utilizadas folhas novas e raízes de primeira ordem coletadas às 13:00 h. Para avaliação da atividade das enzimas redutase do nitrato (RN), glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) foi obtido um extrato a partir da homogeneização do material vegetal em cadinho com nitrogênio líquido e tampão de extração HEPES-NaOH 100 mM (pH 7,5),  $MgCl_2$  5 mM, DTT (ditiotreitól) 5 mM, ácido ascórbico 10 mM, EDTA 5 mM, 10% de glicerol e 2% de PVPP (polivinil-poly-pyrrolydona). O extrato foi centrifugado a 10.000 g e 4 °C por 20 min; posteriormente 2,5 mL do extrato foram dessalinizados em coluna PD 10 (Sephadex G-25) previamente equilibradas com tampão de extração. Os extratos foram armazenados a -80 °C até a quantificação das atividades enzimáticas. Em folhas foram utilizados 8 mL de tampão por grama de material, enquanto em raízes foram utilizados 3 mL  $g^{-1}$ .

#### 3.2.5.1 Ensaio para determinação da atividade de redutase do nitrato (EC 1.7.1.1)

O ensaio da redutase do nitrato foi feito segundo Kato e Kubota (1982), com algumas modificações, em uma mistura de reação composta de 200  $\mu$ L do extrato dessalinizado, 100  $\mu$ L NADH 1 mM e 450  $\mu$ L tampão fosfato 100 mM+ $KNO_3$  25 mM+1% n-propanol, pH 7,5. A mistura do ensaio foi incubada por 30 min a 35 °C e logo depois mantida por 10 min a 100 °C para parar a reação. Adicionou-se 750  $\mu$ L de sulfanilamida 1% dissolvida em HCl 2,4 N+N-1-naftiletilenodiamina 0,02% (m/v) e após 15 min centrifugou-se por 2 min a 3000 g e fez-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade, expressa em  $\mu$ mol  $NO_2^- g^{-1} MF h^{-1}$ , foi calculada a partir da reta padrão com concentrações de  $NaNO_2$  entre 0,2 e 2 nmol  $mL^{-1}$ .

### **3.2.5.2 Ensaio para determinação da atividade de glutamina sintetase (EC 6.3.1.2)**

A atividade foi medida segundo Rhodes *et al.* (1975), quantificando a reação de síntese através da formação de  $\alpha$ -glutamil hidroxamato, utilizando hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) no lugar da amônia. A mistura de reação para a determinação continha para 1 mL de volume final: 50  $\mu\text{L}$  ATP 100 mM, 150  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  300 mM, 150  $\mu\text{L}$  L-glutamina 50 mM, 50  $\mu\text{L}$   $\text{NH}_2\text{OH}$  100 mM e 500  $\mu\text{L}$  tampão Imidazole 200 mM, pH 7,2. A reação iniciou-se pela adição de 100  $\mu\text{L}$  do extrato dessalinizado e incubou-se por 30 min a 30 °C. Adicionou-se 1 mL de solução de cloreto férrico (Ferguson & Sims, 1971), composta de 0,67 N HCl, 0,20 M ácido tricloroacético e 0,37 M  $\text{FeCl}_3$ . O precipitado marrom-amarelado resultante foi centrifugado a 3000 g por 2 min e as leituras feitas em espectrofotômetro a 535 nm e a atividade calculada a partir da reta padrão com concentração de glutamyl-hidroxamato (GGH) entre 0,05 e 30  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol GGH g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$ .

### **3.2.5.3 Ensaio para determinação da atividade de glutamato sintase (EC 1.4.1.14)**

Para determinação da atividade da GOGAT dependente de NADH utilizou-se a metodologia desenvolvida por Suzuki *et al.* (1983), em que a atividade é determinada pelo decréscimo na absorbância do NADH, resultante do consumo na reação de formação de glutamato. Para um volume final de 2 mL utilizou-se meio tamponado com Tris-HCl 100 mM, pH 7,5 + 5 mM glutamina + 5 mM  $\alpha$ -cetoglutarato + 0,21 mM NADH. A reação iniciou-se com a adição de 300  $\mu\text{L}$  do extrato dessalinizado. A oxidação do NADH foi acompanhada pela absorbância a 340 nm, em câmara aquecida a 30 °C, durante 10 min com leituras a cada minuto. Os resultados, expressos em  $\mu\text{mol NADH g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$ , foram calculados a partir do coeficiente de absortividade molar do NADH de 6,3 (Silveira *et al.*, 2010).

### **3.2.5.4 Quantificação de proteína total**

A determinação do teor de proteína total solúvel foi realizada segundo o método de Bradford (1976) usando os extratos preparados para a quantificação das atividades enzimáticas. Em 10 a 30  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, dependendo do tecido, foi acrescentado 1 mL do reagente de Bradford resultando na mistura colorida na qual foi feita a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. O reagente de Bradford foi preparado numa diluição de 1:4 em água do reagente concentrado de Bradford (Marca BioAgency). Os resultados, expressos em mg proteína  $\text{g}^{-1} \text{MF}$ , foram

calculados a partir de reta padrão com concentrações de albumina de soro bovino (BSA) com concentrações entre 1 e 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### **3.2.6 Delineamento experimental e análise estatístico dos dados**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas no tempo. Como fontes de variação consideraram-se os dois níveis de carga de frutos (PCD e PSD) e os estádios considerados para as avaliações: desbaste, repouso, máxima floração, máxima frutificação, fim queda fisiológica dos frutos, crescimento linear de frutos+brotação, crescimento linear e amadurecimento de frutos. Quando se observou efeito significativo da interação entre o tratamento de carga de frutos e os estádios fenológicos, realizou-se comparação das médias no correspondente estágio fenológico.

Os pressupostos do modelo foram analisados graficamente através de gráficos de resíduos contra médias, e com teste de normalidade de Shapiro-Wilks para os resíduos e com teste de Hartley para homocedasticidade das variâncias.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. AMBIENTE NA CASA DE VEGETAÇÃO

Entre janeiro e meados de março de 2009, as temperaturas máximas médias variaram entre 30 e 40 °C e as temperaturas mínimas médias entre 17 e 20 °C. A partir de 15 de março em diante as temperaturas diminuíram e já a partir do dia 15 de abril registraram-se valores inferiores a 15 °C. Entre 1º a 24 de junho a temperatura mínima foi ainda mais reduzida com valores médios inferiores a 12 °C e atingindo valor mínimo absoluto de 5,3 °C no dia 3 de junho. Neste mesmo período, a temperatura máxima dificilmente ultrapassou os 27 °C (Figura 5A). Estas temperaturas estão abaixo do limite inferior para o crescimento da parte aérea em plantas de *Citrus* (Reuther, 1973) e estão dentro dos limites que induzem a diferenciação das gemas em reprodutivas (Hall *et al.*, 1977; Southwick & Davenport, 1986; Ribeiro *et al.*, 2006). Este período de baixas temperaturas, combinado com o estresse hídrico, aplicado entre os dias 6 a 17 de julho, foi suficiente para induzir o desenvolvimento das gemas florais. A partir de julho de 2009 as temperaturas máximas e mínimas aumentaram gradativamente, atingindo em fevereiro-março de 2010 valores médios entre 33 e 37 °C (Figura 5A).

A radiação total diária recebida dentro da casa de vegetação durante os meses do outono-inverno (maio-agosto) foi em média 60% da radiação recebida durante os meses mais ensolarados da primavera-verão (novembro-fevereiro) com média de 6,7 MJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> no outono-inverno e de 11,8 MJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> na primavera-verão (Figura 5B). Nestes mesmos períodos os valores de radiação fora da estufa foram 8,4 MJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> no outono-inverno e 13,2 MJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> na primavera-verão (CIIAGRO/IAC, 2011<sup>1</sup>), ou seja 25 e 12% a mais do que foi registrado dentro da casa de vegetação. A cobertura plástica e a própria estrutura da casa de vegetação interferem na entrada da radiação, afetando a energia recebida, assim a *DFFF* máxima no verão foi de 800 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e no inverno entre 400 e 500 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, estas intensidades estão no limite inferior de saturação luminosa para a fotossíntese em citros (Machado *et al.*, 2005; Ribeiro & Machado, 2007).

---

<sup>1</sup> CIIAGRO/IAC. Centro integrado de informações meteorológicas. Url: [www.ciiagro.sp.gov.br](http://www.ciiagro.sp.gov.br)

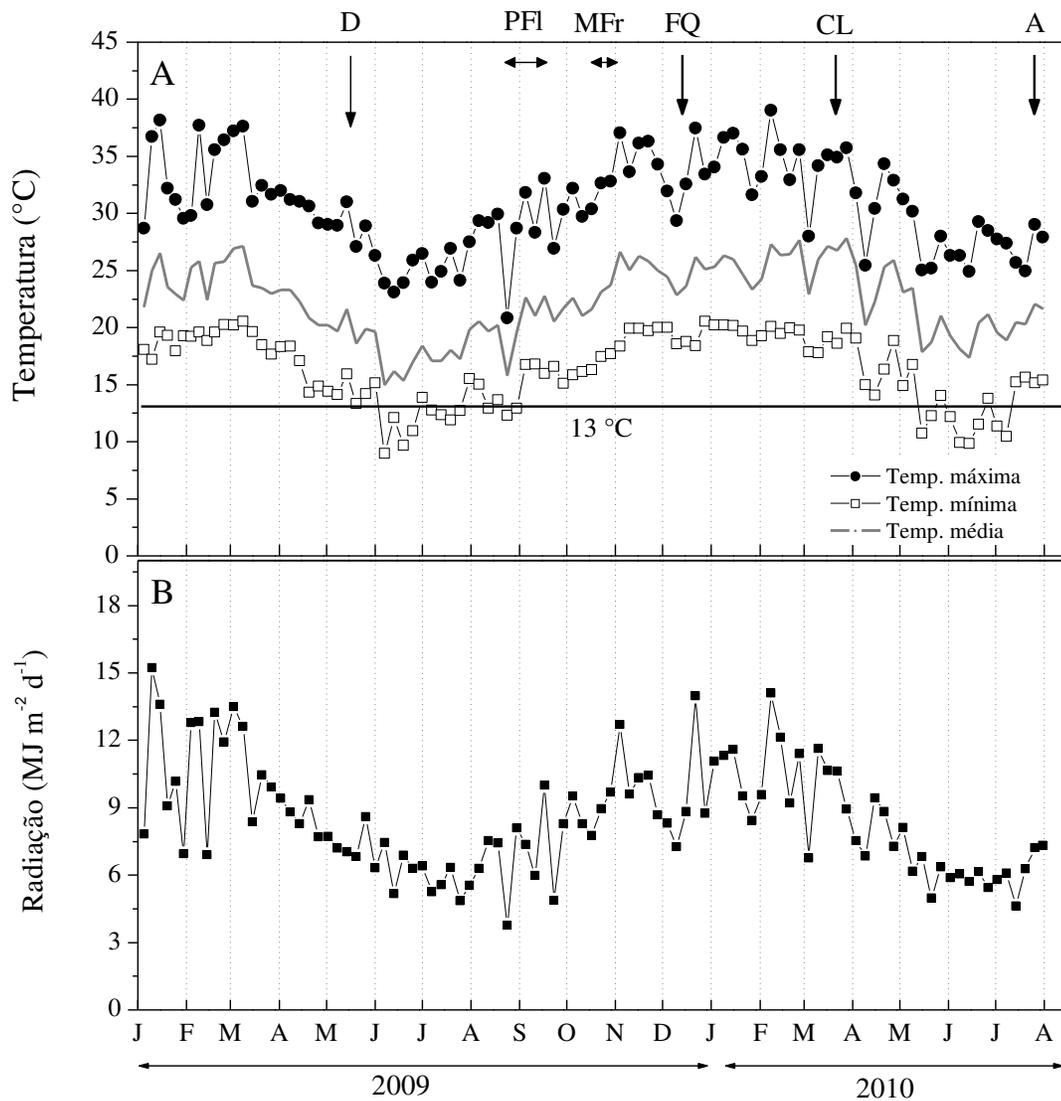


Figura 5: Ambiente dentro da casa de vegetação durante o período experimental de janeiro de 2009 até julho de 2010. Temperatura média, máxima média e mínima média (A) e radiação solar diária recebida em  $\text{MJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$  (B), média de seis dias. Letras e setas acima do gráfico indicam as datas aproximadas do desbaste (D) e dos estádios fenológicos de plena floração (PFI), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica (FQ), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A).

## 4.2. BROTAÇÃO: FLORAÇÃO E CRESCIMENTO VEGETATIVO

Como resposta às baixas temperaturas ocorridas durante o mês de junho de 2009 e associado ao estresse hídrico aplicado, em 29 de julho foram observadas, em PCD, as primeiras gemas brotadas. Uma semana depois se observaram as primeiras brotações em PSD (Figura 6).

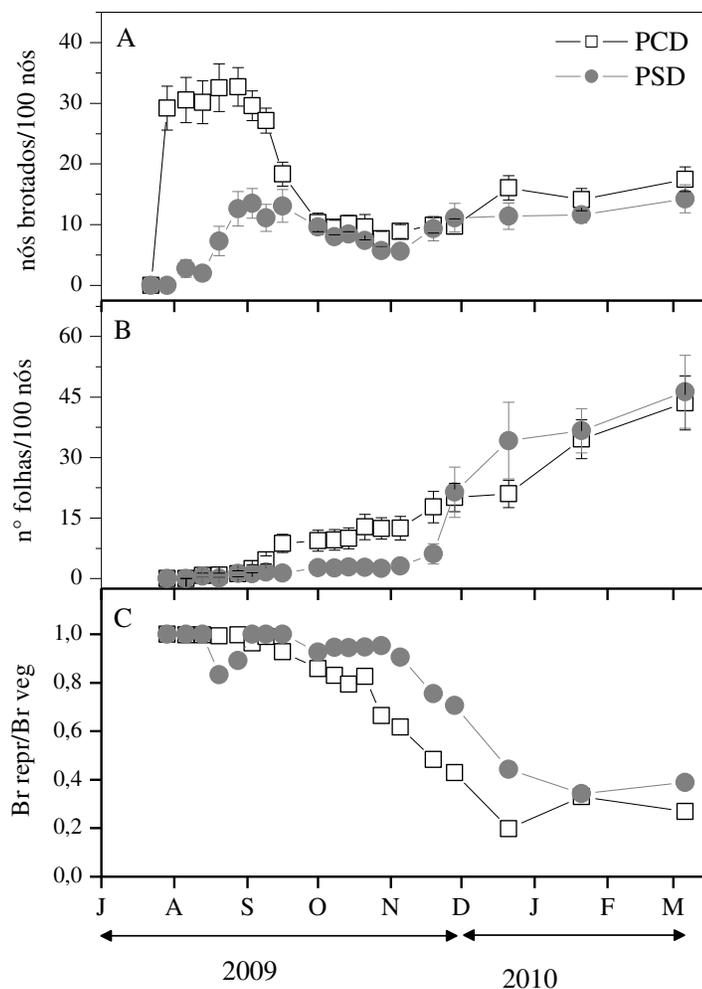


Figura 6: Número de nós do último fluxo de crescimento brotados a cada 100 nós (A), número de folhas iniciadas a cada 100 nós (B), proporção de brotações reprodutivas (Br repr) em relação com as vegetativas (Br veg) em ramos do último fluxo de crescimento (C) em laranjeiras 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo' com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD). Média de 10 plantas  $\pm$  erro padrão.

O início da brotação, apenas 12 dias depois do fim da redução hídrica, é indício que a indução poderia ter acontecido apenas por efeito das baixas temperaturas, visto que o NHF (número de horas de frio) abaixo de 13 °C estimado foi de 335 h, indicando um forte efeito do frio na indução da brotação e floração (Ribeiro *et al.*, 2006). Considerando também que a redução hídrica foi aplicada apenas por 11 dias e, segundo Southwick e Davenport (1986), são necessárias pelo menos duas semanas de estresse para induzir a floração. Além disso, o desenvolvimento das gemas requer de três a cinco semanas (Bustan & Goldschmidt, 1998; Pereira *et al.*, 2003), sendo observado em laranja que a mitose e desenvolvimento de flores ocorrem ainda em temperaturas relativamente baixas (15/8 °C) (Nebauer *et al.*, 2006). Com estes antecedentes é possível inferir que, no presente estudo, as gemas poderiam encontrar-se em processo de diferenciação e desenvolvimento quando a restrição hídrica começou.

Tabela 2: Desenvolvimento das estruturas reprodutivas e produção de frutos das plantas de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD). Média de 10 plantas  $\pm$  erro padrão.

Safra/Estádio	Variáveis	PCD	PSD	<sup>1</sup> p
Safra 2008/09	Número de frutos (fr pl <sup>-1</sup> )	-	55,8 $\pm$ 3,9	
	Massa de frutos (kg pl <sup>-1</sup> )	-	11,2 $\pm$ 0,8	
	Massa por fruto (g fr <sup>-1</sup> )		203,3 $\pm$ 5,6	
Floração 2009	Botões/100 nós	23,6 $\pm$ 3,8	6,6 $\pm$ 2,1	< 0,01
	Flores/100 nós	42,5 $\pm$ 5,0	6,0 $\pm$ 1,7	< 0,01
	Chumbinhos/100 nós	29,3 $\pm$ 3,7	7,2 $\pm$ 1,7	< 0,01
	Massa por flor (g flor <sup>-1</sup> )	0,344 $\pm$ 0,003	0,298 $\pm$ 0,030	ns
Safra 2009/10	Número de frutos (fr pl <sup>-1</sup> )	77,6 $\pm$ 5,6	59,2 $\pm$ 7,4	< 0,07
	Massa de frutos (kg pl <sup>-1</sup> )	12,7 $\pm$ 0,8	9,2 $\pm$ 1,2	< 0,05
	Massa por fruto (g fr <sup>-1</sup> )	165,8 $\pm$ 4,5	155,4 $\pm$ 4,9	ns
	Diâmetro do fruto (mm fr <sup>-1</sup> )	67,6 $\pm$ 1,5	64,4 $\pm$ 2,0	ns

<sup>1</sup>p = significância; ns = não significante

Diferenças entre as plantas dos dois tratamentos foram observadas no desenvolvimento das brotações. Em PCD o número máximo de gemas brotadas foi maior e ocorreu, aproximadamente,

uma semana antes que em PSD; ou seja em 30% dos nós do último fluxo de crescimento observaram-se brotações entre os dias 20 a 28 de agosto em PCD. Enquanto, em PSD o número máximo ocorreu entre os dias 3 a 16 de setembro e somente 13% dos nós brotaram (Figura 6A). Além das diferenças na intensidade de brotação, os tratamentos tiveram também efeito sobre o número de estruturas reprodutivas formadas (Figura 7). A presença de frutos em crescimento, que provocou redução na brotação, também afetou a intensidade de floração ( $p < 0,01$ ), a que foi 7 vezes mais intensa em PCD (Figura 6A, Figura 7, Tabela 2).

Efeitos similares sobre a intensidade da floração têm sido observados tanto em plantas com desbaste total de frutos como em plantas com produção alternada, que apresentaram redução de 25% a 100% na quantidade de flores formadas devido à inibição provocada pela presença de frutos. Estes resultados foram observados tanto em pomares (Prado *et al.*, 2007; Sekita, 2008; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010) como em plantas em vasos (Hall *et al.*, 1977), indicando que há um efeito inibitório dos frutos pendentes da safra anterior sobre a intensidade da floração (Guardiola *et al.*, 1984; García-Luis *et al.*, 1995), mais acentuado em espécies e variedades de colheita tardia, caso da 'Valência'. Este efeito pode ser considerado tanto devido ao consumo e competição pelos assimilados (Goldschmidt & Golomb, 1982; Guardiola *et al.*, 1984; García-Luis *et al.*, 1995), quanto pela produção e transporte de hormônios que inibem a brotação (García-Luis *et al.*, 1986, Koshita *et al.*, 1999; Koshita & Takahara, 2004).

Foi observado também efeito dos tratamentos sobre o momento de ocorrência dos estádios fenológicos. Em PCD os estádios fenológicos de plena floração (PFI) e máxima frutificação (MFr) foram registrados nos dias 26 de agosto e 9 de setembro, respectivamente, enquanto em PSD, estes estádios aconteceram nos dias 16 de setembro e 21 de outubro. Inicialmente as brotações foram reprodutivas (Figura 6C), e assim que o período de queda fisiológica dos chumbinhos terminou em dezembro, iniciou-se um novo fluxo de brotação vegetativa, bem menos intenso que o da primavera. Estas novas brotações foram responsáveis pelo desenvolvimento das folhas (Figura 6B). Nesta etapa não se observaram diferenças entre as plantas dos dois tratamentos. Este fluxo de verão também ocorreu em condições de campo, e em plantas com e sem desbaste de frutos no Estado de São Paulo (Prado *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2010). Estas brotações além de serem responsáveis pela formação da estrutura da planta dão origem aos ramos nos quais serão formadas as flores no seguinte ciclo produtivo, afetando a capacidade de brotação do ano seguinte (Davies & Albrigo, 1994). As brotações nos ramos do

último fluxo de crescimento corresponderam a 98% dos nós brotados. Nos ramos velhos somente entre 1% e 2% das gemas brotaram em PCD e PSD, respectivamente, e estas brotações desenvolveram-se a partir de novembro, e foram principalmente vegetativas (dados não apresentados).

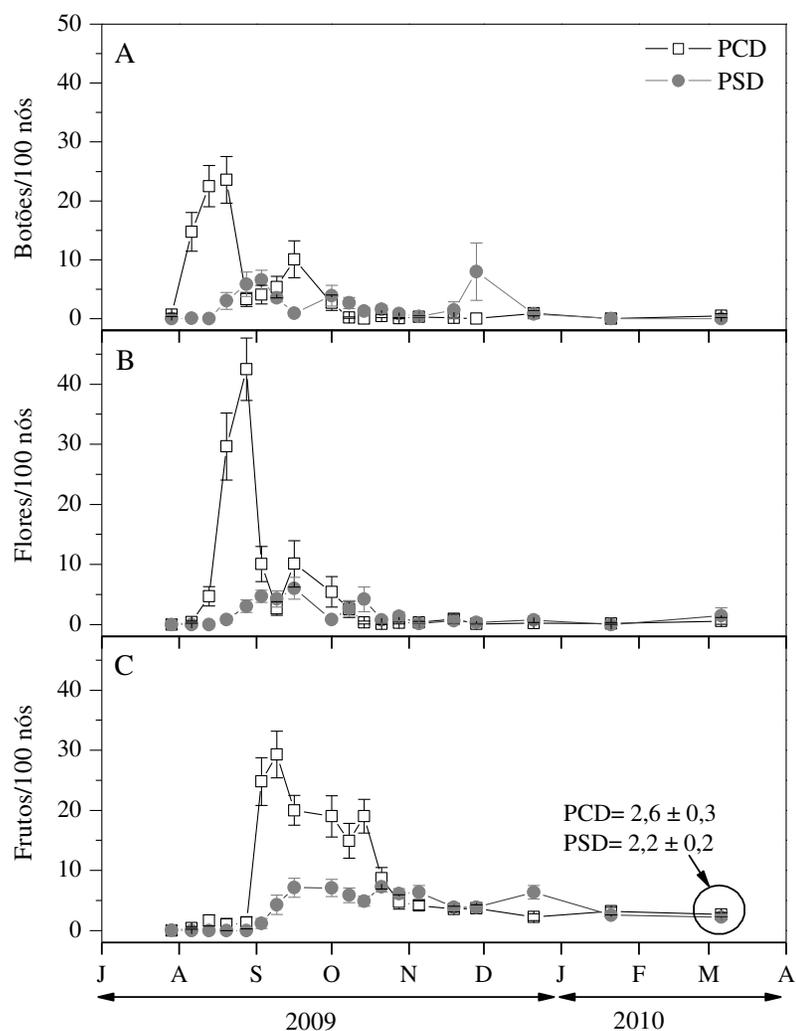


Figura 7: Número de estruturas reprodutivas formadas a cada 100 nós em ramos do último fluxo de crescimento, em laranjeiras ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e sem desbaste de frutos (PSD): botões florais (A), flores (B) e frutos (C). Média de 10 plantas  $\pm$  erro padrão.

Em PCD, que produziram 42 flores/100 nós, o que representa uma floração de média intensidade (Agustí, 2003), e 4,8% destas flores foram fixadas como frutos no fim de FQ (Figura 7C). Quando a floração é intermediária a frutificação é quase independente da quantidade de

flores, e conforme o número destas aumenta, há redução na porcentagem de flores fixadas. Dentro da faixa de floração intermediária, quanto mais intensa, maiores as perdas de energia na abscisão de flores e chumbinhos (Guardiola *et al.*, 1984; Agustí, 2003). Já, em PSD a floração teve um máximo de 6 flores/100 nós, o que é considerada de baixa intensidade, nestas plantas foram fixadas como frutos 15,7% destas flores. Quando há baixa intensidade de floração, entre 0 e 20 flores/100, há limitação no número de estruturas e a frutificação aumenta conforme o número destas aumenta; ou seja, a produção final de frutos é limitada pela quantidade de flores (Guardiola *et al.*, 1984; Agustí, 2003).

A conversão de flores em frutos e sua fixação dependem do reinício do crescimento do ovário após a antese. O sucesso deste processo está relacionado à capacidade do ovário em atrair metabólitos, ou seja, da capacidade de competição. A força de dreno dos ovários em crescimento é afetada pelo balanço dos hormônios ácido abscísico (ABA), giberelinas (GA) e citocininas os quais estão associados com a promoção da fase I do crescimento dos frutos (Guardiola & García-Luis, 2000; Agustí, 2003).

Independentemente da intensidade da floração, somente uma parte dos ovários completam o seu desenvolvimento até maturidade do fruto, podendo ocorrer a abscisão na antese das flores, ou antes, dela. A abscisão de flores está diretamente associada com o número e ocorre mesmo com elevada reserva de carboidratos nas folhas (Guardiola & García-Luis, 2000). Quando a floração é muito intensa a maior perda ocorre por abscisão de flores, enquanto que em plantas com floração intermediária as perdas totais de matéria seca são até 40% menores e as perdas na abscisão de flores podem se reduzir a 55% (Guardiola *et al.*, 1984).

A abscisão de frutinhos num estágio mais avançado ocorre quando este reinicia o seu crescimento, é quando as reservas foliares reduzem-se (Guardiola & García-Luis, 2000). Durante esta etapa, a taxa de crescimento individual de cada frutinho é o fator que afeta sua capacidade de se manter (Guardiola *et al.*, 1984; Guardiola & García-Luis, 2000). O aumento na taxa de crescimento dos frutos aumenta a abscisão, uma vez que a capacidade da planta em prover carboidratos, quando não há reservas foliares, depende exclusivamente da fotossíntese (Guardiola & García-Luis, 2000; Iglesias *et al.*, 2003). Além disso, uma redução nos teores de carboidratos nos frutos induz incremento na concentração de ABA e de ácido 1-amino-ciclopropano, um precursor do etileno, aumentando a abscisão (Gómez-Cadenas *et al.*, 2000).

Como resultado da competição entre os frutinhos em desenvolvimento, pouco depois do fim da queda fisiológica, em janeiro de 2010, foi contabilizado  $2,6 \pm 0,3$  e  $2,2 \pm 0,2$  frutos fixados por 100 nós em PCD e PSD respectivamente (Figura 7C). Em PCD o investimento em flores foi sete vezes maior que em PSD (Figura 7B), mas na colheita o número de frutos por planta foi somente 30% maior em PCD que em PSD (Tabela 2).

No início da fase I as taxas de crescimento em diâmetro dos frutos foram  $0,33$  e  $0,23$  mm dia<sup>-1</sup> em PCD e PSD, respectivamente. A menor taxa de crescimento em PSD deve estar relacionada com a competição inicial dos frutinhos da floração de setembro de 2009 com os remanescentes da florada iniciada em fevereiro de 2009 (Figura 8). Em PCD a maior taxa de crescimento manteve-se até o fim da queda fisiológica dos chumbinhos (final de dezembro) que coincide, aproximadamente, com o fim da fase I de crescimento, de ativa divisão celular e onde os frutos são mais afetados pela redução ou carência de assimilados (Guardiola & García-Luis, 2000; Iglesias *et al.*, 2003). Logo depois começa a fase II, quando ocorre a expansão e enchimento celular, numa velocidade de  $0,21$  mm dia<sup>-1</sup> em PCD e mantendo os  $0,23$  mm dia<sup>-1</sup> em PSD; alcançando 90% do tamanho final do fruto no mês de maio (Figura 8).

Em julho de 2010 quando foi observada a mudança de cor dos frutos e alcançaram o teor de açúcares solúveis (°Brix) indicador de maturação da cultivar ‘Valencia’ procedeu-se a colheita. Os frutos foram colhidos entre 23 e 27 de julho de 2010, sendo que em PCD houve uma média de 78 frutos e com uma produção de 12,7 kg planta. Esta safra foi 30% maior que em PSD ( $p < 0,07$ ) com 59 frutos e 9,2 kg planta (Tabela 2). Os frutos não foram diferentes ( $p < 0,10$ ) com diâmetro médio de 66 mm e massa individual de 160,6 g (Tabela 2).

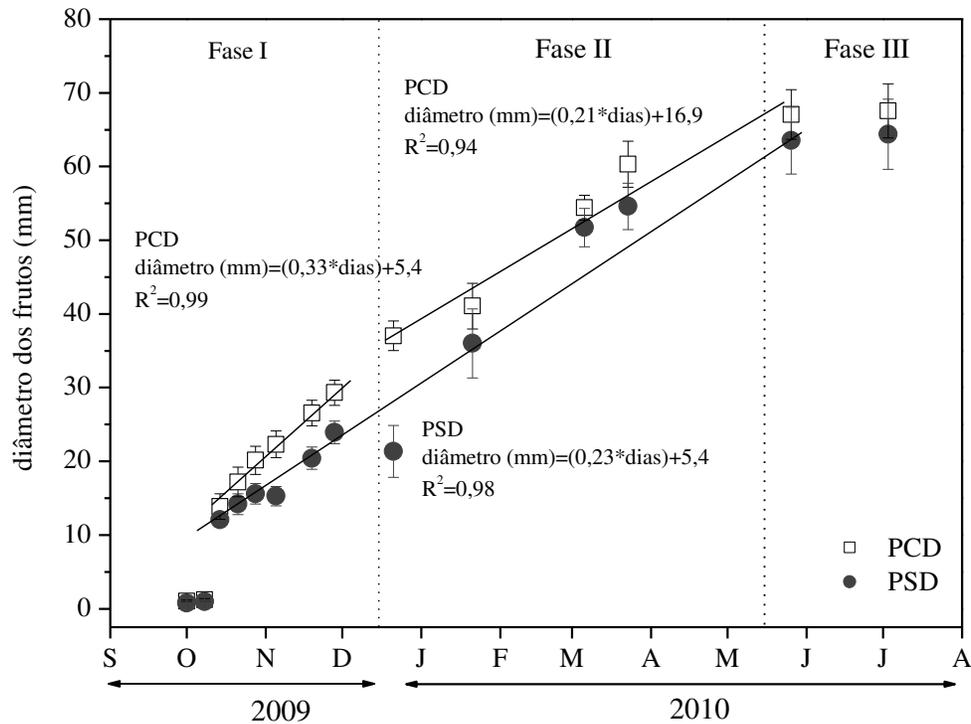


Figura 8: Diâmetro dos frutos em laranjeiras ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD) desde o início da frutificação até a colheita. Retas indicam taxas de incremento do diâmetro desde plena floração, estimadas para cada tratamento. Fase I de divisão celular, Fase II de alongamento celular e Fase III de amadurecimento dos frutos.

#### 4.3. VARIAÇÃO SAZONAL DAS TROCAS GASOSAS

Em resposta à variação do ambiente e em associação com as variações na demanda em cada estágio fenológico, observaram-se variações sazonais na assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $A_n$ ), e condutância estomática ( $g_s$ ) (Tabela 3), e como consequência na assimilação diurna de  $\text{CO}_2$  ( $A_d$ ) ao longo do período experimental. Houve queda na  $A_d$  entre os dias 12 e 20 de maio (Figura 9), embora nestes dias a temperatura média fosse similar, 21 °C aproximadamente (figura 5), e inferior à ótima para citros (Machado *et al.*, 2005). Previamente a medida do dia 20 de maio houve três noites consecutivas com temperatura mínima entre 10 e 12 °C. A baixa temperatura noturna seria responsável pela diminuição da fotossíntese, visto que a ocorrência de noites frias

reduzem  $g_s$  e  $A_n$  em laranjeiras (Machado *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011). Durante os meses de junho e julho de 2009 as temperaturas máximas e mínimas médias diminuíram ainda mais, o que reduziu  $g_s$  e  $A_n$ , causando uma queda tanto nos valores máximos, que ocorreram entre as 9:00 e 11:00 h, como nos valores mínimos que ocorreram ao redor das 15:00 h (dados não apresentados).

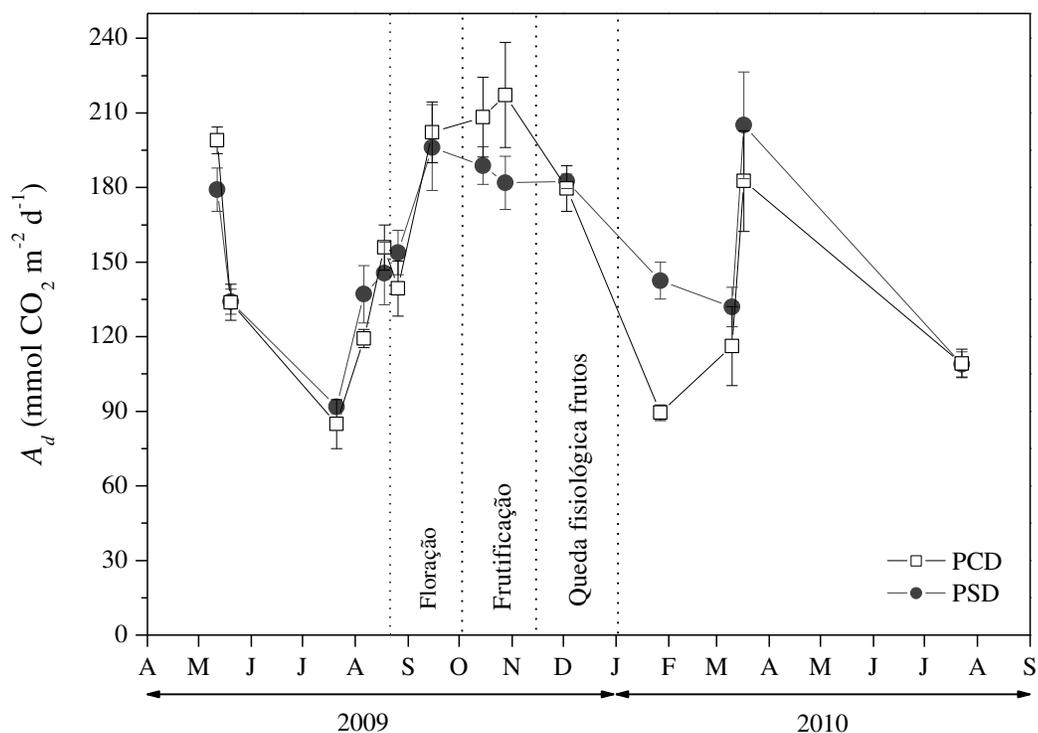


Figura 9: Assimilação diária de CO<sub>2</sub> ( $A_d$ ) em laranjeira 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo' com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD). Média de quatro repetições  $\pm$  erro padrão.

Entre o desbaste, em 14 de maio, e o dia 21 de julho a  $A_d$  teve uma redução aproximada de 50%, sem diferenças entre os tratamentos (Figura 9). O fato do tratamento de desbaste de frutos não ter efeito sobre as variáveis avaliadas indica que a queda em  $A_d$  neste breve período esteve associada com fatores ambientais e não por efeito da presença de drenos (frutos) ou pelos teores de carboidratos nas folhas, como foi mencionado por alguns autores (Iglesias *et al.*, 2002;

Syvertsen *et al.*, 2003; Urban *et al.*, 2004). A temperatura ótima para a fotossíntese em laranja 'Valência' foi estimada em 25 °C (Machado *et al.*, 2005), e a redução da  $A_n$  nos meses mais frios têm sido associada com baixa eficiência de carboxilação e menor capacidade de regeneração da ribulose-1,5- bisfosfato, assim como redução na condutância estomática ( $g_s$ ) e aumento de drenos alternativos de elétrons (Ribeiro *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2011). Os resultados são consistentes com os observados por outros autores que relatam também redução da  $A_n$  e  $g_s$ , e por consequência da  $A_d$ , nos meses de junho e julho, como consequência do frio (Machado *et al.*, 2002; Ribeiro, 2006; Ribeiro & Machado, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2011).

Tabela 3: Valores de assimilação de CO<sub>2</sub> e condutância estomática observados as 11:00 h (horário de máxima) em plantas de laranja 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo', com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste (PSD). No desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: repouso vegetativo aparente (R), plena floração (PFl), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos + brotação (CL+Br), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A). Média de três repetições ± erro padrão.

Estádios fenológicos	Assimilação instantânea de CO <sub>2</sub> ( $A_n$ ) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$		Condutância estomática ( $g_s$ ) $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
	PCD	PSD	PCD	PSD
	média ± erro	média ± erro	média ± erro	média ± erro
D	8,8 ± 0,64	7,5 ± 0,64	0,120 ± 0,02	0,100 ± 0,02
R	4,8 ± 0,61	3,8 ± 0,33	0,035 ± 0,01	0,024 ± 0,00
PFl	5,7 ± 0,35	6,0 ± 1,55	0,083 ± 0,01	0,074 ± 0,02
MFr	7,6 ± 0,62	7,1 ± 0,67	0,102 ± 0,02	0,074 ± 0,01
FQ	8,5 ± 0,60	7,9 ± 0,41	0,145 ± 0,02	0,125 ± 0,01
CL+Br	3,0 ± 0,30	5,7 ± 0,29	0,032 ± 0,02	0,061 ± 0,02
CL	7,3 ± 0,92	7,6 ± 1,33	0,099 ± 0,03	0,119 ± 0,03
A	5,2 ± 0,27	4,6 ± 0,22	0,047 ± 0,00	0,046 ± 0,01

Em seguida, entre as medidas do dia 21 de julho e 18 de agosto, a  $g_s$  e  $A_n$  aumentaram (Tabela 3), o que levou a um aumento em  $A_d$  de 58% nas PSD e de 84% em PCD (Figura 9). Este aumento na  $A_d$ , que coincidiu com o período de desenvolvimento das gemas e aparição das

primeiras brotações nos últimos dias de julho (Figura 5), ocorreu num período que as temperaturas médias ainda são inferiores que 25 °C, temperatura ótima para citros (Machado *et al.*, 2005). Tendência de maior  $A_d$  em PCD foi consistente com a maior intensidade da brotação e floração. As brotações alcançaram a maior quantidade entre os dias 20 a 28 de agosto em PCD e na primeira semana de setembro em PSD (Figura 6A). Este aumento em  $A_d$  prévio a floração já foi observado pelos autores também em plantas em vaso (Dovis *et al.*, 2009) e por outros autores em pomares no campo em plantas com desbaste de frutos e sem desbaste (Sekita, 2008). Este aumento estaria associado com o incremento da demanda pelas brotações em desenvolvimento. Tem sido observado que alterações no balanço fonte/dreno com aumento da demanda provocam aumento da  $A_n$  (Iglesias *et al.*, 2002; Urban *et al.*, 2004; Da Matta *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2012). Na floração, o consumo de assimilados e respiração alcançam seus valores mais elevados durante a antese, com redução durante a queda das pétalas, devido à maior produção de etileno (Vu *et al.*, 1985; Bustan & Goldschmidt, 1998).

De setembro até dezembro, com a ocorrência de condições ótimas de temperatura (acima de 25 °C) e de radiação (Figura 5) (Ribeiro & Machado, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009), e com disponibilidade hídrica adequada a fotossíntese alcançou os valores mais altos do ano, entre 8 e 9  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Tabela 3). Neste período, durante a MFr em PCD tiveram  $A_d$ , aproximadamente, 16% maior (Figura 9). Estas diferenças estariam relacionadas com a maior demanda de energia em PCD devido à floração e frutificação sete vezes mais intensa que em PSD (Da Matta *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2012).

Logo em seguida, entre MFr e FQ vêm o período de intensa divisão celular e abscisão fisiológica dos frutos com menor capacidade de competição, ocorrendo grande consumo de carboidratos, sendo que a disponibilidade de assimilados afeta o número de frutos fixados e seu tamanho potencial (Guardiola & García-Luis, 2000; Iglesias *et al.*, 2003).

Entre os meses de janeiro e março houve redução de  $A_n$  e  $g_s$  (Tabela 3) e em consequência de  $A_d$ , mais acentuada em PCD que em PSD, de 43 e 25% respeito do observado em dezembro, respectivamente (Figura 9). Nestes meses a temperatura máxima acima de 35 °C e radiação solar de 13  $\text{MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (Figura 5) poderiam causar elevado déficit de pressão entre o ar e a folha, prejudicando a assimilação de  $\text{CO}_2$  observada, devido tanto a fatores difusivos como fotoquímicos e bioquímicos (Habermann *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2005; Ribeiro, 2006;

Ribeiro & Machado, 2007). No entanto o efeito do ambiente, a maior redução na  $A_d$  em PCD deve tomar em consideração o efeito da relação fonte/dreno. No momento de FQ em PCD carregavam 88 frutos por planta, numa relação de  $504 \text{ cm}^2$  de folhas por fruto; enquanto em PSD havia 134 frutos, numa relação de  $443 \text{ cm}^2 \text{ fr}^{-1}$ . Possivelmente a maior assimilação em PSD tenha sido resultado do efeito estimulador da maior demanda (Syvertsen *et al.*, 2003; Urban *et al.*, 2004; Léchaudel *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2012). No final de março, com a redução das temperaturas máximas houve um aumento na  $g_s$  e em seguida das trocas gasosas e de  $A_d$ . A partir de junho com a queda das temperaturas mínimas entre os  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $12 \text{ }^\circ\text{C}$  houve redução da assimilação de  $\text{CO}_2$ , registrando em julho de 2010, no amadurecimento dos frutos, valores de assimilação similares aos observados no inverno anterior (Machado *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2009). Finalmente, ao longo dos 14 meses que foi avaliada a assimilação diária de  $\text{CO}_2$ , quando integrada esta foi apenas 6% maior em PSD, quando comparada com PCD.

#### **4.4. CRESCIMENTO DAS PLANTAS**

Os carboidratos produzidos, como consequência da fotossíntese ao longo do ano, são utilizados pelas plantas para os processos de crescimento, manutenção e reprodução. O estudo da dinâmica de produção e armazenamento de energia na forma de carboidratos é determinante para a compreensão do equilíbrio entre os assimilados produzidos pela fonte e os requeridos pelos destinos em cada momento do ciclo produtivo.

A quantificação da massa fresca e seca produzida pelas plantas nos tratamentos foi feita no momento do desbaste de frutos das plantas (D), em 14 de maio de 2009, e nos seguintes estádios fenológicos: de plena floração (PFI) em 26 de agosto em PCD e em 15 de setembro em PSD; de máxima frutificação (MFr) em 15 de outubro em PCD e 28 de outubro em PSD; de fim de queda fisiológica dos frutos (FQ) em 4 de dezembro nos dois tratamentos; de crescimento linear dos frutos (CL) em 22 de março de 2010 nos dois tratamentos e no amadurecimento dos frutos (A) em 28 de julho de 2010. Entre a primeira e a última colheita de plantas se observou que houve uma redução da massa das raízes e aumento da massa seca vegetativa da parte aérea (folhas + ramos) em ambos os tratamentos. Porém, a massa seca total da parte aérea (folhas + ramos + frutos) foi maior em PSD devido à maior produção total de frutos (Figura 10).

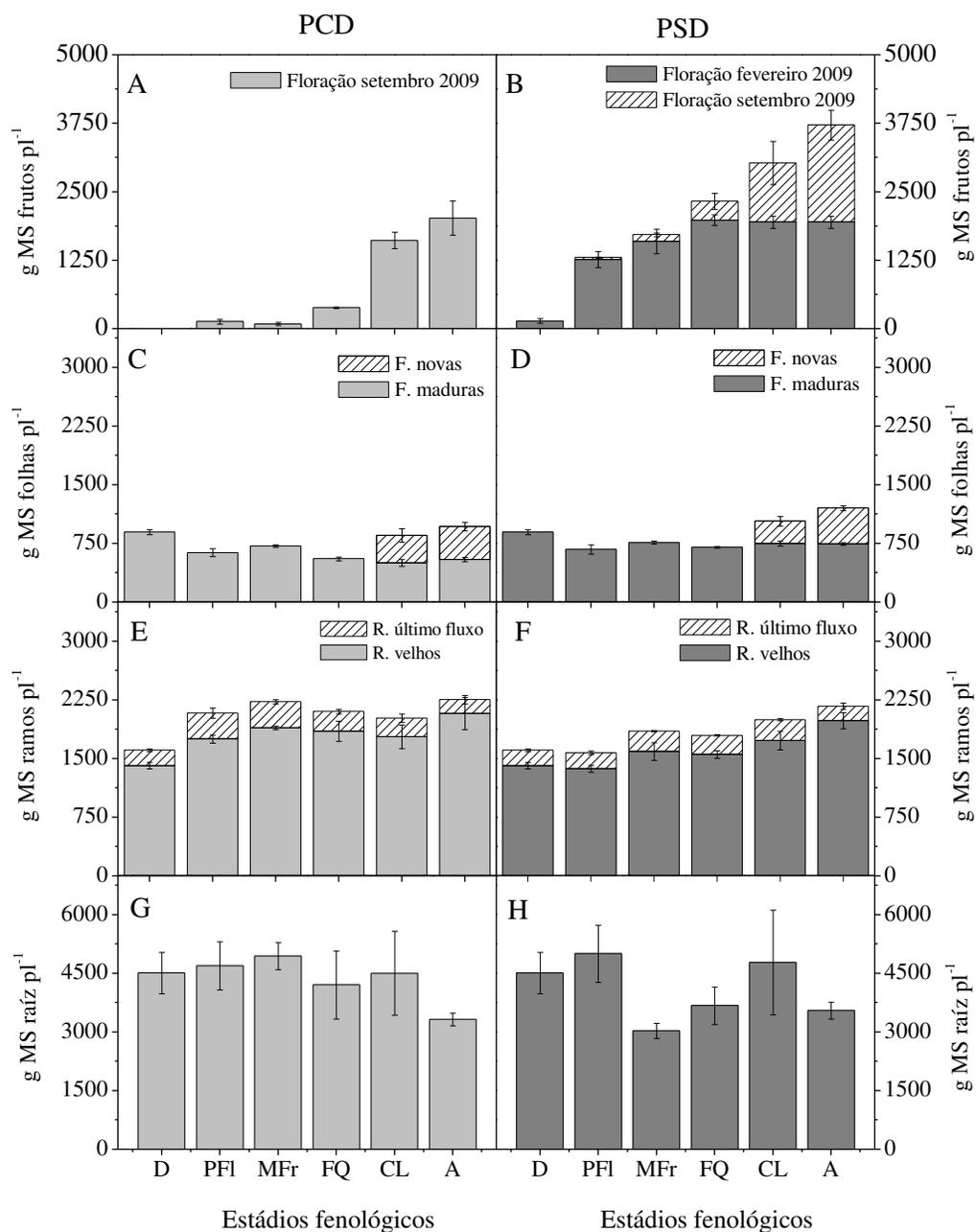


Figura 10: Produção de massa seca de frutos acumulada nas duas florações (A-B), massa seca das folhas maduras e novas (C-D), massa seca dos ramos do último fluxo e velhos (E-F) e massa seca das raízes (G-H) em laranja ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD em A, C, E, G) e plantas sem desbaste de frutos (PSD em B, D, F, H). Avaliações realizadas no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: plena floração (PFI), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A). Média de três repetições  $\pm$  erro padrão.

#### 4.4.1. Frutos

No fim dos 17 meses de experimentação (janeiro de 2009 até julho de 2010) as plantas que foram desbastadas prematuramente (PCD) produziram somente uma safra. Os frutos, produto da floração de setembro de 2009, foram colhidos em julho de 2010 obtendo uma produção de 12,7 kg MF planta<sup>-1</sup>, ou 2,02 kg MS planta<sup>-1</sup> (Figura 10A). Nas PSD obteve-se frutos de duas safras, a primeira de 11,2 kg planta<sup>-1</sup> resultado da floração de fevereiro de 2009 e colhidos em março de 2010, e a segunda safra de 9,2 kg planta<sup>-1</sup> produto da floração de setembro de 2009, colhidos em julho de 2010; em soma estas plantas produziram 20,4 kg MF planta<sup>-1</sup> ou 3,7 kg MS planta<sup>-1</sup> (Figura 10B). Além disso, em PCD entre o estágio de CL (março) e julho, mês da colheita houve 20% de aumento na massa seca dos frutos, enquanto em PSD o aumento foi de 39% no mesmo período.

#### 4.4.2. Folhas

Foram observadas diferenças estatísticas na área ( $p < 0,05$ ) e na massa seca foliar ( $p < 0,01$ ) entre os estádios fenológicos e entre os tratamentos, porém as maiores diferenças observadas foram entre os estádios fenológicos (Anexo 1). Em PSD a área e massa seca foliar foram 8,7% e 14% maiores, respectivamente, que em PCD ao longo do período experimental (Figura 10C, D e Figura 11). O efeito contrário foi observado em citros e outras frutíferas, nos quais a remoção ou redução da carga dos frutos provocou aumento tanto na massa quanto na área foliar, na razão massa/área foliar e no teor de amido (Goldschmidt & Golomb, 1982; Syvertsen *et al.*, 2003; Park, 2011).

No entanto, nestes trabalhos as plantas permaneceram sem frutos entre cinco e sete meses até a próxima floração, permitindo a recuperação das reservas e aumento das brotações vegetativas durante o verão, para realizar novas quantificações de massa seca e carboidratos no inverno seguinte. No presente estudo, os frutos somente foram removidos em 14 de maio, durante o período mais frio e de menor assimilação de CO<sub>2</sub> do ano, e 76 dias após começaram a se observar os primeiros brotos. O efeito de maior área foliar em PSD parece contrário à maior brotação observada em PCD (Figura 6A). Porém, enquanto em PCD houve maior desenvolvimento de brotos e folhas, especialmente no verão, também houve maior abscisão de folhas velhas entre o D e FQ (Figura 10C, D e Figura 11). A maior abscisão foliar, em PCD, poderia estar associada com a remobilização de carboidratos e nutrientes das folhas pelo aumento

da demanda, devido à intensa floração; que poderia não ser atendida pela fotossíntese corrente ou por carência ou dificuldade de absorção de nutrientes do solo. Provocando assim maior abscisão de folhas velhas, que são as que menos CO<sub>2</sub> assimilam (Dovis *et al.*, 2009).

Assim, em ambos os tratamentos houve queda na massa seca foliar entre o D e FQ, de 20% em PSD e quase 40% em PCD (Figura 10C e D), esta redução na massa foliar é consistente com o aumento dos requerimentos de energia e nutrientes para a brotação e floração, e com a redução na assimilação de CO<sub>2</sub> no inverno, consequência da baixa temperatura (Figura 9). Isto corrobora observações feitas em caquizeiro com diferentes intensidades de carga e sem frutos (Park, 2011).

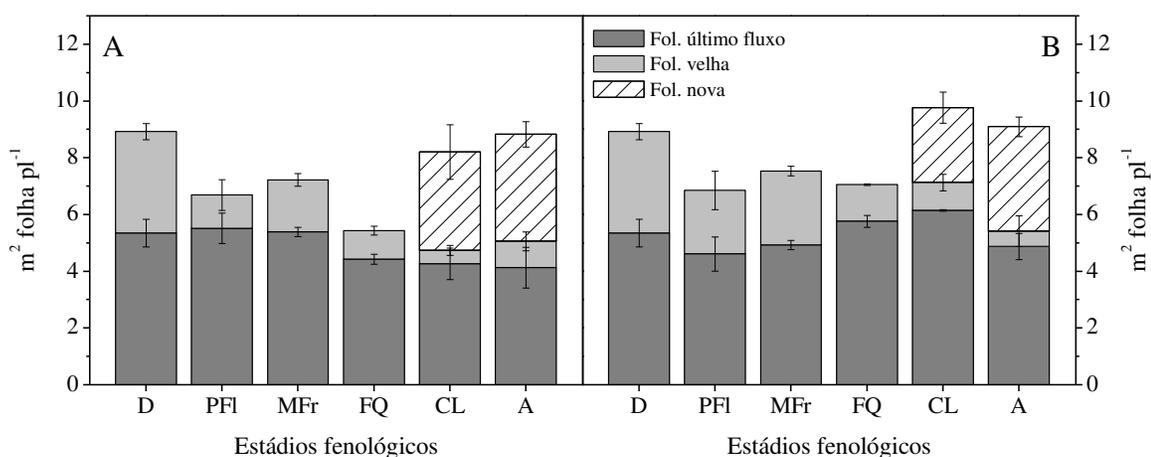


Figura 11: Área de folhas velhas, do último fluxo e novas acumulada em laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD em A) e plantas sem desbaste de frutos (PSD em B). Avaliações realizadas no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: plena floração (PFI), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A). Média de três repetições  $\pm$  erro padrão.

Em dezembro, com o novo fluxo de brotações de verão houve aumento da área e da massa seca de folhas, até que em julho esses valores tinham alcançado e superado as médias do inverno prévio, aumentando 34% a massa seca e 9,5% a área foliar em PSD. Enquanto, em PCD somente houve incremento de 8% na massa seca e sem modificações na área foliar. Esta resposta é

contrária aos relatos de alguns autores de que plantas desbastadas ou com poucos frutos têm tendência a aumentar o crescimento vegetativo e as reservas (Goldschmidt & Golomb, 1982; Park, 2011). Porém, em PSD houve maior produção ao longo dos 17 meses de experimentação, maior demanda e maior crescimento vegetativo.

Considerando a área foliar total, a proporção de folhas do último fluxo e de folhas velhas e a assimilação de CO<sub>2</sub> em PCD no momento de PFI (Anexo 2), pode-se estimar que cada planta produziu uma média de 1,15 mol CO<sub>2</sub> pl<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Esta estimativa já considera que as folhas velhas produzem somente de 30 a 50% dos assimilados das folhas do último fluxo ou maduras (Dovis *et al.*, 2009). Em PFI, as PCD, possuíam uma média de 1975 flores em antese e, segundo cálculos baseados em Bustan e Goldschmidt (1998) uma flor no momento da antese pode respirar até 575 μmol CO<sub>2</sub> flor<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, ainda sem considerar a produção de néctar. Desta forma, podemos estimar que o consumo de assimilados somente das flores em antese pode alcançar 1,14 mol CO<sub>2</sub> pl<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, resultado de 575 μmol CO<sub>2</sub> flor<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>\*1975 flores planta<sup>-1</sup> = 1,14 mol CO<sub>2</sub> pl<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Já em PSD no momento de PFI, apresentavam uma média de 635 flores pl<sup>-1</sup> na antese, sendo o requerimento destas de 0,36 mol CO<sub>2</sub> pl<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, no entanto a produção média nestas plantas foi de 1,0 mol CO<sub>2</sub> pl<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Anexo 2). Segundo estas estimativas, o consumo diário de energia para a antese das flores poderia ser limitante em PCD que apresentaram maior floração. Nesta situação a área foliar é insuficiente para atender a demanda reprodutiva e seriam necessários aportes de assimilados provenientes das reservas.

#### **4.4.3. Ramos**

Os ramos do último fluxo de crescimento, que corresponderam aos ramos formados na primavera-verão de 2008/09, com idade de 8 a 12 meses, representaram entre 10% e 13% da massa seca total de ramos e madeira, sem diferenças entre tratamentos (Anexo 3), com uma média de 240 g MS pl<sup>-1</sup> em ambos tratamentos (Figura 10E e F). Estes ramos são os mais ativos e carregavam 98% das brotações e 100% das que foram reprodutivas. A massa seca dos ramos apresentou pequenas variações ao longo do ano, mas estas não foram significativamente diferentes, nem entre os estádios fenológicos, nem entre os tratamentos (Anexo 3).

Os ramos velhos, de mais de 12 meses de idade, representados pelo tronco acima da enxertia e os galhos que formavam a estrutura da planta, representaram aproximadamente 90% da massa seca aérea (Figura 10E e F). Neles observaram-se diferenças entre os tratamentos e entre

os estádios fenológicos (Anexo 3). As maiores diferenças foram observadas entre os estádios fenológicos ( $p < 0,01$ ) com aumento da massa seca dos ramos velhos de 1,4 kg MS no desbaste em maio de 2009 até, aproximadamente 2,0 kg MS no amadurecimento dos frutos em julho de 2010. Isto representa de 40% a 47% a mais de massa seca (Figura 10E e F). No fim do período as PCD apresentaram 11,6% a mais de massa seca nos ramos velhos que em PSD, nestas plantas, que a carga de frutos ao longo do período foi menor, houve um excedente de assimilados que foi utilizado para o aumento da massa seca vegetativa.

No fim do ciclo estudado observaram-se diferenças estatisticamente significativas no diâmetro do tronco ( $p < 0,05$ ); sendo que em PCD o diâmetro foi 4,8% maior. Goldschmidt e Golomb (1982) observaram em plantas adultas de tangerineira em ciclo imposto de alternância de safra, que logo após um ano sem frutos houve aumento na massa seca de raízes e não nos ramos. Em outro trabalho em caquizeiro cultivado em vasos com diferentes intensidades de carga, foi observado que tanto os ramos velhos, os mais novos que 1 ano e as raízes aumentaram sua massa seca desde o final da queda fisiológica dos frutos, havendo consumo dessa matéria seca na brotação e fixação de frutos (Park, 2011).

#### **4.4.4. Raízes**

Para a massa seca de raiz não houve diferença entre os tratamentos e entre os estádios fenológicos, porém observou-se grande variabilidade entre as distintas plantas, com CV de 22% e 35% para as variáveis analisadas (Anexo 3). As raízes representam entre 50% e 64% da massa seca da planta, sem considerar a massa dos frutos e as raízes finas, as mais ativas na absorção de água e nutrientes, representaram em média 28,8% da massa fresca radicular e seu teor de massa seca foi entre 25 e 30%. O porta-enxerto ‘Cravo’ é reconhecido por conferir alto vigor, resultando em plantas mais vigorosas, produtivas e precoces quando comparado com outros (Ledo *et al.*, 1999; Neves *et al.*, 2004; Pompeu Jr, 2005). Mesmo não sendo observado que este porta-enxerto determina maior massa radicular (Neves *et al.*, 2004); porém considerando o aspecto das plantas no momento do desmonte pode se sugerir que existiu certa limitação física ao crescimento (Figura 12). Consequência disto foi a preferência de acúmulo de assimilados nos ramos mais velhos em vez das raízes, diferentemente do observado em tangerineiras e caquizeiro que aumentaram, preferencialmente, a massa seca das raízes (Goldschmidt & Golomb, 1982; Choi *et al.*, 2010b; Park, 2011).



Figura 12: Raízes das plantas retiradas dos vasos, logo após a lavagem e remoção da terra e substrato, 26 de agosto de 2009 no estágio fenológico de plena floração em PCD. A) Vista frontal, B) Vista inferior. Foto: V.L. Dovis.

#### 4.5. TEORES DE CARBOIDRATOS

A fim de aprofundar os conhecimentos sobre o metabolismo dos açúcares em resposta a produção fotossintética e a demanda de energia para o processo produtivo na planta como um todo, foi analisada a dinâmica da distribuição dos carboidratos nos distintos órgãos da planta nos diferentes estádios fenológicos.

##### 4.5.1. Carboidratos nas folhas

O teor de carboidratos foi avaliado em folhas coletadas por volta das 13:00 h, momento que as concentrações são mais elevadas (Ribeiro, 2006). Nos AT (açúcares totais) nas folhas observaram-se diferenças significativas entre os estádios fenológicos e entre os tratamentos, mas não na interação entre os fatores ( $p < 0,01$ ) (Anexo 4). Em PSD a concentração média de AT ao longo do experimento foi 10% mais elevada que em PCD;  $122,6 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$  contra  $110,8 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ . Estes resultados são contrários aos observados por outros autores, tanto em diferentes espécies e variedades de citros como em outras espécies frutíferas, onde plantas com menor carga de frutos apresentaram teores mais altos de AT (Goldschmidt & Golomb, 1982; Li *et al.*, 2003b;

Syvertsen *et al.*, 2003; Sekita, 2008; Park 2011). Porém, em todos esses trabalhos foi estudada a dinâmica de carboidratos associada com um estágio fenológico específico e por um período de tempo de poucos meses.

Poder-se-ia considerar que a elevada demanda por carboidratos induziu maior assimilação de CO<sub>2</sub> e isso manteve mais elevados os teores de AT nas folhas em PSD (Urban *et al.*, 2004; Léchaudel *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2012). O maior teor de AT metabolizável nas PSD (10%) corresponde com quase 6% a mais na assimilação de CO<sub>2</sub> por metro quadrado de folha durante o período estudado. Considerando esta situação, é importante analisar os efeitos da carga dos frutos em cada estágio fenológico, pois se verificou que a maior concentração de AT durante o experimento ocorreu nos estágios fenológicos de PFl e MFr, quando em PSD (Figura 13A) houve menor consumo de carboidratos, pois houve menor intensidade de floração (Figura 7). Houve variações ao longo do ano nos teores AT, os mais altos foram no outono, em maio no momento do desbaste (D), período que não houve crescimento aparente da parte aérea da planta, mas é uma fase de preparação para a floração (Figura 6 e Figura 13A). Em plantas adultas no campo foi observado que o teor de carboidratos aumenta somente na saída do inverno, normalmente entre fim de junho e setembro, pouco tempo antes da floração (Sanz *et al.*, 1987, García-Luis *et al.*, 1995; Prado *et al.*, 2007).

Logo depois do desbaste não houve aumento no teor de AT, diferente do que foi observado por outros autores após períodos que variaram de 2,5 meses até um ano sem frutos (Goldschmidt & Golomb, 1982; García-Luis *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2003b; Sekita, 2008; Park, 2011). Isto pode ser consequência do breve período de 68 dias entre o desbaste e a observação das primeiras brotações e da redução da assimilação de CO<sub>2</sub> (Figura 9) por efeito das baixas temperaturas entre os meses de maio e junho.

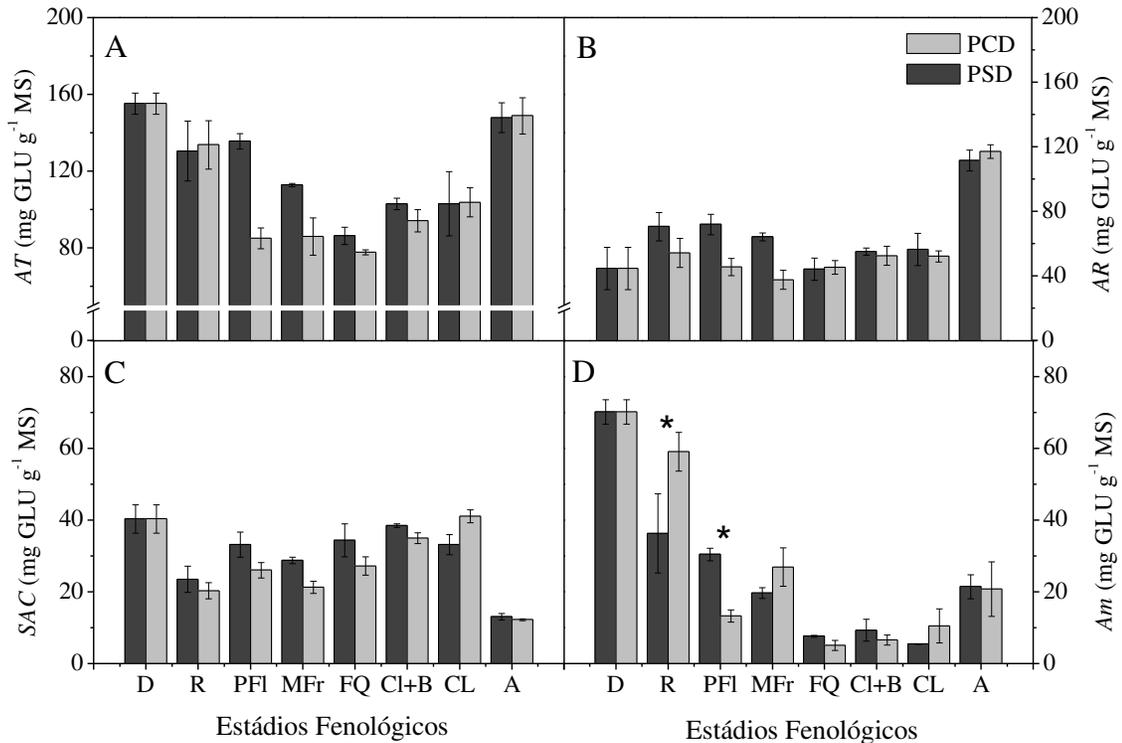


Figura 13: Concentração de carboidratos em folhas de laranja 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo', coletadas as 13:00 h no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: repouso vegetativo aparente (R), plena floração (PFI), máxima frutificação, (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos + brotação (Cl+B), crescimento linear dos frutos (Cl) e amadurecimento dos frutos (A); em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD). Açúcares totais (AT em A), açúcares redutores (AR em B), sacarose (SAC em C) e amido (Am em D). \* Indica diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos em cada estágio fenológico ( $p \leq 0,05$ ). Média de quatro repetições  $\pm$  erro padrão.

Conforme o desenvolvimento das brotações e das flores, o teor de AT reduziu desde o desbaste (D) e alcançou valores mínimos no fim da queda fisiológica dos frutos (FQ), com uma redução de 50% e 44% em PCD e PSD, respectivamente (Figura 13A). Em PCD a diminuição foi mais acentuada entre o repouso (R) e plena floração (PFI) quando o teor de AT foi reduzido em 36%. O maior consumo nestas plantas deve estar associado com a floração mais intensa observada (Figuras 6 e 7). Conforme foi mencionado anteriormente, sobre a base do cálculo de consumo de energia das flores (Bustan & Goldschmidt, 1998), durante a plena floração a produção corrente de assimilados poderia não ter sido suficiente para satisfazer a demanda das

flores em desenvolvimento e na antese, além da manutenção das outras partes da planta. As reservas de carboidratos nas folhas devem ter atendido essa demanda, que foi muito maior em PCD que apresentaram uma floração sete vezes mais intensa que em PSD. Vários trabalhos mostraram que o consumo e remobilização de carboidratos durante a brotação e floração são intensos e estão associados com a intensidade desta (Jones & Steinacker, 1951; Sanz *et al.*, 1987; García-Luis *et al.*, 1995). No entanto, não foi demonstrado que os teores de carboidratos em si sejam responsáveis pela floração e pela intensidade da mesma, visto que foi observado efeito inibitório da presença de frutos, mesmo com altos teores de carboidratos foliares. Goldschmidt *et al.* (1985), em trabalhos com plantas aneladas e com aplicação de giberelina, observaram que o efeito inibitório da presença de frutos (+giberelina) foi maior que o efeito promotor do anelamento. Resultados similares foram observados por García-Luis *et al.* (1995), Li *et al.* (2003b) e Prado *et al.* (2007), que em plantas aneladas ou com desbaste de frutos também não observaram relação entre o teor de carboidratos em laranjeiras com a intensidade de floração.

Logo depois da PFI os *AT* reduziram-se ainda mais, pelo consumo dos frutinhas, como fora observado também por outros autores (Sanz *et al.*, 1987; Iglesias *et al.*, 2003; Léchaudel *et al.*, 2005; Prado *et al.*, 2007; Sekita, 2008). No fim da queda fisiológica dos frutos (FQ), em meados de dezembro, o teor dos carboidratos metabolizáveis atingiu seus menores teores, e em seguida começou a recuperação das reservas, similar ao observado por Jones e Steinhacker (1951) e Sanz *et al.* (1987). O teor de *AT* recuperou-se e alcançou valores similares nos tratamentos no inverno seguinte, durante o amadurecimento dos frutos (Figura 13A).

A queda ou aumento no teor de *AT* nas folhas ao longo do ano está relacionado com variações nas distintas frações (Figura 13A-D). Observaram-se mudanças nos teores de açúcares redutores (*AR*), sacarose (*SAC*) e amido (*Am*), e em todos os casos o maior efeito foi observado pela diferença entre os estádios fenológicos (Anexo 4).

Em *AR* houve variação entre os estádios fenológicos e entre os tratamentos ( $p < 0,01$ ) (Anexo 4). Os teores variaram entre 45 e 60 mg g<sup>-1</sup> MS (Figura 13B) na maioria dos estádios fenológicos, duplicando-se durante o inverno, no momento do amadurecimento dos frutos (A). Além disso, em PSD a concentração média foi 19% maior que em PCD (Figura 13B), estando esta diferença limitada aos estádios de PFI e MFr, quando em PSD houve teores 57% e 70% mais altos que em PCD, respectivamente. A maior concentração em PSD nestes estádios esteve

associada, provavelmente, com o menor consumo devido à menor intensidade de floração (Figura 7 e Figura 13B).

O teor de *SAC* teve variações nos distintos estádios fenológicos ( $p < 0,01$ ) e não houve efeito dos tratamentos ( $p < 0,05$ ) (Anexo 4). Entre o D e o período de crescimento não aparente (R) houve queda de 50% na concentração de *SAC*, indicando que os assimilados produzidos estão sendo exportados e consumidos pelos. Além disso, considerando a função sinalizadora destes açúcares (Koch, 2004; Roitsch & González, 2004) e sua associação com a indução da expressão de genes do metabolismo do amido (Li *et al.*, 2003b); a redução da *SAC* foliar indicar a necessidade da hidrólise do amido. Logo depois, em PFI os teores aumentaram entre 30% e 35% e se mantiveram sem variações significativas até março do ano seguinte, no período de crescimento linear dos frutos (CL) (Figura 13C).

*AR* e *SAC* têm várias funções no metabolismo, ao mesmo tempo que provêm de energia e esqueletos de carbono para o metabolismo, regulam a pressão osmótica e o potencial entre os sítios de carga e descarga no floema e têm também uma função sinalizadora sobre a expressão e biossíntese de hormônios e outras substâncias (Sturm, 1999; Li *et al.*, 2003a, b; Koch, 2004; Roitsch & González, 2004). Neste sentido observou-se que a concentração relativa de *AR* e *SAC*, têm uma função reguladora do destino dos assimilados produzidos, ou eles são exportados como *SAC* para os drenos em crescimento ou são armazenados nos cloroplastos ou vacúolos como *Am* (Pimentel, 1998; Taiz & Zeiger, 2009). A relação entre *AR/SAC* têm sido apontada como indicadora da exportação de assimilados produzidos, o aumento nesta relação foi associado à limitação na exportação devido à baixa demanda dos drenos (Urban *et al.*, 2008). No presente estudo a relação entre a concentração de *AR* e *SAC* duplicou o valor entre o D, em maio, e R, em julho; o que poderia indicar uma limitação a exportação de carboidratos pela diminuição da temperatura (Machado, 2009; Santos *et al.*, 2011). Conforme a temperatura e a atividade na planta aumentaram com o desenvolvimento das brotações, a relação reduziu-se novamente (Figura 14). Porém, mais importante ainda foi o aumento de mais de seis vezes que a relação sofreu durante o A dos frutos, em julho de 2010, o que poderia indicar redução na força dos drenos e aumento na partição dos assimilados para o armazenamento. Este aumento na relação coincidiu com o aumento na concentração de amido nas folhas (Figura 13D e Figura 14).

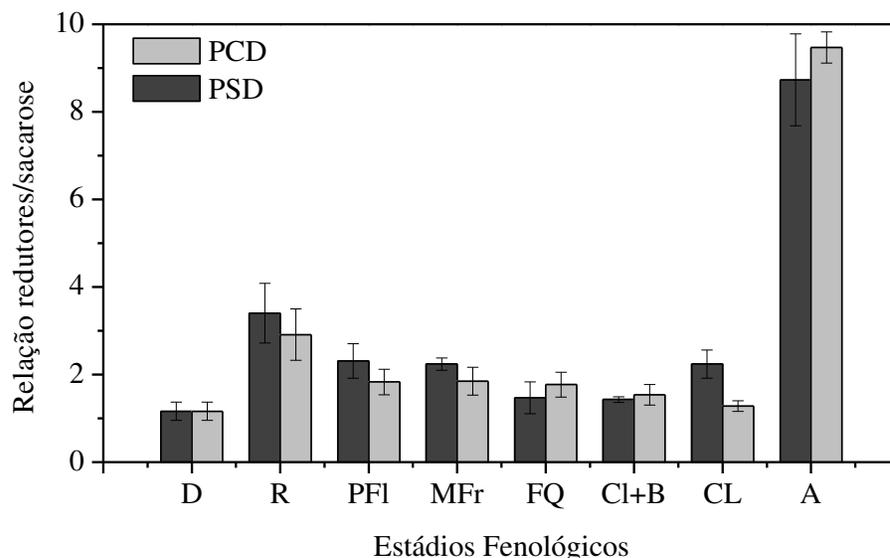


Figura 14: Relação de açúcares redutores/sacarose nas folhas de laranja ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ coletadas as 13:00 h em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e sem desbaste de frutos (PSD). Avaliações no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: repouso vegetativo aparente (R), plena floração (PFI), máxima frutificação (MFr), fim da queda fisiológica frutos (FQ), crescimento linear dos frutos+Brotação (Cl+B), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento (A).

Em relação à concentração de amido, observaram-se diferenças estatísticas entre os estádios fenológicos ( $p < 0,01$ ), na interação ( $p < 0,05$ ) e sem diferenças entre os tratamentos (Anexo 4). A concentração de *Am* teve a maior variação sazonal dentre as frações de carboidratos estudadas, com os mínimos valores, por volta de  $10 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ , ocorrendo durante o verão entre o fim da queda fisiológica (FQ) e crescimento linear dos frutos (CL) e os máximos, aproximadamente  $70 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ , durante maio, no momento do desbaste (D) (Figura 13D). Entre D e PFI uma grande quantidade de *Am* foi hidrolisada durante o desenvolvimento das brotações e estruturas reprodutivas, provavelmente para ajudar atender esta demanda. Neste período 56% das reservas foliares de amido foram consumidas em PSD, enquanto em PCD o consumo foi 80%, mostrando diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 13D). Grande consumo de *Am* foi observado tanto em ‘Valência’ como em outras espécies e variedades de citros e frutíferas, em

relação à brotação e floração (Jones & Steinacker, 1951; Sanz *et al.*, 1987; Ruiz *et al.*, 2001; Sekita, 2008; Park, 2011), sendo o consumo proporcional com a intensidade da brotação.

Após a floração as reservas de *Am* continuaram a ser consumidas nos estádios de FQ, CI+B e CL, recuperando-se parcialmente durante o amadurecimento dos frutos. Há uma dinâmica similar no padrão de resposta da concentração de *Am* em PSD e em PCD, apesar de variações nos valores absolutos (Figura 13D). Alto consumo de *Am*, a fim de manter teores de *SAC* exportáveis, é necessário para garantir o estabelecimento dos frutos. Sendo observado que a taxa abscisão é determinada pela competição entre os ovários que retomaram o crescimento logo depois da fecundação, havendo uma forte relação entre disponibilidade de sacarose e abscisão de frutos (Sanz *et al.*, 1987; Ruiz *et al.*, 2001; Iglesias *et al.*, 2003; Sekita, 2008). A escassez de carboidratos desencadeia incremento nos teores de ABA e ACC (precursor do etileno), e com isto a abscisão (Gómez-Cadenas *et al.*, 2000). Finalmente, no amadurecimento, em julho de 2010, a concentração de *Am* voltou a se incrementar, mas sem recuperar os valores do ano anterior (Figura 13D).

#### **4.5.2. Carboidratos nos ramos**

Poucos trabalhos estudam a variação sazonal na concentração de carboidratos nos ramos, bem como a capacidade que podem ter como órgão de reserva. Aqui foram analisados os teores de carboidratos nos ramos do último fluxo de crescimento (máximo um ano de idade) e em ramos velhos (mais de um ano de idade). Na concentração de *AT* não foram observadas diferenças significativas entre os tipos de ramo, porém a dinâmica sazonal foi diferente; também houve diferenças nos teores nos distintos estádios fenológicos e entre os tratamentos ( $p < 0,01$ ) (Anexo 5).

Em PSD, nos ramos do último fluxo de crescimento, que representavam entre 10% e 15% da massa seca total dos ramos, a concentração de *AT* foi 20% mais alto que em PCD; 90,6 e 76,1  $\text{mg g}^{-1}$  MS, respectivamente. Este efeito de maior concentração de carboidratos nas plantas com maior demanda ao longo do período em estudo foi similar ao observado nas folhas e pode indicar que a elevada demanda induziu um uso mais eficiente dos assimilados, conforme também observado por alguns autores em ramos novos (Choi *et al.*, 2010b; Park, 2011) (Figura 15A). A origem destas diferenças está no menor consumo em PSD nos momentos de PFI, quando estas plantas tinham floração menos intensa (Figura 7) e em A, quando tinham menor carga de frutos

(Tabela 2). Entre o D e FQ houve redução na concentração de *AT* nos dois tratamentos, porém mais acentuada em PCD, e posterior recuperação durante o outono-inverno até alcançar, no amadurecimento dos frutos, os teores do inverno prévio (Figura 15A). A resposta foi similar à observada nas folhas (Figura 13) e ao reportado por outros autores em ramos novos (Jones & Steinacker, 1951; Sanz *et al.*, 1987; Ruiz *et al.*, 2001; Sekita, 2008; Park, 2011).

Nos teores de *AR* e *SAC* somente se observaram diferenças entre os estádios fenológicos ( $p < 0,05$ ) (Anexo 5), onde a concentração de *AR* teve decréscimo desde 60 mg g<sup>-1</sup> MS em D, até 25 mg g<sup>-1</sup> MS em FQ, com posterior recuperação em A (Figura 15C). García-Luis *et al.* (1995) também observaram decréscimo destes açúcares na casca de tangerineira satsuma desde o início do inverno, acompanhando o desenvolvimento das brotações. Há poucas referências da função de *AR* nos ramos, mas poder-se-ia supor que as funções são similares às observadas nas folhas, como aporte de assimilados e sinalização.

Na concentração de *SAC* não houve efeito dos tratamentos, mas sim entre efeitos dos estádios fenológicos ( $p < 0,05$ ) (Figura 15E). A concentração de *SAC* foi constante por volta de 15 mg g<sup>-1</sup> MS, até o A, em julho de 2010, quando decresceu até 5 mg g<sup>-1</sup> MS e ao mesmo tempo a relação redutores/sacarose aumentou para 8 (Figura 16A). Este indicativo de redução da exportação (Urban *et al.*, 2008), pode ter estimulado o aumento do armazenamento de amido nestes ramos (Figura 15G), o aumento na relação redutores/sacarose também foi observado nas folhas, associado ao aumento das reservas de *Am* (Figura 14). Neste sentido, Li *et al.* (2003b) observaram em ramos menores que 5 mm de diâmetro que, após o anelamento, há aumento dos açúcares solúveis, indução da expressão de genes associados ao metabolismo dos carboidratos e incremento nas reservas de *Am*.

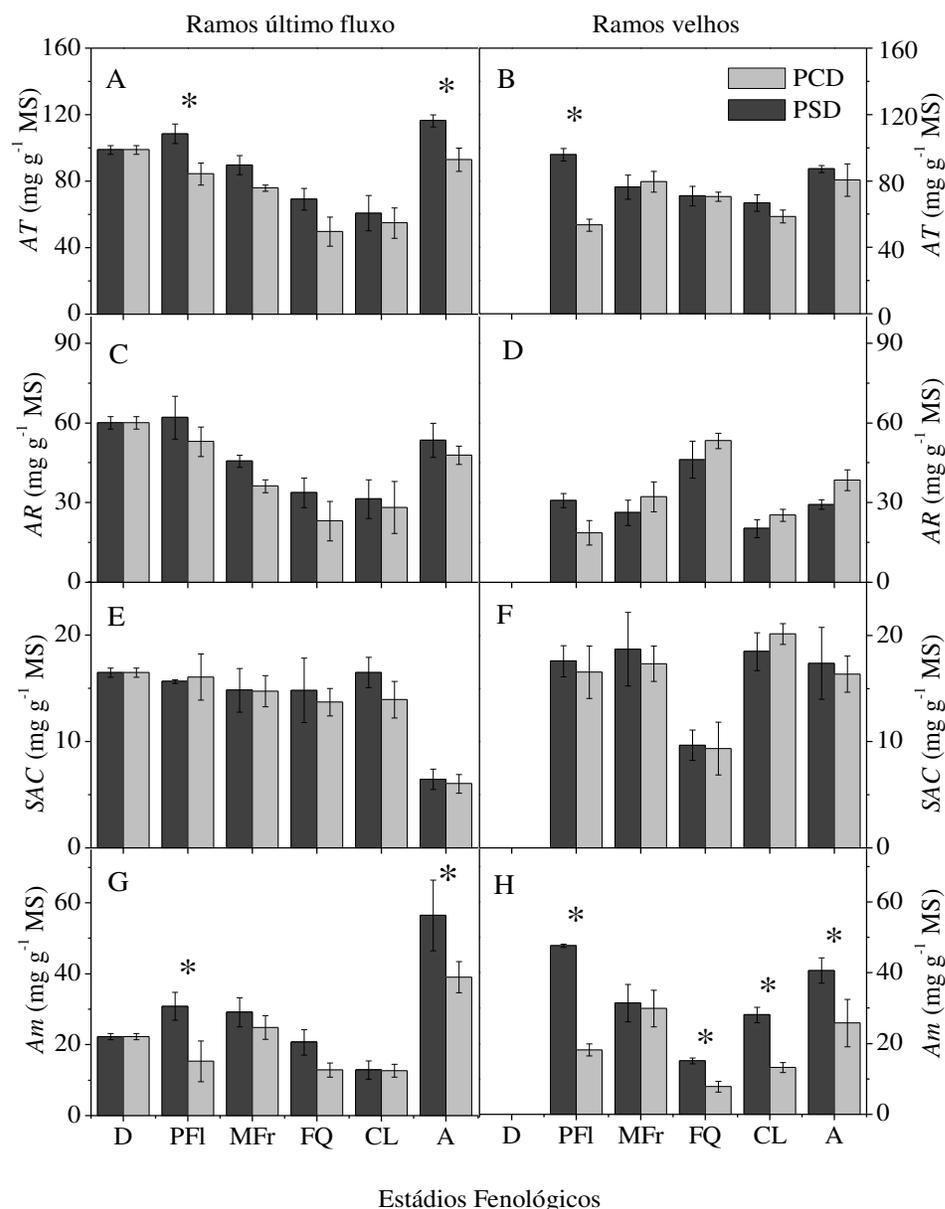


Figura 15: Concentração de carboidratos em ramos do último fluxo de crescimento (A, C, E e G) e ramos velhos (B, D, F e H), coletados as 09:00 h em laranjeira 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo'. Avaliados no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: plena floração (PFI), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A); em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste (PSD). Açúcares totais (A-B), açúcares redutores (C-D), sacarose (E-F) e amido (G-H). \* Indica diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos em cada estágio fenológico ( $p < 0,05$ ). Média de três repetições  $\pm$  erro padrão.

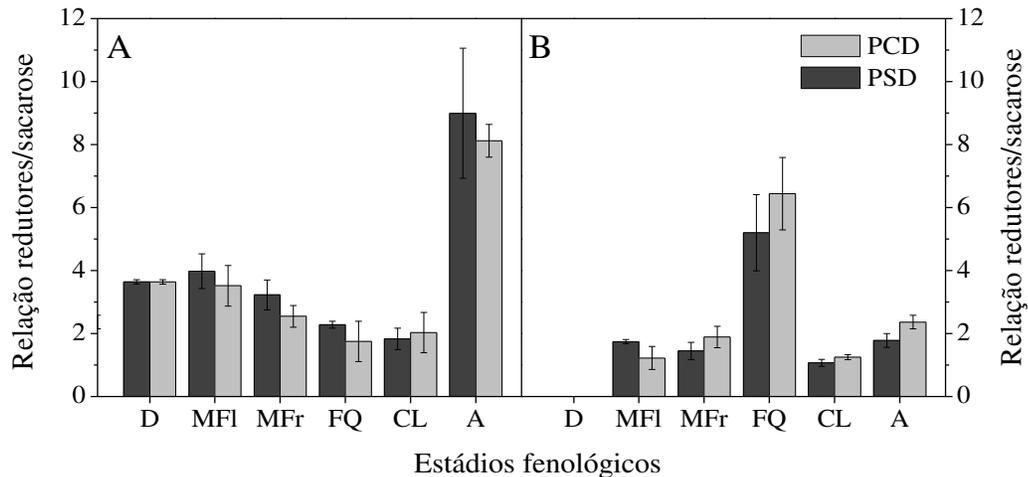


Figura 16: Relação açúcares redutores/sacarose nos ramos do último fluxo de crescimento (A) e nos ramos velhos (B) coletados as 09:00 h em laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’, com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e sem desbaste de frutos (PSD). Avaliados no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: plena floração (PFI), máxima frutificação (MFr), final queda fisiológica de frutos (FQ), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A). Média de três repetições  $\pm$  erro padrão.

Na concentração de *Am* observaram-se diferenças significativas entre os estádios fenológicos e entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ) (Anexo 5). Nos ramos do último fluxo a concentração de *Am* foi baixo no início do ciclo,  $20 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$  o que representou 20% dos açúcares metabolizáveis, neste momento estes ramos têm menos de um ano de idade. Mesmo contendo pouca quantidade de *Am*, parte deste foi hidrolisado atendendo a demanda da floração e fixação dos frutos, havendo uma redução de 42% entre D e CL (Figura 15G). O consumo de *Am* foi especialmente importante em PCD, que também apresentaram maior redução nos ramos que em PSD. Desta forma fica evidente que os ramos têm capacidade de armazenar reservas (Goldschmidt & Golomb, 1982; García-Luis *et al.* 1995; Li *et al.*, 2003b), e que estas podem ser mobilizadas quando a fotossíntese corrente não pode atender a demanda (Jones & Steinacker, 1951; Park, 2011). Depois do período de CL dos frutos em março houve, junto ao aumento na relação redutores/sacarose, grande incremento na concentração de *Am*, alcançando os teores observados nos ramos velhos e representando entre 40% e 45% dos açúcares metabolizáveis (Figura 15G e Figura 16A).

Nos ramos velhos a concentração de *AT* também foi 16% mais alto em PSD que em PCD, sendo que as diferenças aconteceram no estágio de PFI (Anexo 5 e Figura 15B). A concentração de *AR* e *SAC* teve diferenças entre os estádios fenológicos e não entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Neste sentido a concentração de *AR* foi entre 20 e 25 mg g<sup>-1</sup> MS, aumentando até 55 mg g<sup>-1</sup> MS no FQ, no mesmo estágio fenológico a concentração de *SAC* duplicou-se (Figura 15D e F). O resultado foi aumento na relação *AR/SAC*, indicando limitação à exportação (Urban *et al.*, 2008) (Figura 16B).

No *Am* foram também observadas diferenças significativas entre os estádios fenológicos e entre os tratamentos ( $p < 0,01$ ) (Anexo 5). Em PSD a concentração de amido foi sempre maior que em PCD, em média 32,6 mg g<sup>-1</sup> MS e 19,0 mg g<sup>-1</sup> MS, respectivamente. Coincidindo com as mudanças nos açúcares solúveis, observou-se que a concentração de *Am* reduziu-se entre a PFI e FQ, aumentando novamente a partir deste momento, em coincidência com o aumento na relação *AR/SAC* (Figura 15H e Figura 16B). O acúmulo de amido ocorreu com maior intensidade nas PSD, com menor carga de frutos em fase de ativo crescimento neste momento.

Poucos trabalhos quantificam a participação dos ramos velhos no metabolismo de frutíferas e como consequência pouco ainda se sabe sobre a sua contribuição no ciclo produtivo. Goldschmidt e Golomb (1982) observaram que plantas adultas de laranjeira ‘Valência’ podem acumular grande quantidade de amido em ramos velhos e tronco após um ano sem frutos e que plantas sem frutos apresentam mais açúcar solúvel que plantas com frutos. Porém, não foi analisada a dinâmica anual de acúmulo e remobilização destes carboidratos como fonte de energia para o processo produtivo. Já Park (2011), trabalhando com caqui em vasos com diferentes intensidades de carga, observou que a ‘madeira velha’ acumula e exporta *Am* nos distintos estádios e que a magnitude da acumulação e exportação estão relacionadas com a intensidade da carga de frutos.

#### **4.5.3. Carboidratos nas raízes**

As raízes, além da sua função como órgão absorvente de água e nutrientes, têm também a capacidade de armazenar amido (Goldschmidt & Golomb, 1982; Choi *et al.*, 2010b; Park, 2011). Para a avaliação das reservas de carboidratos acumuladas e utilizadas nas raízes foram quantificados os teores de *AT*, *AR*, *SAC* e *Am* em raízes de quatro tamanhos diferentes, em decorrência das diferenças em idade e função fisiológica. Os diâmetros avaliados foram: a) raízes

de primeira ordem, que correspondem as raízes fibrosas que geralmente têm até 0,5 mm de diâmetro, b) com diâmetro entre 1 e 3 mm, c) com diâmetro entre 3 e 5 mm e d) >10 mm de diâmetro.

No presente estudo o tratamento de desbaste somente teve efeito na concentração de AR em raízes em interação com os estádios fenológicos, estando a origem destas diferenças na maior concentração de AR em PSD durante a PFl. Além disso, foram observadas diferenças na concentração dos açúcares nos distintos tamanhos de raízes e entre os estádios fenológicos ( $p < 0,05$ ) (Anexo 6). Os AT nas raízes de primeira ordem apresentaram média anual de 80,4 mg g<sup>-1</sup> MS (Figura 17A), as categorias de raízes de 1 até 5 mm de diâmetro não apresentaram diferenças na concentração, com média de 154,4 mg g<sup>-1</sup> MS (Figura 17C), portanto, estas categorias serão analisadas conjuntamente. Já as raízes com diâmetro maior que 10 mm de diâmetro tiveram concentração média de 108,6 mg g<sup>-1</sup> MS (Figura 17E).

Nos AR, nas raízes de primeira ordem a média e nas raízes entre 1 mm e 5 mm estes açúcares representaram de 20 a 45% dos AT, entanto nas raízes maiores a 10 mm de diâmetro, com média de 16 mg g<sup>-1</sup> MS, representaram de 10 a 15% dos AT (Figura 17F). Na concentração da SAC não foram observadas diferenças em nenhuma das variáveis analisadas (Anexo 6), mantendo-se ao longo do ano entre 20 e 30 mg g<sup>-1</sup> MS (Figura 18). O Am teve as maiores diferenças entre os tipos de raiz e entre os estádios fenológicos, havendo interação entre estes fatores ( $p < 0,01$ ) (Anexo 6). Somente as raízes de primeira ordem apresentaram diferenças com as restantes, nas raízes mais novas e metabolicamente mais ativas apresentaram média de 30 mg g<sup>-1</sup> MS de Am, representando de 20 a 50% dos AT (Figura 19A), nas raízes acima de 1 mm de diâmetro a concentração foi entre 70 e 80 mg g<sup>-1</sup> MS e representou de 50 a 70% dos AT (Figura 19B).

A concentração de AT em PSD foi 26% maior ao longo do período experimental que em PCD; e estas diferenças foram mais evidentes no estágio de PFl quando em PSD acumularam 50 mg g<sup>-1</sup> MS de AT entre o D e PFl, enquanto as PCD consumiram idêntica quantia (Figura 17A). O maior consumo pode ser explicado pela maior demanda de energia pela floração mais intensa em PCD (Bustan & Goldschmidt, 1998). Logo depois, entre MFr e FQ houve ainda consumo de reservas para a fixação dos frutos, atingindo as menores concentrações do período estudado

(Figura 17A). Finalmente no verão, entre FQ e o amadurecimento dos frutos (A), a concentração recupera-se aos valores do inverno prévio

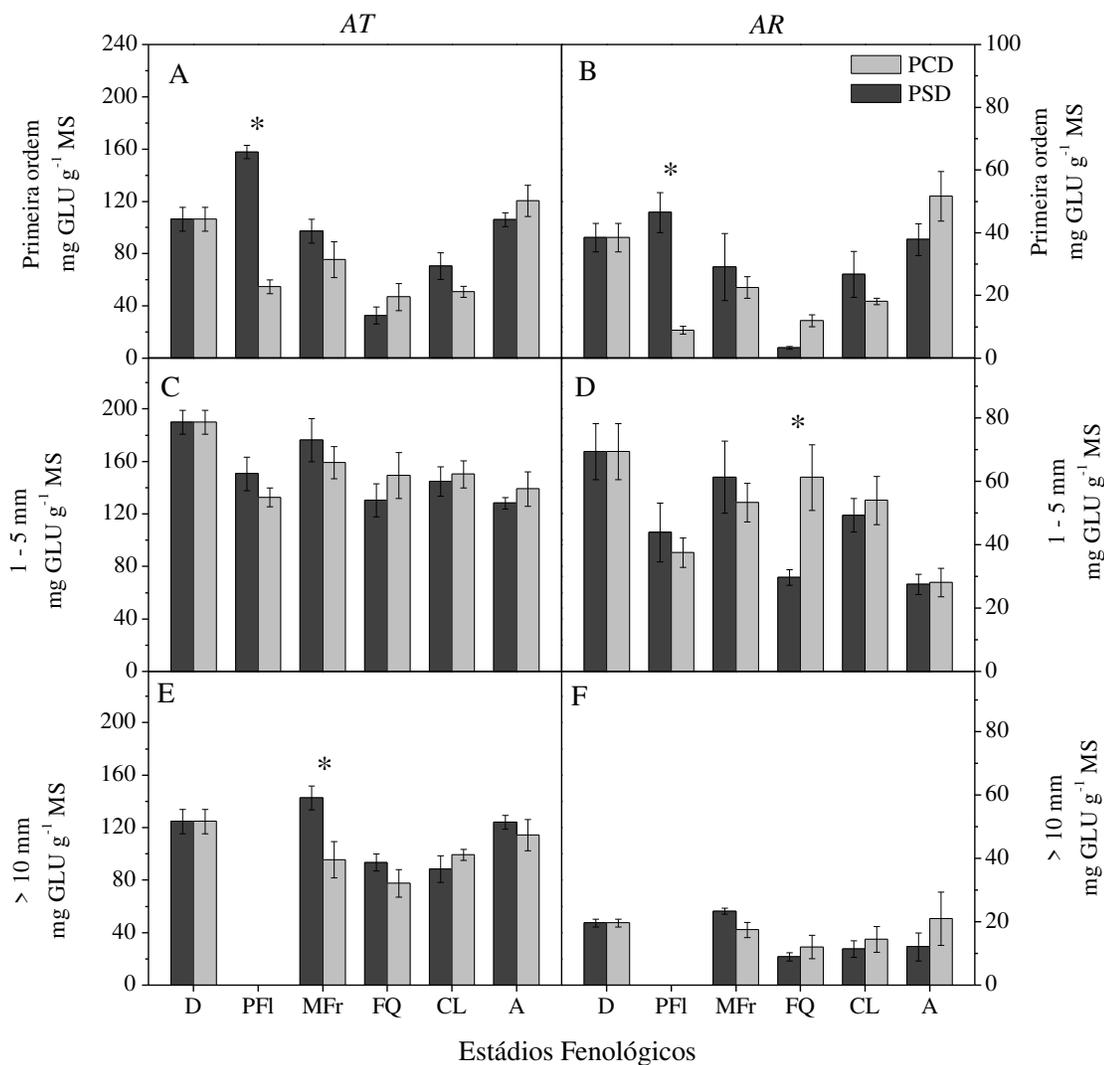


Figura 17: Teor de açúcares totais (A, C e E) e açúcares redutores (B, D e F) em raízes de distinto diâmetro de laranja ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’, coletadas as 13:00 h; em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste (PSD). Avaliadas no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: plena floração (PFI), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A). Raízes de primeira ordem (A-B), raízes entre 1 mm e 5 mm (C-D) e raízes de 10 mm ou mais (E-F). \* Indica diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos em cada estágio fenológico (p < 0,05). Média de três repetições ± erro padrão.

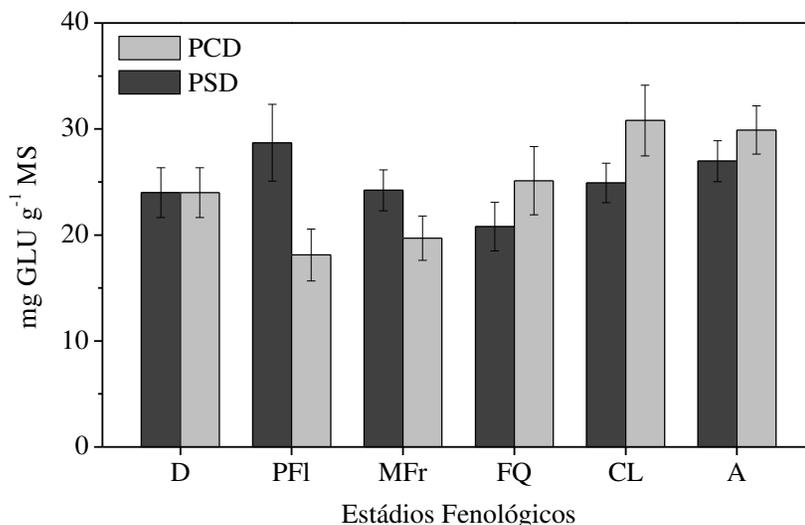


Figura 18: Teor de sacarose em raízes de laranjeira 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo' coletadas as 13:00 h, em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD). Avaliadas no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: máxima floração (MFI), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A). \*Indica diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos em cada estágio fenológico ( $p \leq 0,05$ ). Média de três repetições  $\pm$  erro padrão.

Idêntico padrão de resposta foi observado na concentração de *AR*, com os valores mais baixos no FQ e aumentando novamente no A, no inverno. Nestes açúcares também foi observado que no estágio de PFI, em PSD mantiveram-se teores cinco vezes mais altos nos *AR*, quando comparados com PCD (Figura 17B). Enquanto à concentração de *Am*, as raízes de primeira ordem apresentaram diferenças com as outras categorias, nestas raízes a concentração média foi de  $30 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ , o que representa de 20 a 40% dos carboidratos metabolizáveis (Figura 17B e 19A). A dinâmica sazonal é similar à observada em folhas e ramos e também a PFI o único estágio fenológico no qual foram observadas diferenças entre os tratamentos, quando houve diminuição em PCD e acúmulo em PSD.

Nas raízes de primeira ordem foram reportadas as maiores taxas respiratórias e, como consequência disto, têm sido indicadas como as principais responsáveis pela absorção de água e

nutrientes (Pregitzer *et al.*, 1998). Em árvores adultas de laranjeira constituem, no máximo, 2,5% da massa seca radicular, porém representam 80% do comprimento total das raízes (Goldschmidt & Golomb, 1982). Se observarmos a pequena porcentagem de massa seca que elas representam e o baixa concentração de *Am*; podemos supor que a principal função desta categoria de raiz não seja armazenagem; e então assumir que a variação sazonal na concentração de *AR* é resultado das alterações metabólicas e da necessidade de ajuste osmótico ao longo do ano conforme explica Koch (2004). Além da função fisiológica deste tipo de raiz, a dinâmica de carboidratos observada acompanhou o padrão de remobilização das folhas e ramos, mostrando decréscimo no teor de *Am* entre o D e FQ. Este decréscimo poderia ser associado ao consumo de energia para a floração, fixação e crescimento inicial dos frutos; ou também poderia ser consequência da maior necessidade intrínseca da própria raiz a fim de sustentar um metabolismo mais intenso. Considerando que a assimilação de nitrogênio em aminoácidos precisa de cetoácidos originados da respiração dos carboidratos (Matt *et al.*, 2002), elas podem consumir suas próprias reservas a fim de manter sua funcionalidade durante os períodos de alta demanda de nutrientes (Eissenstat & Duncan, 1992) (Figura 17B e 19A).

Nas raízes de 1 a 5 mm de diâmetro houve variação sazonal no teor de *AT*, que foi devido à variação tanto no teor de *AR* como de *Am* (Figura 17D e 19B). Os *AT* reduziram-se, vagarosa e progressivamente, em 15% até o inverno, no amadurecimento dos frutos (Figura 17C-D). Os *AR* tiveram oscilações ao longo do período, com redução na PFI, no FQ e no A dos frutos (Figura 17D). As variações no teor destes carboidratos em raízes de 5 mm diâmetro, têm demonstrado funções reguladoras da expressão gênica de algumas enzimas associadas com o metabolismo do carbono (Li *et al.*, 2003b). Nas raízes maiores que 10 mm de diâmetro, houve decréscimo de aproximadamente 30% no teor de *AT* entre D e FQ, mas a redução foi consequência de consumo de amido, que representou 65% dos carboidratos metabolizáveis, pois não houve variação nos *AR* e na *SAC* (Figura 17E e F, Figura 18 e 19).

Para o teor de amido não houve diferença entre as raízes de 1 mm até 5 mm com as maiores de 10 mm e em todas elas houve consumo de amido durante o desenvolvimento das brotações e fixação dos frutos. O teor de amido reduziu entre D e CL (Figura 23), com maior consumo no estágio de FQ nas PCD, que apresentaram frutificação mais intensa. O padrão de consumo de amido foi similar ao observado nas folhas (Figura 13) e nos ramos (Figura 15), indicando que a floração e fixação dos frutos consomem a maior parte dos recursos produzidos

anualmente (Bustan & Goldschmidt, 1998), e que as raízes podem aportar assimilados, caso a demanda não possa ser satisfeita pela produção diária.

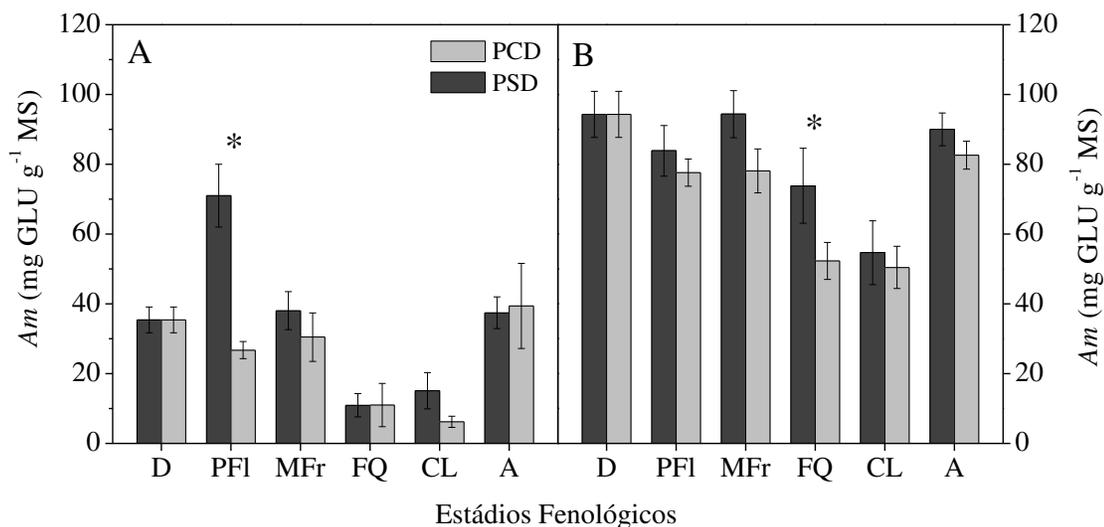


Figura 19: Teor de amido em raízes de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ coletadas as 13:00 h em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD). Avaliadas no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: plena floração (PFI), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A). Raízes menores a 1 mm diâmetro (A), raízes maiores a 1 mm de diâmetro (B). \*Indica diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos em cada estágio fenológico ( $p < 0,05$ ). Média de três repetições  $\pm$  erro padrão.

Eissenstat e Duncan (1992) observaram, em raízes menores que 2 mm de diâmetro de citros, que há consumo das próprias reservas a fim da recuperação da massa foliar perdida em tratamentos de remoção da copa. Por outro lado, em raízes de plantas de laranjeira adultas, após um ano sem frutos, houve grande incremento no teor de amido e no teor de açúcares solúveis (Goldschmidt & Golomb, 1982). Em caquizeiro com desbaste total de frutos, o sistema radicular como um todo acumulou 72% do amido que foi armazenado nos 5 meses depois do desbaste, e na floração seguinte exportou 83% do amido requerido para a floração e estabelecimento dos frutos (Park, 2011). Contudo observou-se que os carboidratos não estruturais, constituídos pelas frações

de amido e dos carboidratos solúveis, formam um ‘pool’ de reserva que pode ser usado pelas plantas para o crescimento vegetativo ou reprodutivo.

#### **4.6. TEORES DE NITROGÊNIO E COMPOSTOS ASSOCIADOS**

##### **4.6.1. Nitrogênio total em folhas e raízes**

Em plantas sempre verdes o teor de nitrogênio e compostos associados presentes nas folhas e outros tecidos podem apresentar variação sazonal, ocasionada por diferenças na intensidade de absorção e atividade metabólica durante o ano (Moreno & García-Martínez, 1983; 1984; Sanz *et al.*, 1987; Legaz *et al.*, 1995). No teor de nitrogênio total ( $N_T$ ) foram observadas diferenças entre os distintos estádios fenológicos e na interação com os tratamentos ( $p < 0,05$ ) (Anexo 7). Os menores teores de  $N_T$  foram observados no outono de 2009 ( $16,3 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$ ), no momento do D dos frutos (Figura 20A), à semelhança do que foi observado em pomares de laranjeira ‘Baianinha’ no estado de São Paulo (Gallo *et al.*, 1960). Estes autores também ressaltaram que o baixo teor no outono pode ser associado, com o envelhecimento foliar e remobilização, com os menores requerimentos neste momento, o por efeito das reduzidas temperaturas (Gallo *et al.*, 1960). A eficiência de absorção de nitrogênio tem uma correlação positiva e linear com a variação de temperatura entre 16 e 26 °C, e uma temperatura base de 10 °C (Scholberg *et al.*, 2002). O frio pode provocar também alterações no balanço hídrico na planta, reduzindo a transpiração (Machado, 2009), o que poderia prejudicar a eficiência de absorção de  $\text{N-NO}_3^-$  do solo (Fidalski & Auler, 2007).

Além disso, durante este período frio havia nas plantas frutos no estágio 74 a 75 da escala BBCH (40 a 50% do tamanho final). Estes frutos encontravam-se, aproximadamente, entre o fim da queda fisiológica e a fase de incremento linear do diâmetro (Guardiola & García-Luis, 2000; Agustí, 2003). A demanda de  $N_T$  durante o crescimento dos frutos é proporcional à carga e pode ser, parcialmente, fornecido pelas folhas, causando o decréscimo no seu teor (Reis *et al.*, 2009), isto pode ser agravado quando a demanda ocorre durante um período com condições climáticas limitantes à absorção. Em plantas cítricas, os frutos extraem entre 6% e 32% do  $N_T$ , dependendo da variedade, idade da planta e condição de adubação (Dasberg, 1987; Legaz *et al.*, 1995).

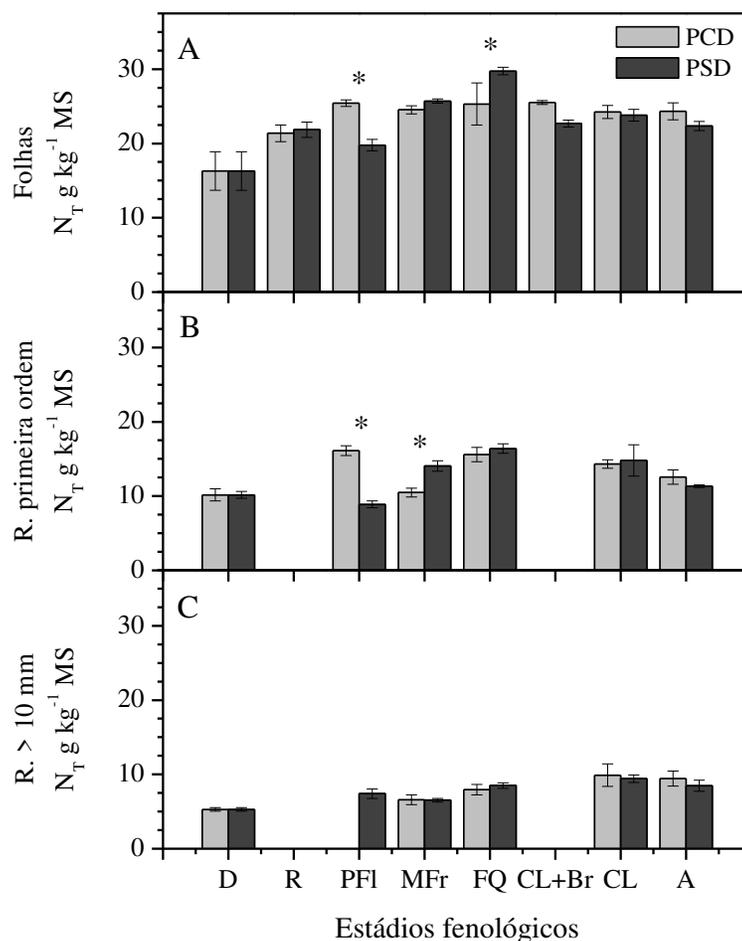


Figura 20: Teor de nitrogênio total ( $N_T$ ) em folhas do último fluxo (A), raízes de primeira ordem (B) e raízes maiores a 10 mm de diâmetro (C) de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’, coletadas as 13:00 h em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD). Avaliações realizadas no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: repouso vegetativo aparente (R), plena floração (PFI), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos + brotação (CL+Br), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A). \*Indica diferença significativa entre os tratamentos em cada estágio fenológico ( $p < 0,05$ ). Média de três repetições  $\pm$  erro padrão.

Entre o D e PFI houve aumento no teor de  $N_T$  nas folhas de 53% em PCD e de 28% em PSD, assim neste estágio houve diferença na concentração de  $N_T$  ( $p < 0,05$ ), sendo 5,6 g kg<sup>-1</sup> MS maior nas PCD (Figura 20A). Este aumento quase contínuo no teor de  $N_T$  durante o inverno é

contrário ao observado por outros autores em citros que registraram queda entre julho e outubro em paralelo ao desenvolvimento das brotações e fixação dos chumbinhos (Gallo *et al.*, 1960; Moreno & García-Martínez, 1984; Sanz *et al.*, 1987; Legaz *et al.*, 1995). No entanto, Gallo *et al.* (1960) registraram aumento no  $N_T$  nas folhas entre maio e junho, que logo depois foi consumido nas brotações. Kim *et al.* (2009), que avaliaram o teor de  $N_T$  no inverno em plantas adubadas e não adubadas no começo do outono; observaram que, sempre que houver disponibilidade de  $N-NO_3^-$  no solo há absorção, no entanto prejudicada pela baixa temperatura. Estas diferenças entre o observado por distintos autores podem indicar que existe a possibilidade de absorção de nutrientes no outono-inverno, mas que é a demanda junto aos fatores ambientais e disponibilidade de nitrogênio no solo que controlariam o processo. A diferença observada no teor de  $N_T$  na PFI coincidiu com a maior demanda em PCD que produziram sete vezes mais flores que PSD, necessitando de  $8,5 \text{ g de planta}^{-1}$  para a formação das mesmas (Bustan & Goldschmidt, 1998), sendo relatado que a demanda induz maior eficiência de absorção (Choi *et al.*, 2010b).

Logo depois houve aumento no teor de  $N_T$  até o FQ, quando em PSD observou-se teor 17% maior que em PCD ( $p < 0,05$ ) (Figura 20A). Neste momento há também efeito da maior demanda de  $N_T$  pela maior carga de frutos em PSD, produto de duas florações ainda presentes nas plantas, com uma carga total de frutos de  $115 \text{ frutos planta}^{-1}$  contra  $78 \text{ frutos planta}^{-1}$  em PCD. Durante o verão observou-se a maior concentração sazonal, em coincidência com o mencionado por alguns autores (Gallo *et al.*, 1960; Fidalski *et al.*, 1999; Fidalski & Auler, 2007), com teores de 25 a  $30 \text{ g kg}^{-1}$  MS, o que é caracterizado como adequado para a produção (Grupo Paulista de Adubação e Calagem para Citros, 1994, GPACC) (Figura 20A). Assim como mencionado por alguns autores, logo no início do outono houve redução do teor de  $N_T$  foliar, sem diferenças entre os tratamentos (Gallo *et al.*, 1960; Fidalski *et al.*, 1999; Fidalski & Auler, 2007).

Nas raízes observaram-se diferenças entre os dois tamanhos de raízes e entre os estádios fenológicos ( $p < 0,01$ ) (Anexo 8). As raízes de primeira ordem apresentaram teor médio de  $12,9 \text{ g kg}^{-1}$  MS, maior que as raízes maiores a 10 mm de diâmetro com teor de  $7,7 \text{ g kg}^{-1}$  MS (Figura 20B, C). Pregitzer *et al.* (1998) em raízes de *Acer saccharum*, e Makita *et al.* (2009) em raízes de *Quercus serrata*, observaram que há uma correlação inversa entre o diâmetro da raiz e o teor de  $N_T$ , e ao mesmo tempo este nutriente é positivamente correlacionado com a taxa respiratória e

com a atividade metabólica. Assim, raízes absorventes têm maior gasto de energia que as raízes condutoras.

Nas raízes de primeira ordem observou-se que houve interação entre os tratamentos e os estádios fenológicos ( $p < 0,01$ ) (Anexo 8), como consequência disto houve maior teor de  $N_T$  nos estádios fenológicos de maior demanda da planta. Os menores teores de  $N_T$  observaram-se no outono-inverno, no D; com progressivo aumento até o FQ, no início do verão e redução após até teores similares ao inverno precedente (Figura 20B). Houve dois estádios fenológicos com diferenças entre os tratamentos: na PFl em PCD, com quatro vezes mais flores em antese, o teor de  $N_T$  foi 80% maior que em PSD. Contrariamente, em MFr foram as PSD, com frutos em crescimento e chumbinhos em processo de fixação, que tiveram 34% mais  $N_T$  que as PCD (Figura 20B). Observa-se que a força de demanda da maior carga de flores ou frutos, induz aumento na eficiência de absorção e no teor de  $N_T$  (Mattos Jr *et al.*, 2003a; Choi *et al.*, 2010b). Nas raízes maiores que 10 mm de diâmetro houve somente diferenças entre os estádios fenológicos ( $p < 0,01$ ) (Anexo 8). O teor de  $N_T$  nestas raízes aumentou 82% entre o D e o CL dos frutos, em março do ano seguinte, e não sofreu redução depois disso (Figura 20C).

As raízes são o segundo órgão de reserva de  $N_T$  na planta, e podem representar entre 10 e 45% do total do nitrogênio contido na planta toda (Dasberg, 1987; Legaz *et al.*, 1995; Mattos Jr. *et al.*, 2003b). Apesar das raízes finas terem maior teor de  $N_T$  que as raízes mais grossas elas representam uma proporção muito pequena (20 a 25%, do armazenado no sistema radicular) e observou-se pouca remobilização durante os processos dependentes destas reservas (Legaz *et al.*, 1995). No presente estudo, somente entre 8% e 15% da massa seca do total do sistema radicular foi de raízes finas, o que significa que acumularam entre 12% e 19% do total de nitrogênio no sistema radicular. Tanto nas raízes de primeira ordem quanto nas raízes maiores a 10 mm o acúmulo de  $N_T$  seguiu o mesmo padrão que observado nas folhas, aumentando desde a saída do inverno até o FQ ou CL dos frutos, acompanhando tanto o aumento de temperatura quanto o aumento da demanda dos drenos em crescimento (Mattos Jr *et al.*, 2003a; Choi *et al.*, 2010b). A curva de aumento no teor de nitrogênio foi similar à observada para a atividade fotossintética (Figuras 9 e 20), e associada ao padrão de consumo de carboidratos (Figuras 13, 15 e 17).

#### 4.6.2. Compostos nitrogenados protéicos e não protéicos

No teor de proteína nas folhas maduras do último fluxo foram observadas diferenças nos estádios fenológicos, nos tratamentos e também na interação entre os fatores ( $p < 0,05$ ) (Anexo 7). A variação sazonal no teor de proteína foi similar à observada no  $N_T$ , onde os teores foram mínimos no outono, no D, aumentando progressivamente até o máximo na MFr, na primavera (Figura 21A). Em PSD, que produziram ao longo do ciclo duas safras, apresentaram 20% mais de proteína solúvel total que em PCD (Figura 21A). A maior concentração total foi devida à diferença observada durante o estágio de MFr quando em PSD havia 56 frutos e mais de 700 chumbinhos em processo de fixação (maior demanda), consequência desta maior demanda em PSD houve 69% mais proteína solúvel que em PCD. Martínez-Fuentes *et al.* (2010), também observaram que plantas com carga de frutos mantêm o teor de proteínas mais alto ao longo do inverno, quando comparadas com plantas sem frutos. No entanto, estes autores mencionam também que há queda na concentração de proteínas no amadurecimento dos frutos, o que foi também observado no presente estudo (Figura 21A).

Contrariamente, Moreno e García-Martínez (1984) quantificaram redução do teor de proteína foliar de 30% entre o início do inverno e plena floração, estes autores atribuíram a diminuição ao consumo de nitrogênio para as novas brotações. Em outro estudo, Moreno e García-Martínez (1983) observaram que a degradação das proteínas foliares coincide com o período de grande aumento do fluxo de seiva e do transporte de substâncias nitrogenadas no xilema. Estas evidências podem indicar que, no mencionado estudo, a baixa temperatura limitou a absorção e transporte de  $\text{NO}_3^-$  desde o solo.

No teor de proteínas solúveis nas raízes de primeira ordem somente foram observadas diferenças entre os estádios fenológicos ( $p < 0,05$ ) (Anexo 9), e da mesma forma que observado nas folhas, a concentração aumentou até a MFr e neste momento em PSD houve o dobro de proteína que em PCD. A partir deste estágio fenológico a concentração se manteve sem mudanças significativas até o A, no inverno seguinte (Figura 21B). Similarmente ao observado com o teor de  $N_T$ , a dinâmica sazonal nos teores de proteína, tanto em folhas quanto em raízes, tiveram uma variação sazonal que acompanhou a assimilação de  $\text{CO}_2$ , demonstrando que a demanda dos drenos afeta tanto ao metabolismo do carbono quanto do nitrogênio.

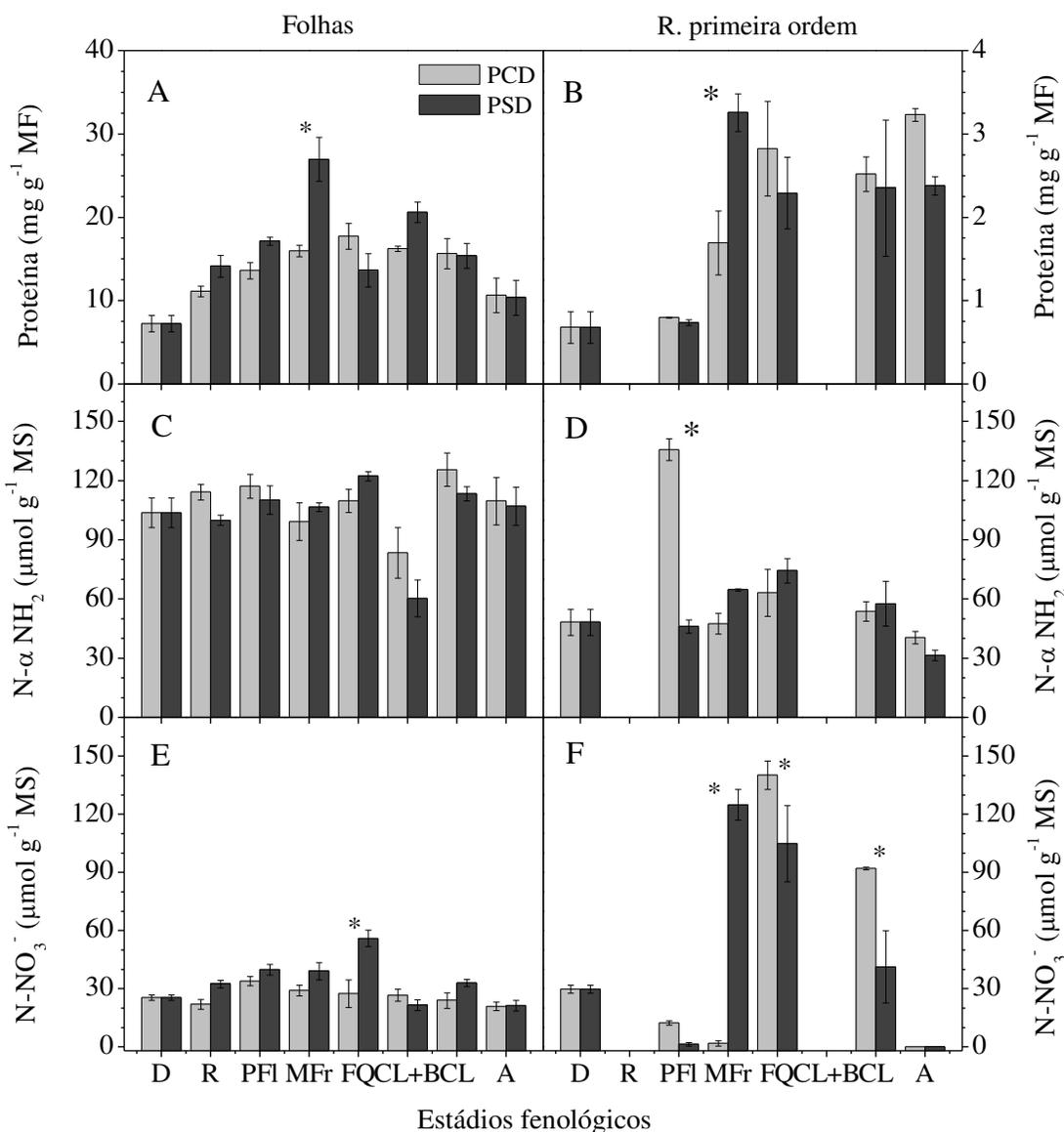


Figura 21: Teor de proteínas totais (A e B), aminoácidos livres totais – N-αNH<sub>2</sub> (C e D) e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> solúvel (E e F) em folhas (A, C e E) e raízes de primeira ordem (B, D e F) em laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’, coletadas as 13:00 h em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD). Avaliações realizadas no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: repouso vegetativo aparente (R), plena floração (PFI), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos + brotação (CL+B), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A). \*Indica diferença significativa entre tratamentos em cada estágio fenológico (p<0,05). Média de três repetições ± erro padrão.

No teor de aminoácidos livres ( $N-\alpha NH_2$ ) nas folhas somente houve efeito dos estádios fenológicos ( $p < 0,05$ ) (Anexo 7), sendo variável desde 70 até 120  $\mu mol g^{-1}$  MS. O teor foi aproximadamente constante, entre 100 e 110  $\mu mol g^{-1}$  MS a maior parte do ano e somente registrou queda, até 71,9  $\mu mol g^{-1}$  MS no estágio de CL+Br (Figura 21C). Contrariamente, Moreno e García-Martínez (1984) observaram acúmulo durante o inverno e, desde pouco tempo antes do início da brotação até o fim da queda fisiológica dos frutos, redução no teor de  $N-\alpha NH_2$  ao mesmo tempo que há redução do teor de proteínas solúveis nas folhas maduras. Sendo que estes autores associaram à redução no teor de proteínas e  $N-\alpha NH_2$  com a translocação para o desenvolvimento das novas estruturas. No presente experimento a concentração de  $N-\alpha NH_2$  foi alta tanto no outono quanto no inverno e não houve redução durante a brotação e desenvolvimento das flores. Isso poderia indicar que a absorção de nitrogênio do substrato não teve limitações climáticas durante o inverno, ou que os  $N-\alpha NH_2$  requeridos para as novas estruturas provêm da proteólise em outros órgãos diferentes das folhas maduras. No verão a redução no teor de  $N-\alpha NH_2$  pode ser devida à competição dos frutos em crescimento com o desenvolvimento das novas brotações, além da maior necessidade de nitrogênio no desenvolvimento das brotações vegetativas.

Nas raízes de primeira ordem o teor de  $N-\alpha NH_2$  apresentou diferenças entre os estádios fenológicos, entre os tratamentos e na interação ( $p < 0,05$ ) (Anexo 9). Da interação entre os fatores observou-se que em PSD houve aumento gradual entre o D e o FQ de 60%, e posterior redução até o A no inverno seguinte (Figura 21D). Em PCD, somente foi observado em PFI um grande aumento que quase triplicou o teor de  $N-\alpha NH_2$ , mantendo nos restantes estádios teores similares aos observados em PSD (Figura 21D). Este aumento nos  $N-\alpha NH_2$  nas PCD coincide com o período de intensa demanda de energia e nutrientes para as flores em antese, e floração sete vezes mais intensa que em PSD (Figura 7). O aumento nos  $N-\alpha NH_2$  em PSD, é correspondido com aumento no teor de proteínas nas próprias raízes, que provavelmente não significa aumento nas reservas de nitrogênio, e sim aumento nas estruturas funcionais devido ou como consequência do aumento na atividade metabólica. Nestas plantas, durante o verão, quando a atividade metabólica é mais intensa, o teor de aminoácidos livres nas raízes foi mais elevado (Figura 21D), assim como observado por Kato e Kubota (1982), tanto para raízes quanto para folhas.

No teor de nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ) nas folhas foram observadas diferenças entre os estádios fenológicos, entre os tratamentos e na interação ( $p < 0,05$ ) (Anexo 7). Da interação entre os fatores surgiu que em PCD não houve variação no teor de  $\text{N-NO}_3^-$  nos distintos estádios fenológicos, com média de  $26,4 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$  (Figura 21E). Em PSD o teor de  $\text{N-NO}_3^-$  foi maior ao longo do ano,  $33,6 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$  e observou-se aumento gradativo desde o D até FQ, duplicando o teor neste estágio fenológico (Figura 21E). Esta resposta diferencial entre os tratamentos, relativas aos teores de  $\text{N-NO}_3^-$  foliar, é contrária a observações de alguns autores que associam negativamente altos teores de  $\text{N-NO}_3^-$  com a brotação e floração. Martínez-Fuentes *et al.* (2010) relataram que em plantas com frutos houve aumento no teor de  $\text{N-NO}_3^-$  durante o amadurecimento dos mesmos, enquanto em plantas desbastadas houve tendência à diminuição no teor de  $\text{N-NO}_3^-$ . Em pêsego e outros frutos de caroço, foi também observada uma correlação negativa entre o teor de  $\text{N-NO}_3^-$  na casca e a intensidade da brotação e floração em ramos destacados submetidos a tratamento de frio artificial (Reig *et al.*, 2006; González-Rossia *et al.*, 2008). Estes autores atribuem esta acumulação diferencial de  $\text{N-NO}_3^-$  a algum tipo de desbalanço que acontece no metabolismo do nitrogênio durante o amadurecimento dos frutos e que teria efeito na indução. No entanto o efeito contrário sobre a brotação e floração, a razão para acumulação de  $\text{N-NO}_3^-$  como resultado do tratamento de desbaste de frutos poder-se-ia encontrar no controle no nível de ativação da atividade da RN *in vivo*, o que não seria evidente na atividade quantificada *in vitro* (Purcino *et al.*, 2007). Porém, a origem da diferença poderia ser também menor disponibilidade de poder redutor (NADH) ou alterações nos fotossistemas prejudicando a síntese de poder redutor.

#### 4.6.3. Enzimas do metabolismo do nitrogênio

A RN nas folhas apresentou grandes variações na atividade ao longo do ano, com valores máximos de  $0,97 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$  em outubro; e mínimo dez vezes menor, no inverno ( $0,097 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$ ) (Figura 22A). A análise estatística revelou que a variabilidade nos dados foi superior a 50% e que com o modelo estatístico utilizado não foi possível quantificar o efeito do tratamento de desbaste de frutos sobre a atividade da RN (Anexo 10). A atividade foi mínima em D e R, nos meses mais frios, e aumentou entre 8 e 10 vezes até o máximo no momento de MFr e reduziu novamente depois, durante o verão, entre FQ e Cl+Br, quando houve elevada temperatura e redução da fotossíntese (Figura 22A). A atividade da enzima, além de ser induzida pela presença do substrato  $\text{NO}_3^-$  (Bar-Akiva & Sternbaum, 1965; Reis *et al.*, 2009), também é

controlada pela luz devido ao fato de ser dependente da energia da fotossíntese por precisar de NADH ou NADPH procedente do fotossistema I para reduzir o  $\text{NO}_3^-$ , sendo neste caso afetada pelos mesmos fatores ambientais que afetam a assimilação de  $\text{CO}_2$  (Xu & Zhou, 2006). Tem sido também destacado o efeito da temperatura, sendo observado que em tangerineira satsuma a atividade da RN no inverno, tanto em folhas quanto em raízes, é no máximo 30% do observado no verão (Kato & Kubota, 1982).

Em café também foi observado que a atividade nas folhas é mais elevada no verão e tem uma tendência decrescente com o crescimento e amadurecimento dos frutos entre janeiro e junho; porém, nestes meses além da redução da temperatura ambiente há progressiva redução da demanda dos drenos e envelhecimento e senescência foliar (Reis *et al.*, 2009). Na redução da atividade sazonal é necessário considerar, não somente as condições ambientais, mas também a idade dos tecidos, pois a atividade é maior em espécies de rápido crescimento e tecidos novos (Bar-Akiva & Sagiv, 1967; Min *et al.*, 1998). Em vista que a atividade da enzima é regulada por vários fatores que afetam também a assimilação de  $\text{CO}_2$  (Figura 9), e da similaridade entre a sazonalidade observada na fotossíntese e a sazonalidade na atividade *in vitro* da RN confirma-se que existe uma relação direta entre estes processos metabólicos, devido à necessidade de NADH procedente dos fotosistemas como doador de  $\text{H}^+$ .

Nas raízes não foi observado diferenças entre os estádios fenológicos nem efeito dos tratamentos sobre a atividade da RN (Anexo 11). A constância na atividade *in vitro* desta enzima nas raízes sugere que sua expressão não foi modificada ao longo do ano, porém o controle poderia ser do tipo post-transcricional, havendo mudanças no estado de ativação, determinando uma sazonalidade na atividade *in vivo* (Figura 22B). Esta sazonalidade foi relatada por Kato e Kubota (1982) em plantas de tangerineira satsuma, avaliando a atividade de enzima *in vivo*. A atividade por grama de massa fresca nas raízes foi em alguns estádios fenológicos similar à observada nas folhas e em outros foi até 15 vezes maior nas folhas (Figura 22A e B). Em citros a atividade da enzima foi constatada em diferentes órgãos, com atividades que variam desde 9% até 150% do observado em folhas maduras, para o flavedo dos frutos e sementes em germinação, respectivamente (Bar-Akiva & Sagiv, 1967). Em raízes a atividade medida *in vivo* foi entre 10% (Bar-Akiva & Sagiv, 1967) e 35% (Hippler *et al.*, 2011) do observado nas folhas.

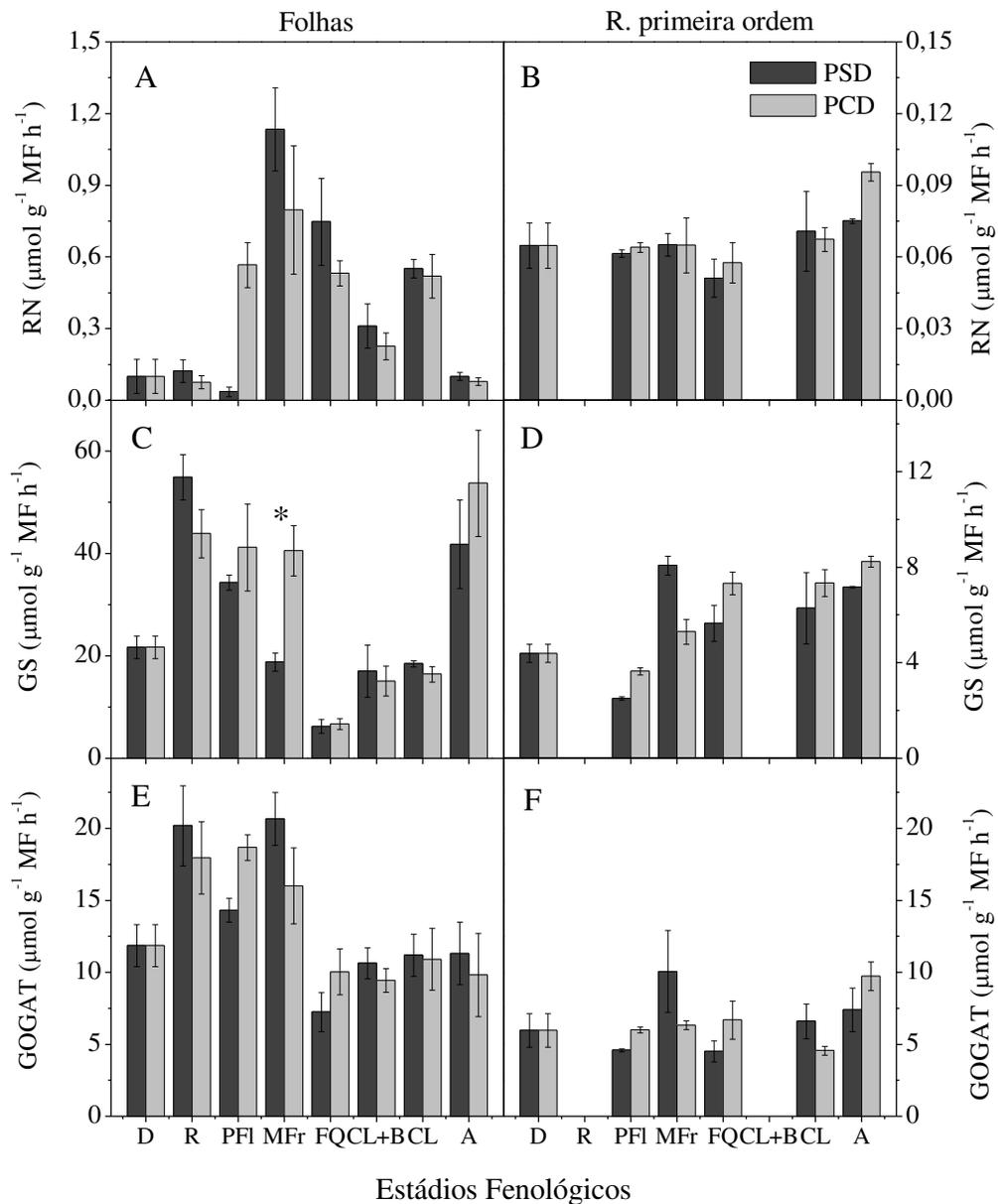


Figura 22: Atividade de enzimas do metabolismo do nitrogênio em folhas (A, C e E) e raízes de primeira ordem (B, D e F) de laranja ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ coletadas as 13:00 h em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD). Avaliações realizadas no desbaste (D) e nos estádios fenológicos de: repouso vegetativo aparente (R), plena floração (PFI), máxima frutificação (MFr), fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), crescimento linear dos frutos + brotação (CL+B), crescimento linear dos frutos (CL) e amadurecimento dos frutos (A). Enzimas avaliadas: redutase do nitrato (RN em A, B), glutamine sintetase (GS em C, D) e glutamato sintase (GOGAT em E, F). \* Indica diferença significativa entre os tratamentos em cada estágio fenológico ( $p < 0,05$ ). Média de 3 repetições  $\pm$  erro padrão.

Para as enzimas do complexo GS/GOGAT em folhas observaram-se somente diferenças entre os estádios fenológicos ( $p < 0,05$ ) (Anexo 10). Somente no caso da GS, a interação foi significativa ( $p < 0,05$ ), havendo efeito do tratamento no estágio de MFr quando a atividade foi maior em PCD (Figura 22C e E). As duas enzimas participantes deste complexo apresentaram uma variação sazonal similar, com maior atividade no inverno e mais reduzida no verão. Esta dinâmica inversa à observada para a RN pode indicar que este aumento de atividade não está associado com aumento da redução de  $\text{NO}_3^-$  absorvido do substrato. No inverno, a atividade do complexo GS/GOGAT poderia estar associada com a remobilização de proteínas das folhas velhas, devido que a glutamina, produto da redução do  $\text{NH}_4^+$  pela GS, é o principal aminoácido de transporte no floema (Yu *et al.*, 2012). Porém, não foi estudada a dinâmica das reservas e atividades enzimáticas nestas folhas velhas, no entanto foi observado que apresentaram pronunciada abscisão previamente à PFl (Figura 11). Além disso, têm sido observado aumento da atividade em tecidos senescentes de trigo (Berger *et al.*, 1984) e em laranjeiras com CVC (Purcino *et al.*, 2007) como consequência de processos de proteólise. Purcino *et al.* (2007) mencionaram também a possibilidade que o incremento na atividade da GS, não associado com aumento na atividade da RN, fosse também consequência da reassimilação do  $\text{NH}_4^+$  originado na fotorrespiração. No entanto, isto não explica o aumento na atividade da GOGAT dependente do NADH, a qual, devido a sua localização no citoplasma celular, não participa deste processo e sem faz parte da reassimilação do nitrogênio após a proteólise (Yamaya *et al.*, 1992). A atividade da GS foi de 1 até 3 vezes maior que a atividade da GOGAT, o que também foi observado em feijão por Sánchez *et al.* (2009).

Nas raízes, somente no caso da atividade da GS houve diferença entre os estádios fenológicos ( $p < 0,05$ ), e sem efeito dos tratamentos de desbaste de frutos. Esta enzima apresentou baixa atividade no outono-inverno, entre o D e PFl, para aumentar quase 80% na MFr (Figura 22D). Para a GOGAT não houve efeito dos estádios fenológicos e dos tratamentos (Anexo 11), sendo que a presença desta enzima nas raízes parece ser constante, assim como foi observado para a RN (Figura 22E). A atividade da GS nas folhas foi de 1 até 10 vezes a observada nas raízes; já no caso da GOGAT a relação foi mais próxima e a atividade nas folhas foi no máximo 3 vezes a quantificada na raiz. Com relação à razão entre as atividades quantificadas na raiz, a razão entre as atividades GS/GOGAT foi de 0,5 até 1 (Figura 22).

Das três enzimas participantes da cadeia de redução do  $\text{NO}_3^-$  estudadas, a RN foi a de menor atividade, sendo aparente que ela limita a taxa de assimilação e redução do  $\text{NO}_3^-$  absorvido. A atividade da GS foi de 50 até mais de 100 vezes superior à RN, entanto em várias espécies foi relatado que a atividade da GS é de 10 até 30 vezes maior (Lillo, 1984; Xu & Zhou, 2006; Reis *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2009).

#### 4.7. BALANÇO GLOBAL DE CARBONO E NITROGÊNIO

Os citros, assim como todas as plantas sempre verdes, têm a capacidade de fixar carbono o ano todo, porém as variações sazonais nas condições do ambiente determinam uma sazonalidade na assimilação de  $\text{CO}_2$ , afetando desta forma a produção de massa seca e o crescimento. Além disso, o ambiente tem um efeito sobre as respostas fisiológicas da planta em cada estágio fenológico, determinando uma sazonalidade também na demanda de energia e nutrientes. Desta interação, surge uma dinâmica entre produção de assimilados e consumo que é ajustada pela planta através do armazenamento e remobilização das reservas.

Foi observado que os frutos inibem a floração por mecanismos não associados com a disponibilidade de carboidratos, visto que a floração em PCD foi sete vezes mais intensa, ainda com altos teores de carboidratos em folhas, ramos e raízes e sem diferenças entre os tratamentos (Figuras 6, 7, 13, 15 e 17). Desta forma aportando evidências sobre a importância dos mecanismos de regulação hormonal (Goldschmidt *et al.*, 1985; García-Luis *et al.*, 1988; Koshita *et al.*, 1999; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010) ou do efeito dos frutos sobre a própria expressão dos genes envolvidos na evocação floral (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011). A floração mais intensa resultou em maior competição por carboidratos entre as estruturas e maior abscisão, em consequência, maiores perdas de massa seca (carboidratos e nutrientes) e menor eficiência de uso dos carboidratos disponíveis. Assim, em PCD que fixaram somente 4,8% das flores produzidas, houve uma perda líquida estimada de  $640 \text{ g MS planta}^{-1}$  pela abscisão das flores; enquanto em PSD a perda por abscisão das flores foi  $118,8 \text{ g MS planta}^{-1}$ . Finalmente, a produção de frutos resultante desta fixação foi somente 39% maior em PCD (Tabela 2).

O período entre PFI e FQ foi o de maior consumo de recursos durante o ciclo produtivo, sendo a remobilização de carboidratos metabolizáveis de todos os órgãos da planta similar em ambos os tratamentos, sendo somente 5,1% maior em PSD (Figura 23A). Porém, em PCD a

remobilização foi maior entre PFI e MFr, o que resultou em maiores perdas na abscisão; enquanto em PSD foi gradual entre PFI e FQ. Considerando as duas safras colhidas em PSD durante o período experimental a produção nestas plantas foi 60% maior que em PCD (Figura 23B).

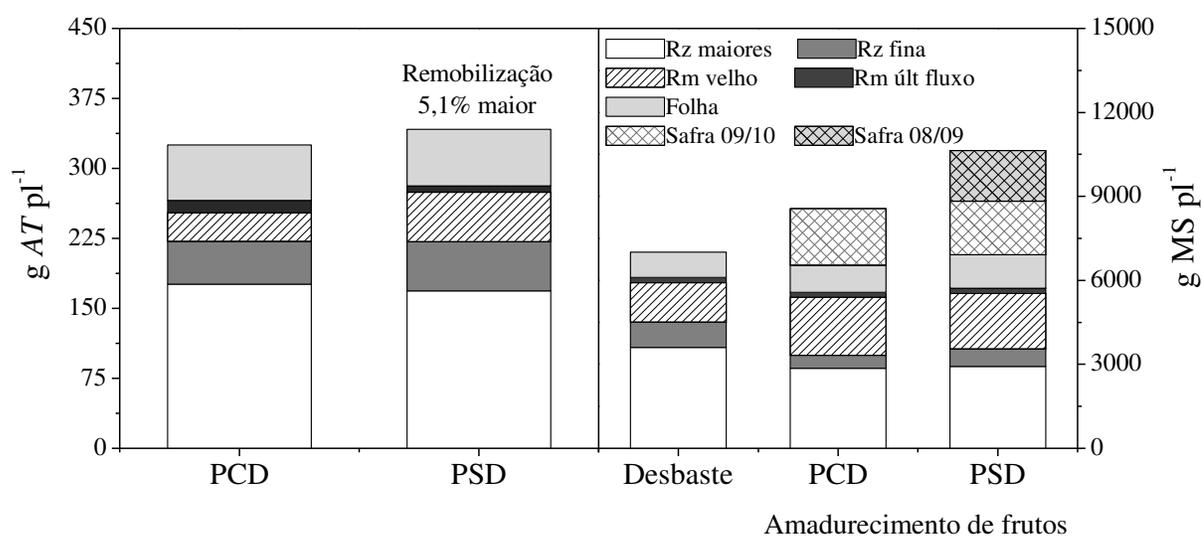


Figura 23: Remobilização de açúcares totais metabolizáveis (AT) no período entre plena floração (PFI) e fim de queda fisiológica dos frutos (FQ), nos distintos órgãos da planta (A), e massa seca acumulada nos distintos órgãos, produzida no período entre o desbaste (D) e o amadurecimento dos frutos (A) em julho de 2010 (B); em plantas de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste (PSD).

Em PSD houve maior força de dreno, devido à superposição de duas safras, isto determinou: assimilação de CO<sub>2</sub> 5,8% maior ao longo do período experimental; teores de açúcares totais metabolizáveis (AT) 10%, 18%, 26% e 9% maiores em folhas, ramos, raízes finas e raízes maiores, respectivamente (Figuras 13, 15 e 17). Finalmente, no amadurecimento dos frutos em julho de 2010, as PSD tinham acumulado 7,7% mais açúcares totais metabolizáveis (AT) em toda planta, estando mais de 50% destes alocado nas raízes (Figura 24). Com isto, há evidências que a maior demanda ao longo do ciclo produtivo estudado determinou maior eficiência de produção de massa seca e na utilização dos assimilados corroborando os trabalhos de Léchaudel *et al.* (2005) e Ribeiro *et al.* (2012). Porém, diferentemente do relatado por Iglesias

*et al.* (2002) que associa altos teores de açúcares metabolizáveis com redução na assimilação de CO<sub>2</sub>.

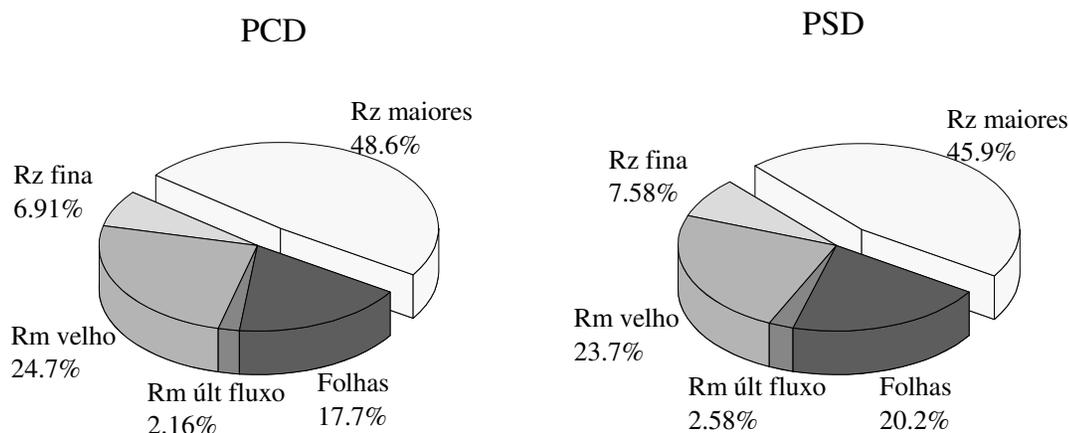


Figura 24: Partição do conteúdo de carboidratos totais metabolizáveis (AT) nos distintos órgãos avaliados, raízes (Rz) e ramos (Rm) no momento de amadurecimento dos frutos, em plantas de laranja 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo' com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste (PSD).

Quanto aos teores de N<sub>T</sub> nas folhas e raízes, os mesmos tiveram aumento gradual e constante desde o período de repouso das plantas (R) até o início do verão, no FQ e observado incremento ainda com baixas temperaturas. A atividade da RN, enzima chave na assimilação do NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, apresentou em folhas uma resposta sazonal similar à observada na assimilação de CO<sub>2</sub>, devido à necessidade de NADH ou NADPH. Não houve diferença no teor de N<sub>T</sub> entre as plantas nos dois tratamentos, porém o teor de proteína foliar foi 20% maior em PSD ao longo do ciclo, indicando que estas plantas mantiveram um metabolismo mais ativo, conforme observado por Reis *et al.* (2009). O conteúdo de N<sub>T</sub> na planta aumentou na maioria dos órgãos devido ao aumento na massa seca e não pelo aumento nos teores. Em PSD o N<sub>T</sub> nos frutos representou mais do 40% do conteúdo total, enquanto em PCD foi quase 30%. O conteúdo de N nas folhas representou entre 30% e 35% do N<sub>T</sub>, considerando somente a massa vegetativa (Figura 25), valores intermediários comparados com os observados em laranja 'Valência' de três anos (Boaretto *et al.*, 2010) e em laranja 'Hamlin' (Mattos Jr. *et al.*, 2003a; Morgan *et al.*, 2006).

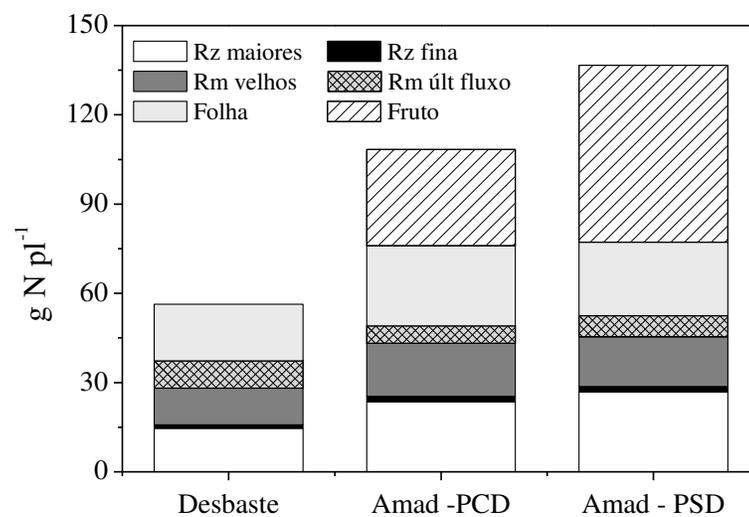


Figura 25: Conteúdo de nitrogênio acumulado em raízes (Rz), ramos (Rm), folhas e frutos de plantas de laranjeira 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo' com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste (PSD). Quantificações realizadas no desbaste e no estágio de amadurecimento dos frutos (Amad), em julho de 2010.



## 5. CONCLUSÕES

- A presença de frutos tem um efeito inibitório da floração, e este efeito não é exercido pela competição por carboidratos, devido que mesmo com altos teores em folhas, ramos e raízes ainda há inibição da brotação.

- O estado fisiológico da planta em cada estágio fenológico condiciona o aumento da assimilação de CO<sub>2</sub> em momentos de alta demanda dos drenos. Isto acontece no inverno, durante o período de indução e desenvolvimento das gemas, mesmo com baixas temperaturas, há incremento na fotossíntese. Também durante o verão, quando as temperaturas são elevadas, a demanda dos frutos em crescimento determina aumento na assimilação de CO<sub>2</sub>. As plantas que apresentam frutos e desenvolvem brotações simultaneamente estão submetidas à maior demanda pelos drenos, assimilam mais CO<sub>2</sub>, e são mais eficientes no uso dos carboidratos.

- A floração é o processo de desenvolvimento de maior consumo de energia. Há intensa hidrólise de amido principalmente em folhas, durante o desenvolvimento das flores e na antese. A hidrólise do amido continua até o fim da queda fisiológica dos frutos, sendo que ramos e raízes apresentam redução nas reservas durante o desenvolvimento reprodutivo. Porém é o sistema radicular que apresenta a maior remobilização de amido. O nitrogênio e proteínas, tanto foliares quanto radiculares, mostram um incremento associado com o incremento da atividade metabólica determinado pelo desenvolvimento das estruturas reprodutivas e a floração.

- A atividade *in vitro* da RN nas folhas responde também a este aumento no metabolismo. Das três enzimas participantes da cadeia de redução do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> estudadas, a RN é a de menor atividade, indicando que é ela que limita a taxa de assimilação do nitrogênio absorvido do substrato.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUSTÍ, M.; ZARAGOZA, S. & BLEIHOLDER, H. 1995. Levante Agrícola, 332: 189–199.
- AGUSTÍ, M. 2003. Citricultura. 2º Edição. Mundi-Prensa (Ed), Madrid. 422p.
- AMARAL, L.I.V; GASPAR, M.; COSTA, P.M.F.; AIDAR, M.P.M. & BUCKERIDGE, M.S. 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. Hoehnea 34: 425-431.
- BAR-AKIVA, A. & STERNBAUM, J. 1965. Possible use of the nitrate reductase activity of leaves as a measure on the nitrogen requirement of *Citrus* trees. Plant & Cell Physiology 6: 575-577.
- BAR-AKIVA, A. & SAGIV, J. 1967. Nitrate reductase in *Citrus* plant: properties, assay conditions and distribution within the plant. Physiologia Plantarum 20: 500-506.
- BERGER, M.G.; WOO, K.C.; WONG, S.C & FOCK, H.P. 1985. Nitrogen metabolism in senescent flag leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) in the light. Plant Physiology 78: 779-783.
- BEVINGTON, K.B. & CASTLE, W.S. 1985. Annual root growth pattern of young citrus trees in relation to shoot growth, soil, temperature, and soil water content. Journal of American Society for Horticultural Science 110: 840-845.
- BIELESKI, R.L. & A. TURNER. 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. Analytical Biochemistry 17: 278-293.
- BOARETTO, R.M.; MATTOS JR., D; QUAGGIO, J.A.; CANTARELLA, H. & TRIVELIN, P.C.O. 2010. Nitrogen<sup>-15</sup> uptake and distribution in two citrus species. In: 19<sup>th</sup> World Congress of Soil Science, 2010, Brisbane. Proceedings....p 156-159.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
- BUENO, A.C.R.; PRUDENTE, D.A.; MACHADO, E.C. & RIBEIRO, R.V. 2011. Daily temperature amplitude affects the vegetative growth and carbon metabolism of orange trees in a

rootstock-dependent manner. *Journal of Plant Growth Regulation*. DOI 10.1007/s00344-011-9240-x

- BUSTAN, A. & GOLDSCHMIDT, E.E. 1998. Estimating the cost of flowering in a grapefruit tree. *Plant, Cell and Environment* 21: 217-224.
- CATALDO, D.A.; HAROON, H.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v.6, p.71-80, 1975.
- CHOI, S.T.; SONG, W.D.; PARK, D.S. & KANG, S.M. 2010a. Effect of different girdling dates on tree growth, fruit characteristics and reserve accumulation in a late-maturing persimmon. *Scientia Horticulturae* 126: 152-155.
- CHOI, S.T.; PARK, D.S.; KANG, S.M. & CHOC, Y.C. 2010b. Effect of fruit-load on the growth, absorption, and partitioning of inorganic nutrients in young 'Fuyu' persimmon trees. *Scientia Horticulturae* 126: 408-412.
- DAMATTA, F.M., CUNHA, R.L., ANTUNES, W.C., MARTINS, S.C.V., ARAUJO, W.L., FERNIE, A.R. & MORAES, G.A.B.K. 2008. In field-grown coffee trees source-sink manipulation alters photosynthetic rates, independently of carbon metabolism, via alterations in stomatal function. *New Phytologist* 178: 348-357.
- DASBERG, S. 1987. Nitrogen fertilization in *citrus* orchards. *Plant and Soil* 100: 1-9.
- DAVIES, F.S. & L.G. ALBRIGO. 1994. Environmental constraints on growth, development and physiology of *citrus*. In: *Citrus*. CAB International (Ed.), Wallingford, UK. p 52-82.
- DONADIO, L.C.; MOURÃO, F.A.A.F. & MOREIRA, C.S. 2005. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: *Citros*. MATTOS, JR.D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag. Pág 1-18.
- DOVIS, V.L.; ROSSI, S.C.; MACHADO, E.C.; RIBEIRO, R.V.; MEDINA, C.L. 2009. Efeito do tipo de brotação sob a fotossíntese em folhas de diferentes idades em laranjeira 'Valência'. In: XII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. Fortaleza, CE. Resumos.

- DOVIS, V.L.; MACHADO, E.C.; ROSSI, S.C.; MAGALHÃES FILHO, J.R. & MICHELOUD, N. 2011. Variación estacional de la fotosíntesis y reservas foliares en naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) cv 'Valencia', asociadas con la floración y establecimiento de frutos en plantas con y sin carga de frutos. In: XXXIV Congreso Argentino de Horticultura. Buenos Aires, Argentina. Livro de Resumos.
- DUBOIS, M.; K.A. GILLES; J.K. HAMILTON; P.A. REBERS & F. SMITH. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28 (30): 350-356.
- EAKS, I.L. 1970. Respiratory response, ethylene production, and response to ethylene of citrus fruit during ontogeny. *Plant Physiology* 45: 334-338.
- EISSENSTAT, D.M & DUNCAN, L.W. 1992. Root growth and carbohydrate responses in bearing citrus trees following partial canopy removal. *Tree Physiology* 10: 245-257.
- EISSENSTAT, D.M. & ACHOR, D.S. 1999. Anatomical characteristics of roots of citrus rootstocks that vary in specific root length. *New Phytologist* 141: 309-321.
- FAO, 2012. Estadísticas: FAOSTAT - Producción agrícola. Disponível em: <http://www.fao.org/corp/statistics/es/>. Acesso em: 30 de março de 2012.
- FERGUSON, A.R. & SIMS, A.P.A. 1971. Inactivation in vivo of glutamine synthetase and NAD-specific glutamate dehydrogenase, its role in the regulation of glutamine synthesis in yeasts. *Journal of General Microbiology*, 69: 423-427.
- FIDALSKI, J.; PAVAN, M.A.; AULER, P.A.M. & JACOMINO, A.P. 1999. Produção de frutos de laranja 'Pêra' e teores de nutrientes nas folhas e no solo, em Latossolo Vermelho-Escuro do Noroeste do Paraná. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 23: 273-279.
- FIDALSKI, J. & AULER, P.A.M. 2007. Adubação nitrogenada e precipitação sobre a nutrição e produção de laranja 'Valência'. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 141-146.
- GALLO, J.P.; MOREIRA, S.; RODRIGUEZ, O. & FRAGA JR, C.G. 1960. Composição inorgânica das folhas de laranja 'Baianinha' com referencia à época de amostragem e adubação química. *Bragantia* 19: 229-246.

- GARCÍA-LUIS, A.; ALMELA, V.; MONERRI, C.; AGUATÍ, M. & GUARDIOLA, J.L. 1986. Inhibition of flowering in vivo by existing fruits and applied growth regulators in *Citrus unshiu*. *Physiologia Plantarum* 66:515-520.
- GARCÍA-LUIS, A.; FORNES, F.; SANZ, A. & GUARDIOLA, J.L. 1988. The regulation of flowering and fruit set in *citrus*: relationship with carbohydrates levels. *Israel Journal of Botany* 37: 189-201.
- GARCÍA-LUIS, A.; F. FORNES & J.L. GUARDIOLA. 1995. Leaf carbohydrates and flower formation in *Citrus*. *Journal of American Society of Horticultural Science* 120 (2): 222-227.
- GOLDSCHMIDT, E.E. & GOLOMB, A. 1982. The carbohydrate balance of alternate-bearing *citrus* trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 107: 206-208.
- GOLDSCHMIDT, E.E., ASCHKENNAZI, N.; HERZANO, Y.; SHAFFER, A.A. & MONSELISE, S.P. 1985. A role for carbohydrate levels in the control of flowering in citrus. *Scientia Horticulturae* 29: 159-166.
- GOLDSCHMIDT, E.E. 1999. Carbohydrate supply as a critical factor for Citrus fruit development and productivity. *Hortscience* 34: 1020-1024.
- GÓMEZ-CADENAS, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F.R.; PRIMO-MILLO, E.; & TALON, M. 2000. Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrates shortage in *Citrus*. *Planta* 210: 636-643.
- GONZÁLEZ-ROSSIA, D.; REIG, C.; DOVIS, V.; GARIGLIO, N. & AGUSTÍ, M. 2008. Changes on carbohydrates and nitrogen content in the bark tissues induced by artificial chilling and its relationship with dormancy bud break in *Prunus* sp. *Scientia Horticulturae* 118: 275-281.
- GRUPO PAULISTA DE ADUBAÇÃO E CALAGEM PARA CITROS. 1994. Recomendações de adubação e calagem para citros no Estado de São Paulo. Laranja, Edição Especial.
- GUARDIOLA, J.L.; MONERRI, C. & AGUSTÍ, M. 1982. The inhibitory effect of gibberellic acid on flowering in *Citrus*. *Physiologia Plantarum* 55: 136-142.
- GUARDIOLA, I.L.; GARCÍA-MARÍ, F. & AGUSTÍ, M. 1984. Competition and fruit set in the 'Washington' navel orange. *Physiologia Plantarum* 62: 297-302.

- GUARDIOLA, J.L.; BARRÉS, M. T.; ALBERT, A.; GARCÍA-LUIS, A. 1993. Effects of exogenous growth regulators on fruit development in *Citrus unshiu*. *Annals of Botany* 71: 169-176.
- GUARDIOLA, J.L. & GARCÍA-LUIS, A. 2000. Increasing fruit in citrus: thinning and simulation of fruit growth. *Plant Growth Regulation* 34:121-132.
- HABERMANN, G.; MACHADO, E.C.; RODRIGUES, J.D. & MEDINA, C.L. 2003. Gas exchange rates at different vapor pressure deficits and water relations of 'Pera' sweet orange plants with citrus variegated chlorosis (CVC). *Scientia Horticulturae*, 15: 79-87.
- HALL, A.E.; M.M.A. KHAIRI & C.W. ASBELL. 1977. Air and soil temperature effects on flowering of *citrus*. *Journal of American Society Horticultural Science* 102 (3): 261-263.
- HANDEL, E.V. 1968. Direct microdetermination of sucrose. *Analytical Biochemistry* 22: 280-283.
- HIPPLER, F.W.R.; DOVIS, V.L.; SILVA, K.I; MACHADO, E.C.; RIBEIRO, R.V. & MATTOS JR., D. 2011. Otimização do ensaio da atividade da redutase do nitrato in vivo em folhas e raízes de laranjeira. In: XII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Búzios. Livro de Resumos..p 92.
- IGLESIAS, J.D.; LLISO, I; TADEO, F.R. & TALON, M. 2002. Regulation of photosynthesis through source-sink imbalance is mediated by carbohydrate in leaves. *Physiologia Plantarum* 116: 563-572.
- IGLESIAS, J.D.; TADEO, F.R.; PRIMO-MILLO, E. & TALON, M. 2003. Fruit set dependence on carbohydrate availability in citrus trees. *Tree Physiology* 23: 199-204.
- JIFON, J.L. & SYVERTSEN, J.P. 2003. Moderate shade can increase net gas exchange and reduce photoinhibition in citrus leaves. *Tree physiology* 23:119-127.
- JONES, W.W. & STEINACKER, M.L. 1951. Seasonal changes in concentration of sugar and starch in leaves and twigs on citrus trees. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 58: 1-4.
- KHAIRI, M.M.A & HALL, A.E. 1976. Effects of air and soil temperatures on vegetative growth of citrus. *Journal of American Society Horticultural Science* 101: 337-341.

- KATO, T. & KUBOTA, S. 1982. Reduction and assimilation of <sup>15</sup>N-nitrate by citrus trees in cold season in comparison with summer. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 50: 413-420.
- KIM, Y.K.; LIM, C.S.; KANG, S.M. & CHO, J.L. 2009. Root storage of nitrogen applied in autumn and its remobilization to new growth in spring of persimmon trees (*Diospyros kaki* cv. 'Fuyu'). *Scientia Horticulturae* 119: 193–196.
- KOCH, K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 7:235–246.
- KOSHITA, Y.; TAKAHARA, T.; OGATA, T. & GOTO, A. 1999. Involvement of endogenous plant hormone (IAA, ABA, GAs) in leaves and flower bud formation of 'Satsuma' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Scientia Horticulturae* 79: 185-194.
- KOSHITA, Y. & TAKAHARA, T. 2004. Effect of water stress on flower-bud formation and plant hormone content of 'Satsuma' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Scientia Horticulturae* 99: 301-307.
- LÉCHAUDEL, M.; GÉNARD, M.; LESCOURET, F.; URBAN, L. & JANNOYER, M. 2005. Modeling effects of weather source-sink relationships on mango fruit growth. *Tree Physiology* 25: 583-597.
- LEDO, A.S.; LEDO, F.J.S.; RITZINGER, R. & DA CUNHA SOBRINHO, A.P. 1999. Porta-enxertos para laranjeiras-doces (*Citrus sinensis* (L.) Osb.), em Rio Branco, Acre. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34: 1211-1216
- LEGAZ, F.; SERNA, M.D. & PRIMO-MILLO, E. 1995. Mobilization of the reserve N in *Citrus*. *Plant and Soil* 173: 205-210.
- LI, C.Y.; WEISS, D. & GOLDSCHMIDT, E.E. 2003a. Effects of carbohydrate starvation on gene expression in *citrus* root. *Planta* 217: 11–20.
- LI, C.Y.; WEISS, D. & GOLDSCHMIDT, E.E. 2003b. Girdling affects carbohydrate-related gene expression in leaves, bark and roots of alternate bearing *citrus* trees. *Annals of Botany* 92: 137-143.

- LILLO, C. 1984. Diurnal variation of nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in barley leaves. *Physiologia Plantarum* 61: 214-218.
- LOVATT, C.J.; ZHENG, Y. & HAKE, K.D. 1988. Demonstration of a change in nitrogen metabolism influencing flower initiation in *citrus*. *Israel Journal of Botany* 37: 181-188.
- MACHADO, E.C.; MEDINA, C.L.; GOMES, M.M.A. & G. HABERMANN. 2002. Variação sazonal da fotossíntese, condutância estomática e potencial da água na folha de laranjeira ‘Valência’. *Scientia Agricola*, 59: 53-58.
- MACHADO, E.C.; SCHMIDT, P.T.; MEDINA, C.L. & RIBEIRO, R.V. 2005. Respostas da fotossíntese de três espécies de citros a fatores ambientais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40: 1161-1170.
- MACHADO, D.F.S.P. 2009. A resposta da fotossíntese à baixa temperatura noturna em laranjeira ‘Valência’ é dependente do porta-enxerto. Dissertação (Mestrado). Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, São Paulo. 58 p.
- MACHADO, D.F.S.P.; MACHADO, E.C.; MACHADO, R.S. & RIBEIRO, R.V. 2010. Efeito da baixa temperatura noturna e do porta-enxerto na variação diurna das trocas gasosas e na atividade fotoquímica de laranjeira ‘Valência’. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32 (2): 351-359.
- MAGALHÃES FILHO, J.R.; MACHADO, E.C.; MACHADO, D.F.S.P.; RAMOS, R.A.; RIBEIRO, R.V. 2009. Variação da temperatura do substrato e fotossíntese em mudas de laranjeira ‘Valência’. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44: 1118-1126.
- MAKITA, N.; HIRANO, Y.; DANNOURA, M.; KOMINAMI, Y.; MIZOGUCHI, T.; ISHII, Y. & KANAZAWA, Y. 2009. Fine root morphological traits determine variation in root respiration of *Quercus serrata*. *Tree Physiology* 29: 579–585.
- MARTÍNEZ-FUENTES, A.; MESEJO, C.; REIG, C. & AGUSTÍ, M. 2010. Timing of the inhibitory effect of fruit on return bloom of ‘Valencia’ sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 1936-1943.
- MATT, P.; KRAPP, A.; HAAKE, V.; MOCK, H.P. & STITT, M. 2002. Decreased Rubisco activity leads to dramatic changes of nitrate metabolism, amino acid metabolism and the levels of

- phenylpropanoids and nicotine in tobacco antisense RBCS transformants. *Plant Journal* 30: 663-677.
- MATTOS JR., D., GRAETZ, D.A. & ALVA, A.K. 2003a. Biomass distribution and nitrogen<sup>-15</sup> partitioning in citrus trees on a sandy entisol. *Soil Science Society of America Journal*, 67:555-563.
- MATTOS JR., D., QUAGGIO, J.A.; CANTARELLA, H. & ALVA, A.K. 2003b. Nutrient content of biomass components of 'Hamlin' sweet orange trees. *Scientia Agricola*, 60: 155-160.
- MEDINA, C.L.; SOUZA, R.P.; MACHADO, E.C.; RIBEIRO, R.V.; SILVA, J.A.B. 2002. Photosynthetic response of citrus grown under reflective aluminized polypropylene shading nets. *Scientia Horticulturae*, 96: 115-125.
- MEDINA, C.L.; RENA, A.B.; SIQUEIRA, D.L. & MACHADO, E.C. 2005. Fisiologia dos citros. In: Citros. MATTOS JR., D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). Campinas: Instituto Agronômico; Fundag. Pág 174-195.
- MENINO, M.R.; CARRANCA, C.; VARENNES, A. DE; D'ALMEIDA, V.V. & BAETA, J. 2003. Tree size and flowering intensity as affected by nitrogen fertilization in non-bearing orange trees grown under mediterranean conditions. *Journal of Plant Physiology* 160: 1435-1440.
- MIN, X.; SIDDIQI, M.Y.; GUY, R.D.; GLASS, A.D.M. & KRONZUCKER, H.J. 1998. Induction of nitrate uptake and nitrate reductase activity in trembling aspen and lodgepole pine. *Plant, Cell and Environment* 21: 1039-1046.
- MONSELISE, S.P. & GOLDSCHMIDT, E.E. 1982. Alternate bearing in fruits trees. *Horticultural Reviews* 4: 128-173.
- MONSELISE, S.P. 1985. Citrus and related genera. In: MONSELISE, S.P. (ed). *Handbook of flowering*. Boca Raton, Florida: CRC Press, p: 275-294.
- MONSELISE, S.P. 1986. Citrus. In: MONSELISE, S.P. (Ed.). *Handbook of fruit set and development*. Boca Raton, Florida: CRC Press, p: 87-108.
- MORENO, J. & GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L. 1983. Seasonal variation of nitrogenous compounds in the xilem sap of *citrus*. *Physiologia Plantarum* 59: 669-675.

- MORENO, J. & GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L. 1984. Nitrogen accumulation and mobilization in *citrus* leaves throughout the annual cycle. *Physiologia Plantarum* 61: 629-634.
- MUÑOZ-FAMBUENA, N.; MESEJO, C.; GONZÁLEZ-MAS, M.C.; PRIMO-MILLO, E.; AGUSTÍ, M. & IGLESIAS, D.J. 2011. Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Annals of Botany* 108: 511–519.
- NAKANO, H.; MURAMATSU, S.; MAKINO, A. & MAE, T. 2000. Relationship between the suppression of photosynthesis and starch accumulation in the pod-removed bean. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 167-173.
- NEBAUER, S.; AVILA, C.; GARCÍA-LUIS, A. & GUARDIOLA, J.L. 2006. Seasonal variation in the competence of the buds of three cultivars from different *citrus* species to flower. *Trees* 20: 507-514.
- NELSON, D. W. & SOMMERS, L. E. 1973. Determination of total nitrogen in plant material. *Agronomy Journal* 65: 109–112.
- NEVES, C.S.V.J.; MURATA, I.M.; STENZEL, N.M.C.; MEDINA, C.C.; BORGES, A.B.; OKUMOTO, S.H., HUO, R.; LEE, C. & KANAI, H.T. 2004. Root distribution of rootstocks for 'Tahiti' lime. *Scientia Agrícola* 61: 94-99.
- NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; PEREIRA, F.C.; KALAKI, R.B. 2010. O Retrato da Citricultura Brasileira. Marcos Fava Neves (Ed.). Ribeirão Preto, SP, 137 p.
- NISHIKAWA, F.; ENDO, T.; SHIMADA, T.; FUJII, H.; SHIMIZU, T.; OMURA, M. & IKOMA, Y. 2007. Increased CiFT abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in 'Satsuma' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Journal of Experimental Botany*, 58: 3915-3927.
- NISHIKAWA, F.; ENDO, T.; SHIMADA, T.; FUJII, H.; SHIMIZU, T. & OMURA, M. 2009. Differences in seasonal expression of flowering genes between deciduous trifoliolate orange and evergreen 'Satsuma' mandarin. *Tree Physiology* 29: 921–926.
- O'HARE, T.J. & TURNBULL, C.G.N. 2004. Root growth, cytokinin and shoot dormancy in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *Scientia Horticulturae* 102: 257-266.

- PARK, S.J. 2011. Dry weight and carbohydrate distribution in different tree parts of affected by various fruit-loads of young persimmon and their effect on new growth in the next season. *Scientia Horticulturae* 130: 732-736.
- PEREIRA, I.A.M.; PINTO, J.E.B.P. & DAVIDE, L.C. 2003. Época da indução e evocação floral em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pêra Rio. *Ciência Rural* 33: 857-862.
- PIMENTEL. 1998. Metabolismo de carbono na agricultura tropical. Edur, Editora Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Ed.) Seropédica: EDUR. 150 p.
- PIMENTEL, C.; BERNACCHI, C. & LONG, S. 2007. Limitations to photosynthesis at different temperatures in the leaves of *Citrus limon*. *Brazilian Journal of Planta Physiology* 19: 141-147.
- PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S. & CARDOSO, S.A.B. 2005. Variedades de copa. In: Citros. MATTOS, JR.D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag. p. 37-60.
- POMPEU JR., J. 2005. Capítulo 4: Porta-enxertos. In: Citros. MATTOS JR., D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JR., J. (Ed.). Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag. p. 63-94.
- PRADO, A.K.S.; MACHADO, E.C.; MEDINA, C.L.; MACHADO, D.F.S.P.; MAZZAFERA, P. 2007. Florescimento e frutificação em laranjeiras ‘Valência’ com diferentes cargas de frutos e submetidas ou não à irrigação. *Bragantia* 66: 173-182.
- PREGITZER, K.S.; LASKOWSKI, M.J.; BURTON, A.J.; LESSARD, V.C. & ZAK, D.R. 1998. Variation in sugar maple root respiration with root diameter and soil depth. *Tree Physiology* 18: 665-670.
- PURCINO, R.P.; MEDINA, C.L.; SOUZA, D.M.; WINCK, F.V.; MACHADO, E.C.; NOVELLO, J.C.; MACHADO, M.A. & MAZZAFERA, P. 2007. Xylella fastidiosa disturbs nitrogen metabolism and causes a stress response in sweet orange *Citrus sinensis* cv. Pêra. *Journal of Experimental Botany*, 58: 2733–2744.
- QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; BLUMER, S. 2005. Morfologia dos citros. In: Citros. MATTOS JR., D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JR., J. (Ed.). Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag. p. 106-122.

- RAMOS, R.A.; RIBEIRO, R.F.; MACHADO, E.C. & MACHADO, R.S. 2010. Variação sazonal do crescimento vegetativo de laranjeiras Hamlin enxertadas em citrumeleiro Swingle no município de Limeira, Estado de São Paulo. *Acta Scientiarum*, 32: 539-545.
- REIG, C.; GONZÁLEZ-ROSSIA, D.; JUAN, M. & AGUSTÍ, M. 2006. Effects of fruit load on flower bud initiation and development in peach. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 81: 1079-1085.
- REIS, A.R.; FAVARIN, J.L.; GALLO, L.A.; MALAVOLTA, E.; MORAES, M.F. & LAVRES J.J. 2009. Nitrate reductase and the glutamine synthetase activity in coffee leaves during fruit development. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 33: 315-324.
- REUTHER, W. 1973. Climate and *Citrus* behavior. In: The citrus industry. Ed. W. Reuther. University California Press, Berkeley. Vol 3 – Chap 9, p. 280-337.
- RHODES, D.; RENDON, G.A. & STEWART, G.R. 1975. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. *Planta*, 125: 201-211.
- RIBEIRO, R.V. 2006. Variação sazonal da fotossíntese e relações hídricas de laranjeira ‘Valência’. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo. 157 p.
- RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C. & BRUNINI, O. 2006. Ocorrência de condições ambientais para a indução do florescimento de laranjeiras no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Fruticultura* 28: 247-253.
- RIBEIRO, R.V. & MACHADO, E.C. 2007. Some aspects of citrus ecophysiology in subtropical climates: re-visiting photosynthesis under natural conditions. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19: 393-411.
- RIBEIRO, R.V.; ROLIM, G.S.; AZEVEDO, F.A.; MACHADO, E.C. 2008. ‘Valencia’ sweet orange tree flowering evaluation under field conditions. *Scientia Agrícola* 65: 389-396.
- RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; SANTOS, M.G. & OLIVEIRA, R.F. 2009. Seasonal and diurnal changes in photosynthetic limitation of young citrus sweet orange trees. *Environmental and Experimental Botany* 66: 203-211.

- RIBEIRO, R.V., MACHADO, E.C.; HABERMANN, G.; SANTOS, M.G. & OLIVEIRA, R.F. 2012. Seasonal effects on the relationship between photosynthesis and leaf carbohydrates in orange trees. *Functional Plant Biology*, <http://dx.doi.org/10.1071/FP11277>
- ROITSCH, T. & GONZÁLEZ, M.C. 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* 9: 605-613.
- RUIZ, R.; GARCÍA-LUIS, A., MONERRI, C. & GUARDIOLA, J.L. 2001. Carbohydrate availability in relation to fruitlet abscission in *citrus*. *Annals of botany* 87: 805-812.
- SAGEE, O. & LOVATT, C.J. 1991. Putrescine content parallels ammonia and arginine metabolism in developing flowers of the 'Washington' navel orange. *Journal of American Society for Horticultural Science* 116:280-285.
- SÁNCHEZ, E.; ÁVILA-QUEZADA, G.; GARDEA, A.A.; MUÑOZ, E.; RUIZ, J.M. & ROMERO, L. 2009. Nitrogen metabolism in roots and leaves of green bean plants exposed to different phosphorus doses. *PHYTON – International Journal of Experimental Botany* 78: 11-16.
- SANTOS, C.M.A. 2010. Respostas da fotossíntese à variação da temperatura do ar e das raízes em mudas de laranjeiras 'Valência'. Dissertação (Mestrado). Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, São Paulo. 51 p.
- SANTOS, C.M.A. ; RIBEIRO, R.V. ; MAGALHÃES FILHO, J.R. ; MACHADO, D. F. S. P. & MACHADO, E. C., 2011 . Low substrate temperature imposes higher limitation to photosynthesis of orange plants as compared to atmospheric chilling. *Photosynthetica* 49:546-554.
- SANZ, A.; MONERRI, C.; GONZÁLEZ-FERRER, J. & GUARDIOLA, J.L. 1987. Changes in carbohydrate and mineral elements in *citrus* leaves during flowering and fruit set. *Physiologia Plantarum* 69: 93-98.
- SCHOLBERG, J.M.S; PARSONS, L.R.; WHEATON, T.A.; MCNEAL, B.L. & MORGAN, K.T. 2002. Soil temperature, nitrogen concentration, and residence time affect nitrogen uptake efficiency in *Citrus*. *Journal of Environmental Quality* 31:759-768.
- SEKITA, M.C. 2008. Floração de laranjeira 'Valência' com variação de carga pendente. Dissertação (Mestrado). Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, São Paulo. 36 p.

- SILVEIRA, J.A.G.; MARTINS, M.O.; LIMA, A.B. & FERREIRA-SILVA, S. 2010. Redução de nitrato e assimilação da amônia em sistemas vegetais: mensuração de atividade enzimática e metabólitos. In: Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais. Figueiredo, M.V.B.; Burity H.A.; Oliveira, J.P; Santos, C.E.R.S.; Stamford, N.P. - Brasília, DF; Embrapa Informação Tecnológica – Recife, PE & Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) (Eds.). p 93-124.
- SOUTHWICK, S.M. & T.L. DAVENPORT. 1986. Characterization of water stress and low temperature effects on flower induction in *Citrus*. *Plant Physiology* 81: 26-29.
- SPIEGEL-ROY, P. & GOLDSCHMIDT, E.E. 1996. *Biology of citrus*. Cambridge: Cambridge, University Press. 230 pág.
- STURM, A. 1999. Invertases. Primary Structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology*, 121: 1–7.
- SUZUKI, A.; JACQUOT, J.P & GADAL, P. 1983. Glutamate synthase in rice roots. Studies on the electron donor specificity. *Phytochemistry*, 22: 1543-1546.
- SYVERTSEN, J.P.; GOÑI, C. & OTERO, A. 2003. Fruit load and canopy shading affect leaf characteristics and net gas exchange of ‘Spring’ navel orange trees. *Tree Physiology* 23: 899-906.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 2009. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 719 p.
- TOURNAIRE-ROUX, C.; SUTKA, M.; JAVOT, H.; GOUT, E.; GERBEAU, P.; LUU, D.T.; BLIGNY, R.; MAUREL, C. 2003. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature*, 425: 393-397.
- URBAN, L.; LÉCHAUDEL, M. & LU, P. 2004. Effect of fruit load and girdling on leaf photosynthesis in *Mangifera indica* L. *Journal of Experimental Botany* 55: 2075-2085.
- URBAN, L.; JEGOUZO, L.; DAMOUR, G.; VANDAME, M. & FRANÇOIS, C. 2008. Interpreting the decrease in leaf photosynthesis during flowering in mango. *Tree Physiology* 28: 1025-1036.
- VESELOVA, S.V.; FARHUTDINOV, R.G.; VESELOV, S.Y; KUDOYAROVA, G.R.; VESELOV, D.S.; HARTUNG, W. 2005. The effect of root cooling on hormone content, leaf conductance and

- root hydraulic conductivity of durum wheat seedlings (*Triticum durum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 162: 21-16.
- VU, J.C.V.; YELENOSKY, G. & BAUSHER, M.G. 1985. Photosynthetic activity in the flower buds of 'Valência' orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck). *Plant Physiology* 78: 420-423.
- XU, Z.Z. & ZHOU, G.S. 2006. Nitrogen metabolism and photosynthesis in *Leymus chinensis* in response to long-term soil drought. *Journal of Plant Growth Regulation* 25:252–266.
- YAHATA, D.; MATSUMOTO, K. & USHIJIMA, K. 2004. Relationship between flower-bud differentiation and carbohydrate contents in spring shoots of very-early, early and late maturing cultivars of 'Satsuma' mandarin. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 73: 405-410.
- YAMANISHI, 1994. Effect of spring day/night temperature on flower development, fruit set and fruit quality on strangulated Pummelo trees. Return bloom, fruit quality and yield of pommelo trees grown in a plastic house. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 63:493-504.
- YAMAYA, T.; HAYAKAWA, T.; TANASAWA, K.; KAMACHI, K.; MAE, T. & OJIMA, K. 1992. Tissue distribution of glutamate synthase and glutamine synthetase in rice leaves. *Plant Physiology* 100: 1427-1432.
- YEMM, E. W. & COCKING, E.C. 1955. The determination of aminoacid with ninhydrin. *Analyst*, London, v. 80, p. 209-213.
- YU, X.; WANG, B.; ZHANG, C.; XU, W.; HE, J.; ZHU, L. & WANG, S. 2012. Effect of root restriction on nitrogen levels and glutamine synthetase activity in 'Kyoho' grapevines. *Scientia Horticulturae* 137: 156-163.

## 7. ANEXOS

### Anexo 1

Análise de variância da área foliar total (Área foliar) e de área de folhas novas (Área foliar novas) formadas na brotação de dezembro 09-Janeiro 10, massa seca total de folhas e diâmetro do tronco em laranjeira Valência sobre limoeiro 'Cravo', em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD), nos estádios fenológicos avaliados. Onde: G.L. indica graus de liberdade; Q.M., quadrados médios; %V.E., porcentagem da variabilidade explicada; <sup>ns</sup>, não significativo, \* e \*\* diferença estatística para  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente.

Fonte de variação	Área foliar			Área foliar nova		Massa seca folhas		Diâmetro tronco	
	G.L.	Q.M.	% V.E.	Q.M.	%V.E.	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.
Estádio Fenológico (A)	5	0,513		9,185 **	37,1	194.059 **	67,5	9,30	
<i>Resíduo a</i>	10	0,854		1,599		16.231	7,4	7,39	
Tratamento (B)	1	1,676 *	6,6	3,864 *	4,8	105.777 **		43,31 **	18,6
A x B	5	1,736 **	34,0	0,852		12.951		3,25	
<i>Resíduo b</i>	14	0,363		0,750		9.542		3,74	
Total/Média geral	35	5,06		7,87		823,2		47,22	
CV1%		18,2 %		16,0 %		15,5 %		5,8	
CV2%		11,9 %		11,0 %		11,9 %		4,1	

## Anexo 2

Cálculo estimativo da produção e consumo máximo de assimilados pelas flores no momento de plena floração em laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD).

	<sup>1</sup> $A_d$ mmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup>	Área F.madura m <sup>2</sup>	Produção F. madura mmol CO <sub>2</sub> pl <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	Área F.velha m <sup>2</sup>	Produção F.velha mmol CO <sub>2</sub> pl <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	Total mmol CO <sub>2</sub> pl <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>
PCD	202,2	5,53	1071,7	1,05	(202,2*0,4) = 80,9	1152,6
PSD	196,1	4,70	921,7	2,27	(196,1*0,4) = 78,4	1000,1

<sup>1</sup> Onde  $A_d$  = assimilação diária de CO<sub>2</sub>

### Anexo 3

Análise de variância para a massa seca dos ramos do último fluxo de crescimento (MS último fluxo), dos ramos velhos (MS ramos velhos) e da massa seca de raiz de laranjeira Valência sobre limoeiro ‘Cravo’, em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD), nos estádios fenológicos avaliados. Onde: G.L. indica graus de liberdade; Q.M., quadrados médios; %V.E., porcentagem da variabilidade explicada; <sup>ns</sup>, não significativo, \* e \*\* diferença estatística para p<0,05 e p<0,01, respectivamente.

Fonte de variação	MS último fluxo			MS ramos velhos		MS raizes	
	G.L.	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.
Estádio Fenológico (A)	5	11875,4		261813,0 *	50,5 %	1720904,8	
<i>Resíduo a</i>	10	5220,7		59197,0		2188797,7	
Tratamento (B)	1	7502,7		312760,0**	12,1 %	770199,0	
A x B	5	5232,5		37840,0		1244274,6	
<i>Resíduo b</i>	14	2678,4		13509,0		844804,2	
Total/Média geral	35	240,0		1700,4		4212,1	
CV1%		30,1		14,3		35,1	
CV2%		21,6		6,8		21,8	

#### Anexo 4

Análise de variância para concentração de açúcares totais, açúcares redutores, sacarose e amido em folhas de laranjeira Valência sobre limoeiro 'Cravo', coletadas às 13:00 h, em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD), nos estádios fenológicos avaliados. Onde: G.L. indica graus de liberdade; Q.M., quadrados médios; % V.E., porcentagem da variabilidade explicada; <sup>ns</sup>, não significativo, \* e \*\* diferença estatística para p<0,05 e p<0,01, respectivamente.

Fonte de variação	Açúcares totais			Açúcares redutores		Sacarose		Amido	
	G.L	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% VE.
Estádio Fenológico (A)	7	5841,1 **	64,1	4207,7 **	69,6	664,9 **	69,2	4006,9 **	81,7
<i>Resíduo a</i>	21	322,1		207,4		38,9		109,5	
Tratamento (B)	1	2231,6 **	3,73	1795,2 **	4,25	117,7 <sup>ns</sup>		35,8 <sup>ns</sup>	
A x B	7	678,6 <sup>ns</sup>		328,2 <sup>ns</sup>		53,11 <sup>ns</sup>		253,3 *	5,16
<i>Resíduo b</i>	24	291,4		171,0		31,4		78,1	
Total/Média geral	63	116,7		61,6		29,3		28,8	
CV1%		15,4%		23,4%		21,3%		40,5%	
CV2%		14,6%		21,2%		19,1%		34,2%	

## Anexo 5

Análise de variância para concentração de açúcares totais, açúcares redutores, sacarose e amido em dois tipos de ramos (diferentes idades) de laranjeira Valência sobre limoeiro ‘Cravo’, coletados às 09:00 h, em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste (PSD), nos estádios fenológicos avaliados. Onde: G.L. indica graus de liberdade; Q.M., quadrados médios; %V.E., porcentagem da variabilidade explicada; <sup>ns</sup>, não significativo, \* e \*\* diferença estatística para  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente.

Fonte de variação	Açúcares totais		Açúcares redutores		Sacarose		Amido		
	G.L	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.
Estádio Fenológico (A)	4	2418,3 **	37,9	502,4 <sup>ns</sup>		91,0 **	26,9	1345,7 **	46,0
<i>Resíduo a</i>	8	167,7		184,5		8,9		85,3	
Tipo ramo (B)	1	577,8 <sup>ns</sup>		1327,2 **	9,41	125,4 *	9,3	1,43 <sup>ns</sup>	
A x B	4	664,2 <sup>ns</sup>		1170,0 **	33,0	91,9 *	27,2	308,2 *	10,5
<i>Resíduo b</i>	10	222,3		123,1		15,5		61,01	
Tratamento (C)	1	3006,6 **	11,8	76,9 <sup>ns</sup>		5,1 <sup>ns</sup>		1919,8 **	16,4
A x C	4	386,1 <sup>ns</sup>		71,9 <sup>ns</sup>		0,11 <sup>ns</sup>		184,5 **	6,3
B x C	1	154,1 <sup>ns</sup>		419,4 <sup>ns</sup>		0,42 <sup>ns</sup>		76,0 <sup>ns</sup>	
<i>Resíduo c</i>	26	167,5		101,7		10,1		41,0	
Total/Média geral	59	77,2		36,8		14,7		25,6	
CV1%		16,8%		36,9%		20,2%		36,0%	
CV2%		19,3%		30,1%		26,7%		30,4%	
CV3%		16,8%		27,4%		21,6%		24,9%	

## Anexo 6

Análise de variância para concentração de açúcares totais, açúcares redutores, sacarose e amido em raízes de quatro tipos (diferentes tamanhos) de laranja Valência sobre limoeiro ‘Cravo’, coletados às 09:00 h, em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste (PSD), nos estádios fenológicos avaliados. Onde: G.L. indica graus de liberdade; Q.M., quadrados médios; %V.E., porcentagem da variabilidade explicada; <sup>ns</sup>, não significativo, \* e \*\* diferença estatística para p<0,05 e p<0,01, respectivamente.

Fonte de variação	Açúcares totais		Açúcares redutores		Sacarose		Amido		
	G.L.	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.
Estádio Fenológico (A)	4	12222,4 *	19,2	1984,4 *	11,1	240,4 <sup>ns</sup>		6658,3 **	20,0
<i>Resíduo a</i>	8	1848,0		316,8		58,9		895,5	
Tipo raiz (B)	3	39973,8 **	47,2	9349,8 **	40,4	200,3 <sup>ns</sup>		19854,4 **	44,7
A x B	12	1355,1 *	6,4	992,5 **	17,2	116,0 <sup>ns</sup>		791,4 **	7,1
<i>Resíduo b</i>	30	513,8		214,2		46,0		263,4	
Tratamento (C)	1	348,8 <sup>ns</sup>		393,9 <sup>ns</sup>		36,8 <sup>ns</sup>		1988,0 *	1,5
A x C	4	965,9 <sup>ns</sup>		519,2 *	3,0	90,6 <sup>ns</sup>		273,7 <sup>ns</sup>	
B x C	3	320,7 <sup>ns</sup>		83,2 <sup>ns</sup>		38,1 <sup>ns</sup>		166,9 <sup>ns</sup>	
<i>Resíduo c</i>	54	625,5		185,8		59,2		348,9	
Total/Média geral	119	124,7		36,1		24,7		63,8	
CV1%		34,5%		49,3%		31,0%		46,9	
CV2%		18,2%		40,5%		27,4%		25,4	
CV3%		20,1%		37,7%		31,1%		29,2	

### Anexo 7

Análise de variância para concentração de nitrogênio total, nitrato solúvel, proteína total e aminoácidos livres totais em folhas de laranja 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo', coletadas às 13:00 h, em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste (PSD), nos estádios fenológicos avaliados. Onde: G.L. indica graus de liberdade; Q.M., quadrados médios; %V.E., porcentagem da variabilidade explicada; <sup>ns</sup> não significativo, \* e \*\* diferença estatística para p<0,05 e p<0,01, respectivamente.

Fonte de variação	N <sup>Total</sup> g kg <sup>-1</sup>			N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> μmol NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> g <sup>-1</sup> MS		Proteína Total μmol BSA g <sup>-1</sup> MF		Aminoácidos Livres μmol leucina g <sup>-1</sup> MS	
	G.L.	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.
Estádio Fenológico (A)	7	85,9 **	55,4	404,2 **	36,5	150,2 **	54,3	1745,5 **	43,6
<i>Resíduo a</i>	21	9,4		40,7		11,3		378,0	
Tratamento (B)	1	1,1		818,3 **	10,5	116,0 **	6,0	717,7	2,6
A x B	7	19,4 **	12,5	220,7 **	19,9	34,2 *	12,4	311,2	
<i>Resíduo b</i>	27	5,6		63,2		10,8		183,6	
Total/Média geral	63	23,2		29,9		14,7		105,5	
CV1%		10,2		21,4		22,8		18,4	
CV2%		10,2		26,6		22,3		12,8	

## Anexo 8

Análise de variância para concentração de nitrogênio total em dois tipos de raízes (diferentes tamanhos) de laranjeira Valência, em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD), nos estádios fenológicos avaliados. Onde: G.L. indica graus de liberdade; Q.M., quadrados médios; %V.E., porcentagem da variabilidade explicada; <sup>ns</sup>, não significativo, \* e \*\* diferença estatística para  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente

Fonte de variação	Raízes		
	G.L.	Q.M.	% V.E.
Estádio Fenológico (A)	3	42,0 **	22,0
<i>Resíduo a</i>	6	1,16	
Tipo de amostra (B)	1	413,86 **	54,1
A x B	3	8,97	
<i>Resíduo b</i>	8	5,27	
Tratamento (C)	1	1,09	
A x C	3	3,30	
B x C	1	3,08	
<i>Resíduo c</i>	21	2,36	
Total/Média geral		10,3	
CV1%		10,4	
CV2%		22,2	
CV3%		14,8	

Análise de variância para concentração de nitrogênio total em raízes de primeira ordem e maiores que 10 mm de diâmetro de laranja Valência, em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD), nos estádios fenológicos avaliados. Onde: G.L. indica graus de liberdade; Q.M., quadrados médios; %V.E., porcentagem da variabilidade explicada; <sup>ns</sup>, não significativo, \* e \*\* diferença estatística para p<0,05 e p<0,01, respectivamente.

Fonte de variação	Raízes primeira ordem			Raízes maiores 10 mm		
	G.L	Q.M.	% V.E.	G.L	Q.M.	% V.E.
Estádio Fenológico (A)	5	25,6 **	41,5	4	19,2 **	61,7
<i>Resíduo a</i>	10	3,1		8	0,8	
Tratamento (B)	1	3,3		1	0,25	
A x B	5	19,5 **	31,6	4	0,5	
<i>Resíduo b</i>	14	3,5		12	3,4	
Total/Média geral	35	12,9		29	7,7	
CV%		14,5			24,0	

## Anexo 9

Análise de variância para concentração de nitrato solúvel, proteína total e aminoácidos livres totais em raízes de primeira ordem de laranjeira Valência, coletadas às 13:00 h, em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD), nos estádios fenológicos avaliados. Onde: G.L. indica graus de liberdade; Q.M., quadrados médios; %V.E., porcentagem da variabilidade explicada; <sup>ns</sup>, não significativo, \* e \*\* diferença estatística para p<0,05 e p<0,01, respectivamente

Fonte de variação	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> μmol NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> g <sup>-1</sup> MS			Proteína Total μmol BSA g <sup>-1</sup> MF		Aminoácidos Livres μmol leucina g <sup>-1</sup> MS	
	G.L.	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.
Estádio Fenológico (A)	5	12093,5 **	62,5	5,54 **	59,9	2040,5 **	37,0
<i>Resíduo a</i>	10	334,5		0,35		181,9	
Tratamento (B)	1	466,7		0,01		897,6	
A x B	5	5629,8 **	29,1	1,01		2395,0 **	43,4
<i>Resíduo b</i>	13	326,2		0,77		207,4	
Total/Média geral	34	49,6		1,94		60,0	
CV1%		36,8		30,4		22,5	
CV2%		36,4		45,3		24,0	

### Anexo 10

Análise de variância para atividade das enzimas redutase do nitrato (RN), glutamine sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) em folhas de laranjeira Valência sobre limoeiro ‘Cravo’, coletadas às 13:00 h, em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste (PSD), nos estádios fenológicos avaliados. Onde: G.L. indica graus de liberdade; Q.M., quadrados médios; %V.E., porcentagem da variabilidade explicada; <sup>ns</sup>, não significativo, \* e \*\* diferença estatística para p<0,05 e p<0,01, respectivamente.

Fonte de variação	Redutase do nitrato $\mu\text{mol NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$			Glutamine sintetase $\mu\text{mol Glu-Hidrox g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$		Glutamato sintase $\mu\text{mol NADH g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$	
	G.L	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.
Estádio Fenológico (A)	7	0,789 **	59,8	2130,9 **	66,1	125,7 **	48,1
<i>Resíduo a</i>	21	0,043		166,7		13,3	
Tratamento (B)	1	0,030		159,2		2,8	
A x B	7	0,1248		224,9 *	7,0	15,8	
<i>Resíduo b</i>	27	0,0703		88,9		20,6	
Total/Média geral	63	0,376		28,8		13,4	
CV1%		55,3		44,9		27,1	
CV2%		70,5		32,8		33,7	

## Anexo 11

Análise de variância para atividade das enzimas redutase do nitrato (RN), glutamine sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) em raízes de primeira ordem em laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’, coletadas às 13:00 h, em plantas com desbaste total de frutos em 14 de maio de 2009 (PCD) e plantas sem desbaste de frutos (PSD), nos estádios fenológicos avaliados. Onde: G.L. indica graus de liberdade; Q.M., quadrados médios; %V.E., porcentagem da variabilidade explicada; <sup>ns</sup>, não significativo, \* e \*\* diferença estatística para p<0,05 e p<0,01, respectivamente

Fonte de variação	G.L.	Redutase do nitrato		Glutamine sintetase		Glutamato sintase	
		Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.	Q.M.	% V.E.
Estádio Fenológico (A)	5	6,6 x 10 <sup>-4</sup>		18,10 **	61,0	16,61	
<i>Resíduo a</i>	10	4,6 x 10 <sup>-4</sup>		1,69		8,21	
Tratamento (B)	1	2,0 x 10 <sup>-4</sup>		1,72		0,16	
A x B	5	6,8 x 10 <sup>-5</sup>		3,80		7,44	
<i>Resíduo b</i>	13	1,9 x 10 <sup>-4</sup>		1,55		4,65	
Total/Média geral	34	0,067		5,83		6,62	
CV1%		32,3		22,3		43,3	
CV2%		20,8		21,4		32,6	