

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



OSMOPROTEÇÃO, EXPRESSÃO GÊNICA E FLUXO DE SEIVA EM
COMBINAÇÃO COPA/PORTA-ENXERTO DE PLANTAS DE CITROS
SUBMETIDAS À DESIDRATAÇÃO/REIDRATAÇÃO EM CONDIÇÕES
DE CAMPO

TAINÃ FERNANDA OLIVEIRA ALVES

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Abril de 2020

TAINÃ FERNANDA OLIVEIRA ALVES

**OSMOPROTEÇÃO, EXPRESSÃO GÊNICA E FLUXO DE SEIVA EM
COMBINAÇÃO COPA/PORTA-ENXERTO DE PLANTAS DE CITROS
SUBMETIDAS À DESIDRATAÇÃO/REIDRATAÇÃO EM CONDIÇÕES
DE CAMPO**

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

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Abril de 2020

A474

Alves, Tainã Fernanda Oliveira.

Osmoproteção, expressão gênica e fluxo de seiva em combinação copa/porta-enxerto de plantas de citros submetidas à desidratação/reidratação em condições de campo / Tainã Fernanda Oliveira Alves. – Ilhéus, BA: UESC, 2020.

xviii, 81 f. : il.

Orientador: Alex-Alan Furtado de Almeida.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências.

1. Cítricos. 2. Estresse hídrico. 3. Carboidratos. 4. Aminoácidos. 5. Expressão gênica. I. Título.

CDD 634.3

TAINÃ FERNANDA OLIVEIRA ALVES

**OSMOPROTEÇÃO, EXPRESSÃO GÊNICA E FLUXO DE SEIVA EM
COMBINAÇÃO COPA/PORTA-ENXERTO DE PLANTAS DE CITROS
SUBMETIDAS À DESIDRATAÇÃO/REIDRATAÇÃO EM CONDIÇÕES
DE CAMPO**

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

APROVADA: 26 de abril de 2019

Dra Bruna Carmo Rehem
(IFBA)

Dra Martielly Santana dos Santos
(UESC)

Dra Milena Amaral dos Santos
(UESC)

Dr. Fábio Pinto Gomes
(UESC)

Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida
(UESC - Orientador)

DEDICATÓRIA

A minha família por todo amor, carinho e apoio. Pelos abraços nas horas de agonia.
Pelas palavras de força e coragem. Pelos bons exemplos e por sempre acreditarem
em mim.

A vocês meu amor eterno e incondicional.

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo agradeço a Deus. Sei que esteve comigo em cada difícil passo dessa estrada. Que me amparou e carregou no colo nos momentos de angústia, tristeza e solidão. E que me deu força, clareza e discernimento para vencer cada uma das etapas dessa longa e complicada jornada. Obrigada senhor!

À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/Mandioca e Fruticultura, pela infraestrutura para execução do experimento em campo. E aos funcionários Jair e Reinaldo pelo auxílio durante o desenvolvimento do experimento.

Ao meu orientador, Profº Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida, pelos ensinamentos, paciência e boas conversas durante todos esses anos da minha formação.

Aos professores e coorientadores Dr. Carlos Priminho Pirovani, Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa, Dr. Abelmon da Silva Gesteira pelo suporte, apoio, paciência, conselhos e ensinamentos. Por me acolherem no meu momento mais difícil.

A vocês mestres meu eterno agradecimento, aprendi muito com cada um de vocês. Muito obrigada!

Aos colaboradores Profº Dr. Maurício Coelho Filho e Walter Soares pelo apoio.

Ao Profº Dr. Luciano Freschi pela colaboração na execução de análises.

A Drª. Márcia Christina da Silva Branco, pela amizade, paciência, parceria, consultoria, colaboração e todo tempo dedicado a mim. Serei eternamente grata.

A Drª. Ivanildes Conceição dos Santos, muito obrigada pelo auxílio e colaboração.

Aos amigos do grupo de Fisiologia Vegetal e do Centro de Biotecnologia e Genética e Centro de Microscopia Eletrônica por compartilharmos experiências e conhecimentos. Cada um de vocês deixou marcas em mim que lembrarei sempre com muito carinho.

À Fabrícia e Mara pelo empenho e comprometimento nas suas funções com os discentes do PPGGBM, saibam que vocês salvam vidas.

À minha família, pela dedicação, por ficar e estar sempre ao meu lado. Sem vocês nada seria e não chegaria a lugar algum. Meu amor eterno.

Aos amigos, cada um de vocês que por todos esses anos ouviram as minhas lamúrias, muitos que dividiram a mesma experiência, obrigada pelos abraços, pelas lágrimas choradas juntas, pelos risos divididos. As lembranças estarão para sempre em meu coração.

A todos os ANJOS que passaram na minha vida e que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Não importa como e quando, seja na hora da labuta no campo, no sofrimento dos dias de coleta, com um auxílio

na bancada, na compreensão de um protocolo, na análise de um dado, seja com um abraço apertado, enxugando uma lágrima, dando uma bronca e trazendo para a realidade seja com uma oração ou um pensamento bom e positivo em mim, meus mais sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xv
INTRODUÇÃO	19
REVISÃO DE LITERATURA	22
Citros	22
Interação copa/porta-enxerto	26
Respostas de plantas de citros à deficiência hídrica	28
O papel fisiológico do acúmulo de amido em plantas sob deficiência hídrica...	31
Osmoproteção	34
MATERIAIS E MÉTODOS	39
Material vegetal e condições de cultivo	39
Fluxo de seiva	41
Açúcares solúveis totais (AST) e Amido	42
Açúcares redutores por GC-MS	43
Prolina	43
Expressão gênica por qPCR	43
Análise estatística	45
RESULTADOS	47
Fluxo de seiva	47
Amido, Açúcares solúveis totais e Prolina	48
Expressão gênica	52
Análise multivariada	57
DISCUSSÃO.....	59

CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67

RESUMO

ALVES, Tainã Fernanda Oliveira Alves, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, abril de 2019. **Osmoproteção, expressão gênica e fluxo de seiva em combinação copa/porta-enxerto de plantas de citros submetidas à desidratação/reidratação em condições de campo.** Orientador: Alex-Alan Furtado de Almeida. Coorientadores: Abelmon da Silva Gesteira, Carlos Priminho Pirovani, Márcio Gilberto Cardoso Costa.

A deficiência hídrica no solo pode afetar importantes funções celulares, alterando a homeostase e induzindo o ajuste em todos os níveis metabólicos das plantas para responder ao fator estressor. *Citrus* apresentam alta diversidade genética e é uma das fruteiras de grande importância econômica e social no cenário mundial. A seleção de porta-enxertos com potencial diversificação e manutenção dos pomares de citros com resistência a deficiência hídrica e que mantenha uma alta produtividade é de fundamental importância para a citricultura. O estudo foi conduzido em condição de campo e avaliado o fluxo de seiva, os teores de carboidratos e prolina, bem como a expressão de genes envolvidos na biossíntese e degradação de carboidratos e na biossíntese de prolina em combinações copa/porta-enxerto de citros em resposta a um ciclo de desidratação/reidratação. O estudo foi conduzido em condição de campo e foram avaliadas as combinações [Limão 'cravo' (RL) enxertada em RL (RL/RL), Laranja Valência (VO) enxertada em RL (VO/RL), Tangerina Sunki 'Maravilha' (SM) enxertada em SM (SM/SM) e VO/SM. A diminuição do potencial hídrico do solo (Ψ_{ws}) e a combinação copa/porta-enxerto reduzem a velocidade total do fluxo de seiva tendo as combinações copa/porta-

enxerto resposta diferencial da taxa de fluxo quando submetidas à deficiência hídrica principalmente na combinação VO/SM enquanto a combinação VO/RL apresentou a menor variação entre o controle e o estresse. Observou-se o decréscimo nos teores de amido em folhas e raízes seguido de aumento nos teores de açúcares solúveis totais durante o processo de deficiência hídrica moderada e severa, principalmente em raízes da combinação VO/SM. Pode-se verificar que VO/SM exibiu menores teores de prolina em condições de deficiência hídrica severa em folhas e raízes utilizando como mecanismo preferencial de proteção o acúmulo de carboidratos simples ao invés de osmoproteção por acúmulo de prolina. As combinações com porta-enxerto RL apresentaram maiores teores de amido com maior expressão de genes associados à biossíntese e degradação de amido, principalmente nas raízes na combinação RL/RL. SM/SM exibiu maior expressão de genes ligados à biossíntese e degradação de sacarose nas raízes, ao passo que para as combinações RL/RL e VO/SM a maior expressão se verificou nas folhas. Em suma, os maiores teores de prolina bem como uma maior expressão dos genes de biossíntese de prolina foram combinações com o porta-enxerto RL e pode ser considerado como uma estratégia metabólica das plantas sob deficiência hídrica para a manutenção da homeostase celular. Em contrapartida, plantas com o porta-enxerto SM acumularam maiores teores de açúcares solúveis e a expressão do gene que catalisam a biossíntese de sacarose teve uma maior associação com os teores de açúcares.

Palavras-chave: *Citrus spp*, estresse hídrico, carboidratos, prolina, respostas moleculares.

ABSTRACT

ALVES, Tainã Fernanda Oliveira Alves, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, april 2019. Advisor: Alex-Alan Furtado de Almeida. **Osmoprotection, gene expression and sap flow in scion/rootstock combination of citrus plants submitted to dehydration/rehydration under field conditions.** Co-advisors: Abelmon da Silva Gesteira, Carlos Priminho Pirovani, Márcio Gilberto Cardoso Costa.

Drought in soil can affect important cellular functions by altering homeostasis and inducing plant adjustment at all metabolic levels to respond to stress. Citrus species have high genetic diversity and are the most important economic and social genus in the world scenario. The selection of rootstocks with potential diversification and maintenance of citrus orchards with resistance to stress and maintaining a high productivity is fundamental importance for citriculture. The aim of present work was evaluate the sap flow, carbohydrate and proline contents, as well as expression of genes involved in carbohydrate biosynthesis and degradation and proline biosynthesis in citrus scion/rootstock combinations submitted to a dehydration/rehydration cycle. The study was conducted under field conditions and the Rangpur lime (RL)/RL, Valencia Orange (VO)/RL Mandarina Sunki Maravilha (SM)/SM, and VO/SM combinations were evaluated. The decrease in soil water potential (Ψ_{ws}) and the scion/rootstock combination reduce total sap flow velocity, with scion/rootstock combinations presenting a differential response when submitted to water deficit mainly in combination VO/SM while VO/RL presents a least variation between control and stress. Decrease in starch contents in leaves and roots was

followed by increase in total soluble sugars contents during moderate and severe drought, especially in roots of VO/SM combination. VO/SM accumulated lower proline content in leaves and roots using as a preferential protection mechanism the accumulation of simple carbohydrates instead of osmoprotection by proline accumulation. Combinations with rootstock RL presents greater starch contents with higher gene expression associated with biosynthesis and starch degradation, especially in roots in RL/RL combination. SM/SM showed higher expression of genes linked to biosynthesis and degradation of sucrose in roots, whereas for the RL/RL and VO/SM highest expression occurred in leaves. In short, highest levels of proline as well as a greater expression of proline biosynthesis genes were combinations with rootstock RL and can be considered as a metabolic strategy of plants under water deficiency for the maintenance of cellular homeostasis. In contrast, plants with SM rootstock accumulated higher levels of soluble sugars and expression of gene that catalyzes sucrose biosynthesis had a greater association with levels of sugars.

Key words: *Citrus spp*, water stress, carbohydrates, proline, molecular responses.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Relação entre os diferentes tipos de <i>Citrus</i>	24
Figura 2 – Via de biossíntese e degradação do amido e sacarose em tecidos fonte e dreno.....	33
Figura 3 – Diagrama representativo do papel dos açúcares solúveis sob deficiência hídrica.....	36
Figura 4 – A) Esquema da via metabólica da biossíntese de prolina (Pro) a partir de glutamato (Glu) em plantas. GSA (<i>Glutamate semialdehyde</i>); P5C (<i>Pirroline-5-carboxylate</i>); P5CS (<i>Pirroline-5-carboxylate synthase</i>); P5CR (<i>Pirroline-5-carboxylate reductase</i>); P5CDH (<i>Pirroline-5-carboxylate dehydrogenase</i>); PDH (<i>Proline dehydrogenase</i>). B) Compartimentos celulares envolvidos no processo (Adaptado de Verbruggen e Hermans, 2008).....	38
Figura 5 – Radiação solar global (A), temperatura e umidade relativa (B) registrada durante o período de seca e coleta de plantas. Dados de intervalos em hora.....	42
Figura 6 – Variação do fluxo de seiva (SF) de quatro diferentes combinações copa/porta-enxerto de plantas de citros submetidas a quatro regimes hídricos. VO: Laranja Valência; RL: Limão Cravo; SM: Tangerina Sunki 'Maravilha'. Controle (C) ($\Psi_{WF} = - 0,1$ a $- 0,5$ MPa); Seca severa (D) ($\Psi_{WF} = - 1,5$ a $- 2,5$ MPa); Reidratação (48 h). Valores médios de quatro repetições técnicas. Dados médios de intervalos de 15 min.....	48
Figura 7 – Variação nos teores de amido e açúcares em diferentes combinações copa/porta-enxerto em folhas e raízes de citros submetidos a regimes de desidratação/reidratação. Amido (A e B), AST (C e D), sacarose (E e F), glicose (G e H) e frutose (I e J). VO: Laranja Valência, RL: Limão Cravo, SM: Tangerina Sunki 'Maravilha'. Controle (C) ($\Psi_{WF} = - 0,1$ a $- 0,5$ MPa), Estresse Moderado (MD) ($\Psi_{WF} = - 0,6$ a $- 1,5$ MPa), Estresse Severo (SD) ($\Psi_{WF} = - 1,6$ a $- 2,5$ MPa), Reidratação (R) após 48 h até que o solo atingisse a capacidade de campo. Letras maiúsculas	

comparam as médias entre as combinações copa/porta-enxerto para o mesmo regime hídrico e as letras minúsculas comparam as médias entre os regimes hídricos para as mesmas combinações copa/porta-enxerto. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Valores médios de quatro réplicas biológicas e oito repetições técnicas $\pm$ EP..... 50

Figura 8 – Teores de prolina em folhas e raízes das diferentes combinações copa/porta-enxerto de citros submetidos a regimes desidratação/reidratação. VO: Laranja Valência, RL: Limão Cravo, SM: Tangerina Sunki ‘Maravilha’. Controle (C) ($\Psi_{WF} = - 0,1$ a $- 0,5$ MPa), Estresse Moderado (MD) ($\Psi_{WF} = - 0,6$ a $- 1,5$ MPa), Estresse Severo (SD) ($\Psi_{WF} = - 1,6$ a $- 2,5$ MPa), Reidratação (R) após 48 h até que o solo atingisse a capacidade de campo. Letras maiúsculas comparam as médias entre as combinações copa/porta-enxerto para o mesmo regime hídrico e as letras minúsculas comparam as médias entre os regimes hídricos para as mesmas combinações copa/porta-enxerto. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Valores médios de quatro réplicas biológicas e oito repetições técnicas $\pm$ EP..... 51

Figura 9 – Expressão relativa dos genes da via de biossíntese e degradação de amido em folhas e raízes de diferentes combinações copa/porta-enxerto de citros submetidas a regimes de desidratação/reidratação. *GBSSIb* (A e B) *BAM1*(C e D), *ISA1* (E e F) e *ISA2* (G e H). VO: Laranja Valência, RL: Limão Cravo, SM: Tangerina Sunki ‘Maravilha’. Controle (C) ($\Psi_{WF} = - 0,1$ a $- 0,5$ MPa), Estresse Moderado (MD) ($\Psi_{WF} = - 0,6$ a $- 1,5$ MPa), Estresse Severo (SD) ($\Psi_{WF} = - 1,6$ a $- 2,5$ MPa), Reidratação (R) após 48 h até que o solo atingisse a capacidade de campo. Letras maiúsculas comparam as médias entre as combinações copa/porta-enxerto para o mesmo regime hídrico e as letras minúsculas comparam as médias entre os regimes hídricos para as mesmas combinações copa/porta-enxerto. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 53

Figura 10 – Expressão relativa dos genes da via de biossíntese e degradação de sacarose em folhas e raízes de diferentes combinações copa/porta-enxerto de citros submetidas a regimes de desidratação/reidratação. *SUS1* (A e B), *SUS 6* (C e D), *SPS1* (E e F) *A/N INV-B* (G e H), *A/N INV-D* (I e J) e *A/N INV-E* (K e L). VO: Laranja Valência, RL: Limão Cravo, SM: Tangerina Sunki ‘Maravilha’. Controle (C) ($\Psi_{WF} = -0,1$ a $-0,5$ MPa), Estresse Moderado (MD) ($\Psi_{WF} = -0,6$ a $-1,5$ MPa), Estresse Severo (SD) ($\Psi_{WF} = -1,6$ a $-2,5$ MPa), Reidratação (R) após 48 h até que o solo atingisse a capacidade de campo. Letras maiúsculas comparam as médias entre as combinações copa/porta-enxerto para o mesmo regime hídrico e as letras minúsculas comparam as médias entre os regimes hídricos para as mesmas combinações copa/porta-enxerto. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 55

Figura 11 – Expressão relativa dos genes da via de biossíntese de prolina em folhas e raízes de diferentes combinações copa/porta-enxerto de citros submetidos a regimes de desidratação/reidratação. *P5CS* (A e B) e *P5CR* (C e D). VO: Laranja Valência, RL: Limão Cravo, SM: Tangerina Sunki ‘Maravilha’. Controle (C) ($\Psi_{WF} = -0,1$ a $-0,5$ MPa), Estresse Moderado (MD) ($\Psi_{WF} = -0,6$ a $-1,5$ MPa), Estresse Severo (SD) ($\Psi_{WF} = -1,6$ a $-2,5$ MPa), Reidratação (R) após 48 h até que o solo atingisse a capacidade de campo. Letras maiúsculas comparam as médias entre as combinações copa/porta-enxerto para o mesmo regime hídrico e as letras minúsculas comparam as médias entre os regimes hídricos para as mesmas combinações copa/porta-enxerto. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 56

Figura 12 – Biplot para teores de amido, AST, glicose, sacarose, frutose e prolina em folhas e raízes de combinações copa/porta-enxerto de citros submetidas a regimes de desidratação/reidratação em campo. VO: Laranja Valência; RL: Limão Cravo; SM: Tangerina Sunki ‘Maravilha’; (●) Controle ($\Psi_{WF} = -0,1$ a $-0,5$ MPa); (●) Estresse moderado ($\Psi_{WF} = -0,6$ a $-1,5$ MPa); (●) Estresse severo ($\Psi_{WF} = -1,6$ a $-2,5$ MPa);

(●) Reidratação, após 48 h até que o solo atingisse a capacidade de campo..... 58

Tabela 1 – Lista de *primers* específicos de citros utilizados em qPCR..... 44

INTRODUÇÃO

A obtenção de porta-enxertos resistente ou tolerante a estresses bióticos e abióticos é o foco dos programas de melhoramento de citros (Zaher-Ara et al., 2016). Em condições de campo, as plantas são frequentemente expostas a ciclos de deficiência hídrica e reidratação no solo, sendo uma das principais causas de redução e perda da produtividade das culturas (Amini et al., 2015; Argamasilla et al., 2014; Chen et al., 2016). A enxertia é amplamente utilizada em plantas de citros (Mudge et al., 2009), sendo um fator determinante para limitar o crescimento da copa, bem como a taxa de sobrevivência da planta enxertada (Johkan et al., 2009). A interação entre copa e porta-enxerto pode ser uma barreira para a translocação de água e de nutrientes, podendo afetar, o fluxo de seiva, a condutividade hidráulica, sinalização química (Martínez-Ballesta et al., 2010) e consequentemente a produção.

O porta-enxerto Limão Cravo (RL) é amplamente utilizado na citricultura brasileira devido ao seu alto potencial produtivo mesmo em condições de deficiência hídrica ou sob estresse causado pelo vírus da tristeza dos citros e também por conferir maior vigor e longevidade das copas (Magalhães-Filho et al., 2008). No entanto, apesar da fácil obtenção de sementes, rápido crescimento e indução precoce, esse porta-enxerto é susceptível a estresses abióticos como o declínio e a morte súbita dos citros (Pedroso et al., 2014). Por outro lado, a Tangerina Sunki 'Maravilha' (SM) é uma alternativa para uso em programas de diversificação de porta-enxertos (Santana-Vieira et al., 2016). Esta variedade apresenta número elevado de sementes por fruto, uniformidade das mudas, bem como compatibilidade com a maioria das mudas comerciais (Soares Filho et al., 2003). Além disso, SM apresenta alta eficiência produtiva, elevada qualidade dos frutos, resistência a doenças, como a gomose causada pelo fungo *Phytophthora* e adaptação a ambientes sujeitos a estresse hídrico (Stuchi, 2015).

A seca altera o balanço hídrico e de carbono (Filippou et al., 2014), iniciando pela redução do potencial hídrico (Ψ_w) celular, afetando a integridade das membranas e proteínas, que por sua vez, pode levar a danos metabólicos pelo acentuado decréscimo no turgor celular (Benitez et al., 2016; Filippou et

al., 2014; Munns, 2011). Essa perda do turgor celular acarreta o declínio da taxa fotossintética (A) por reduções na condutância estomática (g_s) devido a alterações hormonais, tais como o teor de ácido abscísico - ABA (García-Sánchez et al., 2007). Tais respostas são evidenciadas por diminuição no crescimento (Smith e Stitt, 2007), mudança na proporção raiz/parte aérea, antecipação do processo reprodutivo, aceleração da senescência (Rodríguez-Gamir et al., 2010; Shao et al., 2008), e alteração no metabolismo do amido. Este último leva a mudanças na alocação de carbono entre fonte e dreno, e pode favorecer pelo ajuste osmótico, a proteção contra estresses ambientais (Dong e Beckles, 2019).

O acúmulo de solutos também é um mecanismo de resposta às variações ambientais, que se estabelece mediante o acúmulo de solutos compatíveis como trealose, manitol, sorbitol, e prolina, glicina e etc., que podem ser encontrados em organelos como vacúolo, mitocôndrio, cloroplasto ou no citosol (Verbruggen e Hermans, 2008), que promovem a contínua absorção de água, por ajuste osmótico (Filippou et al., 2014). Esses metabólitos atuam como osmoprotetores, eliminando ERO, estabilizando o sistema antioxidativo, protegendo a integridade e estabilizando as membranas celulares (Laxa et al., 2019; Per et al., 2017; Valluru e Den Ende, 2008). Além disso, induz importantes alterações na expressão gênica levando a percepção do sinal com a mudança no status hídrico. Essas são seguidas por alterações transcricionais que ativam respostas adaptativas e conferem uma maior tolerância, que vai depender do genótipo ou do estágio de desenvolvimento de um mesmo genótipo (Kuromori et al., 2014).

Nas células, o CO_2 assimilado pela fotossíntese é utilizado para a formação de trioses-P, que é direcionada para a biossíntese de amido no cloroplasto ou é exportada para o citosol para a síntese de sacarose. O acúmulo de carboidratos complexos serve como estoque de energia para um período de fornecimento energético limitado e, ou para aumentar a demanda de energia (Iglesias et al., 2002; Krasensky e Jonak, 2012). Durante períodos de estresse ambiental, quando a assimilação de CO_2 e a biossíntese de triose-P fica comprometida, o metabolismo do amido pode tamponar os efeitos adversos da redução de carbono induzida pelo estresse. O amido pode atuar como fonte de carboidratos simples quando o carbono é necessário, ou como

um dreno quando os açúcares estão em excesso, o que pode permitir um uso otimizado dessas reservas de carbono (Macneill et al., 2017). Estímulos internos e externos vão controlar a partição entre amido e sacarose (Dong e Beckles, 2019). Trabalhos recentes apontam a importância do amido para a tolerância e como pode melhorar a resposta ao estresse (Macneill et al., 2017; Thalmann e Santelia, 2017) e como os açúcares acumulados afetam os processos fisiológicos de maneiras distintas, atuando como moléculas sinalizadoras (Ruan, 2014), fornecendo carbono e energia, atuando como osmólitos compatíveis (Krasensky e Jonak, 2012) ou detoxificando ERO (Asami et al., 2018; Keunen et al., 2013).

A prolina é um dos aminoácidos mais estudados em plantas sob deficiência hídrica (Ashraf e Foolad, 2007; Filippou et al., 2014; Marijuan e Bosch, 2013; Vives-Peris et al., 2017). Além do seu papel como osmólito, contribui para a estabilização de estruturas subcelulares, tamponando o potencial redox celular sob condições de estresse (Hayat et al., 2012). A quebra rápida da prolina para a redução do estresse pode fornecer agentes redutores suficientes que suportam a fosforilação oxidativa mitocondrial e a geração de ATP para recuperação e reparo de danos induzidos pela deficiência hídrica. Ademais, pode ativar várias funções celulares como: a reserva de carbono e nitrogênio, utilizado no crescimento para restabelecimento após estresse, desintoxicação do excesso de amônia, estabilizador de proteínas e membranas e eliminadores de radicais livres (Ashraf e Foolad, 2007).

Os programas de melhoramento vêm realizando cruzamentos dirigidos à obtenção de novas variedades, principalmente porta-enxertos, que vem sendo validadas em campo, junto ao setor produtivo, em uma complexa rede de experimentos distribuídos pelo país (Stuchi, 2015) com a participação de instituições públicas e privadas servindo de apoio aos projetos. Dentre os principais objetivos desses programas podem ser citados: a seleção de genótipos, principalmente porta-enxertos, mais tolerante à seca e ao alumínio, redução do período juvenil, aumento da longevidade dos pomares, obtenção de variedades mais resistentes aos estresses bióticos como a gomose de *Phytophthora* spp. e ao complexo do Vírus da Tristeza dos Citros – CTV (Citrus Tristeza Vírus).

A compreensão das respostas ao estresse hídrico em plantas tem sido alvo de muitos estudos e as bases morfofisiológicas da tolerância à deficiência hídrica em citros não são totalmente compreendidas (Gonçalves et al., 2016). O desenvolvimento da citricultura vem mostrando a importância da diversificação na utilização de porta-enxertos, além da necessidade de variedades melhoradas visando à tolerância e, ou resistência a estresses bióticos e abióticos, pois o predomínio de um único porta-enxerto é preocupante à medida que torna o parque citrícola vulnerável (Espinoza-Nunez et al., 2011).

O emprego de um único porta-enxerto para todas as variedades copa não permite atender ao máximo o potencial inerente de cada variedade, impedindo que a planta manifeste toda sua capacidade produtiva (Pompeu Júnior, 2005). Ao diversificar, além de facilitar o controle de problemas relacionados aos estresses, os produtores e consumidores tem novas opções de mercado. Deste modo, o trabalho teve como objetivo avaliar diferentes combinações copa/porta-enxerto de citros submetidos a regimes de desidratação e reidratação em condição de campo por meio de análise do fluxo de seiva, dos teores de carboidratos e prolina bem como a expressão de genes relacionados à biossíntese e degradação de amido e sacarose e biossíntese de prolina.

REVISÃO DE LITERATURA

Citros

As plantas cítricas pertencem à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae sendo esta composta por três subtribos. A subtribo Citrinae apresenta 13 gêneros e 65 espécies, contendo as principais espécies de interesse comercial dentro dos gêneros *Poncirus*, *Fortunella* e *Citrus*, bem como os gêneros, *Eremocitrus*, *Clymenia*, *Microcitrus* (Nicolosi et al., 2000). Esses gêneros são originários de regiões úmidas tropicais e subtropicais do continente asiático, onde é considerado o seu centro de origem (Moore, 2001). Foram introduzidas no Brasil por volta da metade do século XVI, por navios portugueses e a rápida disseminação do cultivo das plantas cítricas pelo país se deu graças às condições climáticas que permitiram que as plantas vegetassem e produzissem (Boteon e Neves, 2005).

O gênero *Citrus* é o de maior importância econômica mundial e apresenta quatro espécies ditas verdadeiras, identificadas como *C. maxima* (Burn) Merrill (toranjas), *C. medica* L. (cidras), *C. reticulata* Blanco (tangerinas) e *C. micrantha* (papada) de acordo com estudos isoenzimáticos, taxonomia numérica e análise de DNA. Os citros apresentam uma alta diversidade genética, abrangendo laranjas doces (*C. sinensis*), a laranja azeda (*C. aurantium*), tangerinas (*C. reticulata* e *C. deliciosa*), limões (*C. limon*), limas ácidas como o Tahiti (*C. latifolia*) e o Galego (*C. aurantiifolia*), e doces como a lima da Pérsia (*C. limettoides*) (Figura 1). A grande complexidade na filogenia e taxonomia dos citros é devida à alta variabilidade do gênero, decorrente de hibridizações naturais interespecíficas, mutações espontâneas, alterações cromossômicas estruturais, apomixia e cultivo em ampla área geográfica desde a antiguidade (Garcia-Lor et al., 2013; Moore, 2001; Nicolosi et al., 2000). Assim, sempre existiu muita divergência quanto à origem e classificação dos citros, principalmente no que diz respeito ao número de espécies conhecidas (Oliveira, 2006).

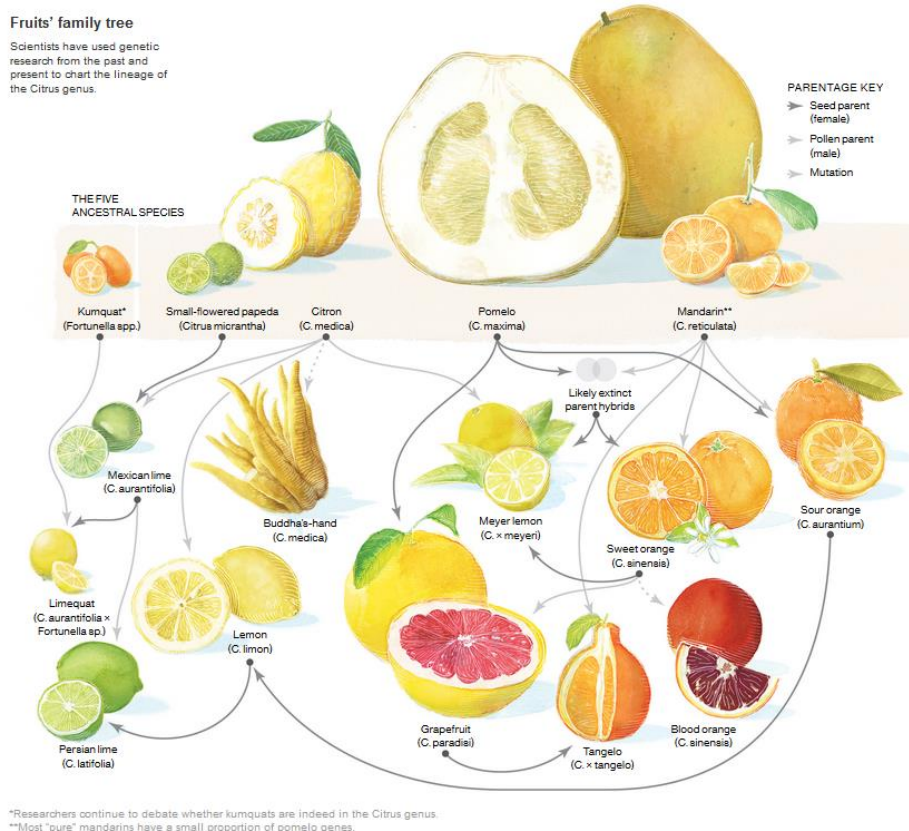


Figura 1 – Relação filogenética entre os diferentes tipos de *Citrus* (Stone, 2017).

A citricultura brasileira exerce grande importância econômica e social no cenário mundial, é um dos mais tradicionais setores do agronegócio brasileiro e gera milhares de empregos diretos e indiretos em diversos setores como serviços, transportes e comércio (FAO, 2019; CitrusBr, 2019). A laranja é a principal fruta cultivada e produzida no mundo, sendo destinada ao consumo *in natura*, como fruta de mesa, e principalmente, na forma de sucos concentrados, pasteurizados ou frescos. Durante o processo de obtenção do suco de laranja, vários outros subprodutos com aplicação comercial são obtidos, como d'limonene, terpenos, líquidos aromáticos e farelo de polpa cítrica. Estes subprodutos estão principalmente relacionados com a fabricação de produtos químicos, solventes, aromas, fragrâncias, substâncias para aplicação em indústrias de tintas, cosméticos, complemento para ração animal, entre outros. Este uso comercial diversificado expande ainda mais o número de

pessoas influenciadas direta e indiretamente pelo agronegócio do citros (Neves e Trombin, 2017).

O Brasil se destaca como maior produtor e exportador de suco de laranja concentrado e congelado correspondendo a aproximadamente 61% da produção mundial sendo seguido pela China, União Europeia e Estados Unidos (USDA, 2019). A safra brasileira 2017/2018 de laranja bateu um recorde de produtividade com 1.033 caixas por hectare, 60% maior que a safra anterior, 2016/2017, que rendeu 634 caixas por hectare. O aumento da produção ocorreu principalmente devido as abundantes chuvas de 2017 e início de 2018 em todas as regiões produtoras (1.373 mm, em média) acarretando em aumento do peso dos frutos de maio a julho que provocou menor crescimento dos frutos (CitrusBr, 2019; Fundecitrus, 2019).

O estado de São Paulo, na região Sudeste, é o principal produtor sendo responsável por aproximadamente 72,1% da produção nacional de laranjas. Constituído como o maior polo citrícola do mundo, também se destaca na produção de lima ácida 'Tahiti' e tangerinas, como Ponkan e o tangor 'Murcott'. A produção da Região Nordeste corresponde a 10,2% da produção nacional de laranja, e a Bahia é o estado que mais produz laranjas na região, ocupando grande destaque na produção nacional (IBGE, 2018).

Os pomares nacionais são predominantemente sustentados pelo porta-enxerto Limão 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), cerca de 85% dos pomares, exceto no Rio Grande do Sul, onde predomina a espécie *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., e em Sergipe, o Limão 'Cravo' divide espaço com o Limão 'Rugoso' (*C. jambhiri* Lush.). Nesse sentido, o estudo e a introdução de novos porta-enxertos com potencial de diversificação dos pomares tem sido uma tarefa constante para os programas de melhoramento genético de citros (Pompeu Júnior, 2005). De acordo com o Fundecitrus (2019), os principais porta-enxertos alternativos ao Limão 'Cravo' são o citrumelo 'Swingle', a tangerina 'Cleópatra' e a tangerina 'Sunki'.

Os Programas de melhoramento realizam cruzamentos dirigidos à obtenção de novas variedades, principalmente porta-enxertos, que vem sendo validadas em campo, junto ao setor produtivo, em uma complexa rede de experimentos distribuídos pelo país (Stuchi, 2015). O predomínio de um único porta-enxerto é preocupante, à medida que torna o parque citrícola vulnerável,

problema semelhante ao que ocorreu na década de 40, quando o vírus da 'tristeza' dos citros (CTV) dizimou a maioria dos pomares cítricos, enxertado sobre um único porta-enxerto, a laranja azeda (*C. aurantium* L.) (Pompeu Júnior, 2005).

Interação copa/porta-enxerto

O cultivo de citros ocorre com o uso de enxertia. É uma antiga prática agrícola utilizada em várias culturas e na citricultura desde o século V, porém a prática só passou a ser utilizada comercialmente no Brasil no século XX (Pompeu Júnior, 2005). A técnica une o sistema radicular de uma planta (porta-enxerto) com a parte aérea de outra (copa) de modo que seja mantida a continuidade vascular entre eles, resultando em uma única planta (Martinez-Ballesta et al., 2010). Assim, a arquitetura hidráulica se torna de fundamental importância, uma vez que o fluxo contínuo de água controla muitos processos vegetais, como crescimento, nutrição mineral, fotossíntese e transpiração (Warschefsky et al., 2016).

A escolha das variedades copa e porta-enxerto são de fundamental importância para o bom desempenho da planta e crucial para o aumento da produtividade. As copas são selecionadas pela qualidade e a quantidade de frutos produzidos. As influências da copa sobre o porta-enxerto, embora menos visíveis, são responsáveis pela captação de luz solar e realização da fotossíntese, contribuindo para o crescimento da planta a partir da assimilação de CO₂, síntese e translocações de carboidratos e também se relacionam com tolerância ao frio, à seca, a pragas e doenças (Hsiao; Xu, 2000; Pompeu Júnior, 2005). Enquanto o porta-enxerto, é responsável pela fixação da planta ao solo, absorção e transporte de água e minerais, síntese e transporte de reguladores de crescimento e armazenamento de nutrientes, cujas interações ainda se estendem a rizosfera (Warschefsky et al., 2016). O porta-enxerto também pode interferir diretamente nas características da copa como: tamanho, peso e produtividade de frutos, precocidade na produção, época de maturação, coloração da casca e da polpa, teor de açúcares e de ácidos, permanência dos frutos na planta, conservação do fruto após a colheita,

transpiração e composição química das folhas, fertilidade do pólen, tolerância à seca, à salinidade e ao frio, resistência e/ou tolerância a pragas (Pompeu Júnior, 2005).

Estudos são realizados com plantas lenhosas para a seleção de porta-enxertos que forneçam os mais variados tipos de resistência e estresses bióticos e abióticos (Santos et al., 2019; Tworkoski e Fazio, 2016; Dória, 2015; Jones, 2012). Em citros muitos estudos são realizados para avaliar a influência e a relação entre copa e porta-enxerto sob deficiência hídrica. Santos et al. (2017) mostraram os impactos da deficiência hídrica no solo no crescimento, no balanço hormonal e no perfil de flavonoides dependente das combinações copa/porta-enxerto. Gonçalves et al. (2016) observaram ajuste osmótico e elástico, bem como o controle do estresse oxidativo em porta-enxertos com tolerância contrastante a seca. Santana-Vieira et al. (2016) revelaram que os porta-enxertos, RL e SM exibiram diferentes estratégias de tolerância e seca e foram capazes de transmitir suas estratégia para a copa (Limão Cravo, Laranja Valência e Limão Tahiti).

Neves et al. (2017) verificaram que diferentes combinações copa-porta-enxerto submetidas a deficiência hídrica sucessiva exibiram alterações hormonais, moleculares e fisiológicas sugerindo a aquisição de tolerância progressiva ao estresse. Oliveira et al. (2015) sugeriram que a aclimação a seca envolve respostas específicas em Cravo e Sunki e que os níveis de proteínas envolvidas em várias vias celulares são afetadas nas raízes sob deficiência hídrica. Romero et al. (2006), Argamasilla et al. (2006) e Pedroso et al. (2014) também relataram a importância do genótipo do porta-enxerto na resposta das plantas.

A citricultura brasileira é em grande parte mantida sob um único porta-enxerto, o Limão Cravo, devido a sua adaptação a diferentes condições edafoclimáticas. Este apresenta características excepcionais relacionadas à facilidade de produção de mudas, compatibilidade com todas as cultivares copas, tolerância à tristeza e resistência à seca, fácil obtenção de sementes, grande vigor no viveiro, bom pegamento de mudas no plantio, rápido crescimento, produção precoce, frutos de boa qualidade e alta produção, média tolerância ao frio e bom comportamento em solos arenosos (Pompeu Júnior, 2005).

A utilização de um único porta-enxerto torna a cultura susceptível, e a diversificação é um tema bastante discutido por pesquisadores e citricultores, pois uma citricultura sustentável tem base na diversificação de suas variedades (Stuchi, 2015). Deste modo, a seleção Tangerina Sunki 'Maravilha', obtida pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, tem sido indicada como alternativa de uso em programas de diversificação de porta-enxertos. Essa variedade apresenta bom comportamento agrônomo, principalmente em função de seu relativamente elevado número médio de sementes por fruto e de sua previsível uniformidade de mudas decorrente da elevada porcentagem de poliembrionia que manifesta (100%), bem como a compatibilidade com a maioria das mudas comerciais (Soares Filho et al., 2003), além de eficiência produtiva, elevada qualidade dos frutos e resistência a doenças, como a gomose de *Phytophthora* e adaptação a ambientes sujeitos a estresse hídrico (Stuchi, 2015).

O desenvolvimento da citricultura vem mostrando a necessidade da diversificação dos porta-enxertos, além da necessidade de variedades melhoradas visando a tolerância a estresses, o que vem sendo realizado em diversos centros de pesquisa (Schafer et al., 2001). O emprego de um único porta-enxerto para todas as variedades copa não permite atender ao máximo o potencial inerente de cada variedade, impedindo que a planta manifeste toda sua capacidade produtiva (Pompeu Júnior, 2005).

Respostas de plantas de citros à deficiência hídrica

Desde a implantação até a colheita, a citricultura brasileira, em sua maioria ocorre em regiões com baixa disponibilidade hídrica. A água é um dos fatores limitantes para a produção da cultura em áreas com distribuição irregular de chuvas, determinado por épocas de alta e baixa precipitação (Ribeiro e Machado, 2007). Nas áreas cultivadas com citros, no Brasil, é comum ocorrer deficiência hídrica no solo, associada a elevados deficits de pressão de vapor (DPV), aumentando as limitações para a produtividade (Peixoto et al., 2006).

A citricultura nordestina encontra-se localizada sob o ecossistema de Tabuleiros Costeiros, com solos profundos, horizontes coesos, com estrutura

maciça e consistência dura a extremamente dura quando secos, o que reduz a profundidade efetiva, prejudicando a dinâmica da água no perfil e principalmente o aprofundamento das raízes (Souza et al., 2008). Deste modo, as plantas cítricas desenvolvem um sistema radicular pouco profundo, tornando-as mais vulneráveis a deficits hídricos, comuns nos meses de novembro a março (Peixoto et al., 2006).

A deficiência hídrica é uma das principais causas de redução do crescimento e desenvolvimento de plantas, diminuindo o rendimento das culturas na maioria das regiões agrícolas do mundo (Arbona et al., 2005; Taiz e Zeiger, 2017). O potencial hídrico foliar (Ψ_{wF}) indica o seu estado energético, cujos gradientes explicam os fluxos da água no sistema solo-planta-atmosfera. Variações nos valores de Ψ_{wF} podem afetar a assimilação de carbono da planta. Isso ocorre, pois quando a planta perde água a uma taxa superior a sua capacidade de absorção e transporte, o Ψ_w diminui, levando ao fechamento dos estômatos e redução da fotossíntese (Bergonci et al., 2000). Todos os processos citados estão diretamente relacionados à disponibilidade de água no solo próximo à região das raízes e aos elementos meteorológicos que afetam o processo de transpiração e abertura estomática (Pires et al., 2005).

A seca altera as relações e o balanço de água e as plantas respondem com várias modificações através de uma cascata de sinais (Mahdieh et al., 2008; Reis et al., 2012). Inicialmente a redução do potencial hídrico do solo acarreta a redução do Ψ_{wF} , a sinalização de hormônios (ácido abscísico – ABA, ácido indolacético – AIA, ácido salicílico – AS e etileno) por meio de uma cascata de sinalização. Há indução do fechamento estomático, inibição da fotossíntese, diminuição dos pigmentos cloroplásticos, produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ERO), resultando em danos à membrana celular causada pela peroxidação lipídica, afetando a atividade respiratória nos mitocôndrios, extravazamento do conteúdo celular e, eventualmente, morte celular (Benitez et al., 2016; Fariduddin et al., 2009; Filippou et al., 2014; Munns, 2011). Também como efeito da deficiência hídrica, as plantas realizam ajuste osmótico por meio do acúmulo de solutos compatíveis (Filippou et al., 2014).

O ajuste osmótico é uma resposta adaptativa das plantas à deficiência hídrica para a manutenção da turgescência celular, auxiliando na manutenção

da abertura estomática e funcionamento do aparelho fotossintético em condições de baixo potencial hídrico (Marijuan e Bosch, 2013). Esses mecanismos se estabelecem mediante o acúmulo, no vacúolo e no citosol, de solutos compatíveis, como prolina e carboidratos simples, como glicose, frutose e trealose (Monteiro et al., 2014), atuando como osmoprotetores, eliminando ERO, estabilizando o sistema antioxidativo através da atividade de enzimas antioxidantes, protegendo a integridade e estabilizando as membranas celulares (Per et al., 2017).

A deficiência hídrica afeta os processos como a distribuição de raízes, a eficiência na absorção de água e nutrientes, o fluxo de seiva, o transporte de substâncias pelos elementos de vaso no tronco do porta-enxerto e diferenças associadas à condutividade hidráulica da raiz (Arbona et al., 2015; Munns, 2011; Siemens; Zwiazek, 2004). A capacidade de fornecer água à planta e o aumento na absorção de nutrientes pode ser determinadas pelo porta-enxerto, que influencia no desenvolvimento de frutos, determinando o vigor da cultivar e sua tolerância ao estresse hídrico (Romero et al., 2006).

Existem poucas informações sobre as respostas de plantas de citros cultivadas em campo e isso, se deve, provavelmente, à alta complexidade da interação das plantas cítricas com o meio ambiente, variando da temperatura do solo e metabolismo das raízes até a variação na exposição das folhas à luz (Ribeiro; Machado, 2007). Um grande número de estudos relacionados com plantas cítricas está disponível, porém, a maioria dos resultados diz respeito às respostas de plantas a um fator ambiental específico obtido sob condições controladas ou semi-controladas (Gonçalves et al., 2016; Machado et al., 2013; Mesquita et al., 2016; Neves et al., 2017; Santana-Vieira et al., 2016).

Para superar o período com restrição hídrica as plantas desenvolvem mecanismos para sobreviver ao estresse, e estas respostas vão depender da duração, da intensidade e do período induzindo modificações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas. As plantas podem adotar diferentes estratégias de sobrevivência para evitar ou tolerar a desidratação (Santana-Vieira et al., 2016; Verslues et al., 2006). Para evitar a desidratação o ponto principal é o balanço entre a absorção de água do solo e a perda de água por transpiração levando a alterações fisiológicas como o aumento do sistema radicular, favorecendo a busca de novas fontes de água em regiões mais profundas do solo (Rodrigues-

Gamir et al., 2010). Indução do fechamento estomático que leva a redução das taxas fotossintéticas devido à limitação da entrada de CO₂ no mesofilo foliar (Chaves et al., 2009) objetivando um uso mais eficiente da água (Munns, 2011; Verslues et al., 2006).

A tolerância à desidratação está ligada a proteção aos danos celulares ocasionados pelo estresse hídrico. Alguns dos mecanismos desenvolvidos nessa estratégia incluem a desintoxicação causada por ERO, assim preservando a integridade de proteínas, enzimas e membranas celulares (Krasensky e Jonak, 2012) bem como de solutos compatíveis, que contribuem para a redução do potencial osmótico celular e consequente manutenção da turgescência celular (Lehmann et al., 2010), ajuste osmótico e elástico das paredes celulares (Gonçalves et al., 2016).

Plantas tolerantes à seca são capazes de regular o potencial osmótico para compensar períodos curtos ou longos de deficit hídrico. Esse processo resulta em um acúmulo de solutos na célula em resposta a uma queda do potencial hídrico da planta. Consequentemente, o potencial osmótico da célula é reduzido, o que por sua vez atrai água para a célula, para manutenção da pressão de turgor. Um potencial de pressão (turgor) é importante para o crescimento, expansão e rigidez mecânica das paredes e tecidos celulares, um papel particularmente importante para tecidos jovens sem lignina que não pode ser sustentada mecanicamente sem um potencial de pressão interna mais elevado (Molinari et al., 2004).

O papel fisiológico do acúmulo de amido em plantas sob deficiência hídrica

O amido é o carboidrato de reserva mais abundante nas plantas, podendo representar até 90% do peso seco (Stitt e Zeeman, 2012). Um homopolímero de glicose unido por ligações glicosídicas. Seu metabolismo e função dependem do tipo de célula a partir do qual é derivado (Horrer et al., 2016), consiste da mistura de dois diferentes componentes, amilose (20-30%) e amilopectina (70-80%). Amilose é um polímero linear de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas α -1,4 enquanto a amilopectina é um polímero

de glicose altamente ramificado com ligações glicosídicas α -1,6 ligando as cadeias lineares (Cheng et al., 2012). Nas plantas superiores, é produzido e armazenado nos cloroplastos e então degradado à noite para fornecer carbono para sustentar a respiração foliar e produzir açúcares que são exportados via tecidos vasculares para sustentar o crescimento das plantas mesmo na ausência de luz (Zeeman et al., 2007).

Em condições de deficiência hídrica, quando a assimilação de carbono fica comprometida, o metabolismo do amido pode tamponar os efeitos adversos causados (Dong e Beckles, 2019). O amido pode ser rapidamente mobilizado para fornecer açúcares que são muito sensíveis às mudanças ambientais (Xie et al., 2017) e que são transportados via tecido vascular para sustentar o crescimento das plantas mesmo na ausência de fotossíntese (Zeeman et al., 2007). Também pode atuar como fonte de açúcares quando o carbono for necessário, ou como dreno quando os açúcares estiverem em excesso, o que permite um uso otimizado dessas reservas de carbono (MacNeill et al., 2017).

O crescimento das plantas é regulado pela síntese (fotossíntese) e consumo (respiração) de substâncias orgânicas, bem como pela partição de fotoassimilados (Bueno et al., 2012). A depender da disponibilidade de carbono e a diferença de sensibilidade do crescimento da planta ao deficit hídrico há uma associação entre a remobilização e o consumo das reservas de carboidratos nas condições limitantes da água (Barry et al., 2004; Pedroso et al., 2014). Com menor assimilação de carbono e redução significativa da fotossíntese (Ashraf e Harris, 2013), há aumento da respiração da parte aérea para a manutenção da atividade metabólica e uma redução nas reservas de carboidratos nos órgãos de armazenamento (Smitt; Stitt, 2007). Para suprir a demanda da planta, o amido pode ser remobilizado e a sacarose sintetizada nos órgãos fotossintéticos ou originada pela degradação do amido, podendo ser usado para manter a atividade metabólica da planta (Pedroso et al., 2014).

Para a síntese ou hidrólise do amido é necessária a ação de enzimas. *GBSSI* atua na biossíntese do amido (Chen et al., 2017), liga-se firmemente ao grânulo de amido e é responsável pela síntese da amilose. O GBSS transfere os resíduos glicosil a partir da ADP-glicose para o seu substrato de glucano processivamente, gerando longas cadeias, a síntese de amilose pode tornar o

amido mais denso e melhorar a eficiência do armazenamento de carbono, explicando a conservação do *GBSS* em plantas superiores (Zeeman et al., 2010). β -amilase (*BAM*) está envolvida na degradação do amido (Krasensky; Jonak, 2012) hidrolisando as cadeias lineares, ligações glicosídicas α , 1-4, liberando maltose das extremidades não redutores exposta da cadeia, que pode ser incorporada no metabolismo do açúcar (Peng et al., 2014; Zeeman et al., 2010). Estudos demonstram que o estresse osmótico pode aumentar a atividade total de *BAM* e diminuir o conteúdo de amido estimulado pela luz em *Arabidopsis* de tipo selvagem, mas não em mutantes *bam1*, que pareciam ser hipersensíveis a estresse osmótico (Valério et al., 2011).

De acordo com Peng et al. (2014), no trabalho onde avaliou o gene *PtrBAM1* de *Poncirus trifoliata* exibiu um aumento nos níveis de expressão de *PtrBAM1*. As isoamilases (*ISA*) são enzimas desramificadoras que hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,6, importantes determinantes da estrutura da amilopectina. Theerawitaya et al. (2012) mostram o aumento da expressão de genes *OsISAIIa* e *OsISAIIb* em plantas de arroz sob estresse salino.

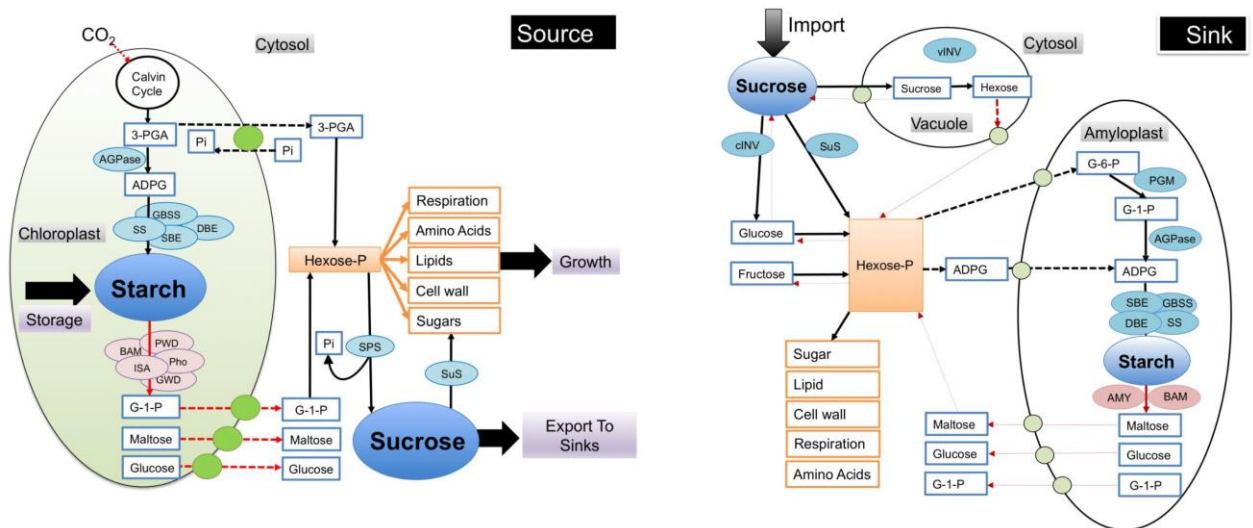


Figura 2 – Via de biossíntese e degradação do amido e sacarose em tecidos fonte e dreno (Dong e Beckles, 2019).

Osmoproteção

Estresses abióticos, particularmente a deficiência hídrica, são responsáveis por disfunções que limitam o crescimento da planta e a produtividade, levando a uma série de mecanismos de resposta adaptativos (Amini et al., 2015). Induzem a redução do potencial osmótico que é responsável pela manutenção da absorção de água e do turgor celular podendo contribuir para o crescimento e expansão das raízes (Tardieu et al., 2018). As plantas acumulam grandes quantidades de solutos compatíveis, moléculas de baixo peso molecular, compostos orgânicos altamente solúveis, normalmente não tóxicos em altas concentrações na célula (Filippou et al., 2014). Estes protegem as plantas contra a desidratação, porém não interferem nos processos bioquímicos (Zou et al., 2013), mas contribuem com o ajuste osmótico, com a detoxificação das ERO, com a proteção da integridade da membrana e a estabilização de enzimas/proteínas (Ashraf et al., 2013; Marijuan e Bosch, 2013).

Dentre os solutos compatíveis destacam-se a prolina, sacarose, trealose, polióis, e compostos amônio quaternários (Qs) como a glicina betaína, alanina betaína, prolina betaína e pipercolato betaína, os quais estão presentes no vacúolo ou no citosol (Benitez et al., 2016). Como alguns desses solutos protegem os componentes celulares dos danos causados pela desidratação eles são comumente conhecidos como osmoprotetores. Embora o papel dos osmorreguladores sob a osmotolerância seja controverso, acredita-se que esses compostos tenham efeitos positivos sobre a integridade de enzimas e das membranas juntamente com papéis adaptativos na mediação do ajuste osmótico em plantas cultivadas sob condições de estresse (Ashraf e Foolad, 2007).

Os porta-enxertos de citros possuem capacidades diferenciais de fornecimento de água e carbono aos tecidos da parte aérea, melhorando a resistência a estresses bióticos e abióticos e afetando o estado hídrico das plantas (Machado et al., 2013; Pedroso et al., 2014). As plantas podem usar carboidratos armazenados para superar condições de estresse, pois baixas taxas fotossintéticas não são adequadas para suprir a demanda metabólica da planta (Shao et al., 2008). Aumentos na concentração foliar de carboidratos

solúveis e reduções na concentração de amido são observados sob déficit hídrico moderado, enquanto há reduções nas frações solúveis e amido sob déficit hídrico severo (Chaves et al., 2009). A interconversão amido-açúcar nos tecidos fonte e dreno desempenha um profundo papel fisiológico em todas as plantas (Dong e Beckles, 2019). Nas células, o CO₂ assimilado pela fotossíntese é utilizado para a formação de amido no cloroplasto ou é exportado para o citosol para a síntese de sacarose (Figura 2). Estímulos internos e externos controlam a partição entre amido e sacarose. As trioses fosfato sintetizadas no ciclo de Calvin-Benson podem ser utilizadas para a síntese de ADP-glicose (doador glicosil para síntese de amido) ou translocado para o citosol para a síntese de sacarose (Sami et al., 2016).

Os açúcares solúveis são amplamente aceitos como osmoprotetores, pois podem funcionar para estabilizar as membranas celulares substituindo as moléculas de água quando as plantas são expostas ao estresse abiótico, mantendo as superfícies das membranas hidratadas e sustentando o espaço entre as moléculas de fosfolipídios para evitar danos à membrana (Valluru e Den Ende, 2008). Os açúcares desempenham papel ativo na regulação do crescimento, desenvolvimento, armazenamento, fotossíntese, partição de carbono, metabolismo de carboidratos e lipídios, homeostase osmótica, transdução de sinais, síntese de proteínas e expressão gênica durante vários estresses abióticos (Sami et al., 2016; Salerno e Curatti, 2003). O aumento na concentração de açúcares solúveis como glicose, sacarose e frutose aumenta a tolerância da planta a vários estresses abióticos, como seca, salinidade e frio (Rathinasabapathi, 2000).

Durante o estresse, os açúcares protegem a membrana e eliminam o excesso dos radicais livres (Krasensky e Jonak, 2012). O acúmulo de ERO está diretamente correlacionado com o acúmulo de açúcar para proteger as plantas dos efeitos danosos do estresse ambiental. Desempenham uma dupla função, pois estão associados ao anabolismo e ao catabolismo das ERO, como a via oxidativa da pentose fosfato envolvida na produção de NADPH envolvida na eliminação de ERO além de atuarem como osmoprotetores na regulação do ajuste osmótico (Keunen et al., 2013; Singh et al., 2015). Mantêm a turgidez das folhas e previnem a desidratação de membranas e proteínas (Sawhney e Singh, 2002), impede a oxidação da membrana celular (Arabzadeh, 2012),

reduz a taxa de fotossíntese sob estresse hídrico (Liu et al., 2004), também mantém o teor de água foliar e o ajuste osmótico das plantas frente às condições de estresse hídrico (Xu et al., 2010) (Figura 3).

A sacarose é sintetizada a partir do ciclo de Calvin pela ação sequencial de sacarose fosfato sintase (SPS). Além da biossíntese, a sacarose é catabolizada reversivelmente pela sacarose sintase (SUS), produzindo UDP-glicose e frutose, ou catabolizada irreversivelmente pelas invertases (INV) produzindo glicose e frutose. A sacarose e seus produtos hidrolíticos, glicose e frutose atuam como moléculas de sinalização que induzem a biossíntese de outras substâncias osmoprotetoras em resposta a condições desfavoráveis, e influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Bolouri-Moghaddam et al., 2010; Ruan et al., 2010). Além disso, há integração do mecanismo de catabolismo e sinalização da sacarose, mediada pela invertase e ativada por hormônio. A invertase é uma enzima chave para o desenvolvimento de plantas e resposta ao estresse (Tauzin e Giardina, 2014).

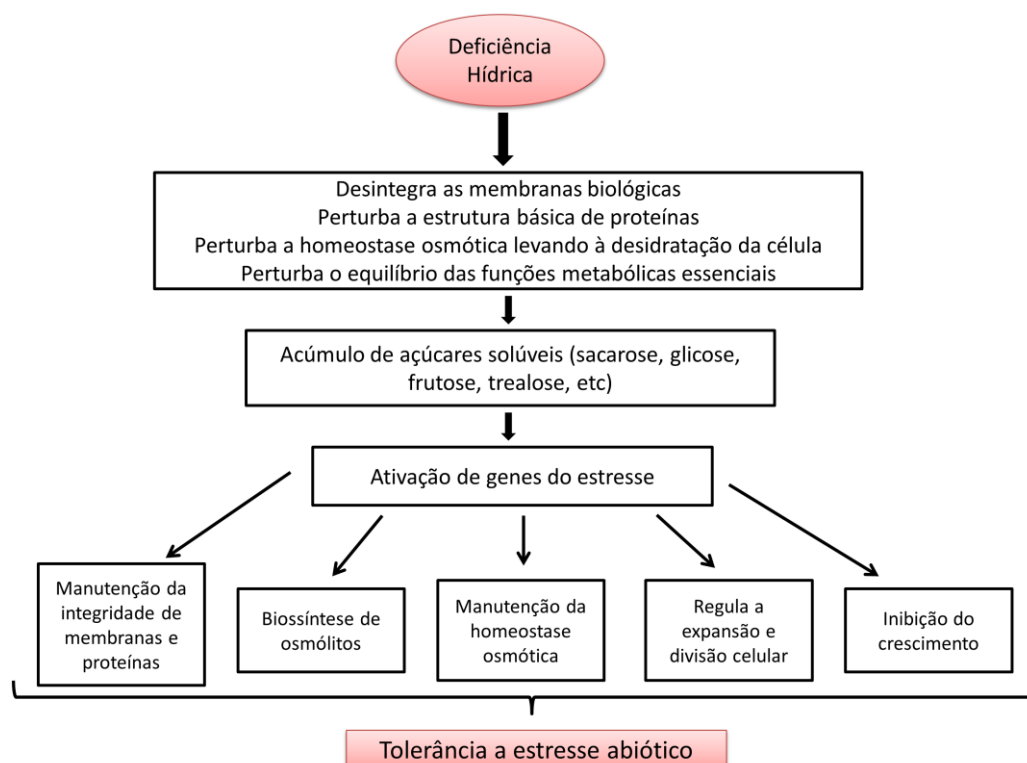


Figura 3 – Diagrama representativo do papel dos açúcares solúveis em condições de deficiência hídrica. Adaptado de Sami et al. (2016).

No ajustamento osmótico, a prolina é um dos aminoácidos mais estudados em plantas submetidas ao déficit hídrico (Marijuan e Bosch, 2013), amplamente distribuído em plantas superiores, e pode ser acumulada como um metabólito comum em resposta ao ajuste osmótico (Verbruggen e Hermans, 2008). Além do seu papel como osmólito, a prolina contribui para a estabilização de estruturas subcelulares e tamponando o potencial redox celular em condições de estresse. A utilização rápida da prolina para a redução do estresse pode fornecer agentes redutores suficientes que suportam a fosforilação oxidativa mitocondrial e a geração de ATP para recuperação e reparo de danos induzidos pela seca (Ashraf e Foolad, 2007). Além disso, pode ativar várias funções celulares como a reserva de carbono e nitrogênio utilizado no crescimento para restabelecimento após estresse; desintoxicação do excesso de amônia; estabilização de proteínas e membranas; e eliminação de radicais livres (Kavi Kishor et al., 2005).

A síntese da prolina em plantas superiores acontece por duas vias: a via Ornitina (Orn) e a via Glutamato (Glu), que são os principais precursores da biossíntese da prolina. Este processo é mediado pelas enzimas D1-pirrolina-5-sintetase (P5CS) e redutase (P5CR). A principal rota para a biossíntese de prolina durante o estresse osmótico em plantas usa o glutamato, que é reduzido a glutamato- γ -semialdeído (GSA) pela enzima D1-pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS). O GSA é convertido espontaneamente por ciclização a D1-pirrolina-5-carboxilato (P5C), que é finalmente reduzido a prolina (Pro) pela D1-pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR). O acúmulo de prolina sob estresse pode ocorrer devido ao aumento da P5CS, a enzima limitante da biossíntese de prolina (Spoljarevic et al., 2011) e uma diminuição da atividade da prolina desidrogenase (PDH) (Filippou et al., 2014). A biossíntese da prolina geralmente ocorre constitutivamente no citosol ou no estroma dos cloroplastos, e é controlada pelo gene P5CS2. Por outro lado, sob o estresse, a biossíntese de prolina é aumentada nos cloroplastos e é controlada principalmente pelo gene P5CS1 (Szabados e Saviouré, 2010) (Figura 4).

A produção de prolina é ativada e seu catabolismo reprimido durante o estresse. Uma vez que a condição ideal é restabelecida, a regulação oposta é desencadeada (Amini et al., 2015). Em geral, o ciclo de degradação e

biossíntese de prolina são necessários para o equilíbrio do potencial redox em condições de deficiência hídrica (Verbruggen e Hermans, 2008). A distribuição da prolina intra e intercelular, também desempenha um papel crítico na resistência osmótica de vários tecidos em condições de estresse, sendo acumulada no citosol para induzir a difusão da água nas células. Na ausência de estresse, a prolina é transportada para os orgânulos celulares, principalmente vacúolos e plastídios. O vacúolo distribui a prolina para o citosol, na falta de água. Na reidratação, a prolina é transportada para os mitocôndrios (Verbruggen e Hermans, 2008), onde é degradada por duas reações de oxidação. A primeira é oxidada pela prolina desidrogenase/oxidase (ProDH) a P5C e depois convertida em GSA espontaneamente para Glu. Além disso, pode percorrer longas distâncias, desde as folhas até as raízes através do xilema e, ou floema. É amplamente sintetizada e se acumula em folhas e raízes sob deficiência hídrica (Amini et al., 2015).

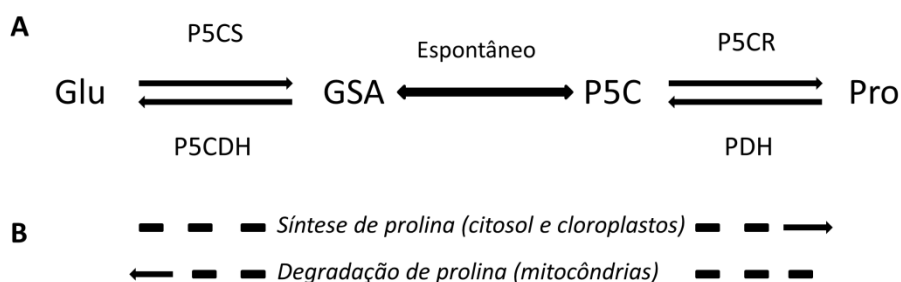


Figura 4 – A - Esquema da via metabólica da biossíntese de prolina (Pro) a partir de glutamato (Glu) em plantas. GSA (*Glutamate semialdehyde*); P5C (*Pirrolíne-5-carboxylate*); P5CS (*Pirrolíne-5-carboxylate synthase*); P5CR (*Pirrolíne-5-carboxylate reductase*); P5CDH (*Pirrolíne-5-carboxylate dehydrogenase*); PDH (*Proline dehydrogenase*). B - Compartimentos celulares envolvidos no processo. Adaptado de Verbruggen e Hermans (2008).

Estudos apontam o acúmulo de prolina como uma resposta geral ao estresse, atua como um marcador que protege a planta atuando como um osmoprotetor (Monteiro et al., 2014; Zandalinas et al., 2017). Fillipous et al. (2014) mostrando o aumento do acúmulo de prolina em plantas estressadas sob deficiência hídrica. Em estudos com plantas de citros Molinari et al. (2004) verificaram a superprodução de prolina em folhas de *Carrizo citrange* em condição de deficiência hídrica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

O experimento foi realizado de janeiro a maio de 2015, em condições de campo na EMBRAPA Mandioca e Fruticultura no município de Cruz das Almas, Bahia, Brasil, (Latitude: 12°40'39"S, 123 Longitude; 39°06'23"O, Altitude; 225 m). A partir do Banco Ativo de Germoplasma de Citros (BAG) foram selecionados três genótipos a saber: o limoeiro 'Cravo Santa Cruz' (*Citrus limonia* Osbeck) e a tangerineira 'Sunki Maravilha' [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka], e um genótipo com copa produtiva, a laranjeira doce 'Valência' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Os porta-enxertos foram produzidos a partir de embriões nucelares oriundos de sementes de frutos coletados das plantas matrizes. Os enxertos foram provenientes de gemas axilares de plantas nucelares, enxertadas por borbulhia.

As combinações copa/porta-enxerto apresentavam-se com 2,5 anos de idade e estavam cultivadas com o espaçamento de 2,0 x 1,5m, em uma área correspondendo a 11 hectares. Foram avaliados os seguintes tratamentos: (i) limoeiro 'Cravo Santa Cruz' enxertado nele próprio (RL/RL); (ii) laranjeira 'Valência' enxertada em limoeiro 'Cravo Santa Cruz' (VO/RL); (iii) tangerineira 'Sunki Maravilha' enxertada nela própria (SM/SM) e (iv) laranjeira 'Valência' enxertada em tangerineira 'Sunki Maravilha' (VO/SM).

As plantas foram irrigadas por um sistema de gotejamento com três emissores por planta com vazão de 4,8L com a linha de gotejamento localizada a 30 cm do tronco da planta. O conteúdo de água do solo foi monitorado durante todo o período experimental usando reflectometria no domínio do tempo (TDR). O tratamento controle foi irrigado por gotejamento pelo menos três vezes por semana com base em estimativas de transpiração da planta ($T = ETo \times K \times AF$), em que $K = 0,32$, segundo a Coelho Filho et al. (2004). A evapotranspiração (ETo) foi calculada a partir de uma estação meteorológica automática próxima a área experimental.

Curvas de retenção de água foram construídas por Santos et al. (2017) para 10, 30, 50 e 70 cm de profundidade de acordo com Van Genuchten (1980).

As sondas TDR foram construídas manualmente de acordo com Coelho et al. (2005). Cada sonda era formada por três barras paralelas de aço inoxidável de 0,09 m de comprimento e 0,4 cm de diâmetro. As sondas foram instaladas a 25 cm do caule de cada planta e nas diferentes profundidades citadas acima. As curvas de calibração foram obtidas em laboratório utilizando amostras de solo coletadas em cada planta (Santos et al., 2019). As medições da TDR foram realizadas a cada dois dias.

O potencial hídrico foliar (Ψ_{WF}) foi determinado no terceiro ou quarto ramo a partir do ápice, na segunda ou terceira folha madura e totalmente expandida para todos os tratamentos utilizando câmara de pressão (Modelo 1000, PMS Instrument Company, Albany, OR, USA), de acordo com metodologia descrita por Scholander et al. (1965). As medições de Ψ_{WF} foram realizadas no período antemanhã, a cada dois dias, a partir da aplicação dos tratamentos.

As plantas dos diferentes tratamentos foram submetidas à desidratação pela suspensão da irrigação, ao passo que o tratamento controle foi mantido próximo da capacidade de campo. A princípio, foram definidas quatro classes de Ψ_{WF} para a coleta do material vegetal: (A) tratamento controle com valores de Ψ_{WF} entre - 0,1 e - 0,5 MPa; (B) tratamento sob estresse moderado, com valores de Ψ_{WF} entre - 0,6 e - 1,5 MPa; (C) tratamento sob estresse severo, com valores de Ψ_{WF} entre - 1,6 e - 2,5 MPa) e (D) Reidratado. Após 48 h de reidratação até o solo atingisse a capacidade de campo e as plantas voltassem a apresentar Ψ_{WF} das plantas controle. As coletas foram realizadas quando as plantas se encontravam dentro da faixa de Ψ_{WF} desejado.

Para todas as combinações foram coletadas folhas e raízes de dez plantas. A coleta das folhas foi padronizada para que fossem coletadas folhas maduras do 3º ao 4º ramo a partir do ápice. Após a coleta, as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e depois transferidas para um ultrafreezer - 80°C. Para as raízes, foram coletadas raízes finas com até 30 cm de profundidade do solo para todas as combinações. As raízes foram lavadas com água destilada, secas em papel absorvente e congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, acondicionadas em ultrafreezer - 80°C.

Fluxo de seiva

A densidade de fluxo de seiva foi determinada por meio do método de dissipação térmica de Granier (1987) com adaptações (Vellame et al., 2009; Coelho Filho et al., 2005). O registro dos dados de diferença de temperatura entre as sondas foi realizado usando um *datalogger* (CR10X Campbell SCi) com armazenamento da média dos sinais emitidos a cada 15 min. A densidade de fluxo de seiva foi obtida pontualmente no caule da planta a uma altura de 0,30 m do solo e na profundidade de 2 cm, considerando a espessura da casca. Esta foi calculada pela razão entre a diferença de temperatura dos sensores instalados no tronco (K), baseado na equação empírica desenvolvida por Granier (1987): $u = 118,99 \times 10^{-6} K^{-1}$. Sendo u a densidade de fluxo de seiva, dado em $L\ day^{-1}$ e $K = (\Delta T_M - \Delta T) / \Delta T$, sendo o ΔT_M a diferença máxima de temperatura ($^{\circ}C$) no dia entre os sensores e ΔT a diferença instantânea de temperatura entre os sensores. As avaliações foram realizadas usando os dados climatológicos coletados diariamente por uma estação meteorológica automática localizada ao lado da área experimental. As análises de fluxo de seiva foram realizadas utilizando a média de três plantas para cada combinação copa/porta-enxerto.

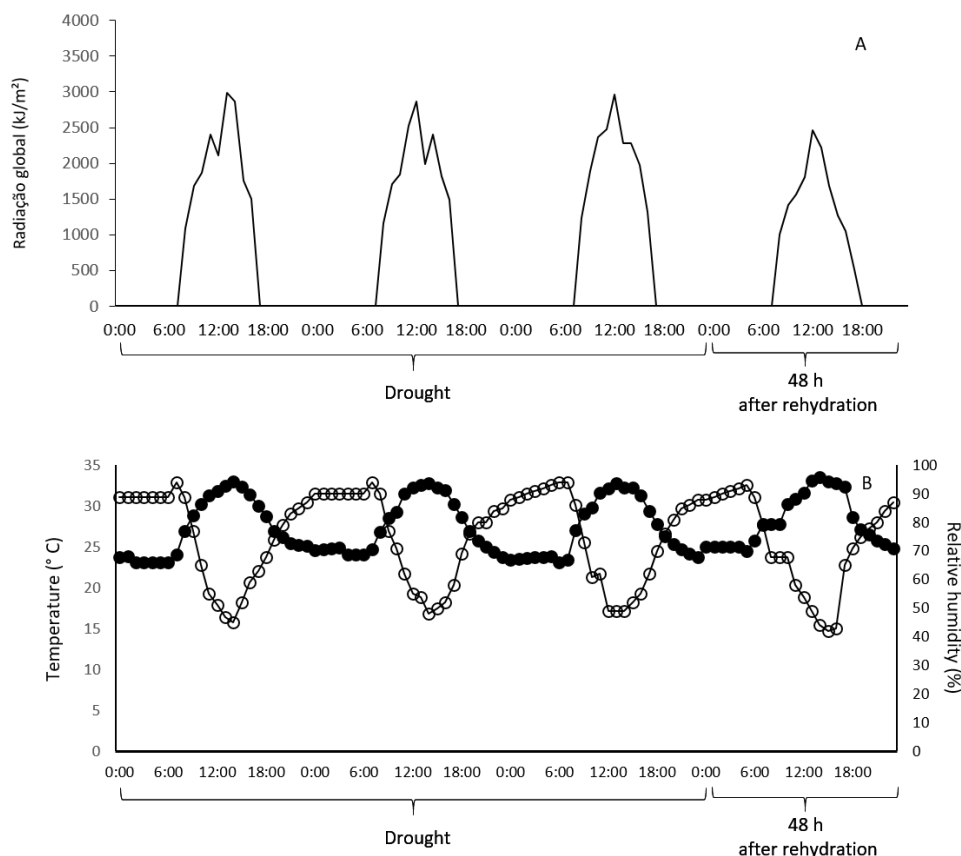


Figura 5 – Radiação solar global (A), temperatura e umidade relativa do ar (B) registradas durante o período de seca e de coleta das plantas. Dados coletados em intervalos de 1 h.

Amido e Açúcares solúveis totais (AST)

O teor de carboidratos foi determinado em folhas e raízes liofilizadas, para todos os tratamentos, de acordo com metodologia descrita por McCready et al. (1950), e quantificado pelo método antrona-ácido sulfúrico de acordo com Clegg (1956) adaptado para microplaca. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível (*Spectramax Paradigm - Molecular Devices*) a 620 nm. Os teores de amido e açúcares solúveis totais (AST) foram calculados tomando-se por base os dados da curva-padrão obtida com D-glicose. Para as amostras obtidas pela extração com ácido perclórico, o valor encontrado foi multiplicado pelo fator 0.9 para conversão da glicose em amido.

Açúcares redutores por GC-MS

Os teores de açúcares redutores foram determinados em amostras de folhas e raízes frescas (50-100 mg MF) de todos os tratamentos. Foram extraídas e analisadas de acordo com protocolo descrito por Lira et al. (2016). As concentrações de metabólitos endógenos foram obtidas comparando as áreas de pico dos cromatogramas com os padrões comerciais.

Prolina

A determinação do teor de prolina foi realizada em folhas e raízes liofilizadas, de acordo como protocolo descrito por Bates et al. (1973) com modificações adaptadas para leitura em microcubeta de quartzo e volumes de tolueno. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível (*Spectramax Paradigm - Molecular Devices*) a 520 nm, usando tolueno como branco. A curva-padrão foi preparada com L-prolina e o teor de prolina foi calculado. Os resultados foram expressos em $\mu\text{moles g}^{-1}$ MS.

Expressão Gênica por qPCR

Os níveis de mRNA foram analisados por meio de Real Time qRT-PCR (qPCR). Extração de RNA total de folhas e raízes foi realizada utilizando o *Trizol Reagent (Invitrogen)* de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida o RNA foi tratado com DNase I (*Thermo Scientific*) a 37°C durante 30 min. e a qualidade das amostras foi avaliada em gel de eletroforese a 1%. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o *kit High Capacity RNA-to-Cdna Kit (Applied Biosystems)*, de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, as amostras de cDNA foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific)* e diluídas a concentração 10 ng μL^{-1} .

A fim de avaliar a expressão de genes da via de biossíntese e degradação de amido e sacarose e biossíntese de prolina, *primers* gene-específicos foram delineados com base nas suas sequências disponíveis em bancos de dados públicos (Tabela 1).

Tabela 1 – Lista de *primers* específicos de citros utilizados em qPCR.

Gene	Sequence	Amplicon size (bp)
GBSSIb	F - 5' ATTTAGAAGCCAGAACGGG 3'	120
	R - 5' CCAAGAACATCACCAAGTCC 3'	
ISA1	F - 5' CCCACCATTGATTGACTTGA 3'	74
	R - 5' TATCCCACGCTTCTGCTAT 3'	
ISA2	F - 5' CGTCATTTCTCTCACCAAC 3'	87
	R - 5' CTTCTTCACCATCTCCTTCAT 3'	
BAM1	F - 5' TACCCTTCGTATCCAGAGCA 3'	120
	R - 5' TGGCTTACCAGCAGATTCAAG 3'	
SUS1	F - 5' CTGAAAGACCGCAACAAGC 3'	85
	R - 5' CATACCACTCCACAAGCCC 3'	
SUS6	F - 5' TCTCAGGCTTCCACATTGAC 3'	94
	R - 5' CAGTATCCAGCATCCGCTTT 3'	
SPS1	F - 5' ACTCTCTACTGGTTTCGGGA 3'	106
	R - 5' TGATTGTCTTCGGTGCTTGA 3'	
A/N-INV B	F - 5' TACACAAAGTCAACGGGAGA 3'	128
	R - 5' CCATCAGCACATAGAAGAGT 3'	
A/N-INV D	F - 5' TATCGGCAATGTGAGTCCTG 3'	127
	R - 5' TCGTGCTTCAATAAGGTCCA 3'	
A/N-INV E	F - 5' TCCTTTGGAGATTCAAGGCAC 3'	72
	R - 5' CCATCCTCTGGTGTAAGCAT 3'	
P5CS	F - 5' TCTTGTCTGTTGAGTGATGT 3'	110
	R - 5' ATGTTATTTCTGCTTGGTGT 3'	
P5CR	F - 5' GCCGTCCACTCTAATCTCA 3'	124
	R - 5' CTACTTGCGGTTTCACAGA 3'	
Cs_GAPC2	F - 5' TCTTGCCTGCTTTGAATGGA 3'	150
	R - 5' TGTGAGGTCAACCACTGCGACAT 3'	
Cs_UPL7	F - 5' TCTTGCCTGCTTTGAATGGA 3'	150
	R - 5' TGTGAGGTCAACCACTGCGACAT 3'	

O qRT-PCR foi realizada em termociclador *Stratagene Mx3005p* (*Stratagene, La Jolla, Califórnia, USA*) usando o kit *Power SYBR Green PCR Master Mix 2X* (*Applied Biosystems*) de acordo com recomendações do fabricante. O *mix* para a reação foi composto por 100 ng de cDNA como molde, 0,5 µM de cada primer e uma quantidade suficiente de *Power SYBR Green PCR Master Mix 2X* para completar o volume final da reação para 20 µL. As reações de amplificação foram realizadas sob as seguintes condições: (1) pré-tratamento a 50°C por 2 min, (2) ativação da *Taq polimerase* a 95°C por 10 min (3) desnaturação a 95°C por 30 s, (4) anelamento a 60°C por 60 s e (5) extensão a 72°C por 40 s, sendo repetido o processo por 40 ciclos. Para verificar se apenas um produto de PCR foi gerado para os transcritos

amplificados foi gerada a curva de dissociação de 95°C por 60 s, 60°C por 30 s e 95°C por 30 s (*PCR Stratagene Mx3005P – Agilent Technologies*). Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise.

Os dados de fluorescência foram normalizados pelo sinal de referência passiva de ROX para corrigir as flutuações do sinal de fluorescência devido a variações no volume ou evaporação. As curvas de fluorescência foram analisadas com o *software MxPro QPCR* e os valores do ciclo *Threshold* (C_T) foram determinados. Os valores de expressão gênica para cada gene de interesse foram calculados como uma variação (*fold change*) da amostra do tratamento em relação à amostra controle (calibrador) usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001) e os genes desidrogenase Gliceraldeído-3-fosfato C2 (*GAPC2*) e Ubiquitina-proteína ligase 7 (*UPL7*) como controle endógeno (Mafra et al., 2012).

Análise Estatística

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados, em esquema fatorial 4 x 4, totalizando 16 tratamentos correspondentes a 4 combinações copa/porta-enxerto (RL/RL, VO/RL, SM/SM e VO/SM), 4 regimes hídricos (controle, estresse moderado, estresse severo e reidratado). Os resultados dos experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a comparação entre médias dos tratamentos foram realizadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para análise biplot, baseada em análise de componentes principais, foi utilizada uma tabela de dupla-entrada contendo as médias das combinações copa/porta-enxerto em cada regime de desidratação e reidratação e em cada variável bioquímica analisada em folhas e raízes (amido, AST, sacarose, glicose, frutose e prolina). Inicialmente, devido as diferenças nas unidades de medida, as médias foram padronizados para média 0 e variância 1 por meio da fórmula $Z_{ij} = (X_{ij} - \mu_j)/S_j$, onde X_{ij} é o valor da i -ésima observação da variável j ; μ_j é a média da variável j ; e S_j é o desvio-padrão da variável j . As médias padronizadas foram submetidas à decomposição em valores singulares e as coordenadas das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) das

combinações copa/porta-enxerto e das variáveis foram utilizadas para a projeção do *biplot*.

RESULTADOS

Fluxo de seiva

A diminuição do potencial hídrico do solo (Ψ_{ws}) e a combinação copa/porta-enxerto reduzem a velocidade total do fluxo de seiva tendo as combinações copa/porta-enxerto resposta diferencial da taxa de fluxo quando submetidas à deficiência hídrica e após a reidratação (Figura 6). O porta-enxerto RL, na condição controle, reduziu drasticamente a taxa de fluxo quando combinada com a copa VO, o que não foi verificada para o porta-enxerto SM. Para a deficiência hídrica, as plantas controle da combinação RL/RL tiveram os valores mais altos de fluxo de seiva ($0,75 \text{ L min}^{-1}$) com uma redução da velocidade de fluxo de seiva de aproximadamente 4x quando comparadas com a deficiência hídrica ($0,15 \text{ L min}^{-1}$). As plantas da combinação VO/RL quando submetidas à deficiência hídrica ($0,20 \text{ L min}^{-1}$) apresentaram as menores variações quando comparadas ao controle ($0,30 \text{ L min}^{-1}$). A combinação SM/SM apresentou um fluxo de seiva de $0,37 \text{ L min}^{-1}$ para o tratamento controle e uma redução do fluxo para $0,10 \text{ L min}^{-1}$ em condições de deficiência hídrica. A combinação VO/SM apresentou os menores valores de fluxo de seiva, de $0,20 \text{ L min}^{-1}$ e $0,9 \text{ L min}^{-1}$, no controle e em condições de deficiência hídrica, respectivamente. Após a reidratação as plantas submetidas à deficiência hídrica tiveram aumento no fluxo de seiva para valores próximos ao controle, exceto para RL/RL que embora tenha apresentado um aumento do fluxo, este não chegou a valores próximos ao controle (Figura 6).

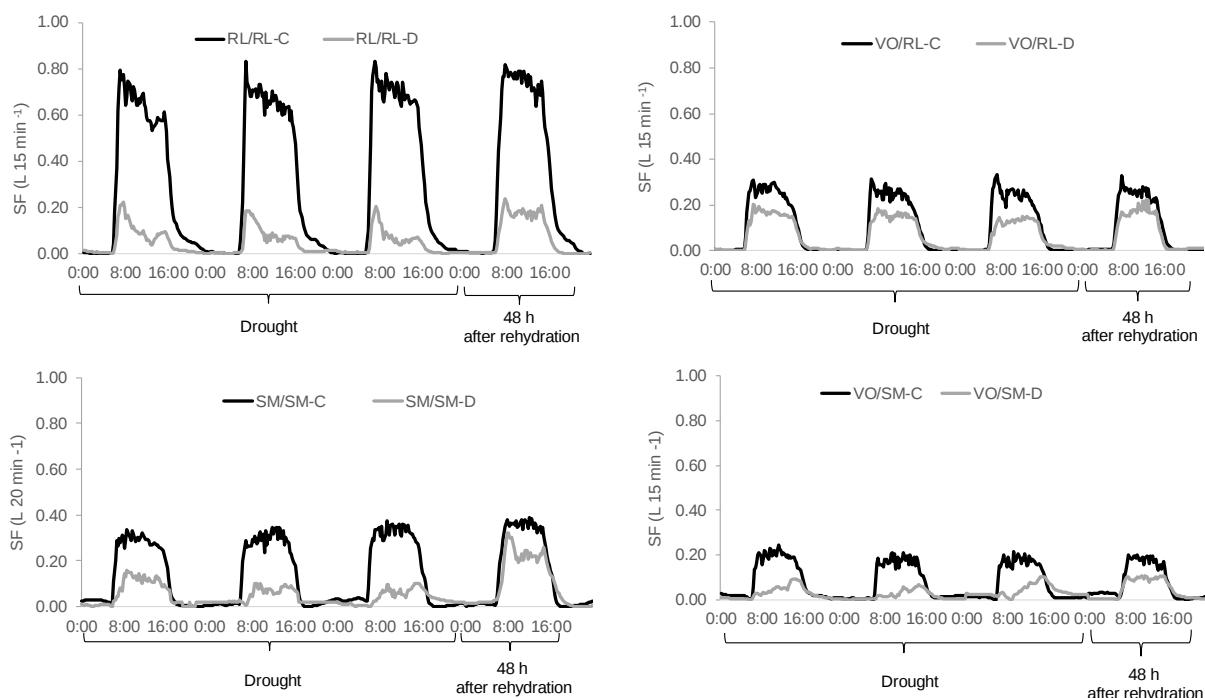


Figura 6 – Variação do fluxo de seiva de quatro diferentes combinações copa/porta-enxerto de plantas de citros submetidas a quatro regimes hídricos. VO: Laranja Valência; RL: Limão Cravo; SM: Tangerina Sunki ‘Maravilha’. Controle (C) ($\Psi_{WF} = -0,1$ a $-0,5$ MPa); Seca severa (D) ($\Psi_{WF} = -1,6$ a $-2,5$ MPa); Reidratação (48 h). Valores médios de quatro réplicas biológicas. Dados médios a intervalos de 15 min.

Amido, Açúcares Solúveis e Prolina

Os teores de amido e de açúcares solúveis totais (AST) apresentaram variações significativas em folhas e raízes nas diferentes combinações copa/porta-enxerto de citros submetidos a regimes de desidratação/reidratação (Figura 7). Nas folhas, as combinações RL/RL, VO/RL, SM/SM e VO/SM sob deficiência hídrica moderada e severa reduziram os teores de amido em relação aos controles. Contudo, VO/SM no estresse moderado teve uma redução mais tênue, em torno de 17,4% quando comparadas ao seu controle. Após a reidratação, apenas VO/RL e SM/SM observou-se um aumento significativo de 39% e 50% em relação ao déficit hídrico severo (Figura 7A). Para as raízes, as combinações com o porta-enxerto RL acumularam os maiores teores de amido e VO/RL acumulou os maiores teores para todos os tratamentos avaliados. A combinação SM/SM apresentou menor amplitude de

variação entre os tratamentos enquanto VO/SM acumulou os menores teores de amido com maior valor médio para o tratamento de deficiência hídrica severa (20,1 mg g⁻¹ MS) (Figura 7B).

Os teores de AST nas folhas foram maiores para as combinações com o porta-enxerto SM. SM/SM teve os valores aumentados com o aumento da deficiência hídrica e esse aumento permaneceu mesmo após a reidratação. Enquanto VO/SM apresentou maior teor de AST sob deficiência hídrica moderada e severa (Figura 7C). Nas raízes os teores de AST foram com a deficiência hídrica em todas as combinações avaliadas (Figura 7D).

Nas folhas os teores de sacarose no porta-enxerto RL apresentou pequenas variações para as suas combinações, enquanto que o SM apresentou aumento significativos para a deficiência severa para ambas as combinações. Por outro lado, incrementos MD e R foram verificados apenas em VO/SM (Figura 7E). Nas raízes para todas as combinações do MD houve incrementos significativos quando comparado ao controle. Tal comportamento foi mantido no SD apenas nas combinações do porta-enxerto SM. Na reidratação apenas a combinação VO/RL não teve aumento significativo quando comparado ao controle (Figura 7F).

Para os teores de glicose na folha a SD favoreceu incrementos em todas as combinações quando comparado ao controle, porém tal resposta não é verificada após a reidratação (Figura 7G). De maneira contrária, para as raízes nos tratamentos MD e SD não houve aumentos nos teores de glicose, mas após a reidratação os valores médios foram equiparados ao controle (Figura 7H).

Os teores de frutose nas folhas exibiu o mesmo padrão apresentado nos teores de glicose (Figura 7I). Nas raízes as combinações com o porta-enxerto RL não exibiram um padrão de resposta em contrapartida para as combinações com o porta-enxerto SM os teores de frutose aumentaram com o aumento do estresse (Figura 7J)

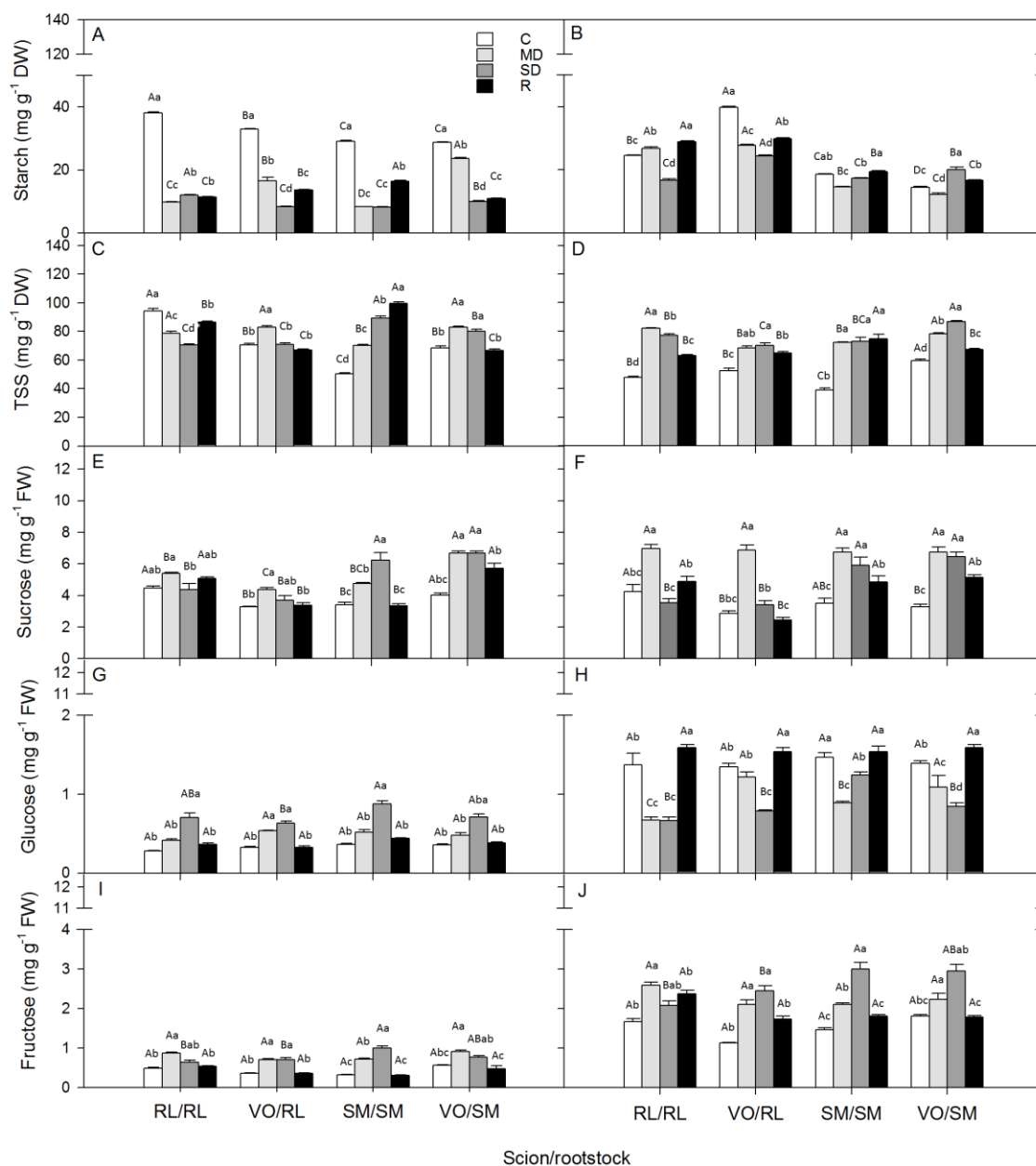


Figura 7 – Variação nos teores de amido e açúcares em folhas e raízes de citros, em diferentes combinações copa/porta-enxerto, submetidos a regimes de desidratação/reidratação. Amido (A e B), AST (C e D), sacarose (E e F), glicose (G e H) e frutose (I e J). VO: Laranja Valência, RL: Limão Cravo, SM: Tangerina Sunki 'Maravilha'. Controle (C) ($\Psi_{WF} = -0,1$ a $-0,5$ MPa), Estresse Moderado (MD) ($\Psi_{WF} = -0,6$ a $-1,5$ MPa), Estresse Severo (SD) ($\Psi_{WF} = -1,6$ a $-2,5$ MPa), Reidratação (R) após 48 h até que o solo atingisse a capacidade de campo. Letras maiúsculas comparam as médias entre as combinações copa/porta-enxerto para o mesmo regime hídrico e as letras minúsculas comparam as médias entre os regimes hídricos para as mesmas combinações copa/porta-enxerto. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Valores médios de quatro réplicas biológicas e oito repetições técnicas $\pm$ EP.

Os teores de prolina em folhas e raízes de todas as combinações copa/porta-enxerto aumentaram com o avanço da deficiência hídrica e apresentaram redução dos teores após o período de reidratação (Figura 8). Nas folhas, a deficiência hídrica (SM, SD) levou a um aumento nos teores de prolina para todas as combinações em comparação ao controle, porém o impacto no teor desse aminoácido foi em média 11 vezes maior para SD. Após a reidratação, o teor de prolina nas folhas teve redução nos valores médios para todas as combinações, sendo 59% menor quando comparado a SD e 90% maior em comparação ao controle (Figura 8A). As raízes apresentam resposta similar as folhas em que o déficit hídrico promoveu aumentos significativos no teor de prolina independentemente do porta-enxerto e de suas combinações (Figura 8B). No entanto foi a SD que promoveu o maior incremento, variando de 4x até 7x para RL/RL, SM/SM, respectivamente em comparação ao controle (Figura 8B).

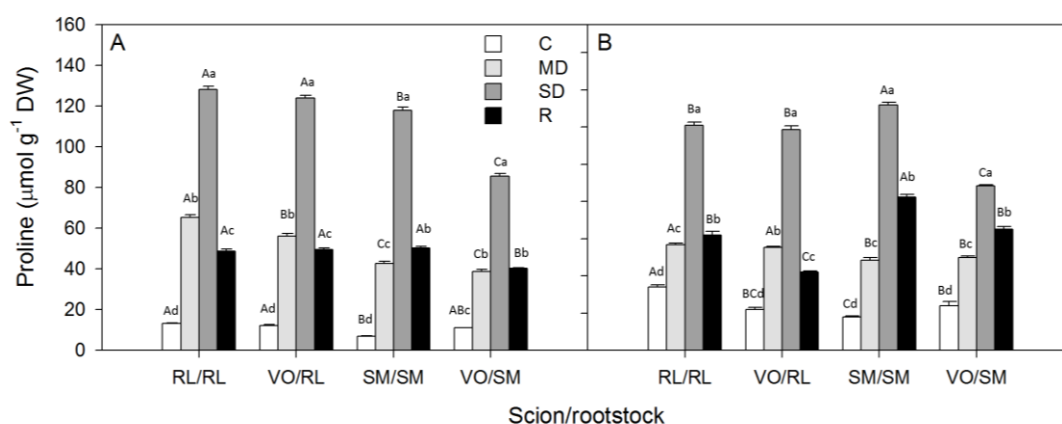


Figura 8 – Teores de prolina em folhas e raízes das diferentes combinações copa/porta-enxerto de citros submetidos a regimes desidratação/reidratação. VO: Laranja Valência, RL: Limão Cravo, SM: Tangerina Sunki ‘Maravilha’. Controle (C) ($\Psi_{WF} = -0,1$ a $-0,5$ MPa), Estresse Moderado (MD) ($\Psi_{WF} = -0,6$ a $-1,5$ MPa), Estresse Severo (SD) ($\Psi_{WF} = -1,6$ a $-2,5$ MPa), Reidratação (R) após 48 h até que o solo atingisse a capacidade de campo. Letras maiúsculas comparam as médias entre as combinações copa/porta-enxerto para o mesmo regime hídrico e as letras minúsculas comparam as médias entre os regimes hídricos para as mesmas combinações copa/porta-enxerto. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Valores médios de quatro réplicas biológicas e oito repetições técnicas $\pm$ EP.

Expressão gênica

A expressão do gene da via de biossíntese do amido, *GBSSIb*, apresentou uma redução na expressão em folhas e raízes, quando comparadas ao controle, para as combinações copa-porta enxerto avaliadas (Figura 9 A e B). Entretanto, a combinação RL/RL apresentou um aumento na expressão durante a reidratação em folhas (Figura 9A) e sob deficiência hídrica moderada e severa nas raízes (Figura 9B). A combinação VO/RL apresentou aumento da expressão sob deficiência hídrica moderada nas raízes (Figura 9B).

A expressão dos genes *BAM1*, *ISA1* e *ISA2* da via de degradação do amido apresentaram expressão, de modo geral, induzida em folhas e raízes (Figura 9 C, D, E, F, G e H). Em maior estresse osmótico a expressão de *BAM1* foi maior para o porta-enxerto RL. A expressão dos genes *GBSSIb*, *BAM1* e *ISA1* apresentaram comportamento similar nas raízes para a combinação RL/RL, com aumento de expressão em condições de deficiência hídrica e de redução da expressão após a reidratação (Figura 9 B, D e F).

A expressão dos genes da via de biossíntese e degradação do amido foram maiores para as combinações com porta-enxerto RL exibindo um ajuste mais rápido do que as combinações com o porta-enxerto SM.

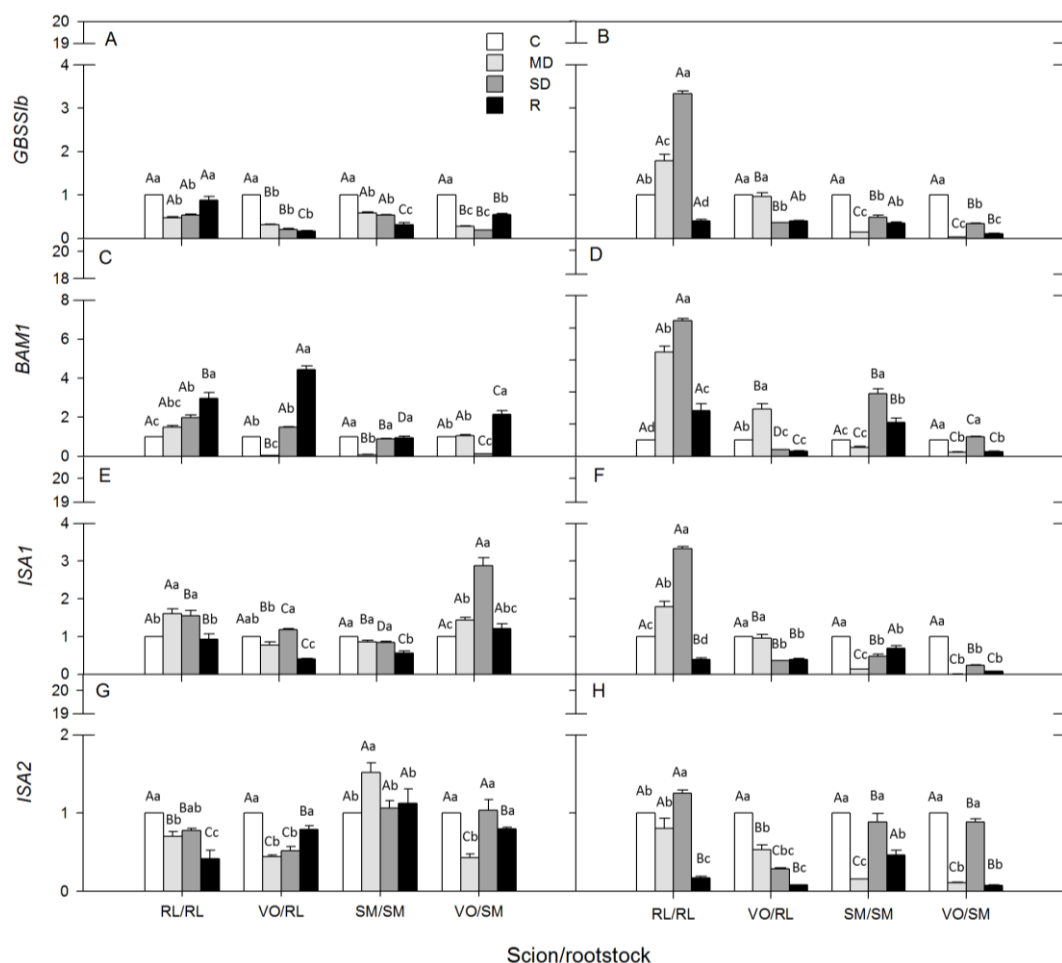


Figura 9 – Expressão relativa dos genes da via de biossíntese e degradação de amido em folhas e raízes de diferentes combinações copa/porta-enxerto de citros submetidas a regimes de desidratação/reidratação. *GBSS/b* (A e B) *BAM1* (C e D), *ISA1* (E e F) e *ISA2* (G e H). Controle (C) ($\Psi_{WF} = -0,1$ a $-0,5$ MPa), Estresse Moderado (MD) ($\Psi_{WF} = -0,6$ a $-1,5$ MPa), Estresse Severo (SD) ($\Psi_{WF} = -1,6$ a $-2,5$ MPa), Reidratação (R) após 48 h até que o solo atingisse a capacidade de campo. Letras maiúsculas comparam as médias entre as combinações copa/porta-enxerto para o mesmo regime hídrico e as letras minúsculas comparam as médias entre os regimes hídricos para as mesmas combinações copa/porta-enxerto. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Houve indução da expressão do gene *SPS1* da via de biossíntese da sacarose em condições de deficiência hídrica moderada e severa para tanto sendo maior nas raízes. (Figura 10 A e B). Por outro lado, para o gene *SUS1* da via de degradação da sacarose, pode-se verificar um aumento da expressão nas folhas em condições de deficiência hídrica severa para as combinações

RL/RL, VO/RL e SM/SM e para a combinação VO/SM em condições de deficiência hídrica moderada. Nas raízes, a expressão deste gene foi reprimida para todos os tratamentos, quando comparada aos respectivos controles. Entretanto, para combinação SM/SM, houve um aumento da expressão deste gene após a reidratação (Figura 10 C e D). Já para o gene *SUS6* da via de degradação de sacarose, a expressão também foi, de modo geral, reprimida nas folhas, sendo induzida apenas para a combinação SM/SM no estresse moderado (Figura 10 E). Nas raízes, a expressão foi induzida na deficiência hídrica severa para a combinação RL/RL e para a combinação SM/SM sob estresse severo e na reidratação (Figura 10 F).

A expressão dos genes *A/N INV-B* e *A/N INV-D*, associados à biossíntese das enzimas invertases, apresentou um perfil semelhante de indução nos órgãos avaliados, com uma maior expressão nas folhas e menor expressão nas raízes (Figura 10 G, H, I e J). Nas folhas, a combinação RL/RL apresentou uma maior expressão destes genes em condições de deficiência hídrica severa. O gene *A/N INV-E* em condições de deficiência hídrica moderada e severa para a combinação RL/RL teve expressão induzida (Figura 10K). Já as combinações RL/RL, SM/SM e VO/SM apresentaram indução da expressão deste gene nas raízes, em condições de deficiência hídrica severa (Figura 10L).

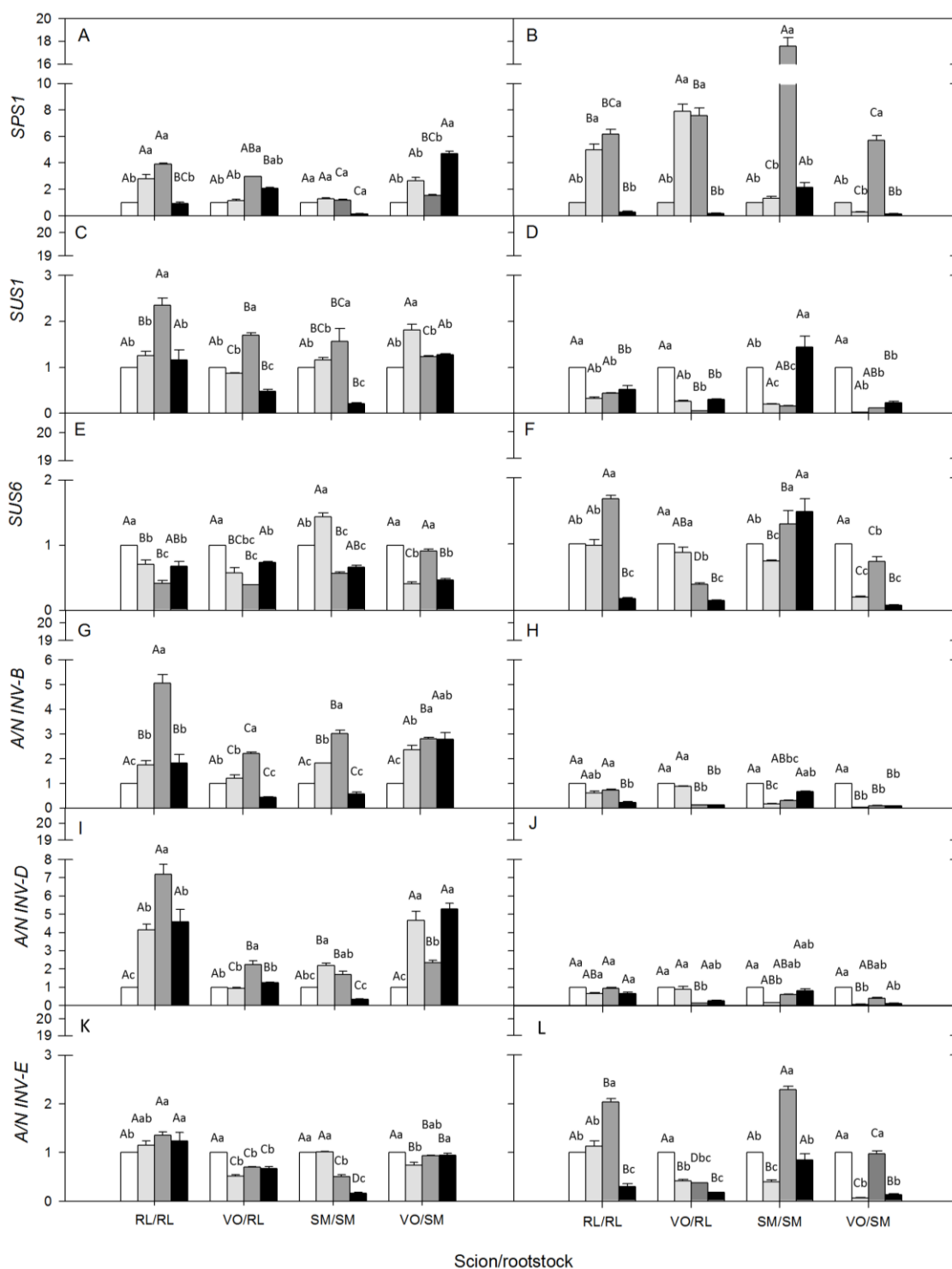


Figura 10 – Expressão relativa dos genes da via de biossíntese e degradação de sacarose em folhas e raízes de diferentes combinações copa/porta-enxerto de citros submetidas a regimes de desidratação/reidratação. *SUS1* (A e B), *SUS 6* (C e D), *SPS1* (E e F) *A/N INV-B* (G e H), *A/N INV-D* (I e J) e *A/N INV-E* (K e L). Controle (C) ($\Psi_{WF} = -0,1$ a $-0,5$ MPa), Estresse Moderado (MD) ($\Psi_{WF} = -0,6$ a $-1,5$ MPa), Estresse Severo (SD) ($\Psi_{WF} = -1,6$ a $-2,5$ MPa), Reidratação (R) após 48 h até que o solo atingisse a capacidade de campo. Letras maiúsculas comparam as médias entre as combinações copa/porta-

enxerto para o mesmo regime hídrico e as letras minúsculas comparam as médias entre os regimes hídricos para as mesmas combinações copa/porta-enxerto. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Nas folhas, em condições severas de deficiência hídrica, houve um aumento na expressão do gene *P5CS* para as combinações RL/RL e SM/SM. A expressão do gene *P5CS* nas raízes foi induzida quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica moderada e severa, especialmente na combinação SM/SM. Em contraste, houve redução na expressão após o período de reidratação para todos os tratamentos (Figura 11 A e B).

Em relação ao gene *P5CR*, verificou-se que sua maior expressão ocorreu em nível foliar para a combinação SM/SM submetida à deficiência hídrica moderada e para a combinação VO/SM após a reidratação, quando comparadas ao controle. A maior expressão nas raízes foi apresentada pela combinação RL/RL em condições de deficiência hídrica moderada e severa. A combinação SM/SM também teve indução na expressão desse gene somente na deficiência hídrica severa, quando comparada ao controle (Figura 11 C e D).

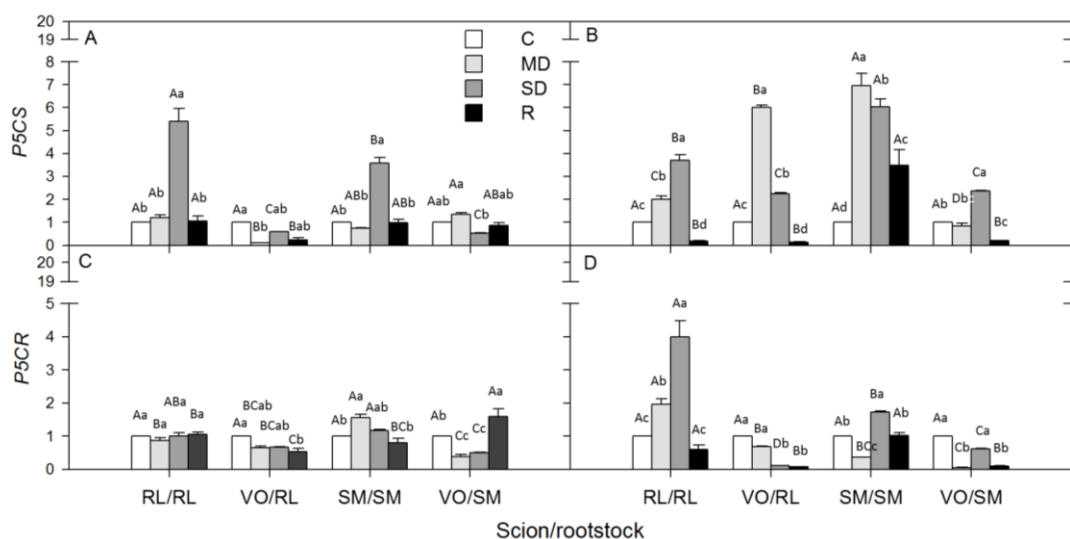


Figura 11 – Expressão relativa dos genes da via de biossíntese de prolina em folhas e raízes de diferentes combinações copa/porta-enxerto de citros submetidas a regimes de desidratação/reidratação. *P5CS* (A e B) E *P5CR* (C e D). Controle (C) ($\Psi_{WF} = -0,1$ a $-0,5$ MPa), Estresse Moderado (MD) ($\Psi_{WF} = -0,6$ a $-1,5$ MPa), Estresse Severo (SD) ($\Psi_{WF} = -1,6$ a $-2,5$ MPa), Reidratação

(R) após 48 h até que o solo atingisse a capacidade de campo. Letras maiúsculas comparam as médias entre as combinações copa/porta-enxerto para o mesmo regime hídrico e as letras minúsculas comparam as médias entre os regimes hídricos para as mesmas combinações copa/porta-enxerto. As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas ou minúsculas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Análise Multivariada

A fim de avaliar o relacionamento entre combinações copa/porta-enxerto de citros sob condições de desidratação e reidratação, entre variáveis, bem como o interrelacionamento entre combinações e variáveis, fez-se a análise biplot baseada em componentes principais (Figura 12). Observou-se que as variáveis que mais contribuíram para formação da primeira componente principal (54.7%) os teores de prolina e frutose em raízes e folhas, de AST em raízes e de glicose em folhas. Para formação da segunda componente principal (14.5%) a variável sacarose, em raízes e folhas, apresentou a maior contribuição.

As combinações copa/porta-enxerto que se localizam no mesmo quadrante das variáveis estão positivamente associadas a elas, sendo as combinações que formam os vértices do polígono consideradas as mais responsivas. Assim, em relação ao teor de amido, em folhas, e de glicose, em raízes, a combinação RL/RL, submetida à condição controle, apresentou a melhor resposta. Em contraste, SM/SM e VO/RL, nas mesmas condições, apresentou a melhor resposta para teor de amido em raízes.

A combinação VO/SM, em condições de estresse moderado e severo, apresentou a melhor resposta para teor de AST, sacarose e frutose, tanto em folhas quanto em raízes. Já as combinações RL/RL, VO/RL e SM/SM apresentaram resposta mais positiva para teor de prolina, em folhas e raízes, e teor de glicose, em folhas. O agrupamento das combinações copa/porta-enxerto dentro do polígono, próximas à origem do gráfico, indica maior estabilidade na resposta aos diversos tratamentos de desidratação e de reidratação. Nesse caso, as combinações apresentaram médias, para cada variável próxima à média da variável e, conseqüentemente, contribuíram pouco

significativamente pouco significativa para a variação total observada no conjunto de dados.

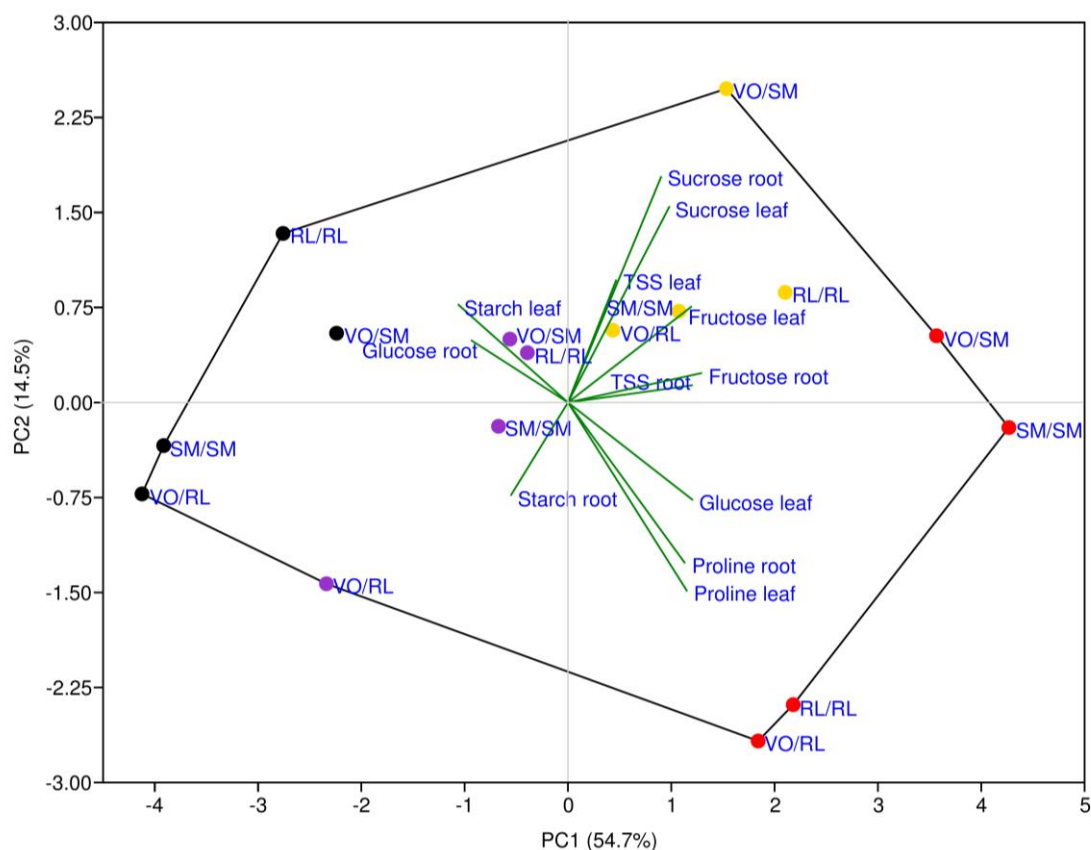


Figura 12 – *Biplot* para teores de amido, TSS, glicose, sacarose, frutose e prolina em folhas e raízes de combinações copa/porta-enxerto de citros submetidas a regimes de desidratação/reidratação em condições de campo. VO: Laranja Valência; RL: Limão Cravo; SM: Tangerina Sunki 'Maravilha'; (●) controle ($\Psi_{WF} = -0,1$ a $-0,5$ MPa); (●) Estresse moderado ($\Psi_{WF} = -0,6$ a $-1,5$ MPa); (●) Estresse severo ($\Psi_{WF} = -1,6$ a $-2,5$ MPa); (●) Reidratação, após 48 h até que o solo atingisse a capacidade de campo.

DISCUSSÃO

A diminuição da disponibilidade de água no solo leva a redução do potencial hídrico das plantas e induz ajustes metabólicos e moleculares (Nakashima e Yamaghuchi, 2013). O melhoramento de citros tem como foco, além da seleção de copas e porta-enxertos com tolerância ou resistência a estresses bióticos e abióticos, a busca de porta-enxertos com potencial diversificação e manutenção dos pomares, com tolerância a deficiência hídrica e boa produtividade (Stuchi, 2015). A deficiência hídrica no solo induziu o aumento do fluxo de seiva das diferentes combinações de copa/porta-enxerto de citros avaliadas bem como as respostas diferenciais no acúmulo de amido, açúcares solúveis e prolina, e na expressão de genes envolvidos na biossíntese e degradação de carboidratos e prolina. Estudos prévios com os porta-enxertos RL e SM mostraram que as plantas exibem diferentes padrões de resposta e estratégia de tolerância quando submetidos à deficiência hídrica (Neves et al., 2013; Oliveira et al., 2015; Santana-Vieira et al., 2016; Santos et al., 2017; Santos et al., 2019).

As plantas ajustam o metabolismo para lidar com as condições desfavoráveis, induzindo (i) alterações no fluxo de seiva do xilema (She et al., 2013), (ii) ajustes na alocação de carbono e energia e no acúmulo de amido (Pedroso et al., 2014) e no crescimento de raízes (Santos et al., 2017), (iii) síntese e acúmulo de solutos compatíveis como prolina (Zaher-Ara et al., 2016, Filippou et al., 2014) e açúcares solúveis (Neves et al., 2018; Santana-Vieira et al., 2017) e (iv) alterações na expressão de genes (Amini et al., 2015; Islam et al., 2014; Peng et al., 2014; Li et al., 2003) em resposta ao estresse.

Um menor potencial hídrico no solo reduziu a velocidade do fluxo de seiva das combinações copa/porta-enxerto de citros avaliadas (Figura 6). O potencial hídrico foliar indica o estado energético da planta. A capacidade das plantas em manter o potencial hídrico elevado e uma alta assimilação de carbono durante a transpiração ativa está relacionada à capacidade de transporte de água pelo caule da planta (condutância hidráulica) e a eficiência no suprimento de água das raízes as folhas (Siddiq et al., 2019). A água e alguns metabólitos produzidos nas raízes e transportados para a parte aérea, através da seiva do xilema, são vitais para a manutenção do *status* de

hidratação da copa, sinalização e aclimação ou adaptação ao estresse ambiental (Alvarez et al., 2008). Em condições ambientais estressantes, como a redução dos níveis de água do solo, geralmente estimulam o aumento dos níveis de hormônios como ácido abscísico (ABA), o ácido salicílico (AS) e o decréscimo do ácido indolacético (AIA) que estão envolvidos em resposta ao estresse (Santana-Vieira et al., 2016; Neves et al., 2017; Santos et al., 2017; Santos et al., 2019).

A menor variação entre os valores de fluxo de seiva entre controle e deficiência hídrica para a combinação VO/RL está em consonância com o maior volume e comprimento de raízes finas ($<0,5$ mm), conforme verificado por Santos et al. (2017). As raízes finas são a principal rota de absorção de água e nutrientes dissolvidos para as plantas, e a redução do fluxo de seiva pode ter sido afetado tanto pelo menor número de raízes finas para as combinações SM/SM e VO/SM (Santos et al., 2017), quanto pelo processo de enxertia (Zobel et al., 2007; Martinez-Ballesta et al., 2010). Quarenta e oito horas após a reidratação do solo, os valores de fluxo de seiva se aproximaram daqueles do controle, exceto para a combinação RL/RL (Figura 6). Com o aumento da umidade do solo esses valores podem aumentar rapidamente (She et al., 2013).

A deficiência hídrica exerce importante influência nos teores de carboidratos. As flutuações entre o acúmulo e redução nos teores de carboidratos em plantas de citros atuam como uma importante estratégia de sobrevivência, podendo reduzir a oferta de fotoassimilados em condições de deficiência hídrica (Ribeiro e Machado, 2007; Dong e Beckles, 2019). O amido foi degradado nas raízes e folhas de todas as combinações copa/porta-enxerto avaliadas, em condições de deficiência hídrica no solo (Figura 7 A e B). O aumento da hidrólise do amido permite a utilização do carbono de reserva para o crescimento, bem como fornece energia e esqueletos de carbono para vários processos metabólicos, como respiração, síntese de aminoácidos, lipídios e açúcares (Zeemam et al., 2010; Ruan, 2010). As combinações com o porta-enxerto RL acumularam maiores teores de amido nas raízes do que nas folhas, em comparação às combinações com o porta-enxerto SM. O porta enxerto RL é capaz de alterar a capacidade da copa sob deficiência hídrica, mantendo a disponibilidade de carboidratos e o crescimento das raízes em condições

desfavoráveis (Santos et al., 2017; Santos et al., 2019). Um maior acúmulo de amido nas raízes pode estar relacionado à maior disponibilidade de carboidratos complexos e pode atuar como uma fonte de açúcares simples como glicose e frutose. Isso permite um aumento na respiração e disponibilidade de ATP para o crescimento radicular e maior emissão de raízes finas, visando uma melhor absorção de água do solo. Ao mesmo tempo, a disponibilidade de amido em órgãos não-senescentes seria uma forma de garantir o suprimento de energia e esqueletos de carbono para a retomada do crescimento após a reidratação das plantas.

Deste modo, a manutenção dos teores de carboidratos solúveis e o investimento no crescimento das raízes, em condições desfavoráveis, indicam a capacidade do limão Cravo em coordenar a relação fonte e dreno, e com isso estabelecer um equilíbrio entre síntese e consumo de carboidratos por meio de alterações na fotossíntese, respiração e partição de carboidratos. A análise biplot mostrou que a combinação RL/RL apresentou melhor resposta para o teor de amido nas folhas em condição de controle, ao passo que a combinação VO/RL teve melhor resposta para o teor de amido nas raízes. Pedroso et al. (2014) constataram que o acúmulo de carboidratos nas raízes está associado à maior degradação de amido e redução na concentração de carboidratos no tecido foliar, um indício de aumento da exportação de carboidratos das folhas para as raízes. Resultados semelhantes foram observados em plantas de citros em condições de deficiência hídrica (García-Sanchez et al., 2007; Pérez-Péres et al., 2007; Zaher-Ara et al., 2016).

A redução dos teores de amido em raízes e folhas durante a deficiência hídrica das plantas, para as combinações copa/porta-enxerto de citros, coincidiu com a redução da expressão dos genes da via de biossíntese de amido e com o aumento da expressão dos genes associados à via de degradação nos tecidos. O gene *GBSS*, responsável pela síntese de amilose (Stitt e Zeeman, 2012), teve sua expressão reduzida em folhas e raízes com o aumento da deficiência hídrica. A expressão do gene *BAM1* das vias de degradação de amido, juntamente com os genes das isoamilases (*ISA1* e *ISA2*) que catalisam a hidrólise dos grãos de amido (Kotting et al., 2010) tiveram um aumento nas suas expressões, apresentado uma correlação inversa com o acúmulo de amido. O mesmo fato se observou para os genes

GBSSI, *BAM1* e *ISA1*, que apresentaram comportamento similar em raízes para a combinação RL/RL, exibindo aumento da expressão com a redução do potencial hídrico (Figura 9). Isto demonstra que durante períodos de estresse, as plantas remobilizam suas reservas na forma de amido para liberar energia, açúcares e metabólitos, atuando como mecanismo de proteção e auxiliando a mitigar o estresse causado pela seca. A expressão dos genes da via de biossíntese e degradação do amido foram maiores para as combinações com porta-enxerto RL exibindo um ajuste mais rápido.

Os teores de açúcares solúveis aumentaram em folhas para a maior parte das combinações de citros e em raízes para todas as combinações em condições de deficiência hídrica (Figura 7). Esse acúmulo ocorre devido a um maior grau de conversão de amido em carboidratos simples. Além de estarem envolvidos na regulação e sinalização, os açúcares atuam como osmoprotetores, estabilizando as membranas celulares e mantendo a turgescência das células de todos os tecidos da planta (Bolouri-Moghaddam et al., 2010; Zaher-Ara et al., 2016). A contribuição osmótica dos açúcares também pode ser essencial para o acúmulo de uma força motriz para as raízes absorverem a água do solo (Gomes Silveira et al., 2003).

O acúmulo de sacarose foi aumentado em condições de deficiência hídrica em folhas e raízes e as combinações com o porta-enxerto SM acumularam mais sacarose (Figura 7). Evidenciado, principalmente, na combinação VO/SM, que, em deficiência hídrica moderada e severa, apresentou o melhor desempenho em relação ao acúmulo de sacarose, frutose e AST em folhas e raízes (Figura 12). Logo, esta combinação se apresentou com maior fonte de carbono, melhor sinalização e regulação de processos metabólicos, bem como melhor osmoproteção contra radicais livres gerados em resposta à escassez de água no solo (Neves, et al., 2017; Santos, et al, 2019). A sacarose é o principal produto da fotossíntese, o fotoassimilado mais transportado via floema pelas plantas, que desempenha um papel central para as plantas, fornecendo esqueletos de carbono dos tecidos fontes para os tecidos drenos, afetando o desenvolvimento, o crescimento, o armazenamento, a sinalização e a aclimação ao estresse (Ruan, 2014).

Em citros, a ausência da atividade de órgãos dreno resulta em aumento da concentração de sacarose no floema, redução na taxa fotossintética e

acúmulo de amido nas folhas. Quando os drenos estão ativos, uma relação positiva entre fotossíntese e aumento da exportação/consumo de fotoassimilados é estabelecida, o que resulta no crescimento do órgão dreno (Ribeiro et al., 2012). De acordo com Santana-Vieira et al. (2016), o porta-enxerto RL adota a estratégia de evitar a seca, focada na manutenção do crescimento, enquanto que o porta-enxerto SM apresenta estratégia de tolerância à seca focando na sobrevivência, o que pode conferir uma vantagem sob deficiência hídrica prolongada.

Numa visão geral, os teores de hexoses foram maiores nas raízes do que nas folhas das combinações de citros avaliadas. Os teores de glicose foram aumentados nas folhas e reduzido nas raízes para todas as combinações copa-porta-enxerto avaliadas. Os teores de frutose, sob condição de deficiência hídrica moderada e severa, foram maiores que no controle (Figura 7). Uma das respostas das plantas a deficiência hídrica é o aumento da concentração de açúcares solúveis. E estudos sugerem que plantas com maior capacidade de tolerância a deficiência hídrica acumulam maiores teores de açúcares. Os açúcares atuam como moléculas sinalizadoras, como fonte de energia e também estão envolvidas em uma ampla gama de eventos fisiológicos (Yamada e Osakabe, 2017), como a redução do crescimento durante o estresse metabólico para a manutenção da homeostase celular (Tsai e Gazzarrini, 2014; Naëgele e Weckwerth 2014). A hidrólise da sacarose em hexoses (glicose e frutose) duplica a contribuição osmótica, contribuindo para o fluxo de hexoses na célula, o que pode sugerir o fornecimento de açúcares para osmoproteção em condições de deficiência hídrica. As hexoses estão envolvidas na substituição da perda de água se ligando as extremidades polares da membrana e mantendo o turgor celular. O aumento dos teores de açúcares durante o estresse osmótico pode levar a um menor acúmulo de radicais livres e redução do estresse oxidativo, além de uma maior atividade do metabolismo enzimático e não enzimático (Santos et al., 2019; Neves et al., 2017; Santana-Vieira et al., 2016; Gonçalves et al., 2016).

O aumento da expressão dos genes envolvidos na biossíntese de enzimas associadas à síntese de sacarose contribuiu para o acúmulo de sacarose em folhas e raízes das combinações de citros avaliadas. Em citros, a sacarose é a principal forma de carboidrato transportado. Sendo assim, a força

de dreno é determinada pela atividade das enzimas de clivagem da sacarose nos drenos, a sacarose sintase (SUS) e as invertases. Ambas são responsáveis pela clivagem da sacarose em locais de descarregamento do floema, com os produtos gerados seguindo rotas bioquímicas variadas (Coleman et al., 2009). O gene *SPS1*, que catalisa a biossíntese de sacarose (Winter; Huber, 2000), teve uma maior associação com os teores de açúcares e foi mais expresso nas raízes do que em folhas em condições de deficiência hídrica, principalmente para a combinação SM/SM em condições de deficiência hídrica severa (Figura 10). Por outro lado, os genes *SUS* e invertases, que catalisam a conversão de sacarose em glicose e frutose, demonstraram ter expressão tecido-específica. O gene *SUS1* teve expressão induzida em folhas em condições de deficiência hídrica severa para as combinações com porta-enxerto RL (Figura 10). A hidrólise da molécula de sacarose é vital em plantas, não só na alocação do carbono, mas na sinalização a base de hexoses nos drenos, desempenhando um papel positivo na tolerância ao estresse abiótico, promovendo o ajuste osmótico, a detoxificação de ERO e a eficiência da fotossíntese (Ruan, 2012; Bolouri-Moghaddam et al., 2010; Ruan et al., 2010). As hexoses, liberadas a partir da hidrólise de sacarose, podem ser utilizadas em processos anabólicos ou catabólicos e também fornecendo açúcares redutores para o processo de ajustamento osmótico (Tauzin e Giardina, 2014; Dahro et al., 2016).

O aumento no teor de prolina ocorreu em paralelo com a severidade da deficiência hídrica nas raízes e folhas das combinações de citros avaliadas (Figura 8). O acúmulo de prolina é uma resposta comum em plantas submetidas à deficiência hídrica. Esta resposta metabólica das plantas se apresentou como estratégia de tolerância à deficiência hídrica nas diferentes combinações de citros. Pois, a prolina atuou como osmoprotetor em condições de estresse hídrico, principalmente para as combinações RL/RL, VO/RL e SM/SM, as quais apresentaram o melhor desempenho para síntese de prolina, em raízes e folhas, em condições de deficiência hídrica severa (Figura 12). Diversos estudos reportam o acúmulo de prolina em plantas de citros sob deficiência hídrica (Garcia-Sanchez et al., 2007; Arbona et al., 2015; Zaher-Ara et al., 2016; Zandalinas et al., 2017). De acordo com Per et al. (2017), a

biossíntese e a sinalização de prolina contribuem para o equilíbrio redox da célula em condições normais e estressantes.

A expressão do gene *P5CS*, da via de biossíntese de prolina, desempenhou um papel significativo no acúmulo de prolina nas combinações copa/porta-enxerto de plantas de citros em condições de deficiência hídrica. Sua expressão nas raízes exibiu maior relação com os níveis de prolina acumulado durante o período de estresse (Figura 11 e 8). O mesmo fato foi observado para a expressão do gene *P5CR*, também associado com a biossíntese de prolina em raízes, para a combinação RL/RL (Figura 11). Quando a expressão de *P5CS* é induzida, o acúmulo de prolina atinge níveis mais elevados, o que não ocorre com a outra via da enzima *P5CR* (Molinari et al., 2014; Amini et al., 2015). A via biossintética da prolina é ativada e seu catabolismo reprimido durante a desidratação, enquanto a reidratação regula em direções opostas. O equilíbrio entre síntese e degradação de prolina é essencial na determinação de fatores osmoprotetores e de desenvolvimento (Benitez et al., 2016).

O acúmulo de amido, que são hidrolisados e convertidos em açúcares solúveis e osmólitos como a prolina, podem diminuir o potencial osmótico das folhas, permitindo que as plantas mantenham um gradiente de potencial hídrico favorável à medida que o solo se torna mais seco. Além disso, atuam protegendo as plantas contra a desidratação sem interferir nos processos bioquímicos, contribuindo para o ajuste osmótico, desintoxicação de ERO, proteção da integridade da membrana e estabilização de enzimas/proteínas, além de fornecer nitrogênio e carbono após a reidratação, como fonte de energia e molécula sinalizadora (Marijuan e Bosch, 2013; Zou et al., 2013; Amini et al., 2015). Assim, folhas com baixo potencial osmótico podem manter o turgor necessário para manter os estômatos abertos e sustentar as trocas gasosas foliares e o crescimento da planta toda (Syvertsen e Garcia-Sanchez, 2006; Garcia-Sanchez et al., 2007; Zandalinas et al., 2017).

CONCLUSÕES

Diante das análises realizadas e dos resultados obtidos pode-se inferir que as combinações VO/RL e VO/SM apresentaram diferentes estratégias de tolerância à deficiência hídrica no solo. VO/RL utilizou como estratégia de tolerância à seca, a menor redução do fluxo de seiva no caule e o maior acúmulo de amido nas raízes. Nesta combinação, os menores teores de amido coincidiram com uma menor expressão dos genes da via de biossíntese de amido e com o aumento da expressão dos genes da via de degradação, exibindo um ajuste mais rápido. Por outro lado, VO/SM acumulou maiores teores de açúcares solúveis totais nas raízes e folhas, como mecanismo de proteção de suas células.

Os maiores teores de prolina nas folhas e raízes, bem como as maiores expressões dos genes associados à sua biossíntese, foram resultados de combinações tendo RL como porta-enxerto. Isto pode ser considerado como uma estratégia metabólica das plantas de citros sob deficiência hídrica para a manutenção da homeostase celular. Em contrapartida, combinações tendo SM como porta-enxerto acumularam maiores teores de açúcares solúveis nas folhas e raízes, cuja expressão do gene, que catalisa a biossíntese de sacarose, teve uma maior associação com os teores de açúcares.

REFERÊNCIAS

- Alvarez, S.; Marsh, E.L.; Schroeder, S.G.; Schachtman, D.P. Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. **Plant, Cell and Environmental**, 31: 325 – 340, 2008.
- Amini, S.; Ghobaldi, C.; Yamchi, A. Proline accumulation and osmotic stress: an overview of *P5CS* gene in plants. **Journal of Plant Molecular Breeding**, 3 (2): 44–55, 2015.
- Arabzadeh, N. The effect of drought stress on soluble carbohydrates (sugars) in two species of *Haloxylon persicum* and *Haloxylon aphyllum*. **Asian Journal of Plant Science**, 11 (1): 44-51, 2012.
- Arbona, V.; Iglesias, D.; Jacas, J.; Primo-Millo, E.; Gómez-Cadenas, A. Hydrogel substrate amendment alleviates drought effects on young citrus plants. **Plant and Soil**, 270 (1): 73–82, 2005.
- Arbona, V.; De Ollas, C. J.; Argamasilla, R.; López-Climent, M. F.; Gómez-Cadenas, A. Hormone and metabolite traits related to abiotic stress tolerance in citrus. **Acta Horticulturae**, 1065: 1275-1282, 2015.
- Argamasilla, R.; Gómez-Cadenas, A.; Arbona, V. Metabolic and Regulatory Responses in Citrus Rootstocks in Response to Adverse Environmental Conditions. **Journal of Plant Growth Regulation**, 33 (2): 169–180, 2014.
- Asami, P.; Mundree, S.; Williams, B. Plant Science Saving for a rainy day: Control of energy needs in resurrection plants. **Plant Science**, 271: 62–66, 2018.
- Ashraf, M.; Foolad, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, 59 (2): 206–216, 2007.
- Ashraf, M.; Harris, P. J. C. Photosynthesis under stressful environments: An overview. **Photosynthetica**, 51 (2): 163–190, 2013.
- Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. CitrusBr, 2018. <http://www.citrusbr.com/>
- Barry, G.; Castle, W.; Davies, F. Rootstocks and plant water relations affect sugar accumulation of citrus fruit via osmotic adjustment. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 129 (6): 881–889, 2004.

Bates, L. S., Waldren, R; Teare, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, 39, 205–207, 1973.

Beever, D. Os transgênicos e o futuro da agricultura. **Biotecnologia e Desenvolvimento**. 15: 4-7, 2000

Benitez, L. C.; Vighi, I. L.; Auler, P. A.; Amaral, M. N.; Moraes, G. P.; Rodrigues, G. S.; Maia, L. C.; Magalhães Júnior, A. M.; Braga, E. J. B. Correlation of proline content and gene expression involved in the metabolism of this amino acid under abiotic stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, 38, 267, 2016.

Bergonci, J.I.; Bergamaschi, H.; Berlato, M.A.; Santos, A.O. Potencial da água na folha como um indicador de déficit hídrico em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35 (8): 1531-1540, 2000.

Bolouri-Moghaddam, M. R.; Le Roy, K.; Xiang, L.; Rolland, F., Van den Ende, W. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. **FEBS Journal**, 277 (9): 2022–2037, 2010.

Boteon, M.; Neves, E. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. **Citros: liderança paulista**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. 20–36, 2005.

Bray, E. A. Plant Responses to Water Deficit. 1385, 96, 1997.

Bueno, A. C. R.; Prudente, D.; Machado, E.; Ribeiro, R. Daily Temperature Amplitude Affects the Vegetative Growth and Carbon Metabolism of Orange Trees in a Rootstock-Dependent Manner. **Journal of Plant Growth Regulation**, 31 (3): 309–319, 2012

Ceusters, N.; Ende, W. Van Den; Ceusters, J. Exploration of Sweet Immunity to Enhance Abiotic Stress Tolerance in Plants : Lessons from CAM. **Progress in Botany**, 78: 145–166, 2016

Chaves, M. M.; Flexas, J.; Pinheiro, C. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, 103 (4): 551–560, 2009.

Chen, Y. et al. Epigenetic events in plant male germ cell heat stress responses. **Plant Reproduction**, 29 (1–2): 21–29, 2016

Chen, G. X.; Zhen, S.; Liu, Y.; Zangh, M.; Yan, Y. In vivo phosphoproteome characterization reveals key starch granule-binding phosphoproteins involved in wheat water-deficit response. **BMC Plant Biology**, 17 (1): 1–13, 2017.

Cheng, J.; Khan, M. A.; Qiu, A.; Li, J.; Zhou, H.; Zhang, Q.; Guo, W.; Peng, J.; Sun, F.; Li, S.; Korban, S.; Han, Y. Diversification of genes encoding granule-

bound starch synthase in monocots and dicots is marked by multiple genome-wide duplication events. **PLoS ONE**, 7 (1): 1–10, 2012.

Clegg, K. M. The application of the anthrone reagent to the estimation of starch in cereals. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 7 (1): 40–44, 1956.

Coelho Filho, M. A.; Angelocci, L. R.; Campeche, L. F. S. M.; Folegatti, M. V.; Bernardes, M. S. Field determination of young acid lime plants transpiration by the stem heat balance method. **Scientia Agricola**, 62 (3): 240–247, 2004.

Coleman, H.D.; Yan, J.; Mansfield, S. D. Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure. **Proc Natl Acad Sci USA**, 106:13118-13123, 2009.

Dahro, B.; Wang, F.; Peng, T.; Liu, J. PtrA/NINV, an Alkaline/neutral invertase gene of *Poncirus trifoliata*, confers enhanced tolerance to multiple abiotic stresses by modulating ROS levels and maintaining photosynthetic efficiency. **BMC Plant Biology**, 16 (1): 1–18, 2016.

Delgado-Rojas, J.; Angelocci, L.; Folegatti, M. V.; Coelho Filho, M. A. Desempenho da sonda de dissipação térmica na medida da transpiração de plantas jovens de lima ácida. **Engenharia Agricola**, 27: 404–413, 2007.

Dong, S.; Beckles, D. M. Dynamic changes in the starch-sugar interconversion within plant source and sink tissues promote a better abiotic stress response, **Journal of Plant Physiology**, 234 – 235: 80 – 93, 2019.

Dória, M. S.; Souza, A. O.; Barbosa, C. J.; Costa, M. G. C.; Gesteira, A. S.; Souza, R. M.; Freitas, A. C. O.; Pirovani, C. P. Citrus tristeza virus (CTV) Causing Proteomic and Enzymatic Changes in Sweet Orange Variety “Westin”. **PLoS ONE**, 10: 1 – 18, 2015.

Espinoza-Núñez, E.; Mourão Filho, A. A.; Stuchi, E. S.; Cantuarias-Avilés, T.; Dias, C. T. Performance of “Tahiti” lime on twelve rootstocks under irrigated and non-irrigated conditions. **Scientia Horticulturae**, 129 (2), 227–231, 2011.

Fariduddin, Q.; Khanam, S.; Hasan, S. A.; Ali, B.; Hayat, S.; Ahmad, A. Effect of 28-homobrassinolide on the drought stress-induced changes in photosynthesis and antioxidant system of *Brassica juncea* L. **Acta Physiologiae Plantarum**, 31 (5): 889–897, 2009.

Filippou, P.; Bouchagier, P.; Skotti, E.; Fotopoulos, V. Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the

invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, 97: 1–10, 2014.

Fundo de Defesa da Citricultura. Fundecitrus, 2019.
<https://www.fundecitrus.com.br/>

Galtier, N.; Foyer, C. H.; Huber, J.; Voelker, T. A.; Huber, S. C. Effects of Elevated Sucrose-Phosphate Synthase Activity on Photosynthesis , Assimilate Partitioning , and Growth in Tomato (*Lycopersicon esculentum* var UC82B). **Plant Physiology**, 111(2): 535–543, 1993.

Garcia-Lor, A.; Curk, F.; Snoussi-Trifa, H.; Morillon, R.; Luro, F.; Navarro, L.; Ollitrault, P. A nuclear phylogenetic analysis : SNPs , indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the ‘ true citrus fruit trees ’ group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. **Annals of Botany**, 1967: 1–19, 2013.

García-Sánchez, F.; Syvertsen, J.; Gimeno, V.; Botia, P.; Perez-Perez, J.G. Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water-use efficiency. **Physiologia Plantarum**, 130 (4): 532–542, 2007.

García-Sánchez, F.; Syvertsen, J. Salinity tolerance of Cleopatra mandarin and Carrizo citrange citrus rootstock seedlings is affected by CO₂ enrichment during growth. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, 131 (1): 24–31, 2006.

Gomes Silveira, J. A.; Viegas, R. A.; Rocha, I. M. A.; Moreira, A. C.; Moreira, R.; Oliveira, J. T. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, 160 (2): 115–123, 2003.

Gonçalves, L. P.; Alves, T. F. O.; Martins, C.; Souza, A.; Santos, I.; Pirovani, C.; Almeida A-A.; Coelho-Filho, M.; Gesteira, A.; Soares Filho, W.; Girardi, E.; Costa, M. Rootstock-induced physiological and biochemical mechanisms of drought tolerance in sweet orange. **Acta Physiologiae Plantarum**, 38 (7): 174, 1-12, 2016.

Granier, A. Evaluation of transpiration in a Douglas-fir stand by means of sap flow measurements. **Tree Physiology**, 3 (4): 309–320, 1987.

Hayat, S.; Hayat, Q.; Alyemeni, M.; Wani, A.; Pichtel, J.; Ahmad, A. Role of proline under changing environments: A review. **Plant Signaling and Behavior**, 7: 1-12, 2012.

Horrer, D.; Flutsch, S.; Pazmino, D.; Leonhardt, N.; Lawson, T.; Santelia, D. Blue light induces a distinct starch degradation pathway in guard cells for stomatal opening. **Current Biology**, 26 (3): 362–370, 2016.

Hsiao, T. C.; Xu, L. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. **Journal of Experimental Botany**, 51 (350): 1595–1616, 2000.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE, 2018 <https://www.ibge.gov.br/>

Iglesias, D. J.; Lliso, I.; Tadeo, F.; Talon, M. Regulation of photosynthesis through source: sink imbalance in citrus. **Physiologia Plantarum**, 116: 563–572, 2002.

Islam, M. Z.; Hu, X.; Jin, L.; Peng, Y. Genome-Wide Identification and Expression Profile Analysis of Citrus Sucrose Synthase Genes: Investigation of Possible Roles in the Regulation of Sugar Accumulation. **PLoS ONE**, 9 (11): e113623, 2014.

Jiménez, S.; Dridi, J.; Gutiérrez, D.; Moret, D.; Irigoyen, J.; Moreno, M.; Gogorcena, Y. Physiological, biochemical and molecular responses in four Prunus rootstocks submitted to drought stress. **Tree Physiology**, 33 (10): 1061–1075, 2013.

Johkan, M.; Mitukuri, K.; Yamasaki, S.; Mori, G.; Oda, M. Causes of defoliation and low survival rate of grafted sweet pepper plants. **Scientia Horticulturae**, 119 (2): 103–107, 2009.

Jones, H. G. How do rootstocks control shoot water relations? **New Phytologist**, 194 (2): 301–303, 2012.

Kausar, R.; Arshad, M.; Shahzad, A.; Komatsu, S. Proteomics analysis of sensitive and tolerant barley genotypes under drought stress. **Amino Acids**, 44 (2): 345–359, 2013.

Kavi Kishor, P. B.; Sangam, S.; Amrutha, R. N.; Laxmi, P.; Naidu, K.; Rao, K.; Reddy, K.; Theriappan, P.; Sreenivasulu, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, 88 (3): 424–438, 2005.

Keunen, E.; Peshev, D.; Van Den Ende, W.; Cuypers, A. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress. **Plant, Cell and Environment.**, 36: 1242–1255, 2013.

Kingston-Smith, A. H.; Walker, R. P.; Pollock, C. J. Invertase in leaves: conundrum or control point? **Journal of Experimental Botany**, 50 (335): 735–743, 1999.

Kosová, K.; Vitámvás, P.; Prášil, I.; Renaut, J. Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, 74 (8): 1301–1322, 2011

Kötting, O.; Kossmann, J.; Zeeman, S.; Lloyd, J. Regulation of starch metabolism: The age of enlightenment? **Current Opinion in Plant Biology**, 13 (3): 321–329, 2010.

Krasensky, J.; Jonak, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of Experimental Botany**, 63 (4): 1593–1608, 2012.

Kuromori, T.; Mizoi, J.; Umezawa, T.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Stress signalling networks: Drought stress. **Molecular Biology**, 2: 1–23, 2014.

Laxa, M.; Liethal, M.; Telman, W.; Chibani, K.; Dietz, K-J. The Role of the Plant Antioxidant System in Drought Tolerance. **Antioxidants**, 8 (94): 1 - 31, 2019.

Lehmann, S.; Funck, D.; Szabados, L. Proline metabolism and transport in plant development. **Amino Acids**, 39 (4): 949–962, 2010.

Lei, Y.; Yin, C.; Li, C. Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. **Physiologia Plantarum**, 127 (2): 182–191, 2006.

Li, C. Y.; Weiss, D.; Goldschmidt, E. E. Effects of carbohydrate starvation on gene expression in citrus root. **Planta**, 217: 11–20, 2003.

Lira, B. S.; Rosado, D.; Almeida, J.; Souza, A.; Buckridge, M.; Purgatto, E.; Guyer, L.; Hortensteiner, S.; Freschi, L.; Rossi, M. Pheophytinase knockdown impacts carbon metabolism and nutraceutical content under normal growth conditions in tomato. **Plant and Cell Physiology**, 57 (3): 642-653, 2016.

Liu, F.; Jensen, C. R.; Andersen, M. N. Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development: its implication in altering pod set. 86: 1–13, 2004.

Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, 25 (4): 402–408, 2001.

Machado, D. S. P.; Ribeiro, R.; Silveira, J.; Magalhães Filho, J.; Machado, E. Rootstocks induce contrasting photosynthetic responses of orange plants to low night temperature without affecting the antioxidant metabolism. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, 25 (1): 26–35, 2013.

Macneill, G. J.; Mehrpouyan, S.; Minow, M.; Patterson, J.; Tetlow, I.; Emes, M. Starch as a source , starch as a sink : the bifunctional role of starch in carbon allocation. **Journal of Experimental Botany**, 68 (16): 4433–4453, 2017.

Mafrá, V.; Kubo, K.; Alves-Ferreira, M.; Ribeiro-Alves, M.; Stuart, R.; Boava, L.; Rodrigues, C.; Machado, M. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. **Plos One**, 7 (2): 1-11, 2012.

Magalhães-Filho, J.; Amaral, L.; Machado, D.; Medina, C.; Machado, E. Deficiência hídrica, trocas gasosas e crescimento de raízes em laranjeira ‘Valência’ sobre dois tipos de porta-enxerto. **Bragantia**, 67 (1): 75–82, 2008.

Mahdieh, M.; Mostajeran, A.; Horie, T.; Katsuhara, M. Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. **Plant and Cell Physiology**, 49 (5): 801–813, 2008.

Martínez-Ballesta, M. C.; Alaraz-López, C.; Muries, B.; Mota-Cadenas, C.; Carvajal, M. Physiological aspects of rootstock-scion interactions. **Scientia Horticulturae**, 127 (2): 112–118, 2010.

Marijuan, M.; Bosch, S. Ecophysiology of invasive plants: Osmotic adjustment and antioxidants. **Trends in Plant Science**, 18 (12): 660–666, 2013.

Mccready, R. M.; Guggolz, J.; Silveira, V.; Owens, H. Determination of starch and amylase in vegetables. **Analytical Chemistry**, 22: 1156–1158, 1950.

Mesquita, G. L.; Zambrosi, F.; Tanaka, F.; Boareto, R.; Quaggio, J.; Ribeiro, R.; Mattos-Jr, D. Anatomical and Physiological Responses of Citrus Trees to Varying Boron Availability Are Dependent on Rootstock. **Frontiers in Plant Science**, 7: 1–12, 2016.

Molinari, H. B. C.; Marur, C.; Bessalho Filho, J. C.; Kobayashi, A.; Pileggi, M.; Leite Júnior, R.; Pereira, L.; Vieira, L. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, 167 (6): 1375–1381, 2004.

Monteiro, J. G.; Cruz, F.J.; Nardin, M.; Santos, D. Crescimento e conteúdo de prolina em plântulas de guandu submetidas a estresse osmótico e à putrescina exógena. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, 49 (1): 18–25, 2014.

Moore, G. A. Oranges and lemons: Clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. **Trends in Genetics**, 17 (9): 536–540, 2001.

Mudge K. J. Janick J. S. Scofield S.; E. Goldschmidt. A History of grafting. **Horticultural Reviews**, 35 (1): 437–493, 2009.

Munns, R. Plant Adaptations to Salt and Water Stress. Differences and Commonalities. **Advances in Botanical Research**, 57 (1), 1-22, 2011.

Nakashima, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. ABA signaling in stress-response and seed development. **Plant Cell Rep.** 32: 959–970, 2013.

Neves, M. F.; Trombim, V.; Milan, P.; Lopes, F.; Cressoni, F.; Kalaki, R. O retrato da citricultura brasileira. **Markestrat**. 1-138, 2010.

Neves, D. M.; Almeida, L.; Santana-Vieira, D.; Freschi, L.; Ferreira, C.; Soares Filho, W.; Costa, M.; Micheli, F.; Coelho-Filho, M.; Gesteira, A. Recurrent water deficit causes epigenetic and hormonal changes in citrus plants. **Scientific Reports**, 7 (1): 1–11, 2017.

Neves, D. M.; Santana-Vieira, D.; Doria, M.; Freschi, L.; Ferreira, C.; Soares Filho, W.; Costa, M.; Coelho-Filho, M.; Micheli, F.; Gesteira, A. Recurrent water deficit causes alterations in the profile of redox proteins in citrus plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, 132: 497–507, 2018.

Nicolosi, E.; Deng, Z.; Gentile, A.; Malfa, S.; Continella, G.; Tribulato, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 100 (8): 1155–1166, 2000.

Oliveira, R. P. Biotecnologia em Citros. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 36p, 2006.

Oliveira, T. M.; Silva, F.; Bonatto, D.; Neves, D.; Morillon, R.; Maserti, B.; Coelho-Filho, M.; Costa, M.; Pirovani, C. P.; Gesteira, A. Comparative study of the protein profiles of Sunki mandarin and Rangpur lime plants in response to water deficit. **BMC Plant Biology**, 15 (1), 1-16, 2015.

Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, FAO, 2019. <http://www.fao.org/brasil/pt/>

Pedroso, F. K. J. V.; Prudente, D.; Bueno, A. C.; Machado, E.; Ribeiro, R. Drought tolerance in citrus trees is enhanced by rootstock-dependent changes

in root growth and carbohydrate availability. **Environmental and Experimental Botany**, 101: 26–35, 2014.

Peixoto, C. P.; Cerqueira, E.; Soares-Filho, W.; Castro Neto, M.; Ledo C. A.; Matos, F.; Oliveira, J. Análise de crescimento de diferentes genótipos de citros cultivados sob déficit hídrico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 28 (3): 439–443, 2006.

Peng, T.; Zhu, X.; Duan, N.; Liu, J. *PtrBAM1*, a β -amylase-coding gene of *Poncirus trifoliata*, is a CBF regulon member with function in cold tolerance by modulating soluble sugar levels. **Plant Cell and Environment**, 37 (12): 2754–2767, 2014.

Per, T. S.; Khan, N.; Reddy, P.; Massod, A.; Hanuzzaman, M.; Khan, M.; Anjum, N. Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. **Plant Physiology and Biochemistry**, 115: 126–140, 2017.

Pérez-Pérez, J. G.; Syvertsen, J. P.; Botia, P.; Garcia-Sanchez, P. Leaf water relations and net gas exchange responses of salinized Carrizo citrange seedlings during drought stress and recovery. **Annals of Botany**, 100 (2): 335–345, 2007.

Pires, R.; Luchiari, D.; Arruda, F.; Mossak, I. Irrigação. In: Mattos Júnior, D.; De Negri, J.D.; Pio, R.M.; Pompeu Júnior, J. (Ed.). **Citros**, cap 13, 369-408. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005.

Podda, A.; Checcucci, G.; Mouhaya, W.; Centeno, D.; Rofidal, V.; Carratore, R.; Luro, F.; Morillon, R.; Ollitrault, P.; Maserti, B. Salt-stress induced changes in the leaf proteome of diploid and tetraploid mandarins with contrasting Na^+ and Cl^- accumulation behaviour. **Journal of Plant Physiology**, 170 (12): 1101–1112, 2013.

Pompeu Júnior. Porta-Enxertos. In: Mattos Júnior, D.; De Negri, J.D.; Pio, R.M.; Pompeu Júnior, J. (Ed.). **Citros**, cap 4, 61-104. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005.

Rathinasabapathi, B. Metabolic Engineering for Stress Tolerance: Installing Osmoprotectant Pathways. **Annals of Botany**, 4: 709–716, 2000.

Reis, S.; Lima, A.; Souza, C. Recent molecular advances on downstream plant responses to abiotic stress. **International Journal of Molecular Sciences**, 13 (7): 8628–8647, 2012

Ribeiro, R. V.; Machado, E. C. Some aspects of citrus ecophysiology in subtropical climates: Re-visiting photosynthesis under natural conditions. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 19 (4): 393–411, 2007.

Ribeiro, R. V.; Machado, E. C.; Espinoza-Núñez, E.; Ramos, R. A.; Machado, D. F. S-P. M. Moderate warm temperature improves shoot growth, affects carbohydrate status and stimulates photosynthesis of sweet orange plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 24 (1): 37-46, 2012.

Rodríguez-Gamir, J.; Primo-Millo, E.; Forner, J.; Forner-Giner, M. Citrus rootstock responses to water stress. **Scientia Horticulturae**, 126 (2): 95–102, 2010

Romero, P.; Navarro, J. M.; Pérez-Pérez, J.; Garcia-Sanchez, E.; Gómez-Gómez, A.; Porras, I.; Martinez, V.; Botia, P. Deficit irrigation and rootstock-their effects on water relations, vegetative development, yield, fruit quality and mineral nutrition of orange. **Tree Physiology**, 26: 1537–1548, 2006.

Ruan, Y. L.; Jin, Y.; Yang, Y.; Li, G.; Boyer, J. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: Roles in development, yield potential, and response to drought and heat. **Molecular Plant**, 3 (6): 942–955, 2010.

Ruan, Y. Signaling role of sucrose metabolism in development. **Molecular Plant**, 5 (4): 763–765, 2012.

Ruan, Y. Sucrose Metabolism: Gateway to Diverse Carbon Use and Sugar Signaling. **Annual Review of Plant Biology**, 65: 33–67, 2014.

Salerno, G. L.; Curatti, L. Origin of sucrose metabolism in higher plants: When, how and why? **Trends in Plant Science**, 8 (2): 63–69, 2003.

Sami, F.; Yusuf, M.; Faisan, M.; Faraz, A.; Hayat, S. Role of sugars under abiotic stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, 109: 54–61, 2016.

Santana-Vieira, D. D. S.; Freschi, L.; Almeida, L.; Moraes, D.; Neves, D.; Santos, L.; Bertolde, F.; Soares-Filho, W.; Coelho-Filho, M.; Gesteira, A. Survival strategies of citrus rootstocks subjected to drought. **Scientific Reports**, 6: 1–12, 2016.

Santos, I. C.; Almeida, A-A; Pirovani, C. P.; Costa, M.; Silva, M. F.; Belleto, B.; Freschi, L.; Soares-Filho, W.; Coelho-Filho, M.; Gesteira, A. Differential accumulation of flavonoids and phytohormones resulting from the canopy/rootstock interaction of citrus plants subjected to

dehydration/rehydration. **Plant Physiology and Biochemistry**, 119: 147–158, 2017.

Santos, I. C.; Almeida, A-A; Pirovani, C. P.; Costa, M.; Conceição, A.; Soares-Filho, W.; Coelho-Filho, M.; Gesteira, A. Physiological, biochemical and molecular responses to drought conditions in field-grown grafted and ungrafted citrus plants. **Environmental and Experimental Botany**, 162: 406–420, 2019.

Sawhney, V.; Singh, D. P. Effect of chemical desiccation at the post-anthesis stage on some physiological and biochemical changes in the flag leaf of contrasting wheat genotypes. **Field Crops Research**, 77: 2–7, 2002.

Schafer, G.; Bastaniel, M.; Dornelles, A. L. Porta-Enxertos utilizados na citricultura. **Ciencia Rural**, 31 (4): 723–733, 2001.

Shao, H. B.; Chu, L.; Jaleel, C.; Zhao, C. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus - Biologies**, 331 (3): 215–225, 2008.

Sharma, P.; Jha, A.; Dubey, R.; Pessarakli, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, 2012: 1–26, 2012.

She, D.; Xia, Y.; Shao, M.; Peng, S.; Yu, S. Transpiration and canopy conductance of *Caragana korshinskii* trees in response to soil moisture in sand land of China. **Agroforest System**, 87: 667–678, 2013.

Shinozaki; Yamaguchi-Shinozaki. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, 58 (2): 221–227, 2007.

Scholander, P.F., Bradstreet, E.D., Hemmingsen, E.A., Hammel, H.T. Sap Pressure in Vascular Plants: negative hydrostatic pressure can be measured in plants. **Science**, 148: 339–346, 1965.

Siemens, J.; Zwiazek, J. J. Changes in root water flow properties of solution culture-grown trembling aspen (*Populus tremuloides*) seedlings under different intensities of water-deficit stress. **Physiologia Plantarum**, 121 (1): 44–49, 2004.

Signora, L.; Galtier, N.; Sket, L.; Lucas, H.; Foyer, C. Over-expression of sucrose phosphate synthase in *Arabidopsis thaliana* results in increased foliar sucrose/starch ratios and favours decreased foliar carbohydrate accumulation

in plants after prolonged growth with CO₂ enrichment. **Journal of Experimental Botany**, 49 (321): 669–680, 1998.

Singh, M.; Kumar, J.; Singh, S. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants : a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, 14: 407-426, 2015

Smith, A. M.; Stitt, M. Coordination of carbon supply and plant growth. **Plant, Cell and Environment**, 30 (9): 1126–1149, 2007.

Soares Filho, W. S.; Sobrinho, A.; Passos, O.; Moitinho, E. ‘Maravilha’: Uma Nova Seleção De Tangerina ‘Sunki’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 25: 268–271, 2003.

Souza, L.; Souza, L., Paiva, A.; Rodrigues, A.; Ribeiro, L. Distribuição do sistema radicular de citros em uma topossequência de solos de tabuleiro costeiro do estado da Bahia. **Sociedade Brasileira de Ciências do Solo**, 32 (2): 503-513, 2008.

Špoljarević, M. Agic, D.; Lisjak, M.; Gumze, A.; Wilson, I.; Hancock, J.; Teklic, T. The relationship of proline content and metabolism on the productivity of maize plants. **Plant Signaling & Behavior**, 6: 251-257, 2011.

Stitt, M.; Zeeman, S. C. Starch turnover: Pathways, regulation and role in growth. **Current Opinion in Plant Biology**, 15 (3): 282–292, 2012.

Stuchi, E. Raiz & Fruto. **Informativo Embrapa Mandioca e Fruticultura**, 27 (74): 5-8, 2015.

Szabados, L.; Savouré, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, 15 (2): 89–97, 2010.

Syvertsen, J. P.; Garcia-Sanchez, F. Salinity Tolerance of Cleopatra Mandarin and Carrizo Citrange Citrus Rootstock Seedlings Is Affected by CO₂ Enrichment during Growth. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, 131: 24 – 31, 2006.

Taiz, L.; Zeiger, E. Møller, I. M.; Murphy, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. Tradução Alexandra Antunes Mastroberti et al., 6ª Edição, **Artmed**, 2017.

Tardieu, F.; Simonneau, T.; Muller, B. The Physiological Basis of Drought Tolerance in Crop Plants: A Scenario-Dependent Probabilistic Approach. **Annual Review of Plant Biology**, 69: 733–759, 2018.

Tauzin, A; Giardina, T. Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, 5: 1–9, 2014.

Thalmann, M.; Santelia, D. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. **New Phytologist**, 214 (3): 943–951, 2017.

Theerawitaya, C.; Boriboonkaset, T.; Cha-um, S.; Supaibulwatana, K.; Kirdmanee, K. Transcriptional regulations of the genes of starch metabolism and physiological changes in response to salt stress rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, 18 (3): 197–208, 2012.

Timperio, A. M.; Egidi, M.J.; Zolla, L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). **Journal of Proteomics**, 71 (4): 391–411, 2008.

Tworowski, T.; Fazio, G. Hormone and growth interactions of scions and size-controlling rootstocks of young apple trees. **Plant Growth Regulation**, 78: 105 – 119, 2016.

Van Genuchten, M.T. A closed-form equation for predicting the hydraulic conductivity of unsaturated Soils. **Soil Science Society of America Journal**, 44 (5): 892-898, 1980.

Valerio, C.; Costa, A.; Marri, L.; Issakidis-Bourguet, E.; Pupillo, P.; Sparla, F. Thioredoxin-regulated β -amylase (*BAM1*) triggers diurnal starch degradation in guard cells, and in mesophyll cells under osmotic stress. **Journal of Experimental Botany**, 62 (2): 545–555, 2011.

Valluru, R.; Den Ende, W. V. Plant fructans in stress environments: Emerging concepts and future prospects. **Journal of Experimental Botany**, 59 (11): 2905–2916, 2008.

Vellame, L.; Coelho-Filho, M.; Paz, V. Transpiração em mangueira pelo método Granier. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 13 (5): 516–523, 2009.

Verbruggen, N.; Hermans, C. Proline accumulation in plants: A review. **Amino Acids**, 35 (4): 753–759, 2008.

Verslues, P. E.; Agarwal, M.; Katiyar-Agarwal, S.; Zhu, J.; Zhu, J-K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **Plant Journal**, 45 (4): 523–539, 2006.

Vives-Peris, V.; Gómez-Cadenas, A.; Pérez-Clemente, R. M. Citrus plants exude proline and phytohormones under abiotic stress conditions. **Plant Cell Reports**, 36 (12): 1971–1984, 2017.

Wang, J.; Du, J.; Mu, X.; Wang, P. Cloning and characterization of the *Cerasus humilis* sucrose phosphate synthase gene (ChSPS1). **PLoS ONE**, 12 (10): 1–14, 2017.

Warschefsky, E.; Klein, L.; Frank, M.; Chitwood, D.; Londo, J.; von Wettberg, E.; Miller, A. Rootstocks: Diversity, Domestication, and Impacts on Shoot Phenotypes. **Trends in Plant Science**, 21 (5): 418–437, 2016.

Winter, H.; Huber, S. C. Critical Reviews in Plant Sciences Regulation of Sucrose Metabolism in Higher Plants : Localization and regulation of Activity of Key Enzymes Regulation of Sucrose Metabolism in Higher Plants : Localization and Regulation of Activity of Key Enzymes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 19: 37–41, 2000.

Xie, R.; Zhang, J.; Ma, Y.; Pan, X.; Dong, C.; Pang, S.; He, S.; Deng, L.; Yi, S.; Zheng, Y.; Lv, Q. Combined analysis of mRNA and miRNA identifies dehydration and salinity responsive key molecular players in citrus roots. **Scientific Reports**, 7: 1–19, 2017.

Xu, X.; Tong, L.; Li, F.; Kang, S.; Qu, Y. Effects of Sucrose on Germination and Seedling Development of Brassica Napus. **International Journal of Biology**, 2 (1): 150–154, 2010.

Xu, X.; Tong, L.; Li, F.; Kang, S.; Qu, Y. Sap flow of irrigated Populus alba var. pyramidalis and its relationship with environmental factors and leaf area index in an arid region of Northwest China. **Journal of Forest Research**, 16 (2): 144–152, 2011.

Zadrazilnik, T.; Hollung, K.; Egge-Jacobsen.; Meglic, V.; Šuštar-Vozlič, J. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Proteomics**, 78: 254–272, 2013.

Zaher-Ara, T.; Boroomand, N.; Sadat-Hosseini, M. Physiological and morphological response to drought stress in seedlings of ten citrus. **Trees - Structure and Function**, 30 (3): 985–993, 2016.

Zandalinas, S.; Balfagón, D.; Arbona, V.; Gómez-Cadenas, A. Modulation of Antioxidant Defense System Is Associated with Combined Drought and Heat Stress Tolerance in Citrus. **Frontiers in Plant Science**, 8: 1–10, 2017.

Zeeman, S.; Smith, S.; Smith, A. The diurnal metabolism of leaf starch. **Biochemical Journal**, 401 (1): 13–28, 2007.

Zeeman, S.; Kossmann, J.; Smith, A. Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, 61 (1): 209–234, 2010.

Zobel, W.; Kinraide, T.; Baligar, V. Fine root diameters can change in response to changes in nutrient concentrations. **Plant Soil**, 297 (1): 243–254, 2007.

Zou, Y.; Wu, Q.; Huang, Y.; Ni, Q.; He, X. Mycorrhizal-mediated lower proline accumulation in *Poncirus trifoliata* under water deficit derives from the integration of inhibition of proline synthesis with increase of proline degradation. **PLoS ONE**, 8 (11): 1–8, 2013.