



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Biologia

SIMONE FERREIRA DA SILVA

**O PAPEL DOS PORTA-ENXERTOS CÍTRICOS NO METABOLISMO E
TRANSPORTE DE FOTOASSIMILADOS EM PLANTAS SOB DÉFICIT HÍDRICO**

**THE ROLE OF CITRUS ROOTSTOCKS ON METABOLISM AND TRANSPORT OF
PHOTOASSIMILATE IN PLANTS UNDER WATER DEFICIT**

**Campinas
2020**

SIMONE FERREIRA DA SILVA

**O PAPEL DOS PORTA-ENXERTOS CÍTRICOS NO METABOLISMO E
TRANSPORTE DE FOTOASSIMILADOS EM PLANTAS SOB DÉFICIT HÍDRICO**

**THE ROLE OF CITRUS ROOTSTOCKS ON METABOLISM AND TRANSPORT OF
PHOTOASSIMILATE IN PLANTS UNDER WATER DEFICIT**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção do
Título de doutora em BIOLOGIA VEGETAL.*

*Thesis presented to the Institute of Biology,
University of Campinas, as a partial fulfillment
of requirements for the degree of Doctor in
PLANT BIOLOGY.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA SIMONE FERREIRA DA SILVA E
ORIENTADA PELO DR. RAFAEL VASCONCELOS
RIBEIRO.

Orientador: RAFAEL VASCONCELOS RIBEIRO

**Campinas
2020**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Si38p Silva, Simone Ferreira da, 1984-
O papel dos porta-enxertos cítricos no metabolismo e transporte de fotoassimilados em plantas sob déficit hídrico / Simone Ferreira da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Rafael Vasconcelos Ribeiro.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Porta-enxertos. 2. Cítricos. 3. Plantas - Tolerância à seca. 4. Carbono - Isótopos. 5. Metabolômica. I. Ribeiro, Rafael Vasconcelos, 1977-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The role of citrus rootstocks on metabolism and transport of photoassimilate in plants under water deficit

Palavras-chave em inglês:

Rootstocks

Citrus

Plants - Drought tolerance

Carbon - Isotopes

Metabolomics

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Rafael Vasconcelos Ribeiro [Orientador]

Sara Adrián López de Andrade

Camila Pinto da Cunha

Neidiquele Maria Silveira

Sarah Caroline Ribeiro de Souza

Data de defesa: 23-07-2020

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-2860-3711>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0206014745322077>

Campinas, 23 de julho de 2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro (Orientador)

Profa. Dra. Sara Adrian Lopez de Andrade

Profa. Dra. Neidiquele Maria Silveira

Profa. Dra. Sarah Caroline Ribeiro de Souza

Dra. Camila Pinto da Cunha

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp.

Aos meus pais,

Luiz Carlos Ferreira da Silva e

Marina Ap. Venezian Ferreira da Silva.

À minha irmã Mônica Ferreira da Silva.

Ao meu sobrinho Caio Belloni.

DEDICO

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de estudos concedida (2015/14817-4).

À Universidade Estadual de Campinas e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso.

Ao meu orientador, Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro, pela oportunidade oferecida, por confiar no meu trabalho, por todo o conhecimento transmitido e por me ensinar a fazer ciência através de um agradável convívio de aprendizagem, amizade e compreensão.

Ao Dr. Eduardo Machado Caruso, por toda assistência e apoio no desenvolvimento dos experimentos nas dependências do IAC e também por compartilhar seus conhecimentos contribuindo para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas pela utilização de suas instalações e seus equipamentos. À Yolanda Bosa e à Daniela F. S. P. Machado pelo auxílio nas análises laboratoriais. Ao Severino pela assistência e colaboração durante o desenvolvimento dos experimentos, pelos cafés, chás e conversas agradáveis na fazenda.

Aos professores Dra. Sara Adrián López de Andrade e Dr. Ladaslav Sodek pelas sugestões e contribuição na escrita deste trabalho.

Ao professor Dr. Vladimir Costa pelo auxílio com a análise isotópica, pelas sugestões e contribuição na escrita deste trabalho.

À Dra. Camila Cunha, Dr. Adilson Pereira e Msc. Juliana Aricetti, pelo auxílio com a análise de metabolômica, pela troca de ideias e pelo conhecimento compartilhado.

À amiga Marcela T. Miranda, pela parceria no desenvolvimento das atividades do projeto, pela troca de conhecimento, pela agradável convivência, pelo apoio nos momentos mais difíceis, pela amizade e pela frase inesquecível: “são plantas e não máquinas”.

Aos amigos do nosso grupo de pesquisa, em especial Fernanda Castro, Neidiquele Silveira, Luciano Pereira, José R. Magalhães, Vanessa Tofanello, Mylaine Santos, Giovanna Cerqueira, Maria Dolores Pissolato, Vinícius Pacheco e Rafael Leonardo, pela agradável convivência, pela troca de ideias e pela amizade.

À Mônica Ferreira da Silva, minha irmã-amiga sempre presente em todos os momentos da minha vida. Ao Brunno Belloni pelo auxílio durante minha instalação em Campinas. Ao meu sobrinho Caio Belloni por preencher a minha vida com tanto amor e alegria.

Aos meus pais, Luiz Carlos Ferreira da Silva e Marina Ap. Venezian Ferreira da Silva, pela minha educação e condições de estudo, o que proporcionou a minha chegada até aqui. Pelo apoio emocional e financeiro, e pela certeza de que sempre estarão torcendo por mim. Obrigada por todo amor, carinho e dedicação.

Agradeço acima de tudo a Deus pela oportunidade desta vida e por ter iluminado o meu caminho me conduzindo até aqui. Agradeço por ter permitido o encontro com cada uma dessas pessoas tão especiais e fundamentais para a conclusão deste trabalho, muitas das quais já sinto saudade. Diante do trabalho finalizado, faço minhas as palavras de Chico Xavier: “Agradeço por todas as dificuldades que enfrentei, não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar”.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Uma estratégia eficaz para amenizar os impactos da escassez de água na citricultura sem afetar a vulnerabilidade dos pomares a doenças é o uso diversificado de porta-enxertos resistentes à seca. Estudos envolvendo o limoeiro Cravo sob déficit hídrico buscam identificar os mecanismos fisiológicos que conferem resistência à seca a este porta-enxerto, o que representa o primeiro passo para o desenvolvimento de novos porta-enxertos cítricos capazes de garantir aos pomares um bom desempenho em períodos de escassez de água. A redução da disponibilidade de água exige das plantas um novo equilíbrio entre a oferta e a demanda dos recursos disponíveis, o que pode resultar em maior ou menor comprometimento do crescimento dependendo da estratégia adotada pelo porta-enxerto. A alocação dos fotoassimilados está associada à relação fonte e dreno estabelecida sob déficit hídrico, sendo que, a força de dreno vai depender da atividade metabólica do órgão dreno influenciada por ajustes regulatórios em resposta ao déficit hídrico. Neste contexto, este estudo combinou análises fisiológicas com o acompanhamento da alocação de fotoassimilados marcados com ^{13}C e análise do perfil de metabólitos primários de órgãos fonte e dreno, para avaliar como os porta-enxertos cítricos influenciam na força de dreno e identificar quais metabólitos são alterados em plantas cítricas sob déficit hídrico. Plantas de laranjeira Valência enxertada em citrumeleiro Swingle, limoeiro Cravo ou tangerineira Sunki foram avaliados quanto à resposta ao déficit hídrico e reidratação. Diferente das demais espécies, o limoeiro Cravo respondeu à variação inicial da disponibilidade de água priorizando o crescimento radicular em detrimento da parte aérea e, demonstrando a habilidade do seu sistema radicular em aumentar a importação de fotoassimilados, o que provavelmente favoreceu o crescimento. Nas raízes, o perfil metabólico exibiu down-regulation do metabolismo de nucleotídeos e das vias do chiquimato e aspartato, vinculado à up-regulation dos níveis de arginina e citrulina, estimulando na parte aérea maior suprimento alternativo de energia e acúmulo de arginina e asparagina. Em resposta à reidratação apresentou maior eficiência no uso do nitrogênio, acumulando em maior proporção compostos com maior razão N/C. Os resultados sugerem que a maior força de dreno e os ajustes metabólicos diferenciados podem estar envolvidos na resistência do limoeiro Cravo à seca. Tal informação é essencial para o direcionamento de novos estudos que buscam o desenvolvimento de novas espécies de porta-enxertos cítricos resistentes à seca, condição ambiental que limita o crescimento e a produtividade vegetal.

Palavras-chave: limoeiro Cravo, seca, força de dreno, metabolismo primário, isótopos.

ABSTRACT

An effective strategy to mitigate the impacts of water scarcity on citrus crops without affecting the vulnerability of orchards to disease is the diversified use of drought-resistant rootstocks. Studies involving Rangpur lime under water deficit seek to identify physiological mechanisms that give drought resistance to this rootstock, which represents the first step towards the development of new citrus rootstocks capable of ensure orchards good performance in periods of water shortage. The reduction of availability of water requires plants to strike a new balance between supply and demand for available resources, which can result in greater or lesser growth impairment depending on the strategy adopted by the rootstock. The reduction of availability water requires of plants a new balance between supply and demand for available resources, which can result in greater or lesser growth impairment depending on the strategy adopted by the rootstock. The allocation of photoassimilates is associated with source and sink relationship established under water deficit, and sink strength will depend on the metabolic activity of the sink organ influenced by regulatory adjustments in response to the water deficit. In this context, this study combined physiological analyzes with monitoring on the allocation of ^{13}C -labeled photoassimilates and analysis of primary metabolite profile of source and sink organs, to assess how citrus rootstocks influence sink strength and identify which metabolites are altered in citrus plants under water deficit. Valencia orange plants grafted on Swingle citrumeleiro, Rangpur lime or Sunki mandarin were evaluated for response to water deficit and rehydration. Unlike the other species, Rangpur lime responded to initial variation in water availability by prioritizing root growth over shoot and demonstrating ability of its root system to increase the import of photoassimilates, which probably favored growth. In the roots, metabolic profile showed down-regulation of nucleotide metabolism and of shikimate and aspartate pathways, linked to the up-regulation of arginine and citrulline levels, stimulating in the aerial part a greater alternative energy supply and arginine and asparagine accumulation. In response to rehydration, it showed greater efficiency in the use of nitrogen, accumulating in greater proportion compounds with higher N/C ratio. The results suggest that greater sink strength and differentiated metabolic adjustments are involved in the resistance of the Rangpur lime to drought. Such information is essential for the direction of new studies that seek the development of new species of citrus rootstocks resistant to drought, an environmental condition that limits plant growth and productivity.

Keywords: Rangpur lime, drought, strength sink, primary metabolism, isotopes.

Sumário

Introdução geral	12
Hipóteses e objetivos	18
CAPÍTULO 1	19
Abstract.....	21
Introduction	22
Materials and methods.....	23
Plant material	23
Experimental design	23
Enriching plants with $^{13}\text{CO}_2$	24
Leaf gas exchange and photochemistry	25
Leaf water potential	25
Phloem sap extraction	25
Biometry	26
Carbohydrates	26
Isotopic analysis.....	26
Statistical analysis.....	27
Results	28
Leaf water potential, gas exchange and photochemistry	28
Plant growth.....	28
Changes in carbohydrate concentration in roots and leaves	29
$^{13}\text{CO}_2$ enrichment and ^{13}C allocation	29
Discussion.....	30
Drought sensing and plant performance under water deficit are affected by rootstocks.....	30
Carbon allocation as affected by rootstocks in citrus trees under water deficit.....	31
Sink strength of citrus rootstocks under water deficit	31
Conclusion.....	32
References	33
List of figures	39
Figures	41
Supplementary data	48
CAPÍTULO 2	52
Resumo	53

Introdução	54
Material e métodos	56
Material vegetal	56
Estratégia experimental.....	56
Trocas gasosas	57
Potencial de água na folha	58
Biometria	58
Concentração de amido.....	59
Extração de metabólitos polares	59
Análise em GC-TOF-MS.....	60
Identificação de metabólitos e pré-processamento de dados	60
Análise estatística	61
Resultados.....	61
Potencial de água na folha e trocas gasosas.....	61
Crescimento vegetativo.....	64
Alterações na concentração de amido em raízes e folhas	67
Alterações metabólicas em raízes sob déficit hídrico	68
Alterações metabólicas em raízes em resposta à reidratação.....	73
Alterações metabólicas em folhas em resposta ao déficit hídrico	74
Alterações metabólicas em folhas em resposta à reidratação	78
Discussão.....	78
Alterações metabólicas associadas ao ajustamento osmótico, metabolismo respiratório e estado redox sob déficit hídrico	79
As alterações metabólicas persistem mesmo após a reidratação das plantas.....	84
Perfil metabólico da tolerância à seca induzida pelo limoeiro Cravo.....	85
Conclusão	91
Considerações finais	93
Referências gerais.....	94
Anexos.....	106

Introdução geral

A seca é um evento climático caracterizado por precipitações abaixo das condições normais por um determinado período de tempo, ou seja, o caráter temporário diferencia eventos de seca de áreas permanentemente áridas (Dai et al., 2011). A seca agrícola ocorre quando a umidade do solo é menor que a demanda de água da planta, de modo a comprometer o seu desenvolvimento. Como diferentes plantas têm demandas diferentes de água, esse conceito varia de acordo com a espécie cultivada e também com o sistema de cultivo em uso (Eslamian et al., 2017; Tardieu et al., 2018). De modo geral, períodos de seca severa, os quais interrompem o acesso à água, culminam na morte das espécies vegetais, porém este é um evento pouco frequente em áreas agrícolas porque os agricultores adaptam os sistemas de cultivo às condições ambientais prevalentes, desse modo, é mais provável que plantas cultivadas enfrentem condições de déficit hídrico moderado e progressivo, o que é mais compatível com as áreas de cultivo (Tardieu et al., 2018). Entre os diversos estresses abióticos, a escassez de água é o principal fator limitante da produtividade agrícola (Chaves et al., 2003; 2009) e, como agravante, o aumento das temperaturas e a incerteza na quantidade e distribuição da precipitação devido às mudanças climáticas devem levar ao aumento da intensidade, duração e frequência das secas em muitos locais (Colminelli et al., 2009; IPCC 2013; PBMC, 2013). Dentro do contexto das mudanças climáticas, a agricultura é um dos setores mais vulneráveis (Ahmed et al., 2019) e por esse motivo, o efeito do déficit hídrico no crescimento, rendimento e qualidade das culturas tornou-se uma das mais importantes preocupações científicas nas últimas décadas (Kang et al., 2009).

O déficit hídrico resulta da disponibilidade insuficiente de água no solo para atender à demanda de uma determinada planta em um determinado momento, resultando em uma mudança no status da água da planta (Tardieu et al., 2018). De acordo com Levitt (1972), as plantas se aclimatam à seca através de duas estratégias principais. A primeira estratégia consiste em evitar a seca otimizando a absorção de água e mantendo o potencial hídrico elevado através do fechamento estomático, desenvolvimento de raízes profundas, redução do tamanho celular e espessamento da parede celular. A segunda estratégia consiste em tolerar o déficit hídrico mantendo a homeostase metabólica durante o baixo potencial hídrico tecidual através de mecanismos de sobrevivência envolvendo ajuste osmótico, síntese de solutos protetores e enzimas tolerantes à dessecação. Independente da estratégia utilizada, uma das primeiras respostas ao déficit hídrico é a redução da abertura estomática, o que limita a perda de água por transpiração, ao mesmo tempo em que restringe a difusão de CO₂ da atmosfera para os sítios

de carboxilação, reduzindo também a fotossíntese (Chaves & Oliveira, 2004; Flexas et al., 2006). A manutenção das reações fotossintéticas sob concentração limitada de CO₂ intercelular associada à contínua exposição luminosa das folhas gera um desequilíbrio entre a absorção e a utilização da energia luminosa pelos fotossistemas, o que desencadeia um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, poderão ocorrer danos oxidativos (Hasanuzzaman et al., 2017; Hussain et al., 2019). No entanto, sob déficit hídrico moderado a demanda por carbono para o crescimento diminui antes de reduções significativas na fotossíntese, e o crescimento das folhas tende a ser mais sensível do que o crescimento radicular, o que resulta, ao menos inicialmente, em acúmulo de fotoassimilados nas folhas (Hummel et al., 2010; Muller et al., 2011). Em outras palavras, a inibição do crescimento representa uma adaptação primária ocasionada por ajustes regulatórios induzidos pela redução inicial da disponibilidade de água, e essa adaptação permite economizar e redistribuir recursos para órgãos prioritários (Sharp et al. 2004; Hummel et al., 2010; Muller et al., 2011; Körner, 2013; Verslues, 2017). O excedente de fotoassimilados é alocado preferivelmente nas raízes, onde exercem um papel duplo como estoques transitórios de carbono e energia, e também contribuem para o ajuste osmótico em resposta ao déficit hídrico (Hummel et al., 2010).

O ajuste osmótico reduz o potencial osmótico celular, minimizando a perda de água e conseqüentemente promovendo o adiamento da desidratação e a preservação do turgor celular (Sanders & Arndt, 2012; Slama et al., 2015). Os metabólicos que participam do ajuste osmótico apresentam altos níveis de solubilidade e permeabilidade celular, e não influenciam na atividade enzimática mesmo em altas concentrações (Ghatak et al., 2017). Além de carboidratos, cátions inorgânicos, ácidos orgânicos e aminoácidos livres também são solutos que normalmente se acumulam em resposta ao déficit hídrico. O acúmulo de solutos compatíveis, como prolina, contribui não apenas com o ajuste osmótico, mas também pela desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (EROs), proteção da integridade da membrana e estabilização de enzimas ou proteínas (Chen & Jiang, 2010; Guo et al., 2018). Se por um lado o ajuste osmótico sustenta a fotossíntese por atuar como regulador da condutância estomática e do turgor, por outro lado ele desvia solutos de processos essenciais como a síntese de proteínas e paredes celulares, o que pode comprometer o acúmulo de biomassa. Desse modo, as espécies vegetais podem diferir em seus aspectos osmóticos, uma vez que o ajuste osmótico tende a ser expresso em genótipos que apresentam maior redução em seu potencial hídrico em comparação com aqueles que mantêm um potencial hídrico mais elevado (Blum, 2016).

Ajustes fisiológicos entre oferta e demanda de energia em resposta ao déficit hídrico podem diferir entre as espécies e resultar em maior ou menor comprometimento do crescimento,

o qual está diretamente associado à relação fonte e dreno, que por sua vez também pode ser influenciada por fatores ambientais como o déficit hídrico (Körner, 2013; Lemoine et al., 2013). A relação fonte e dreno é uma das principais determinantes do crescimento, sendo a assimilação de carbono nas folhas regulada de acordo com as necessidades dos órgãos heterotróficos (Ainsworth & Bush, 2011; Ribeiro et al., 2012; Lemoine et al., 2013). O transporte de longa distância pelo floema ocorre por fluxo de massa, utilizando como força motriz um gradiente de pressão hidrostática gerado pela variação da concentração de fotoassimilados que depende da fotossíntese e da utilização desses compostos nos tecidos dreno (Sturm & Tang, 1999). A direção do fluxo da seiva entre os órgãos dreno é determinada de acordo com a demanda ou força de dreno, definida como a capacidade competitiva de um órgão de importar fotoassimilados e que depende de seu tamanho e estado fisiológico (Ho, 1988; Marcelis, 1996; Herbers & Sonnewald, 1998)

As alterações que antecedem a limitação de recursos indicam o envolvimento de sinalização e regulação hormonal em resposta ao déficit hídrico (Sharp, 2002). Os hormônios vegetais influenciam o desenvolvimento das plantas e, como reguladores do crescimento, também influenciam na força dreno (Kuiper, 1993). O ácido abscísico (ABA) é o principal hormônio sintetizado nas raízes e translocado para as folhas para iniciar a adaptação das plantas ao estresse hídrico por meio do fechamento estomático e redução do crescimento das plantas (Wilkinson & Davies, 2010). No entanto, a resposta ao déficit hídrico é regulada pelo equilíbrio entre hormônios que promovem e aqueles que inibem os diversos ajustes metabólicos (Basu et al., 2016), o que desencadeia uma série de mudanças nos níveis morfológico, fisiológico e bioquímico em todos os órgãos da planta (Anjum et al., 2011), visando estabelecer uma nova homeostase sob condições desfavoráveis de crescimento.

Considerando que as alterações citadas anteriormente envolvem a reconfiguração de várias vias metabólicas (Shulaev et al., 2008), a identificação de redes metabólicas que regulam as respostas das plantas aos estresses ambientais é uma das formas de entender a suscetibilidade diferencial das espécies à seca (Llanes et al., 2018). Nesse contexto, a metabolômica oferece uma visão abrangente dos metabólitos que participam de diferentes eventos celulares, e que podem ser vistos como o produto final da expressão gênica que define o fenótipo bioquímico de uma célula ou tecido (Ghatak et al., 2017; Kumar et al., 2017).

A metabolômica pode ser definida como o estudo do metaboloma, o qual compreende todas as moléculas químicas com baixo peso molecular (<1800 Da) ou metabólitos presentes em uma célula vegetal ou tecido sob uma faixa específica de condições (Hall, 2011). O metaboloma vegetal é composto por aproximadamente 30.000 metabólitos, abrangendo

carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos e lipídios. Metabólitos primários são aqueles implicados no crescimento, desenvolvimento e reprodução normais das plantas, enquanto os metabólitos secundários são aqueles cruciais para a sobrevivência das plantas em condições desfavoráveis (Llanes et al., 2018). Devido à complexidade química dos metabólitos, não é possível avaliar todos aqueles presentes em uma determinada amostra, por isso, para uma visão mais abrangente são necessárias múltiplas tecnologias e protocolos de extração seletiva. Ainda assim, a metabolômica tem a capacidade de detectar uma vasta gama de metabólitos a partir de um único extrato, o que permite uma análise rápida e precisa (Kumar et al., 2017). A análise de metabolômica fornece informações sobre metabólitos específicos envolvidos em alterações fisiológicas e bioquímicas em resposta à aclimação das plantas sob condições adversas, o que permite a identificação de grupos de compostos envolvidos na mediação da tolerância ao estresse. Em um contexto aplicado, as informações relevantes podem ser transferidas para culturas sensíveis visando melhorar suas estratégias de aclimação (Ghatak et al., 2017).

O gênero *Citrus* (*Citrus* spp.) inclui espécies arbóreas de sub-bosque nativas de regiões tropicais e subtropicais da Ásia (Roose et al., 2015), mas o seu cultivo ocorre em diversos países, incluindo Brasil, China e Estados Unidos, e representa a cultura de frutas economicamente mais importante do mundo (Iglesias et al., 2007). O Brasil é responsável por cerca de 30% da produção mundial de laranja, e a maior porcentagem de produção no país está concentrada no estado de São Paulo (Carrer & Souza Filho, 2016). Como uma cultura perene, as árvores cítricas estão submetidas à variação sazonal da disponibilidade de água ao longo do seu ciclo de desenvolvimento (Ribeiro et al., 2006), o que torna essa cultura ainda mais suscetível ao atual cenário de mudanças climáticas.

No cultivo de citros é utilizada a técnica de enxertia, um método de propagação vegetativa que envolve dois componentes genéticos diferentes, enxerto e porta-enxerto. O enxerto é selecionado de acordo com a qualidade e quantidade de seus frutos, enquanto o porta-enxerto é selecionado de acordo com as características do seu sistema radicular, incluindo sustentação física, absorção de água e de nutrientes, síntese de hormônios e interação química e biológica com o solo (Cohen & Naor, 2002). Os porta-enxertos podem influenciar várias características das plantas enxertadas, como o tamanho e os hábitos de crescimento da árvore, o rendimento, o tamanho e o tempo de maturação dos frutos (Beshir et al., 2019). Sob deficiência hídrica, a interação entre porta-enxerto e copa pode se tornar mais significativa (Donato et al., 2007), ou seja, a técnica de enxertia é capaz de influenciar a suscetibilidade das plantas ao déficit hídrico como um todo, uma vez que porta-enxerto e copa apresentam resistências diferentes à seca (Ribeiro et al., 2014).

Uma estratégia eficaz para lidar com períodos de escassez de água é a escolha de um porta-enxerto resistente ao déficit hídrico. Na citricultura brasileira existe uma ampla variedade de porta-enxertos disponível, no entanto, o limoeiro Cravo é uma das espécies mais usadas devido à sua tolerância ao vírus da Tristeza dos Citros, fácil obtenção de sementes, rápido crescimento, indução de produção precoce, compatibilidade com a maioria das copas comerciais (Amaro & Baptistella, 2010) e principalmente por induzir bom desempenho fisiológico e produtivo sob déficit hídrico (Medina et al., 2005; Boscariol-Camargo et al., 2007; Donato et al., 2007; Magalhães Filho et al., 2008; Pedroso et al., 2014; Ribeiro et al., 2014). Por outro lado, o predomínio de um único porta-enxerto em diferentes áreas de cultivo torna os pomares cítricos vulneráveis a outros estresses bióticos e abióticos (Pompeu Júnior, 2005). Essa vulnerabilidade ficou explícita na década de 30, quando o surto do vírus da Tristeza dos Citros dizimou pomares sobre laranjeira Azeda (*Citrus aurantium* L), e desde então o limoeiro Cravo tem sido o porta-enxerto mais utilizado. No entanto, desde 1999, a Morte Súbita dos Citros tem causado a perda de milhares de árvores enxertadas em limoeiro Cravo (Bové & Ayres, 2007), o que demonstra a urgência no desenvolvimento de novos porta-enxertos.

Pesquisas envolvendo o limoeiro Cravo sob déficit hídrico buscam investigar os mecanismos fisiológicos que conferem a este porta-enxerto a tolerância à seca como um primeiro passo para o desenvolvimento de novos porta-enxertos igualmente resistentes à seca. Sob déficit hídrico, plantas enxertadas em limoeiro Cravo apresentam redução nas trocas gasosas sem alterações significativas na eficiência quântica do fotossistema II, o que sugere a existência de mecanismos de dissipação de energia que protegem a atividade fotoquímica, como a fotorrespiração (Erismann et al., 2008; Pedroso et al., 2014). O déficit hídrico no limoeiro Cravo também induz a transcrição de genes relacionados com a síntese de prolina (Δ -1-pirrolina-5-carboxilato sintetase), aquaporinas (PIP2,1) e desidrinas (Boscariol-Camargo et al., 2007), os quais estão envolvidos com mecanismos de tolerância à seca. Seu sistema radicular possui alta condutividade hidráulica, o que confere melhor hidratação da parte aérea e manutenção da abertura estomática (Medina & Machado, 1998; Medina et al., 1998), favorecendo as trocas gasosas mesmo em condições de déficit hídrico. Além disso, suas raízes também apresentam maior taxa de crescimento e acúmulo de carboidratos solúveis em condições de déficit hídrico, sendo um forte dreno de carboidratos (Pedroso et al., 2014). A fotossíntese de árvores cítricas está relacionada com a atividade do órgão dreno e, portanto, com a demanda por fotoassimilados (Minchin & Thorpe, 1996). Entre os porta-enxertos cítricos, o limoeiro Cravo parece ter uma maior influência em órgãos fonte, com maior capacidade em mobilizar as reservas de carboidratos e utilizar energia liberada pela respiração

para a biossíntese de estruturas vegetativas nos órgãos dreno, o que ressalta a sua habilidade em coordenar a relação fonte-dreno (Bueno et al., 2012). As raízes do limoeiro Cravo também apresentam maior capacidade de redistribuição hidráulica vinculado ao ajuste osmótico e acompanhado por uma regulação estomática eficaz da perda de água (Miranda et al., 2018). Todavia, as bases morfo-fisiológicas da resistência à seca do limoeiro Cravo ainda não foram totalmente compreendidas.

Hipóteses e objetivos

A compreensão dos mecanismos de resistência à seca em citros depende, ao menos em parte, do entendimento de como os porta-enxertos afetam o metabolismo nos órgãos fonte e dreno para estabelecer um novo equilíbrio entre oferta e demanda de energia em condições de baixa disponibilidade hídrica. O acompanhamento da alocação dos fotoassimilados vinculado ao crescimento e ao perfil de metabólitos primários de órgãos fonte e dreno poderia elucidar as estratégias fisiológicas do limoeiro Cravo que levam ao melhor desempenho das plantas em condições de déficit hídrico. Este estudo foi composto por dois experimentos, cujos resultados estão organizados em dois capítulos.

No primeiro estudo temos como hipótese que o melhor desempenho de plantas cítricas sob déficit hídrico está associado à capacidade do porta-enxerto em drenar fotoassimilados para as raízes, órgãos responsáveis pela absorção de água e nutrientes e primeiros sensores da baixa disponibilidade hídrica no solo. Com o acompanhamento da alocação de fotoassimilados marcados com ^{13}C em plantas sob déficit hídrico buscamos avaliar a força de dreno desenvolvida por três porta-enxertos cítricos e revelar como as trocas gasosas e o crescimento das plantas são modulados sob seca.

No segundo estudo temos como hipótese que o melhor desempenho do limoeiro Cravo sob déficit hídrico seria resultado de alterações metabólicas diferenciadas tanto nas raízes com nas folhas, as quais poderiam ser identificadas através da análise dos metabolomas de plantas enxertadas em limoeiro Cravo em comparação com o metaboloma de plantas enxertadas em outras duas espécies de porta-enxerto cítrico. A identificação de metabólitos relacionados ao déficit hídrico nas plantas cítricas contribuiria para ampliar a compreensão das alterações no metabolismo primário desenvolvidas por essas espécies em resposta à seca. Ainda, a identificação de metabólitos e vias metabólicas que distinguem o limoeiro Cravo dos demais porta-enxertos poderia direcionar novos estudos de seleção de plantas baseada em metabólitos críticos associados à resistência à seca em plantas cítricas.

CAPÍTULO 1

Sink strength of citrus rootstocks under water deficit

Running title: Sink strength of citrus rootstocks under water deficit

Sink strength of citrus rootstocks under water deficit

Simone F. da Silva¹, Marcela T. Miranda^{1,2}, Vladimir E. Costa³, Eduardo C. Machado²,
Rafael V. Ribeiro^{1,*}

¹University of Campinas (UNICAMP), Institute of Biology, Department of Plant Biology, Laboratory of Crop Physiology, P.O. Box 6109, 13083-970 Campinas SP, Brazil.

²Agronomic Institute (IAC), Center R&D in Ecophysiology and Biophysics, Laboratory of Plant Physiology “Coaracy M. Franco”, P.O. Box 28, 13012-970 Campinas SP, Brazil.

³São Paulo State University (UNESP), Stable Isotopes Center (CIE), Botucatu SP, Brazil.

*Corresponding author: rvr@unicamp.br

Keywords: drought, abiotic stress, pulse-labelling trees, partitioning, ¹³C accumulation.

Abstract

Carbon allocation between source and sink organs determines plant growth and is influenced by environmental conditions. Under water deficit, plant growth is inhibited before photosynthesis and shoot growth tends to be more sensitive than root growth. However, the modulation of source-sink relationship by rootstocks remain unsolved in citrus trees under water deficit. Citrus plants grafted on Rangpur lime are drought tolerant, which may be related to a fine coordination of the source-sink relationship for maintaining root growth. Here, we followed ^{13}C allocation and evaluated physiological responses and growth of Valencia orange trees grafted on three citrus rootstocks (Rangpur lime, Swingle citrumelo and Sunki mandarin) under water deficit. As compared to plants on Swingle and Sunki rootstocks, ones grafted on Rangpur lime showed higher stomatal sensitivity to the initial variation of water availability, less accumulation of non-structural carbohydrates in roots, higher root growth and also higher ^{13}C allocation to roots under water deficit. As consequences, plants grafted on Rangpur lime had higher leaf water potential and photosynthesis under severe water deficit. Higher ^{13}C allocation to roots indicates that Rangpur lime rootstock exhibits high sink demand associated with root growth under water deficit. Our data suggest that Rangpur lime rootstock used photoassimilates as sources of energy and C skeletons for growing under drought, which is likely associated with increases in root respiration. Taken together, our data revealed that carbon supply by leaves and delivery to roots are critical for maintaining root growth and improving drought tolerance, with citrus rootstocks showing differential sink strength under water deficit.

Introduction

Carbon allocation between source and sink organs regulates plant growth, with leaf CO₂ assimilation being affected by heterotrophic organs (Ainsworth and Bush 2011, Ribeiro et al. 2012, Lemoine et al. 2013). While long-distance transport is controlled by hydrostatic pressure gradient based on differential photoassimilate concentration (Sturm and Tang 1999), the direction of photoassimilate partitioning between sink organs is determined by sink strength – the competitive capacity of an organ to import photoassimilates, which is dependent on sink size and physiological state (Ho 1988, Marcelis 1996, Herbers and Sonnewald 1998).

The source-sink relationship is influenced by environmental factors and modulates carbon allocation and plant growth (Lemoine et al. 2013). According to Körner (2013), environmental factors such as water deficit affect sink activity rather than source activity. In other words, the supply of photoassimilates is less restricted by low water availability than the incorporation of carbon into plant structure. As leaf growth is inhibited under water deficit before any reduction in photosynthesis, at least initially, there is a buildup of carbohydrates in leaves and then an increase in photoassimilate availability to roots (Hummel et al. 2010, Muller et al. 2011). Such sugars may accumulate in roots when supply exceeds the carbon demand for growth (Chen and Jiang 2010, Durand 2018) and citrus roots have been recognized as unsaturated sinks for carbohydrates (Goldschmidt and Koch 1996).

In citrus trees, the photosynthetic rate and starch concentration are reduced in leaves and phloem sucrose concentration is increased under lower sink demand. As a consequence, the expression of genes related to sucrose synthesis and transport is inhibited while the expression of ADP-glucose pyrophosphorylase is increased (Nebauer et al. 2011). When sinks are active, a positive relationship between photosynthesis and increased export/consumption of photoassimilates is established, which is associated with increases in vegetative growth (Ribeiro et al. 2012). Thus, photosynthesis seems to be more regulated by leaf carbohydrate dynamics than by carbohydrate concentration itself, revealing a close relationship between source and sink in citrus trees (Minchin and Thorpe 1996, Ribeiro and Machado 2007, Nebauer et al. 2011, Ribeiro et al. 2012).

When comparing citrus trees grafted on Rangpur lime and Swingle citrumelo rootstocks, the ones on Rangpur lime showed higher shoot growth and higher root starch consumption under favorable conditions for plant growth (Bueno et al. 2012). Those results suggested that Rangpur lime is more efficient in mobilizing carbohydrate reserves and using the energy and carbon for vegetative growth in sink organs. Accordingly, we have found that root carbohydrate

accumulation is related to leaf starch degradation and low leaf carbohydrate concentration in citrus trees grafted on Rangpur lime and facing water deficit (Pedroso et al. 2014). In fact, Rangpur lime is known to improve the performance of citrus trees under water deficit (Ribeiro and Machado 2007, Magalhães Filho et al. 2008, Bueno et al. 2012, Pedroso et al. 2014; Miranda et al. 2020) but the role of source-sink balance in enhancing the growth of citrus trees under water deficit remains unexplored.

Higher frequency and severity of drought events are predicted in climate change scenarios (Thornton et al., 2014, IPCC 2013) and the resilience of both natural and crop fields depends on how plants face such environmental challenge. As roots are responsible for the uptake of water and nutrients and are the first sensors of soil water availability, we hypothesized that citrus performance under water deficit is associated with the rootstock ability in importing photoassimilates. By supplying plants with ^{13}C and following its allocation, we aimed to assess the sink strength of three citrus rootstocks species and reveal how leaf gas exchange and plant growth are modulated under drought.

Materials and methods

Plant material

Ten-month old Valencia orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] plants grafted on Swingle citrumelo [*Citrus paradisi* Macf x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck), or Sunki mandarin (*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka) rootstocks were grown in plastic bags (4.5 L) containing commercial organic substrate composed of pine bark (Tropstrato V8 Citrus, Vida Verde, Mogi Mirim SP, Brazil) under greenhouse conditions.

Experimental design

Citrus plants with similar height and leaf area were pruned and moved to a growth chamber (PGR15, Conviron, Winnipeg MB, Canada) at 30/20°C (day/night), 12-hour photoperiod (7h00-19h00), photosynthetically active radiation (Q) of 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and air vapor pressure deficit (VPD) lower than 2.0 kPa. Plants remained in such environmental conditions for eight days, when shoot sprouting was noticed.

An initial evaluation of six well-hydrated plants was performed to characterize citrus trees and then plants were enriched with ^{13}C by supplying $^{13}\text{CO}_2$, as done by Freund and Hegeman (2017). Then, plants were grouped into two lots of 6 plants each and one lot was subjected to water withholding for 14 days while the other remained well-watered (Figure S1). Well-watered plants (Control) were maintained under substrate moisture around 80% of the maximum water storage capacity (MWC) throughout the experimental period. For drought-stressed plants (WD), irrigation was stopped until the substrate reaches ~25% MWC at the end of the experimental period. Substrate moisture was monitored by weighing the bags (substrate + plant) daily with an electronic scale and water supply was done to keep moisture ~80% MWC for control plants, following Pedroso et al. (2014). At the beginning of the experiment, all plants were similar in size and substrate moisture was ~80% MWC.

Enriching plants with $^{13}\text{CO}_2$

Acrylic chambers (31 L) equipped with an airtight sealing system composed of a rubber layer pressed by an acrylic cover through lateral clips were used for supplying $^{13}\text{CO}_2$ to plants (Figure 1). The acrylic cover contained a device that made it possible to apply the enriched gas while preventing leakage. The transparent acrylic allowed Q of $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ to reach plants and air temperature inside the chambers ranged from 30 to 32 °C. The $^{13}\text{CO}_2$ gas was obtained from a 10 L cylinder with 99% ^{13}C (Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury MA, USA). A device regulated the gas flow from the cylinder to a 20 mL syringe (Figure 1). Afterwards, the gas inside the syringe was injected manually into the chamber. For the enrichment procedure, the plant substrate was isolated with a plastic bag to avoid $^{13}\text{CO}_2$ supply to roots. Citrus plants remained inside the chambers for 30 min before the first application of $^{13}\text{CO}_2$, a period necessary to reduce the air $^{12}\text{CO}_2$ concentration and, consequently, stimulate stomatal opening. Each chamber received four applications of 20 mL $^{13}\text{CO}_2$ in intervals of 40 min between applications. An application of 20 mL $^{13}\text{CO}_2$ resulted in approximately $700 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ inside the chamber, which was reduced to $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ within 15 min. $^{13}\text{CO}_2$ supply was done when plants were well-hydrated, between 9h00 and 12h00, period of highest photosynthetic activity (Ribeiro et al. 2009). This procedure was repeated for three consecutive days for each rootstock species.

Leaf gas exchange and photochemistry

Leaf gas exchange was measured using an infrared gas analyzer (LI-6400F, LI-COR, Lincoln NE, USA), under air CO₂ concentration ($\sim 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) and Q of $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. CO₂ assimilation (A_n), stomatal conductance (g_s), transpiration (E) and intercellular CO₂ concentration (C_i) were measured in mature leaves positioned at the apex of plant shoot. Measurements were taken every two days during the experimental period, between 9h00 and 10h00, in six plants of each rootstock in each water condition. Chlorophyll fluorescence was measured with a modulated fluorometer (LCF6400-40, LI-COR, Lincoln NE, USA) attached to the LI-6400F system. In light-adapted leaves, the same used in gas exchange, a light saturation pulse ($\lambda = 630 \text{ nm}$, $Q \sim 6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0.8 s) was applied to evaluate the effective quantum yield of photosystem II [$\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_t)/F_m'$], in which F_m' is the maximum fluorescence signal and F_t is the steady state fluorescence signal (Rohacek 2002).

Leaf water potential

Leaf water potential (ψ) was measured with a pressure chamber (model 3005, Soilmoisture Equipment Corp., Santa Barbara CA, USA), using leaves similar to those in which photosynthesis was evaluated. ψ was measured at the end of the experimental period, between 11h00 and 12h00, just after measuring leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence. Again, we evaluated six plants of each rootstock in each treatment.

Phloem sap extraction

Phloem sap was collected according to Devaux et al. (2009). Approximately 2/3 of plant trunk was washed with distilled water and the entire outer part of the bark was carefully removed by scraping with a blade. Then, the inner part of the bark containing the phloem was detached from the central region of the trunk. Phloem fragments were washed and inserted in 4 mL plastic tubes filled with distilled water. The tubes were stored under -20°C until the isotopic analysis. Sap samples were collected before the $^{13}\text{CO}_2$ enrichment and 14 days after water withholding, using six plants of each rootstock in each water condition.

Biometry

Mature leaves, the main trunk, new shoots (developed during the experiment), coarse roots (> 2 mm in diameter) and fine roots (< 2 mm in diameter) were harvested and dried in an oven with forced air circulation at 60 °C until constant weight. Biometric evaluations were performed before the ¹³CO₂ enrichment and at the end of water withholding period. For new shoots and fine roots, we calculated the relative growth rate (RGR): $RGR = [(\ln * DM2 - \ln * DM1) / (t2 - t1)]$, where $\ln * DM2$ and $\ln * DM1$ are the natural logarithm of the final (DM2) and initial (DM1) values; and $t2$ and $t1$ are the final ($t2$) and initial ($t1$) evaluations, in days (Beadle 1993). Dry samples of new shoots, mature leaves, main trunk and fine roots were crushed in a cryogenic mill (SPEX, SamplePrep, Geno/Grinder 2010, London, UK), by placing samples in individualized vials with three steel balls in liquid nitrogen.

Carbohydrates

Dry samples of mature leaves and fine roots were used to quantify total soluble sugars, sucrose and starch concentration. The total soluble sugars and sucrose concentration were assayed in 75 mg samples after extraction in a 3 mL of methanol:chloroform:water (MCW, 12:5:3 v:v:v), according to Bieleski and Turner (1966). The total soluble sugars were quantified by the phenol-sulfuric method (Dubois et al. 1956), using 5 µL (leaf) or 10 µL (root) of the MCW extract. Sucrose analysis was performed according to van Handel (1968), in 15 µL of the MCW extract. After extraction of soluble sugars, the precipitate was dried at room temperature until complete evaporation of the ethanol. Starch was then quantified by the enzymatic method described by Amaral et al. (2007), using 500 µL (120 U mL⁻¹) of α-amylase (EC 3.2.1.1) of thermostable *Bacillus licheniformis* (code E-ANAAM, Megazyme, Bray, Ireland) and 500 µL (30 U mL⁻¹) of amyloglucosidase (EC 3.2.1.3) from *Aspergillus niger* (code E-AMGPU, Megazyme, Bray, Ireland).

Isotopic analysis

Dry and ground samples (60 to 70 µg) of new shoots (young leaves and branches), mature leaves, main trunk and fine roots were weighed on a highly sensitive analytical balance (XP6, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) and packed in tin cylindrical capsules model

D1106 (Elemental Microanalysis Limited, Okehampton, UK). For phloem sap analysis, 2 mL of each sample were transferred to a microcentrifuge tube and then centrifuged at 3500 rpm for 5 min (CT-4000, Cientec, Belo Horizonte MG, Brazil) to remove any trace of plant tissue. After centrifugation, 1 μ L of each sample was packed in tin capsules, as described above. The capsules were inserted into the elemental analyzer EA (EA 1108, Fisons, Milan, Italy) coupled to an isotopic ratio mass spectrometer IRMS (Delta S, Finnigan Mat, Bremen, Germany) to perform the isotopic analysis. After combustion in EA, sample CO₂ was transferred to the IRMS through the gas interface (ConFlo III, Finnigan Mat, Bremen, Germany) and ¹³CO₂/¹²CO₂ ratio ($R = {}^{13}C/{}^{12}C$) and the mass of total carbon isotopes ($mtC = m^{13}C + m^{12}C$) were determined in each sample. Atom fraction ($x^{13}C$) is expressed as $x^{13}C = R/(1+R)$ (Coplen 2011) and the mass fraction of total carbon isotopes (xtC) as $xtC = (mtC/sample\ mass)$. To determine the total mass of ¹³C in each organ ($m^{13}C_{organ}$), $x^{13}C$ was converted into mass fraction ¹³C ($x^{13}C_m$), following Scrimgeour and Robinson (2004). Considering the mass of each organ, total mass of ¹³C in each organ was calculated as: $m^{13}C_{organ} = (x^{13}C_m) * (organ\ mass) * (xtC)$. The relative ¹³C accumulation in each organ was obtained by the $m^{13}C_{organ}/m^{13}C_{plant}$ ratio. Total accumulation of ¹³C in plant ($m^{13}C_{plant}$) was the sum of new shoots, mature leaves, main trunk and roots. For estimating of relative and total ¹³C accumulation in roots, we considered the isotopic composition of fine roots.

Statistical analysis

The experiment was carried out in a completely randomized design, and data were analyzed using Bayesian statistics and the JASP software (<https://jasp-stats.org>), with water regimes and rootstocks as sources of variation. When significant effects of the water regimes or rootstocks were detected, mean values ($n=6$) were compared using Bayes Factor (BF₁₀). Bayes Factors as evidence for the alternative hypothesis (H₁) followed Miranda et al. (2020), with weak support to H₁ when $1 < BF_{10} < 3$, positive support to H₁ when $3 < BF_{10} < 20$, and strong support to the alternative hypothesis when $BF_{10} > 20$.

Results

Leaf water potential, gas exchange and photochemistry

Substrate moisture was gradually reduced after water withholding, reaching ~25% MWC after 14 days (Figure 2a), when plants under water deficit (WD) showed a significant reduction in ψ as compared to control plants, regardless of the rootstock (Figure 2b). However, plants grafted on Rangpur lime showed higher ψ than ones grafted on the other rootstocks under water deficit (Figure 2b).

As an expected response to low water availability, reductions in A_n , g_s and E were noticed on all rootstock species (Figure 3). While leaf gas exchange of plants grafted on Rangpur lime was reduced after four days of water deficit (Figure 3e-g), ones grafted on Swingle citrumelo showed such reduction after six days (Figure 3a-c) and plants grafted on Sunki mandarin exhibited the lowest E values only after eight days of water shortage (Figure 3i-k). Increases in C_i were found in plants grafted on Swingle citrumelo and on Sunki mandarin after 10 or 12 days of water deficit, respectively (Figure 3d, l). Plants grafted on Rangpur lime did not present any increase in C_i under water deficit and exhibited higher A_n than ones grafted on the other species at the maximum water deficit (Figure 3a, e, i). While Φ_{PSII} was unaffected by low water availability in plants grafted on Rangpur lime, ones grafted on Swingle citrumelo and Sunki mandarin showed decreases in Φ_{PSII} after 8 and 14 days of water deficit, respectively (Figure 4).

Plant growth

Regardless of the rootstock, water deficit reduced biomass accumulation in new shoots during the experimental period (Figure 5a). Interestingly, only plants grafted on Rangpur lime showed increases in biomass of fine roots under water deficit (Figure 5b). Growth of new shoots (RGR_{NS}) was decreased in plants under water deficit on all three rootstocks (Figure 5c), while fine root growth (RGR_{FR}) increased only in plants grafted on Rangpur lime (Figure 5d), with a six-fold increase as compared to the control plants. On the other hand, non-significant changes were found in biomass of older organs (mature leaves, trunk and coarse root) throughout the experimental period, with exception of coarse roots in Sunki mandarin – which had lower biomass under drought (Figure S2).

Changes in carbohydrate concentration in roots and leaves

Despite the rootstock, plants showed accumulation of sucrose and total soluble sugars in fine roots under water deficit (Figure 6e, f) and there was no difference between treatments when considering mature leaves (Figure 6b, c). Under water deficit, only fine roots of Swingle citrumelo showed starch accumulation (Figure 6d) while decreases in leaf starch concentration were found on all three rootstocks (Figure 6a). Increases in sucrose and total soluble sugar concentration were found in fine roots under water deficit. Increases in total soluble sugar varied among rootstocks: +57% in Rangpur lime; +231% in Swingle citrumelo; and +104% in Sunki mandarin (Figure 6f).

$^{13}\text{CO}_2$ enrichment and ^{13}C allocation

Non-enriched citrus plants showed negative $\delta^{13}\text{C}$, while ^{13}C -enriched ones showed positive $\delta^{13}\text{C}$ in all organs and sap (Table S1). Regardless the rootstock and water conditions, relative ^{13}C accumulation was higher in roots.

Similar relative ^{13}C accumulation among new shoots and leaves of plants grafted on Swingle citrumelo indicates homogeneous partitioning of photoassimilates under well-watered conditions (Figure 7a). In relation to other organs, relative ^{13}C accumulation in new shoots on Swingle citrumelo was reduced under water deficit (Figure 7a). Comparing a given organ under varying water availability, we found that the ^{13}C accumulation was reduced (-81%) in new shoots and increased in leaves (+21%) of plants grafted on Swingle citrumelo under water deficit (Figure 7b). In well-hydrated plants grafted on Rangpur lime, the relative ^{13}C accumulation was lower in leaves and trunk than in new shoots (Figure 7c). When plants faced water deficit, there was less ^{13}C accumulation in new shoots and similar accumulation between leaves and trunk (Figure 7c). While plants grafted on Rangpur lime had a significant reduction (-60%) of ^{13}C accumulation in new shoots, ^{13}C accumulation increased 10% and 25% in leaves and roots under water deficit, respectively (Figure 7d). When considering ^{13}C accumulation among organs, we found lower ^{13}C allocation to leaves of plants grafted on Sunki mandarin maintained well-watered (Figure 7e). Under water deficit, new shoots and leaves exhibited the lowest ^{13}C accumulation in plants grafted on Sunki mandarin (Figure 7e). Comparing the same organ between water conditions, ^{13}C accumulation increased (+33%) in leaves and reduced (-39%) in new shoots of plants grafted on Sunki mandarin under water deficit (Figure 7f).

Discussion

Drought sensing and plant performance under water deficit are affected by rootstocks

Decreases in ψ and leaf gas exchange and an altered pattern of plant growth indicated morpho-physiological adjustments to low water availability (Figures 2b, 3 and 5). While these overall responses were already expected (García-Sánchez et al. 2007, Smith and Stitt 2007; Erismann et al. 2008, Shao et al. 2008), they revealed significant differences on how rootstocks modulate the performance of citrus trees under water deficit. Higher stomatal sensitivity to varying water availability was found in plants grafted on Rangpur lime, unlike on the other rootstocks (Figure 3f). Such stomatal sensitivity was followed by less pronounced decline in ψ , less reduction in A_n and insensitivity of primary photochemistry on Rangpur lime at the maximum water deficit (Figures 2b, 3e and 4). Taken together, we may argue that such ability of Rangpur lime in sustaining photosynthesis under drought was associated with early stomatal closure for reducing water loss through transpiration and then preserving leaf water status under low water supply.

Early stomatal closure suggests that Rangpur lime rootstock is able to detect subtle variation in substrate water availability. While plants grafted on Rangpur lime and on Sunki mandarin presented gradual stomatal closure under water deficit, ones grafted on Swingle citrumelo experienced an abrupt g_s reduction after six days of water withholding (Figure 3b, f, j). Besides stomatal limitation found at early stages of water deficit, our data suggest that low photosynthesis was caused by photochemical impairment in plants grafted on Swingle citrumelo and Sunki mandarin under severe water deficit (Figure 4a, c). In addition, reduced Rubisco carboxylation cannot be ruled out as a cause of low citrus photosynthesis under severe water deficit (Vu and Yelenosky 1988).

Although leaf CO_2 assimilation was reduced under low water availability, only plants grafted on Rangpur lime showed no photochemical damage and were able to sustain photosynthetic activity even under severe water deficit (Figures 3e and 4b), which favoured the photoassimilate supply to sink organs.

Carbon allocation as affected by rootstocks in citrus trees under water deficit

^{13}C accumulation revealed that ^{13}C enrichment was satisfactory and citrus plants assimilated and distributed ^{13}C among organs (Table S1). Such photoassimilates are commonly used in respiration and synthesis of other compounds, which are stored or incorporated into the cell structures (Epron et al. 2012). While limiting water loss, stomatal closure also constrains photoassimilate synthesis (Chaves and Oliveira 2004, Flexas et al. 2006) and this condition leads to readjustments of energy demand and supply, compromising plant growth (Sharp 2002, Smith and Stitt 2007). In fact, such plant responses to water deficit were found herein (Figures 3 and 5). Limited growth represents a primary response to water deficit, allowing energy saving and resource redistribution to priority organs (Muller et al. 2011, Verslues 2017). Carbon surplus may be accumulated in roots as carbohydrates, which play a double role as transitory carbon and energy stocks in citrus trees (Dovis et al. 2014) and contribute to osmotic adjustment under water deficit (Hummel et al. 2010).

Our data suggest that the water deficit changed the carbon dynamics in plants under water deficit, reducing growth of new shoots (Figure 5a, c) and causing low leaf starch concentration (Figure 6a) and accumulation of non-structural carbohydrates (NSC) in all rootstocks (Figure 6e, f). However, the accumulation of NSC was smaller in Rangpur lime as compared to the others (Figure S3). This finding was associated with a significant increase in biomass of fine roots found only in plants grafted on Rangpur lime under water deficit (Figure 5b, d). Then, less NSC accumulation in Rangpur lime rootstock would indicate a large consumption of resources for promoting root growth rather than a low supply of photoassimilates by leaves.

Sink strength of citrus rootstocks under water deficit

While plants grafted on Swingle citrumelo showed the largest increase in total soluble sugars in roots under water deficit (Figure 6c), only plants grafted on Rangpur lime exhibited increases in root growth under low water availability (Figure 5d). Such ability of Rangpur lime in increasing sink strength under water deficit became more evident through the ^{13}C allocation under water deficit (Figure 7c, d): increases of 25% in ^{13}C allocation to roots (Figure 7d). Increased partitioning of photoassimilates to produce energy and provide C skeletons for growth is associated with increases in root respiration (Liu et al. 2020), a likely process

upregulating sink strength in Rangpur lime rootstock. Although the maintenance of root growth represents an energy expenditure, fine roots uptake water more efficiently and are metabolically more active, showing high respiratory demand for photoassimilates (Brunner et al. 2015). Assuming that Rangpur lime rootstock has high respiratory activity, we would suggest that ^{13}C accumulation was even higher as there are ^{13}C losses in mitochondria. However, such hypothesis remains to be explored in future research.

As plant hormones shape developmental processes and then influence sink strength (Kuiper, 1993), regulatory adjustments to coordinate photoassimilate partitioning likely involve signalling and hormonal regulation (Sharp et al. 2004). Gibberellins (GAs) act on the source-sink metabolism, regulating the phloem translocation process through the induction of extracellular invertase. The interaction between plant hormones and the involvement of abscisic acid (ABA) should also be considered when studying adaptative responses in source-sink relationship to water deficit (Gomes et al. 2003, Gomes et al. 2004). ABA plays an important role in integrating several stress signals and controlling plant responses to stressful conditions, such as water deficit (Tuteja 2007, Vishwakarma et al. 2017). Unraveling the regulatory mechanisms and altered metabolic pathways in Rangpur lime rootstock under water deficit is the next step towards the understanding of physiological and metabolic strategies related to sink strength that benefit citrus trees under low water availability.

Conclusion

Rangpur lime rootstock has the ability to increase sink demand by photoassimilates and then root growth under water deficit, showing more stomatal sensitivity to the initial variation of water availability than Swingle citrumelo and Sunki mandarin rootstocks. As consequences, plants grafted on Rangpur lime have higher leaf water status and photosynthesis than ones grafted on Swingle citrumelo or Sunki mandarin rootstocks under severe water deficit. Overall, we revealed one more facet of the complex mechanism related to drought tolerance induced to citrus trees by Rangpur lime, linking altered source and sink activities to root growth under water deficit. Even without elucidating the mechanistic and morphological aspects behind sugar partitioning in citrus trees, our data show clearly that carbon supply to rootstock is a key element for improving plant performance in rainfed areas.

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Funding

The São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil, Grant #2015/14817-4, #2016/11906-9, #2016/02199-7 and #2018/09834-5); the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, Grant #401104/2016-8, #302460/2018-7 and #311345/2019-0)

Acknowledgments

We thank the assistance provided by Dr. Daniela F. S. P. Machado during starch analyses.

Authors' Contributions

SFS, ECM and RVR designed the experiments; SFS and MTM executed the experiments, collected data and carried out all statistical analyses; VEC supervised the isotopic analysis; SFS and RVR interpreted the dataset; SFS wrote the first draft; and all authors edited the manuscript and approved the final version.

References

- Ainsworth EA, Bush DR (2011) Carbohydrate export from the leaf: a highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiol* 155: 64-69.
- Amaral LIV, Gaspar M, Costa PMF, Aidar MPM, Buckeridge MS (2007) Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34: 425-431.
- Beadle CL (1993) Growth analysis. In: Hall DO, Scurlock JMO, Bolhàr-Nordenkampf HR, Leegood RC, Long SP (eds) *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*. Springer, Dordrecht, pp 36-46.
- Bielecki RL, Turner A (1966) Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Anal Biochem* 17: 278-293.

Brunner I, Herzog C, Dawes MA, Arend M, Sperisen C (2015) How tree roots respond to drought. *Front Plant Sci* 6: 547.

Bueno ACR, Prudente DA, Machado EC, Ribeiro RV (2012) Daily temperature amplitude affects the vegetative growth and carbon metabolism of orange trees in a rootstock-dependent manner. *J Plant Growth Regul* 31: 309-319.

Chaves MM, Oliveira MM (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *J Exp Bot* 55: 2365-2384.

Chen H, Jiang JG (2010) Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environ Rev* 18: 309-319.

Coplen TB (2011) Guidelines and recommended terms for expression of stable isotope-ratio and gas-ratio measurement results. *Rapid Commun Mass Spectrom* 25: 2538-2560.

Devaux M, Ghashghaie J, Bert D, Lambrot C, Gessler A, Bathellier C, Ogee J, Loustau D (2009) Carbon stable isotope ratio of phloem sugars in mature pine trees throughout the growing season: comparison of two extraction methods. *Rapid Commun Mass Spectrom* 23: 2511-2518.

Dovis VL, Machado EC, Ribeiro RV, Magalhães Filho JR, Marchiori PER, Sales CRG (2014) Roots are important sources of carbohydrates during flowering and fruiting in ‘Valencia’ sweet orange trees with varying fruit load. *Sci Hortic* 174: 87-95.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356.

Durand M, Mainson D, Porcheron B, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N (2018) Carbon source–sink relationship in *Arabidopsis thaliana*: the role of sucrose transporters. *Planta* 247: 587-611.

Epron D, Bahn M, Derrien D, Lattanzi FA, Pumpanen J, Gessler A, Högberg P, Maillard P, Dannoura M, Gérant D, Buchmann N (2012) Pulse-labelling trees to study carbon allocation

dynamics: a review of methods, current knowledge and future prospects. *Tree Physiol* 32: 776-798.

Erismann NM, Machado EC, Tucci MLS (2008) Photosynthetic limitation by CO₂ diffusion in drought stressed orange leaves on three rootstocks. *Photosynth Res* 96: 163-172.

Freund DM, Hegeman AD (2017) Recent advances in stable isotope-enabled mass spectrometry-based plant metabolomics. *Curr Opinion Biotechnol* 43:41-48.

García-Sánchez F, Syvertsen JP, Gimeno V, Botía P, Perez-Perez JG (2007) Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstocks with different water-use efficiency. *Physiol Plant* 130: 532-542.

Goldschmidt EE, Koch KE (1996) Citrus. In: Zamski E, Schaffer AA (eds) Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships. Marcel Dekker, New York, pp. 797–823.

Gomes MMA, Lagôa AMMA, Machado EC, Medina CL (2003) Absciscic acid and indole-3-acetic acid contents in orange trees infected by *Xylella fastidiosa* and submitted to cycles of water stress. *Plant Growth Regul* 39: 263-270.

Gomes MMA, Lagôa AMMA, Medina CL, Machado EC, Machado MA (2004) Interactions between leaf water potential, stomatal conductance and absciscic acid content of orange trees submitted to drought stress. *Braz J Plant Physiol* 16: 155-161.

Herbers K, Sonnewald U (1998) Molecular determinants of sink strength. *Curr Opinion Plant Biol* 1: 207-216.

Ho LC (1988) Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 355-378.

Hummel I, Pantin F, Sulpice R, Piques M, Rolland G, Dauzat M, Christophe A, Pervent M, Bouteillé M, Stitt M, Gibon Y, Muller B (2010) Arabidopsis plants acclimate to water deficit

at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiol* 154: 357-372.

IPCC (2013). *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker TF Qin D Plattner G-Ket al (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, NY.

Iqbal N, Nazar R, Khan MIR, Masood A, Khan NA (2014) Role of gibberellins in regulation of source-sink relations under optimal and limiting environmental conditions. *Curr Sci* 100: 998-1007.

Körner C (2013) Growth controls photosynthesis - Mostly. *Nova Acta Leopold* 391: 273-283.

Kuiper D (1993) Sink strength: Established and regulated by plant growth regulators. *Plant Cell Environ* 16: 1025-1026.

Lemoine R, La Camera S, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain JL, Laloi M, Coutos-Thévenot P, Maurousset L, Faucher M, Girousse C, Lemonnier P, Parrilla J, Durand M (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front Plant Sci* 4: 272.

Liu Y, Li P, Wang T, Liu Q, Wang W (2020) Root respiration and below ground carbon allocation respond to drought stress in a perennial grass (*Bothriochloa ischaemum*). *Catena* 188: 104449.

Magalhães Filho JR, Amaral LR, Machado DFSP, Medina CL, Machado EC (2008) Deficiência hídrica, trocas gasosas e crescimento de raízes em laranjeira ‘Valência’ sobre dois tipos de porta-enxertos. *Bragantia* 67: 75-82.

Marcelis LFM (1996) Sink strength as a determinant of dry matter partitioning in the whole plant. *J Exp Bot* 47: 1281-1291.

Minchin PEH, Thorpe MR (1996) What determines carbon partitioning between competing sinks? *J Exp Bot* 47: 1293-1296.

Miranda MT, Silva SF, Silveira NM, Pereira L, Machado EC, Ribeiro RV (2020) Root osmotic adjustment and stomatal control of leaf gas exchange are dependent on citrus rootstocks under water deficit. *J Plant Growth Regul* Online first. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10069-5>

Muller B, Pantin F, Génard M, Turc O, Freixes S, Piques M, Gibon Y (2011) Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *J Exp Bot* 62: 1715-1729.

Nebauer SG, Renau-Morata B, Guardiola JL, Molina RV (2011) Photosynthesis down-regulation precedes carbohydrate accumulation under sink limitation in Citrus. *Tree Physiol* 31: 169-177.

Pedroso FKJV, Prudente DA, Bueno ACR, Machado EC, Ribeiro RV (2014) Drought tolerance in citrus trees is enhanced by rootstock-dependent changes in root growth and carbohydrate availability. *Environ Exp Bot* 101: 26-35.

Ribeiro RV, Machado EC (2007) Some aspects of citrus ecophysiology in subtropical climates: re-visiting photosynthesis under natural conditions. *Braz J Plant Physiol* 19: 393-411.

Ribeiro RV, Machado EC, Santos MG, Oliveira RF (2009) Photosynthesis and water relations of well-watered orange plants as affected by winter and summer conditions. *Photosynthetica* 47: 215-222.

Ribeiro RV, Machado EC, Habermann G, Santos MG, Oliveira RF (2012) Seasonal effects on the relationship between photosynthesis and leaf carbohydrates in orange trees. *Funct Plant Biol* 39: 471-480.

Rohacek K (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* 40: 13-29.

Scrimgeour CM, Robinson D (2004) Stable isotope analysis and applications. In: Smith KA, Cresser MS (eds.) *Soil and environmental analysis*. Dekker, New York, pp 381-432.

Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Zhao CX (2008) Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plant. *Comptes Rend Biol* 331: 215-225.

Sharp RE (2002) Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant Cell Environ* 25: 211-222.

Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert HJ, Nguyen HT (2004) Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J Exp Bot* 55: 2343-2351.

Smith AM, Stitt M (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ* 30: 1126-1149.

Sturm A, Tang GQ (1999) The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci* 4: 401-107.

Thornton PK, Ericksen PJ, Herrero M, Challinor AJ (2014) Climate variability and vulnerability to climate change: a review. *Global Change Biol* 20: 3313-3328.

Tuteja N (2007) Absciscic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signal Behavior* 2: 135-138.

van Handel E (1968) Direct microdetermination of sucrose. *Anal Biochem* 22: 280-283.

Verslues PE (2017) Time to grow: factors that control plant growth during mild to moderate drought stress. *Plant Cell Environ* 40: 177-179.

Vishwakarma K, Upadhyay N, Kumar N, Yadav G, Singh J, Mishra RK, Kumar V, Verma R, Upadhyay RG, Pandey M, Sharma S (2017) Absciscic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Front Plant Sci* 8: 161.

Vu JCV, Yelenosky G (1988) Water deficit and associated changes in some photosynthetic parameters in leaves of 'Valencia' orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Physiol* 88: 375-378.

List of figures

Figure 1. Side (a) and top (b) view of the chamber used for enriching plants with $^{13}\text{CO}_2$ and (c) visual aspect of plants inside a growth chamber. $^{13}\text{CO}_2$ cylinder with apparatus used for the gas transfer (d).

Figure 2. Percentage variation of the maximum water storage capacity of substrate (MWC) during the experimental period (a) and leaf water potential (b) of Valencia orange plants grafted on Swingle citrumelo, Rangpur lime or Sunki mandarin maintained well-watered (Control) or under water deficit (WD). In (a), each point represents the mean value ($n=6$) $\pm$ standard deviation. In (b), measurements were taken 14 days after water withholding and boxplots consider the median, the 25th and 75th percentiles, the error bars indicate range within 1.5 IQR and ♦ indicates outliers ($n=6$). Asterisks indicate statistical differences between water treatments ($\text{BF}_{10}>20$), and capital letters indicate statistical differences among rootstocks under water deficit ($\text{BF}_{10}>3$).

Figure 3. Leaf CO_2 assimilation (A_n), stomatal conductance (g_s), transpiration (E) and intercellular CO_2 concentration (C_i) in mature leaves of Valencia orange plants grafted on Swingle citrumelo, Rangpur lime or Sunki mandarin maintained well-watered (Control) or under water deficit (WD). Each point represents the mean value ($n=6$) $\pm$ standard deviation. * and ** indicate statistical differences between water treatments at $\text{BF}_{10} >3$ and >20 , respectively.

Figure 4. Effective quantum yield of photosystem II (Φ_{PSII}) in mature leaves of Valencia orange plants grafted on Swingle citrumelo, Rangpur lime or Sunki mandarin maintained well-watered (Control) or under water deficit (WD). Each point represents the mean value ($n=6$) $\pm$ standard deviation. * and ** indicate statistical differences between water treatments at $\text{BF}_{10} >3$ and >20 , respectively.

Figure 5. New shoot dry mass (NSDM, a), fine root dry mass (FRDM, b) and relative growth rates (c; d) of new shoots (RGR_{NS} , c) and fine roots (RGR_{FR} , d) of Valencia orange plants grafted on Swingle citrumelo, Rangpur lime or Sunki mandarin maintained well-watered (Control) or under water deficit (WD). Measurements were taken 14 days after water withholding and boxplots consider the median, the 25th and 75th percentiles, the error bars indicate range within 1.5 IQR and ♦ indicates outliers ($n=6$). * and ** indicate statistical differences between water treatments at $\text{BF}_{10} >3$ and >20 , respectively

Figure 6. Starch (Sta, a, d), sucrose (Suc, b, e) and total soluble sugars (SS, c, f) concentrations in mature leaves (a-c) and fine roots (d-f) of Valencia orange plants grafted on Swingle citrumelo, Rangpur lime or Sunki mandarin maintained well-watered (Control) or under water deficit (WD). Measurements were taken 14 days after water withholding and boxplots consider the median, the 25th and 75th percentiles, the error bars indicate range within 1.5 IQR and ♦ indicates outliers ($n=6$). * and ** indicate statistical differences between water treatments at $BF_{10} > 3$ and > 20 , respectively

Figure 7. Relative ^{13}C accumulation (a, c, e) and relative ^{13}C variation due to water deficit (b, e, f) in new shoots, mature leaves, main trunk and roots of Valencia orange plants grafted on Swingle citrumelo, Rangpur lime or Sunki mandarin maintained well-watered (Control) or under water deficit (WD). Measurements were taken 14 days after water withholding. Capital letters indicate statistical differences among organs within a water regime, and * indicates significant change due to water deficit ($BF_{10} > 3$).

Figures

Figure 1

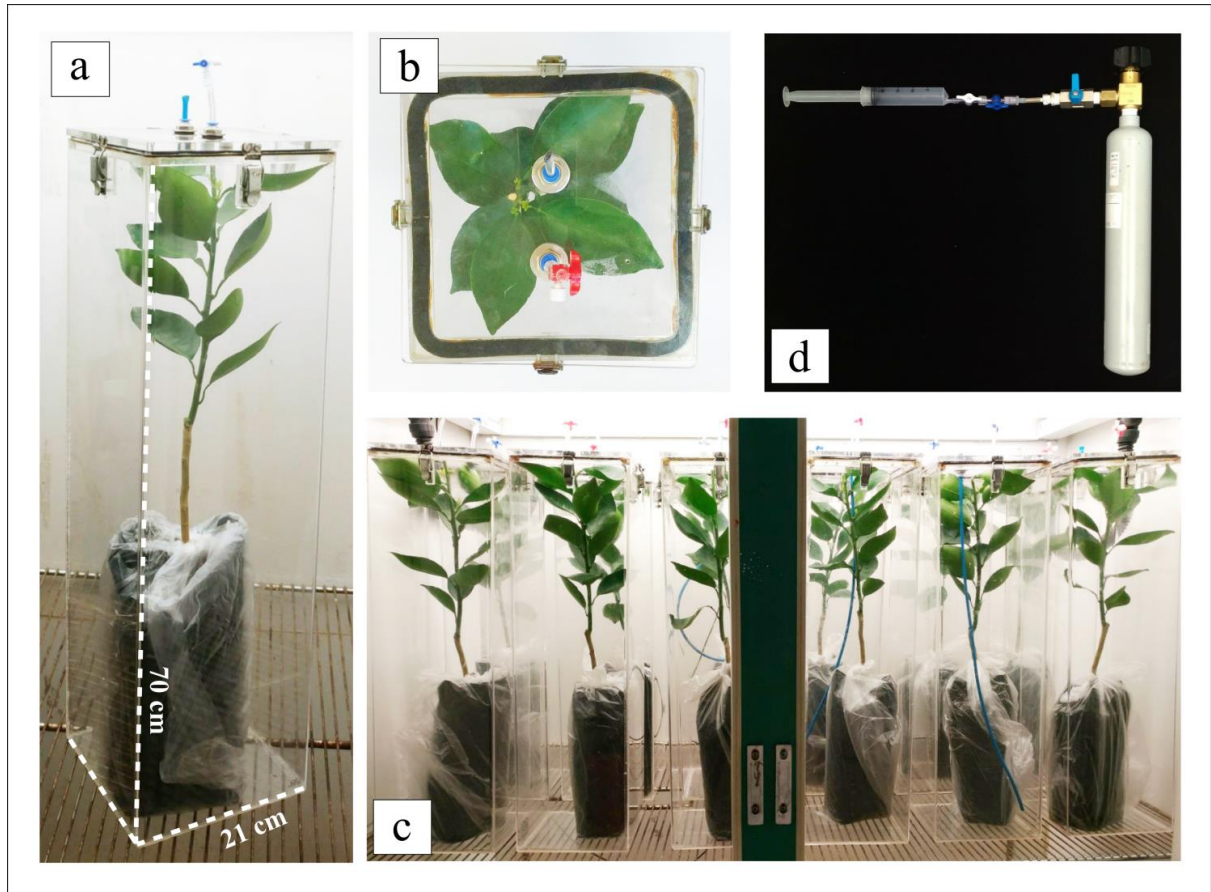


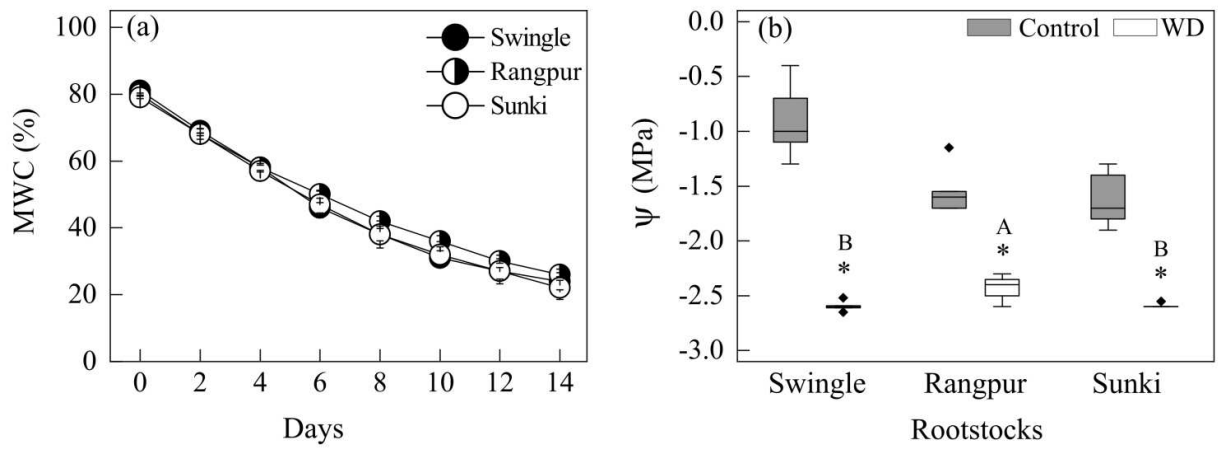
Figure 2

Figure 3

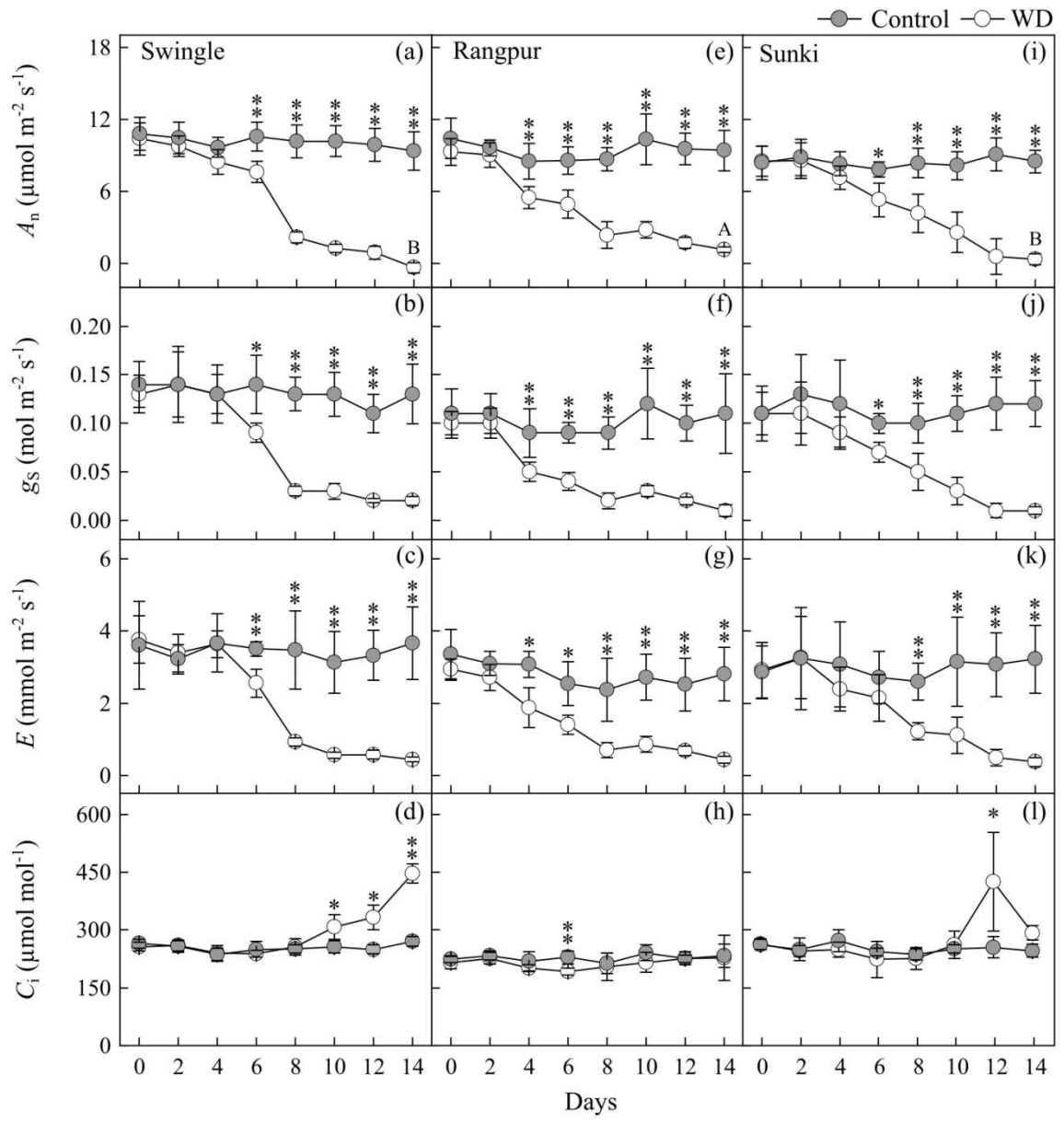


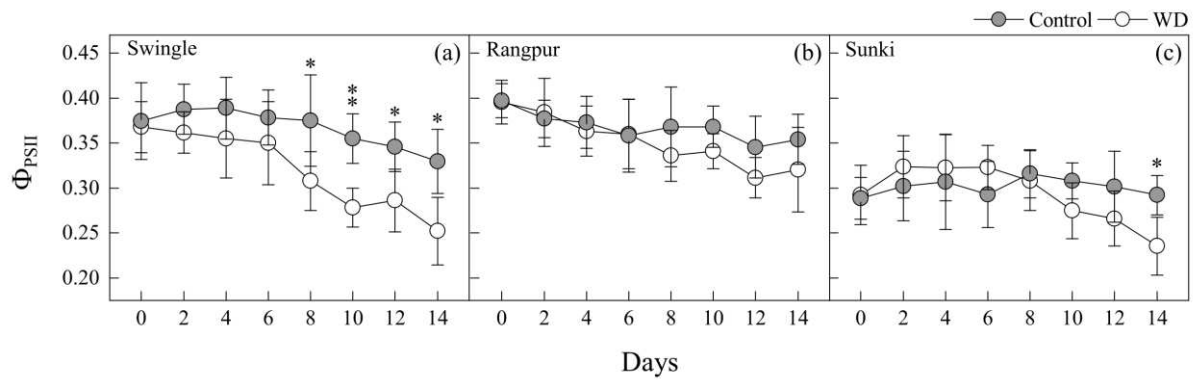
Figure 4

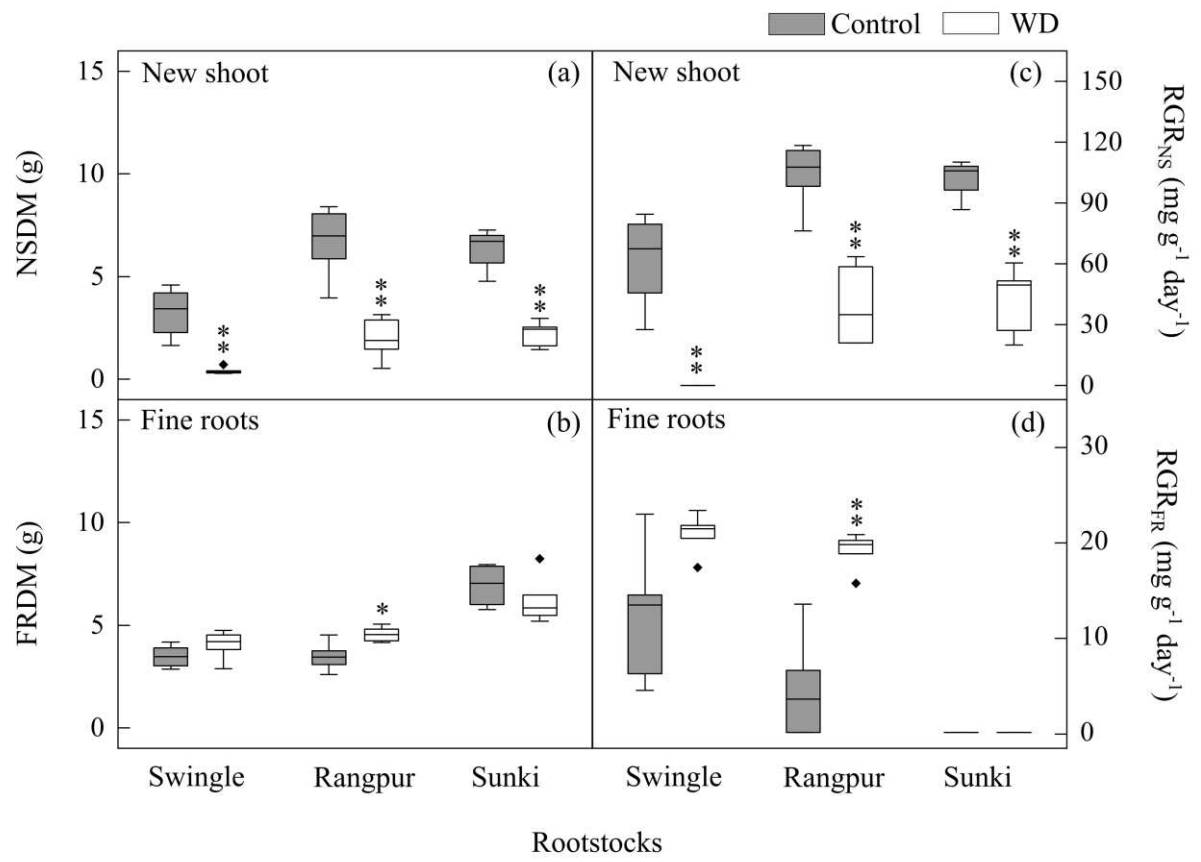
Figure 5

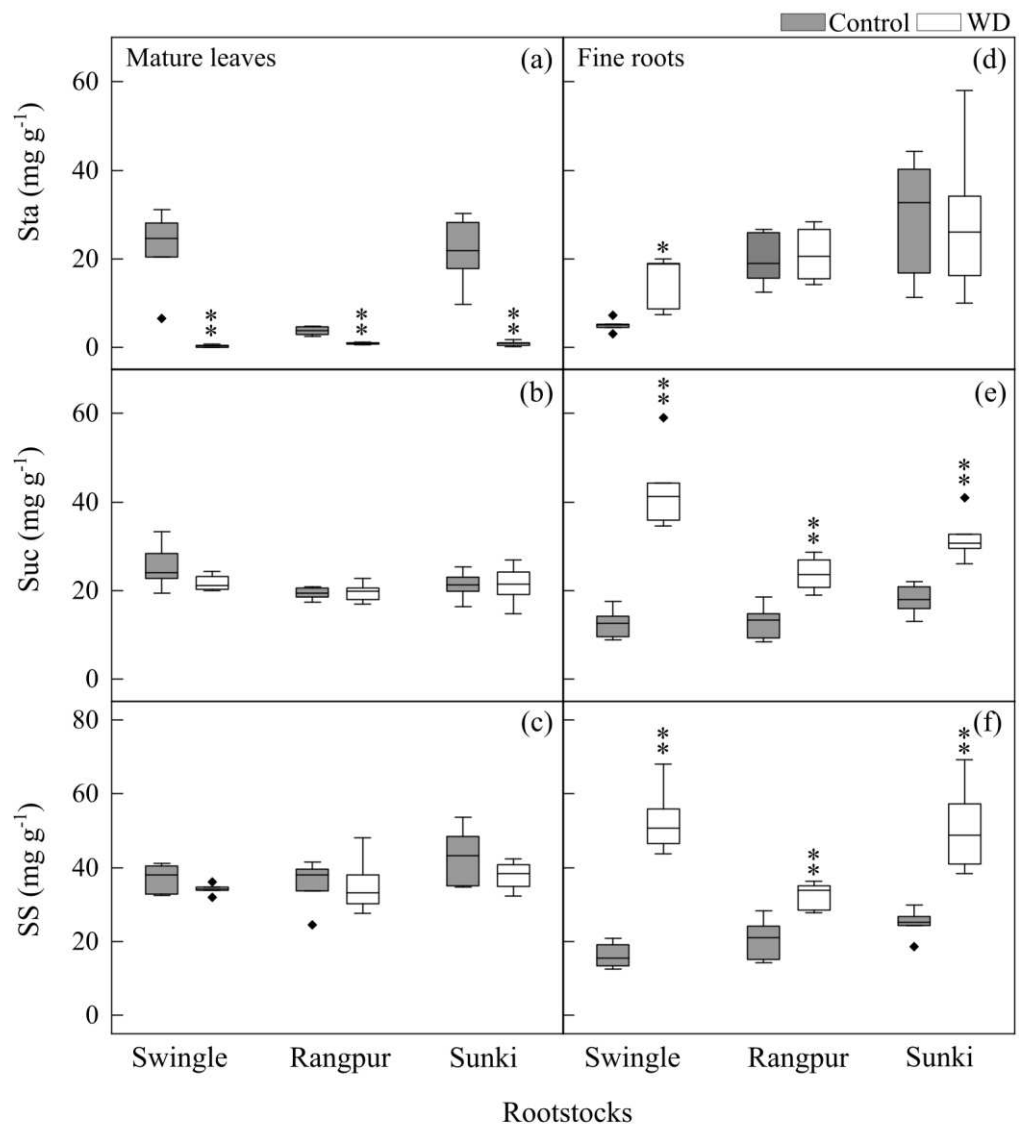
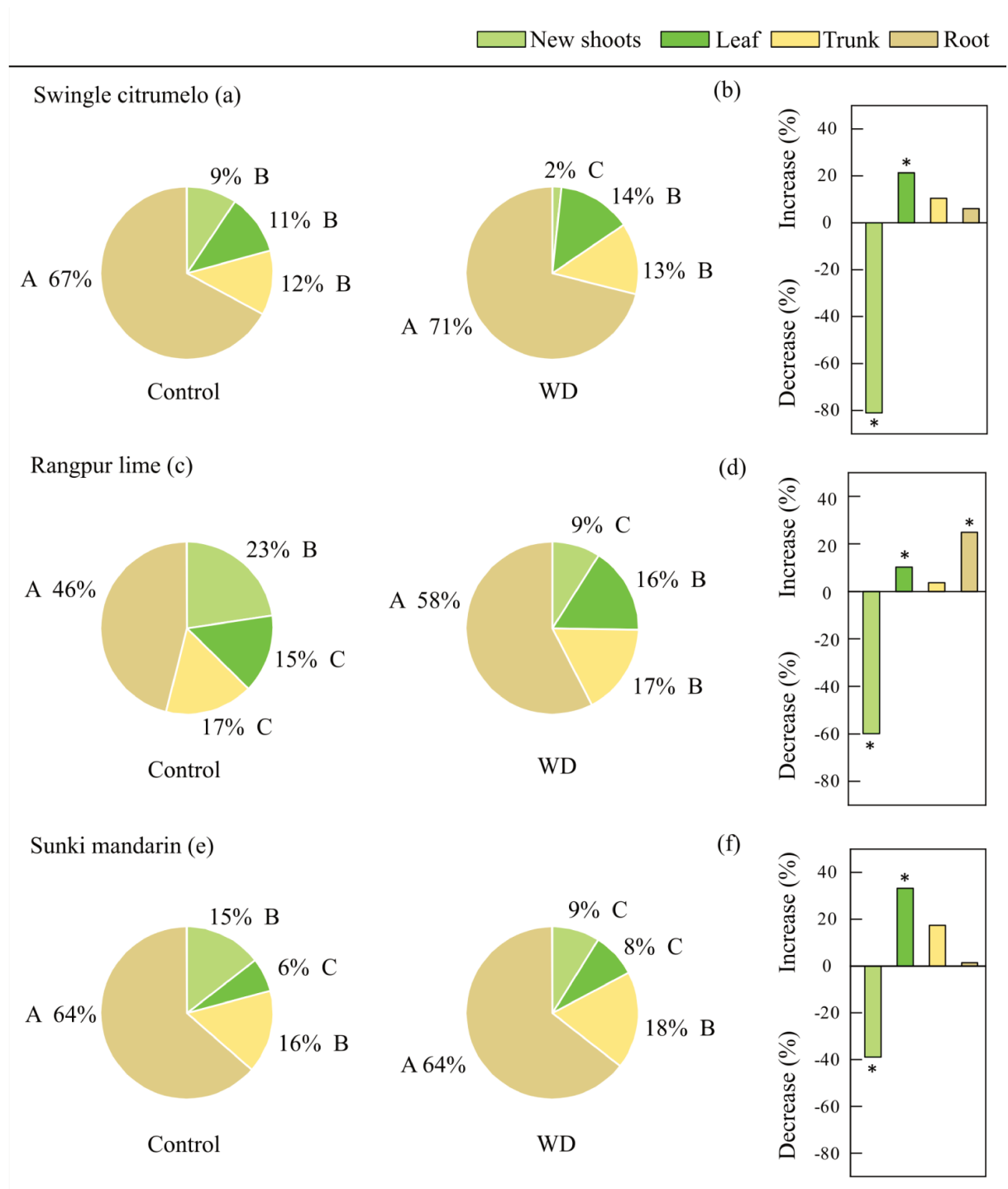
Figure 6

Figure 7



Supplementary data

Table S1. $\delta^{13}\text{C}$ (‰) in new shoots, mature leaves, main trunk, fine roots and phloem sap of Valencia orange plants grafted on Swingle citrumelo, Rangpur lime or Sunki mandarin before $^{13}\text{CO}_2$ enriching plants (Natural) and 14 days after $^{13}\text{CO}_2$ enriching in plants maintained irrigated (Control) or under water deficit (WD).

Rootstock	Condition	New shoots	Leaves	Trunk	Fine roots	Phloem sap
Swingle citrumelo	Natural	- - -	-28.6±0.3	-28.1±0.5	-27.2±0.5	-27.6±1.0
	Control	377±25 b	435±50 a	545±124 a	811±342 a	568±60 b
	WD	851±116 a	416±75 a	644±112 a	881±184 a	754±71 a
Rangpur lime	Natural	- - -	-24.1±0.3	-24.7±0.8	-23.9±0.9	-21.2±0.4
	Control	493±92 b	417±35 a	350±64 a	429±138 a	517±85 a
	WD	815±223 a	439±66 a	359±16 a	521±85 a	552±72 a
Sunki mandarin	Natural	- - -	-24.2±1.8	-26.2±0.6	-26.4±0.5	-24.5±0.6
	Control	751±90 b	443±62 a	278±67 a	197±89 a	575±55 b
	WD	1333±156 a	516±124 a	304±43 a	255±72 a	694±102 a

For a given rootstock, different letters indicate statistical difference between control and WD conditions ($\text{BF}_{10} > 3$). Mean values ($n=6$) $\pm$ standard deviation.

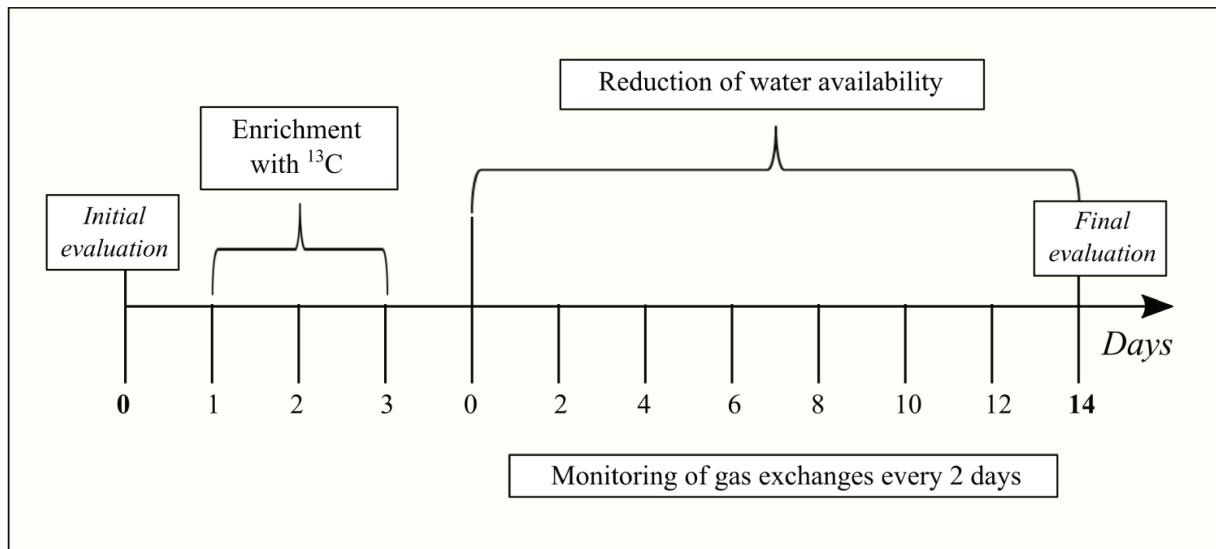


Figure S1. Schematic representation of the experimental period.

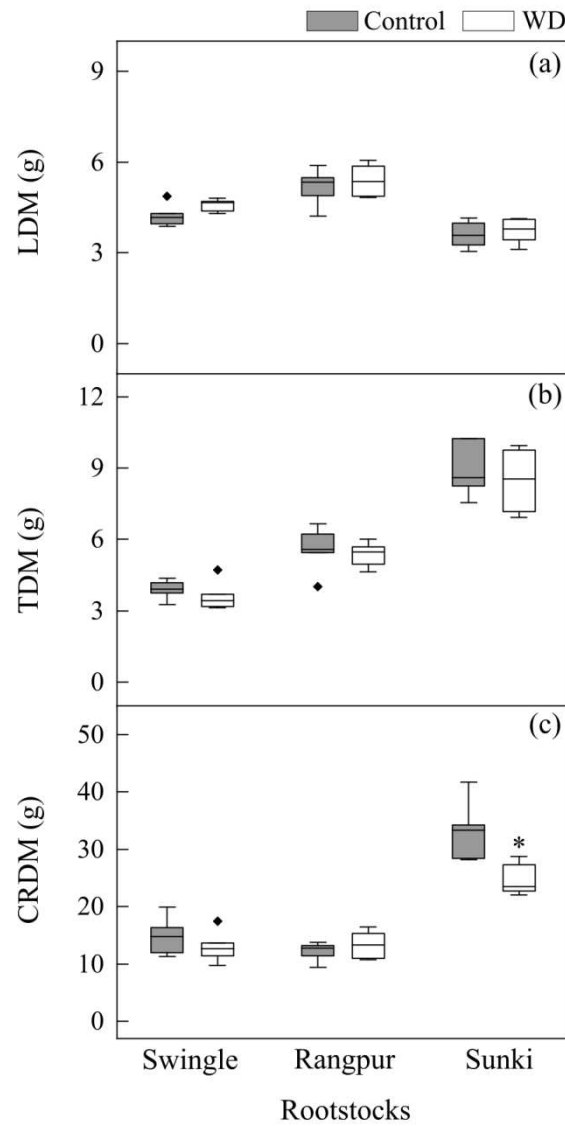


Figure S2. Leaf (LDM, a), trunk (TDM, b), and coarse root (CRDM, c) dry mass of Valencia orange plants grafted on Swingle citrumelo, Rangpur lime or Sunki mandarin maintained well-watered (Control) or under water deficit (WD). Measurements were taken 14 days after water withholding and boxplots consider the median, the 25th and 75th percentiles, the error bars indicate range within 1.5 IQR and ♦ indicates outliers ($n=6$). * indicates statistical difference between water regimes at $BF_{10} > 3$.

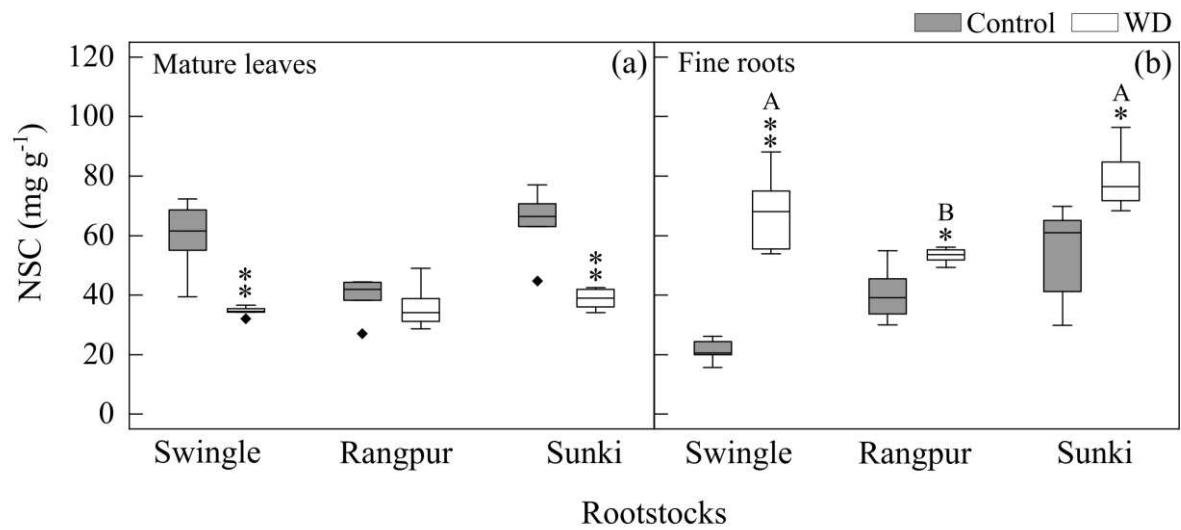


Figure S3. Non-structural carbohydrate (NSC) concentration in mature leaves (a) and fine roots (b) of Valencia orange plants grafted on Swingle citrumelo, Rangpur lime or Sunki mandarin maintained well-watered (Control) or under water deficit (WD). Measurements were taken 14 days after water withholding and boxplots consider the median, the 25th and 75th percentiles, the error bars indicate range within 1.5 IQR and ♦ indicates outliers ($n=6$). * and ** indicate statistical differences between water treatments at $BF_{10} > 3$ and > 20 , respectively. Capital letters indicate statistical differences among rootstocks under water deficit ($BF_{10} > 3$).

CAPÍTULO 2

Mapeamento metabólico da resistência à seca induzida por porta-enxertos de citros

Mapeamento metabólico da resistência à seca induzida por porta-enxertos de citros

Resumo

Desvendar os mecanismos fisiológicos que conferem tolerância à seca ao porta-enxerto limoeiro Cravo é uma estratégia eficaz para o desenvolvimento de novos porta-enxertos cítricos capazes de garantir aos pomares um bom desempenho em períodos de escassez de água e menor vulnerabilidade à disseminação de doenças. Este estudo combinou análises fisiológicas com a análise de perfil metabólico de raízes e folhas de plantas de laranjeira Valência enxertadas em citrumeleiro Swingle, limoeiro Cravo ou tangerineira Sunki, mantidas irrigadas ou submetidas ao deficit hídrico e reidratação, a fim de identificar particularidades do limoeiro Cravo. Diferente das demais espécies, o limoeiro Cravo respondeu à variação inicial da disponibilidade de água priorizando o crescimento radicular em detrimento da parte aérea. Nas raízes, o perfil metabólico exibiu down-regulation do metabolismo de nucleotídeos e das vias do chiquimato e aspartato, vinculado à up-regulation de arginina e citrulina, estimulando na parte aérea maior suprimento alternativo de energia e acúmulo de arginina. Em resposta à reidratação apresentou maior eficiência no uso do nitrogênio, acumulando em maior proporção compostos com maior razão N/C. Nossos resultados sugerem que esses ajustes metabólicos diferenciados podem estar envolvidos na resistência do limoeiro Cravo à seca, e representam dados relevantes para o direcionamento de novos estudos.

Palavras-chave: estresse abiótico, metabolômica, limoeiro Cravo, raiz, metabólitos primários.

Introdução

O gênero *Citrus* (*Citrus* spp.) inclui espécies arbóreas nativas de regiões tropicais e subtropicais da Ásia (Roose et al., 2015), mas o seu cultivo ocorre em diversos países, incluindo Brasil, China e Estados Unidos, e representa uma importante atividade econômica. Nesse cenário, o Brasil é o maior produtor de laranja (Iglesias et al., 2007; Foreign Agricultural Service/USDA, 2019). Como uma cultura perene, as árvores cítricas estão submetidas à variação sazonal da disponibilidade de água ao longo do seu ciclo de desenvolvimento (Ribeiro et al., 2006), o que torna essa cultura suscetível aos eventos de seca previstos pelo atual cenário de mudanças climáticas (IPCC, 2013).

Uma estratégia eficaz para lidar com períodos de escassez de água na citricultura é a escolha de um porta-enxerto resistente ao déficit hídrico. O limoeiro Cravo é uma das espécies de porta-enxerto mais utilizadas na citricultura brasileira porque apresenta diversas características de interesse agrônomo somada à capacidade de induzir bom desempenho fisiológico e produtivo sob déficit hídrico (Mourão Filho et al., 2007; Ribeiro et al., 2014). No entanto, cientes de que a baixa diversificação do uso de porta-enxertos torna os pomares cítricos vulneráveis a outros estresses bióticos e abióticos (Pompeu Júnior, 2005), existe grande interesse em investigar os mecanismos fisiológicos que conferem a este porta-enxerto a resistência à seca como um primeiro passo para o desenvolvimento de novos porta-enxertos igualmente resistentes.

Entre as características do limoeiro Cravo destacam-se a alta condutividade hidráulica (Medina & Machado, 1998), maior capacidade de redistribuição hidráulica (Miranda et al., 2018) e manutenção do crescimento radicular sob déficit hídrico (Magalhães Filho et al., 2008; Pedroso et al., 2014). Todavia, as bases morfo-fisiológicas que conferem a resistência à seca ao limoeiro Cravo ainda não foram totalmente compreendidas.

O déficit hídrico resulta da disponibilidade insuficiente de água no solo para atender à demanda de uma determinada planta em um determinado momento, resultando em uma mudança no status da água na planta (Tardieu et al., 2018). A redução da abertura estomática como primeira resposta para limitar a perda de água, consequentemente reduz a fotossíntese (Flexas et al., 2006) e afeta o crescimento à medida que ajustes fisiológicos são desencadeados para equilibrar a oferta e a demanda de energia no organismo vegetal (Smith & Stitt, 2007).

Considerando que a aclimação à seca envolve a reconfiguração de várias vias metabólicas (Shulaev et al., 2008), a identificação dessas vias seria uma forma de entender a suscetibilidade diferencial de plantas cítricas à seca (Llanes, 2018). Nesse contexto, a

metabolômica, análise exploratória que oferece uma visão abrangente de metabólitos que participam de diferentes eventos celulares, tem sido utilizada como ferramenta para avaliar as respostas das plantas aos estresses abióticos (Ghatak et al., 2017; Kumar et al., 2017).

Os metabolomas de espécies vegetais submetidas ao déficit hídrico geralmente apresentam acúmulo de metabólitos que atuam no ajustamento osmótico, na estabilidade de biomembranas e proteínas, e na eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas sob condições de estresse (Guo et al., 2018; Michaletti et al., 2018). Ativação da síntese de prolina e poliaminas, ativação das vias de catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) e ativação de vias de biossíntese de açúcares como a trealose e a rafinose, são respostas comuns (Mata et al., 2016).

O metaboloma de porta-enxertos de videiras sob déficit hídrico, espécie lenhosa e perene como os citros, apresentou aumento nos níveis de aminoácidos, açúcares e polióis, enquanto os ácidos orgânicos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) foram reduzidos, ou seja, as plantas responderam ao déficit hídrico através de ajuste osmótico, modulações do metabolismo de carbono e nitrogênio e alterações na funcionalidade mitocondrial (Prinsi et al., 2018).

Considerando o contexto apresentado, análises fisiológicas e a análise do perfil de metabólitos primários de raízes e folhas foram combinadas para identificar alterações metabólicas induzidas por porta-enxertos cítricos em resposta ao déficit hídrico e à reidratação. Além do limoeiro Cravo, foram avaliados o citrumeleiro Swingle e a tangerineira Sunki, porta-enxertos de resistência moderada à seca e também muito utilizados na citricultura brasileira (Girardi et al., 2017).

Como hipótese, o melhor desempenho do limoeiro Cravo sob déficit hídrico seria resultado de alterações metabólicas diferenciadas das demais espécies. A identificação de metabólitos relacionados ao déficit hídrico e a discriminação de vias metabólicas das quais estes metabólitos podem atuar, contribuiria para ampliar a compreensão dos mecanismos gerais desenvolvidos pelas plantas cítricas em resposta à seca. Ainda, a identificação de metabólitos que distinguem o limoeiro Cravo dos demais porta-enxertos poderia direcionar novos estudos com maior enfoque apenas nos metabólitos de interesse, o que posteriormente permitiria aplicar esse conhecimento no desenvolvimento de novas espécies cítricas resistentes à seca.

Material e métodos

Material vegetal

Este estudo foi realizado com plantas de laranjeira Valência [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] enxertadas em citrumeleiro Swingle [*Citrus paradisi* Macf x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], limoeiro Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) ou tangerineira Sunki (*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka), de aproximadamente 10 meses de idade, cultivadas em sacos plásticos (4,5 L) contendo substrato orgânico comercial de casca de pinus (Tropstrato V8 Citrus, Vida verde, Mogi Mirim SP, Brasil) e crescidas em casa de vegetação.

Estratégia experimental

Plantas similares (altura e área foliar) foram podadas e transferidas para uma câmara de crescimento (PGR15, Conviron, Winnipeg MB, Canada) com temperatura de 30/20°C (dia/noite), fotoperíodo de 12 horas (7h00 - 19h00), radiação fotossinteticamente ativa (Q) de 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e déficit de pressão de vapor do ar (DPV) mantido inferior a 2,0 kPa. As plantas foram aclimatadas por aproximadamente oito dias, quando houve o surgimento das brotações. Apenas três brotações foram mantidas em cada planta, dando prioridade para aquelas presentes no ápice do caule. Após a aclimação, as plantas foram agrupadas em dois lotes. Um lote permaneceu irrigado, mantendo-se a umidade do substrato próxima a 80% da capacidade máxima de armazenamento de água no substrato (CMA) durante todo o período experimental (Controle). O outro lote foi submetido à restrição hídrica controlada (DH), ou seja, a irrigação foi suspensa até o substrato alcançar aproximadamente 25% da CMA, a qual foi mantida até o momento da reidratação. Os valores de 25% e 80% da CMA foram obtidos pesando-se o conjunto substrato + planta. Primeiramente foi calculada a massa do substrato saturado com água (100% de CMA) e a massa do substrato seco para a determinação da quantidade de água retida. Considerando esses valores somados a massa média da planta, foi calculada a massa do conjunto substrato + planta referente a 25% e 80% da CMA. A umidade foi monitorada diariamente através da pesagem das plantas com uma balança eletrônica, seguida da reposição de água quando necessário. No início do experimento todas as mudas foram padronizadas, apresentando biomassa similar. De acordo com a disponibilidade de água no substrato das plantas sob déficit hídrico, o período experimental foi dividido em três fases. O período

experimental teve início quando todas as plantas estavam hidratadas, momento em que a irrigação das plantas foi suspensa. Após 18 dias o substrato das plantas sob déficit hídrico atingiu 25% da CMA, período correspondente à fase I caracterizada pela redução da disponibilidade de água. Essa condição hídrica (25% da CMA) foi mantida por mais 15 dias, período correspondente à fase II, caracterizada pelo déficit hídrico controlado. Após 33 dias sob déficit hídrico, as plantas foram reidratadas durante 6 dias, período correspondente à fase III, conforme esquema experimental apresentado na figura 1.

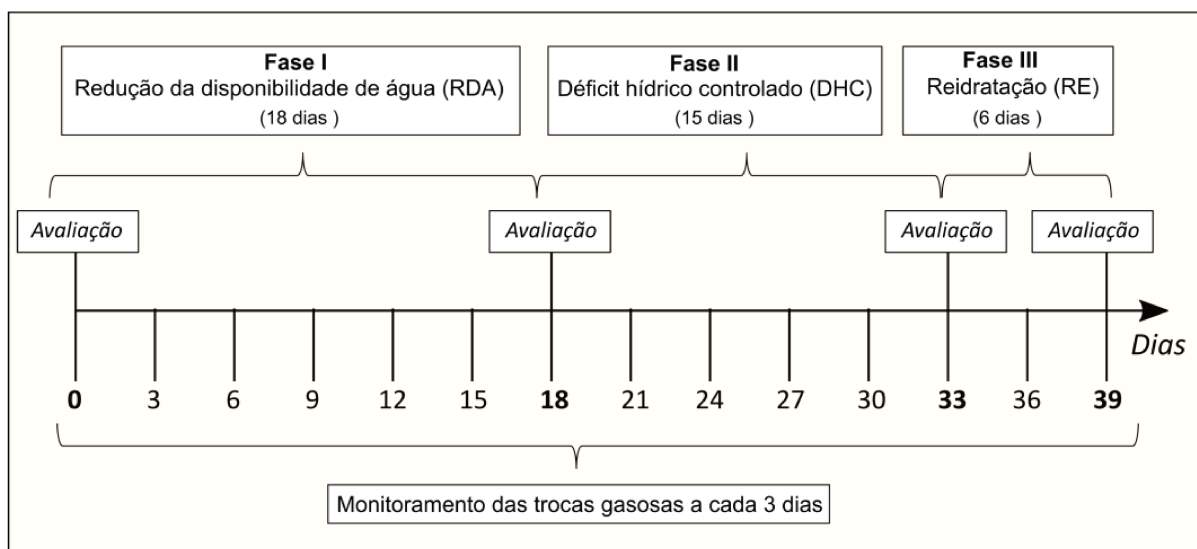


Figura1. Representação esquemática do período experimental destacando as diferentes condições impostas ao tratamento DH.

Trocas gasosas

As trocas gasosas foram mensuradas com um analisador de gases por radiação infravermelha (LI-6400F, LI-COR, Lincoln NE, USA), sob concentração de CO_2 do ar ambiente (aproximadamente $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e Q de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A assimilação de CO_2 (A), a condutância estomática (g_s) e a transpiração (E) foram mensuradas em folhas maduras e jovens (Figura 2). Inicialmente as medidas foram realizadas em folhas desenvolvidas antes da indução dos tratamentos (maduras), as quais apresentavam o limbo totalmente expandido e estavam posicionadas na base de uma brotação próxima ao ápice da planta. Após o desenvolvimento das brotações, essas medidas passaram a ser realizadas em folhas jovens e completamente expandidas presentes nas ramificações. Essas medidas foram realizadas a cada três dias entre 9h00 e 12h00 durante todo o período experimental, em cinco plantas de cada tratamento.

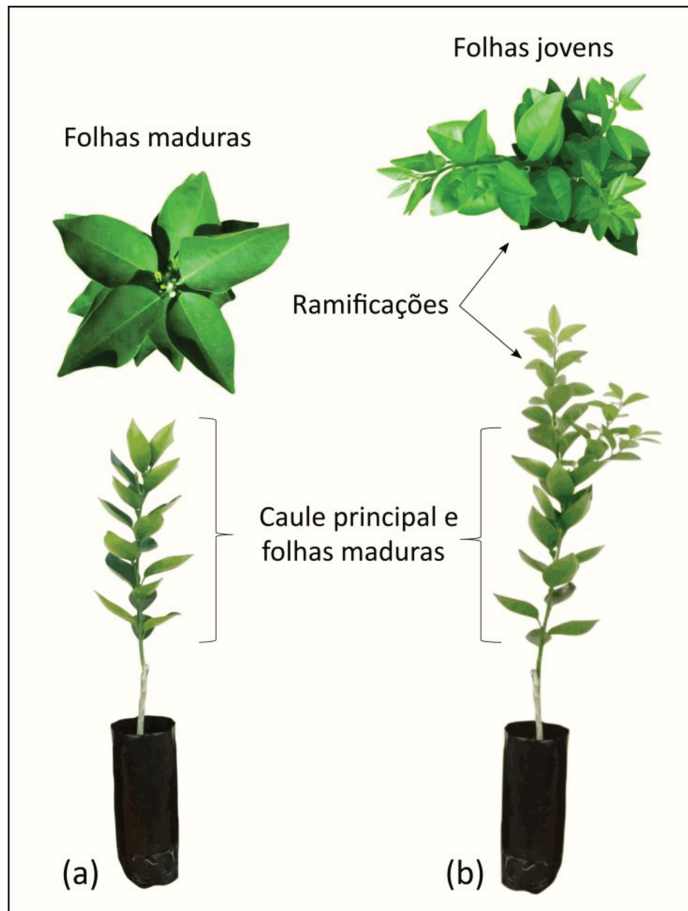


Figura 2. Aspecto geral das plantas. Aspecto das plantas no início (a), e no final do período experimental (b), destacando as folhas maduras e as folhas jovens desenvolvidas nas ramificações.

Potencial de água na folha

O potencial da água na folha foi medido com uma câmara de pressão (model 3005, Soilmoisture Equipment Corp., Santa Barbara CA, USA) em folhas semelhantes às aquelas utilizadas nas medidas de trocas gasosas. Essa medida foi realizada entre 11h00 e 12h00, após as medidas de trocas gasosas. O potencial da água foi mensurado no início do período experimental e ao término das três fases, em cinco plantas de cada tratamento.

Biometria

A parte aérea foi dividida em caule principal (caule e folhas maduras) e ramificações (ramos e folhas jovens). No caule principal foi mensurado o número de folhas, diâmetro do caule, altura, área foliar e massa seca. Nas ramificações foram mensurados o número de folhas, área foliar, comprimento dos ramos e massa seca. A massa seca das raízes também foi determinada após secagem em estufa com circulação forçada de ar. A área foliar

foi obtida com planímetro digital (LI-3000, LI-COR, Lincoln NE, USA). O material vegetal foi desidratado em estufa a 60°C até atingir o peso constante, em seguida, a massa seca foi obtida em balança eletrônica. Para a massa seca de raiz e massa seca de ramificações foi calculada a Taxa de Crescimento Relativo: $TCR = [(Ln_2 - Ln_1) / t_2 - t_1]$, onde Ln_2 e Ln_1 = logaritmo natural do valor final – logaritmo natural do valor inicial; $t_2 - t_1$ = número de dias (Beadle, 1993). As avaliações biométricas foram realizadas no início do período experimental e após as três fases, em três plantas de cada tratamento.

Concentração de amido

Amostras congeladas de raiz fina, folha madura e folha jovem foram moídas com nitrogênio líquido e liofilizadas. Para a determinação do amido utilizou-se 10 mg de amostra liofilizada, seguindo o método enzimático descrito por Amaral et al. (2007). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm e a concentração de amido foi determinada através de curva padrão. Essa análise foi realizada ao término de cada fase do período experimental, em quatro plantas de cada tratamento.

Extração de metabólitos polares

Amostras congeladas de folhas jovens, folhas maduras e raízes finas coletadas nas três fases do período experimental foram moídas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó homogêneo de finíssima granulometria. Os metabólitos foram extraídos a partir de 15 mg de folha e 30 mg de raiz. *Pools* representativos de cada material também foram preparados para atestar a estabilidade do equipamento ao longo da análise. A solução de extração dos metabólitos foi composta por methyl-tertiar-butyl-ether (MTBE):metanol:água, 3:1:1 (v/v/v), seguindo o protocolo descrito por Salem et al. (2016). Ao final da extração, uma alíquota de 150 µL da fase polar foi seca a vácuo a 4°C e armazenada a -80°C. A derivatização química ocorreu através da reação de metoximação, utilizando cloridrato de metoxiamina com adição de piridina, seguida pela reação de sililação com N-metil (trimetilsilil) trifluoroacetamina (MSTFA), como descrito por Lisec et al. (2006). Nesta etapa, treze FAMES (Fatty Acid Methyl Esters, C₈ – C₃₀) foram adicionadas em cada amostra e, amostras controles (brancos) também foram preparadas. O uso de FAMES por amostra possibilitou que o cálculo dos índices de retenção fosse realizado por amostra e não através de um marcador externo.

Análise em GC-TOF-MS

Uma alíquota de cada amostra (1 μL) foi analisada em high-throughput gas chromatography with time-of-flight mass spectrometer (GC-TOF-MS Pegasus HT-C, Leco, Saint Joseph, USA) equipado com Combi-PAL autosampler e Agilent 7890 gas chromatograph (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), com coluna de sílica fundida (DB35MS) de 30 m de comprimento x 0,32 mm de diâmetro interno x 0,25 μm de filme. Após a derivatização, as amostras randomizadas foram automaticamente injetadas (1 μL) em dois modos de injeção, *split e splitless*. A temperatura de injeção foi de 230 $^{\circ}\text{C}$, com fluxo de 2 mL min^{-1} de hélio, iniciando após 180 s. A temperatura inicial da coluna foi de 85 $^{\circ}\text{C}$, mantida por 2 minutos e aumentada 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até atingir 360 $^{\circ}\text{C}$, que foi mantida por 15 minutos. O efluente da coluna foi introduzido na fonte de íons (impacto de elétrons) do GC-TOFMS. A temperatura da fonte de íons foi de 250 $^{\circ}\text{C}$, feixe de elétrons 70 eV e 20 espectros s^{-1} sendo registrados na faixa de m/z 85-500.

Identificação de metabólitos e pré-processamento de dados

Os cromatogramas gerados foram exportados para o programa ChromaTOF-GC (v. 4.51.6.0, Leco) no qual foi realizado a correção da linha de base e a conversão dos dados para arquivo netCDF. Em seguida, as etapas de deconvolução, obtenção do índice de retenção, correção do tempo de retenção, alinhamento dos picos e identificação dos metabólitos foram realizadas com o auxílio do pacote *TargetSearch* (Cuadros-Inostroza et al., 2009; 2016) no ambiente R (<http://www.r-project.org>). Ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) adicionados na etapa de derivatização foram usados como índices para identificação de pico e, metabólitos foram identificados através de uma biblioteca *in-house*. A curadoria manual (usando a ferramenta de visualização de software ChromaTOF-GC) confirmou a identidade dos metabólitos com intensidades de ápice de pico baixas detectadas pelo TargetSearch.

Os metabólitos foram quantificados pela intensidade do pico de uma massa seletiva. A intensidade de cada metabólito foi normalizada pelo peso seco da amostra correspondente, pela contagem iônica total (TIC) de cada amostra e pela substituição global de *outliers*. Por fim, os valores obtidos para cada metabólito foram normalizados através da divisão de cada valor bruto pela mediana referente a todos os valores obtidos para este mesmo metabólito (relativização). O valor final corresponde à intensidade relativa de cada metabólito identificado.

Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado. Diferenças significativas foram calculadas por análise de variância unidirecional (ANOVA), e quando detectada diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Os *Heatmaps* foram construídos usando Log^2 Fold Change (DH / Controle) de intensidades médias relativizadas ($n=4$), através dos pacotes Complex heatmap (Gu, 2016) e Circlize (Gu, 2014) no ambiente R (<http://www.r-project.org>). Apenas os metabólitos que foram significativamente alterados com fold change maior ou igual a 0,5 foram apresentados na forma de *Heatmap*. A análise de componentes principais (PCA) foi construída utilizando o software online MetaboAnalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>).

Resultados

Potencial de água na folha e trocas gasosas

Durante o experimento, três fases foram definidas em termos de disponibilidade de água no substrato (Figura 1): fase de redução gradativa na disponibilidade de água para as plantas, com duração de 18 dias (Fase I, RDA); fase com déficit hídrico máximo e controlado, com duração de 15 dias (Fase II, DHC); e fase de reidratação do substrato, com duração de 6 dias (Fase III, RE). Como consequência da redução da disponibilidade de água no substrato (Figura 3a), as plantas apresentaram redução significativa no potencial de água na folha quando comparadas com as plantas irrigadas (Figura 3b, c, d), independente do porta-enxerto. Após a reidratação do substrato, o potencial de água na folha das plantas foi recuperado e as plantas previamente submetidas ao déficit hídrico apresentaram potencial de água na folha similar ao das plantas sempre irrigadas (Figura 3b, c, d).

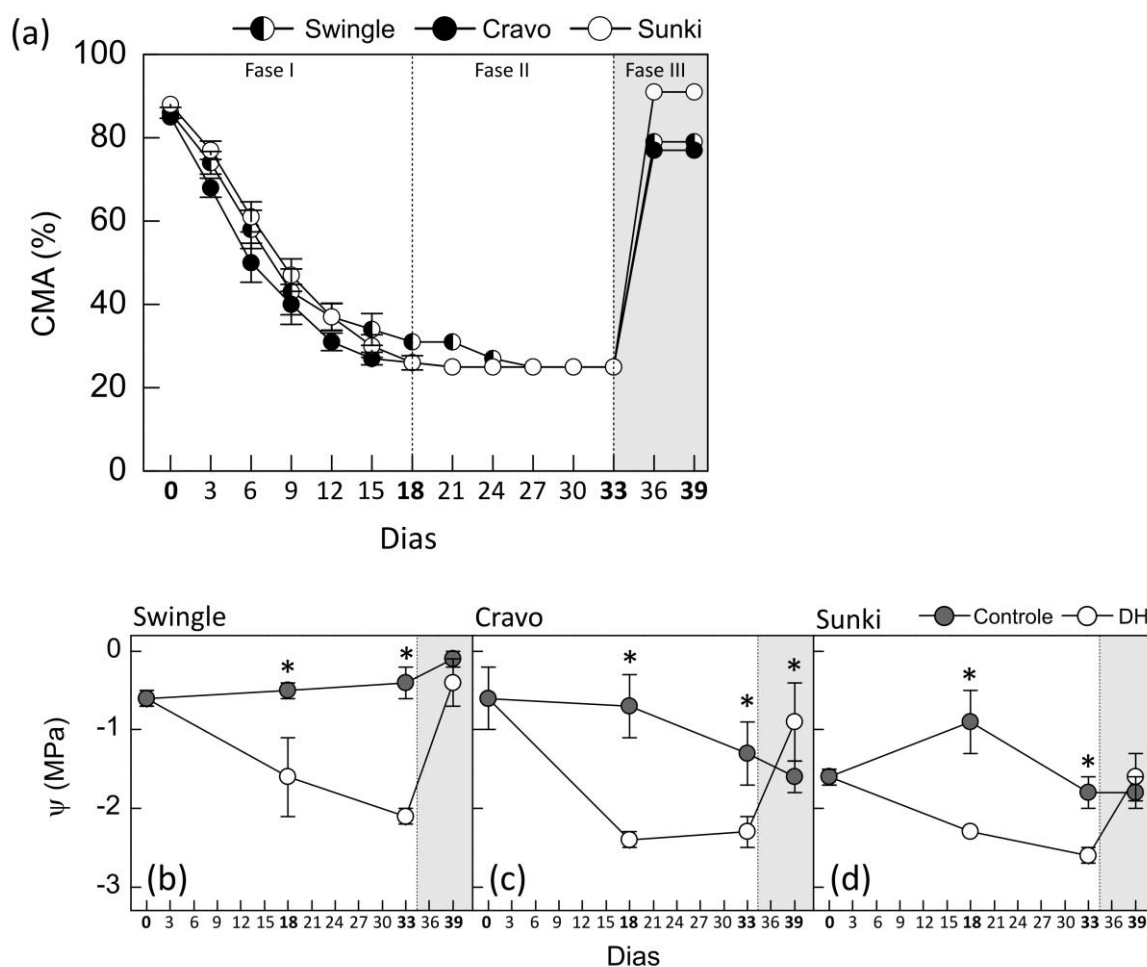


Figura 3. Variação porcentual da capacidade máxima de armazenamento de água no substrato (a) de plantas de laranjeira Valência enxertadas em citrumeleiro Swingle, limoeiro Cravo ou tangerineira Sunki sob déficit hídrico (DH), caracterizando as três fases do período experimental. Cada ponto representa o valor médio ($n = 3$) $\pm$ desvio padrão. Potencial de água na folha (b) de plantas de laranjeira Valência enxertadas em citrumeleiro Swingle, limoeiro Cravo ou tangerineira Sunki, mantidas irrigadas (Controle) ou sob déficit hídrico (DH). Cada ponto representa o valor médio ($n = 5$) $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatística entre os tratamentos hídricos ($p < 0,05$). O período entre 0 e 18 dias corresponde à fase I, entre 18 e 33 dias corresponde à fase II e entre 33 e 36 dias corresponde à fase III. A área sombreada representa os valores obtidos após a reidratação do substrato das plantas do tratamento DH.

Em resposta à suspensão da irrigação, houve redução gradativa da assimilação líquida de CO_2 (A), da condutância estomática (g_s) e da transpiração (E), independente do porta-enxerto (Figura 4). Nas plantas enxertadas em Cravo a redução significativa em A e g_s ocorreu seis dias após a suspensão da irrigação (Figura 4d, e), enquanto que, essa redução foi constatada após nove dias de suspensão da irrigação nas plantas enxertadas nos demais porta-enxertos (Figura 4a, b, g, h).

Em relação à E , as plantas enxertadas em Swingle e em Cravo apresentaram redução significativa após nove dias (Figura 4c), enquanto que as plantas enxertadas em Sunki apresentaram tal redução apenas após doze dias (Figura 4i). Após 6 dias de reidratação houve recuperação de todas as variáveis analisadas e as plantas previamente expostas ao déficit hídrico apresentaram trocas gasosas similares às das plantas irrigadas (Figura 4).

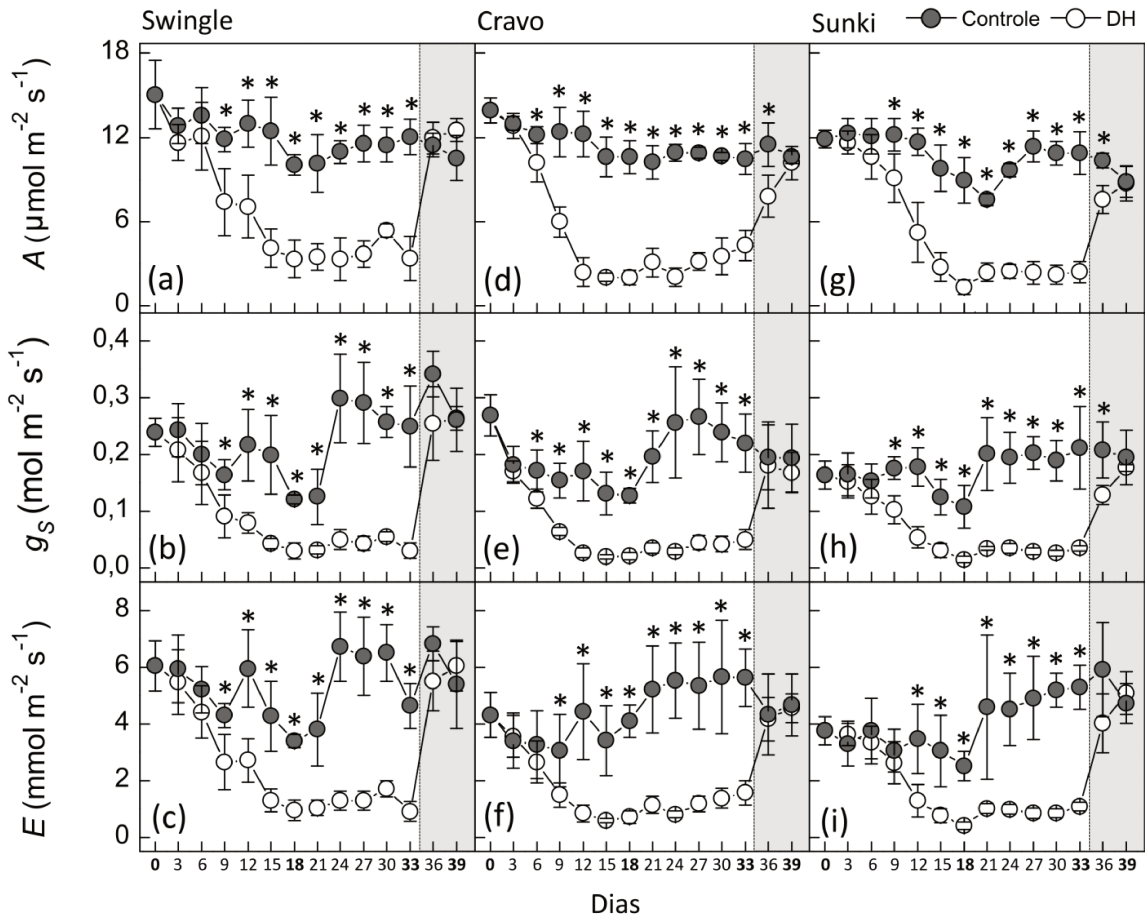


Figura 4. Assimilação líquida de CO₂ (A), condutância estomática (g_s) e transpiração (E) em folhas de plantas de laranja Valência enxertadas em citrumeleiro Swingle, limoeiro Cravo ou tangerineira Sunki, mantidas irrigadas (Controle) ou sob déficit hídrico (DH). Cada ponto representa o valor médio (n= 5) $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatística entre os tratamentos hídricos (p<0,05). A área sombreada representa os valores obtidos após a reidratação do substrato das plantas do tratamento DH. O período entre 0 e 18 dias corresponde à fase I, entre 18 e 33 dias corresponde à fase II e entre 33 e 36 dias corresponde à fase III.

Crescimento vegetativo

A parte aérea das plantas desenvolvida antes do início do período experimental (caule principal + folhas maduras) e a biomassa seca de raiz não apresentaram variação de massa devido à redução da disponibilidade de água, independente do porta-enxerto (Anexos 1 e 2). Assim, alterações na parte aérea devido à imposição do déficit hídrico puderam ser constatadas apenas nas ramificações desenvolvidas durante o período experimental (Figura 5). No período de redução gradativa da disponibilidade de água no substrato (Fase I, RDA), as plantas enxertadas em Swingle e sob déficit hídrico mantiveram o crescimento das ramificações de forma semelhante às plantas irrigadas, sem apresentar diferenças quanto ao número de folhas, comprimento dos ramos, área foliar e biomassa seca das ramificações. Durante o período de déficit hídrico controlado (Fase II, DHC), o padrão de crescimento das ramificações das plantas do sob Swingle foi significativamente menor em relação às plantas irrigadas para todas as variáveis analisadas (Figura 5a, b, c, d). Após seis dias de reidratação (Fase III, RE), não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto ao número de folhas e comprimento das ramificações das plantas enxertadas em Swingle (Figura 5a, c). Nas plantas enxertadas em Cravo, o padrão de crescimento das ramificações foi menor na Fase I (RDA), diferindo significativamente das plantas irrigadas em todas as variáveis analisadas. Nas fases II (DHC) e III (RE), a diferença entre os tratamentos foi mantida (Figura 5e, f, g, h). Já as plantas enxertadas em Sunki apresentaram menor número de folhas e comprimento dos ramos na fase I (RDA) de déficit hídrico, quando comparados às plantas irrigadas (Figura 5i, k). Porém, não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto à área foliar e à biomassa seca das ramificações (Figura 5j, l). Nas fases II (DHC) e III (RE), diferença entre os tratamentos foi notada para todas as variáveis avaliadas nas plantas enxertadas em Sunki (Figura 5i, j, k, l). Um resultado importante foi que apenas as plantas enxertadas em Cravo apresentaram crescimento durante a fase II (DHC), dado pelo aumento do número de folhas, da área foliar, do comprimento e da massa seca das ramificações (Figura 5e, f, g, h).

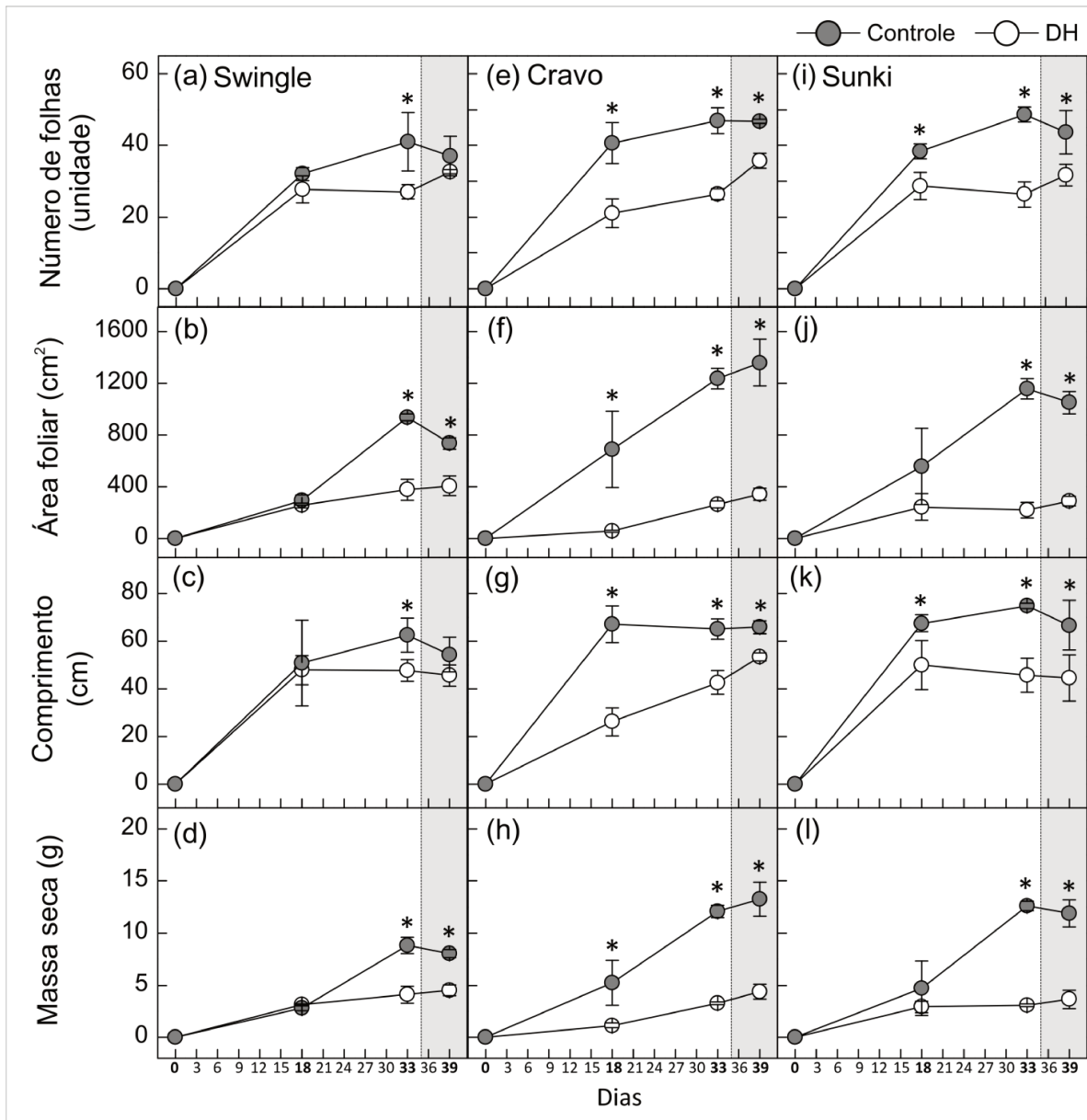


Figura 5. Biometria das ramificações desenvolvidas após a imposição dos tratamentos de plantas de laranja Valência enxertadas em citrumeleiro Swingle (a), limoeiro Cravo (b) ou tangerineira Sunki (c), mantidas irrigadas (Controle) ou sob déficit hídrico (DH). Cada ponto representa o valor médio ($n=3$) $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatística entre os tratamentos hídricos ($p<0,05$). A área sombreada representa os valores obtidos após a reidratação do substrato das plantas do tratamento DH. O período entre 0 e 18 dias corresponde à fase I, entre 18 e 33 dias corresponde à fase II e entre 33 e 36 dias corresponde à fase III.

As taxas de crescimento relativo (TCR) nas fases I e II revelaram que os porta-enxertos diferiram quanto ao investimento de biomassa em raiz e em ramificações (Figura 6). Na fase I, de redução da disponibilidade de água (RDA), tanto o investimento em biomassa de raiz, como em biomassa das ramificações foi semelhante entre os tratamentos nas plantas enxertadas em Swingle e em Sunki (Figura 6a, b). No entanto, as plantas sob déficit hídrico e enxertadas em Cravo apresentaram maior investimento em biomassa de raiz (Figura 6b) e

menor investimento em biomassa de ramificações (Figura 6a) do que as plantas irrigadas durante a fase I de déficit hídrico. Já na fase II (DHC), as plantas enxertadas em Swingle apresentaram uma redução significativa no investimento em biomassa de ramificações e no investimento em biomassa de raiz sob seca (Figura 6c, d). Nas plantas enxertadas em Cravo, o investimento em biomassa de ramificações aumentou na fase II em relação à fase I, porém não houve diferença estatística entre plantas bem hidratadas e as submetidas ao déficit hídrico (Figura 6c, d). Na fase II (DHC), as plantas sob Cravo reduziram significativamente o investimento em biomassa de raiz sob baixa disponibilidade hídrica (Figura 6c, d). As plantas enxertadas em Sunki e sob déficit hídrico aumentaram o crescimento das raízes em relação às plantas irrigadas na fase II (Figura 6d) e houve uma redução significativa no crescimento das ramificações (Figura 6c).

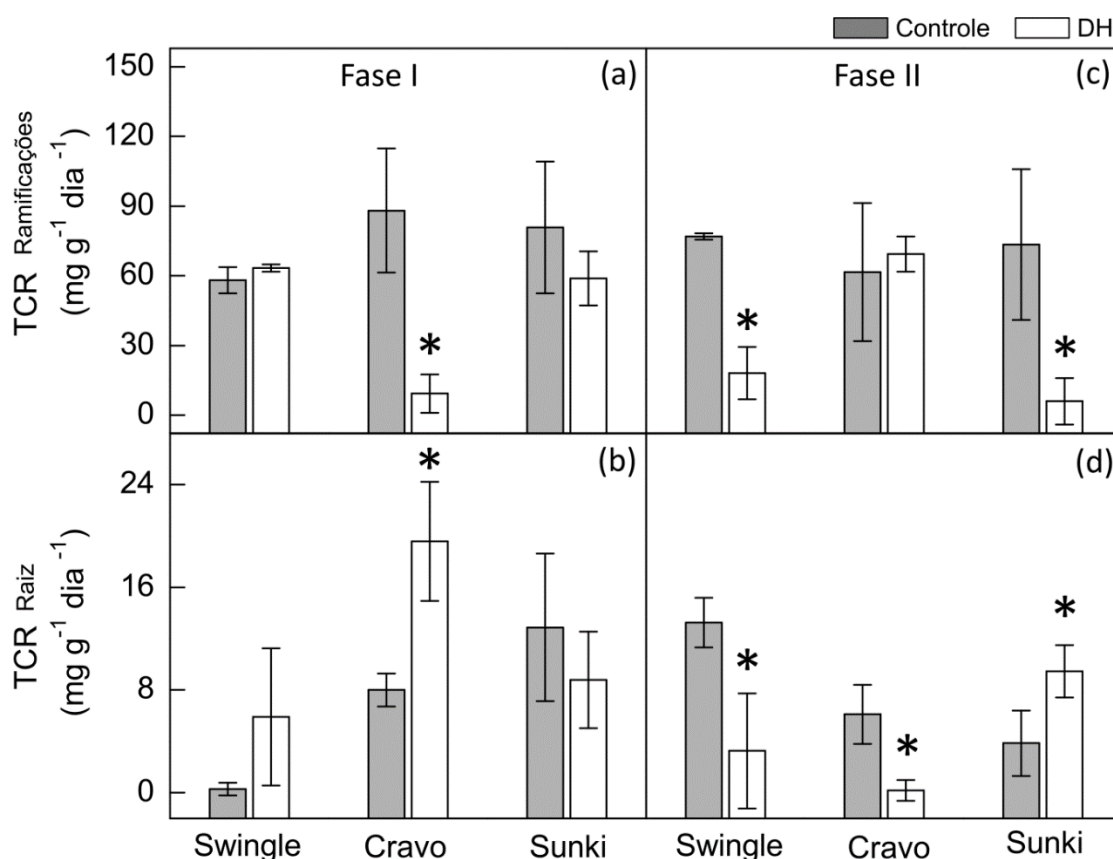


Figura 6. Taxa de crescimento relativo de biomassa seca das ramificações (ramo + folhas jovens) e biomassa seca de raiz na fase I (a) e na fase II (b), de plantas de laranja Valência enxertadas em citrumeleiro Swingle, limoeiro Cravo ou tangerineira Sunki, mantidas irrigadas (Controle) ou sob déficit hídrico (DH). Cada histograma representa o valor médio ($n = 3$) $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatística entre os tratamentos hídricos ($p < 0,05$).

Alterações na concentração de amido em raízes e folhas

A concentração de amido nas raízes foi alterada somente na fase I (RDA), período em que houve acúmulo de amido nas plantas sob déficit hídrico enxertadas em Cravo e redução do teor de amido nas plantas enxertadas em Sunki (Figura 7c, f, i). Em folhas maduras, não houve armazenamento de amido na fase I, independente da espécie ou da condição hídrica. Na fase II (DHC), houve redução do teor de amido em folhas maduras de todas as plantas sob seca. Essa diferença entre os tratamentos foi mantida na fase III (RE), nas plantas sob déficit hídrico enxertadas em Swingle e em Sunki (Figura 7b, e, h). Em folhas jovens, as plantas sob déficit hídrico apresentaram redução do teor de amido nas fases II e III de déficit hídrico, independente do porta-enxerto (Figura 7a, d, g).

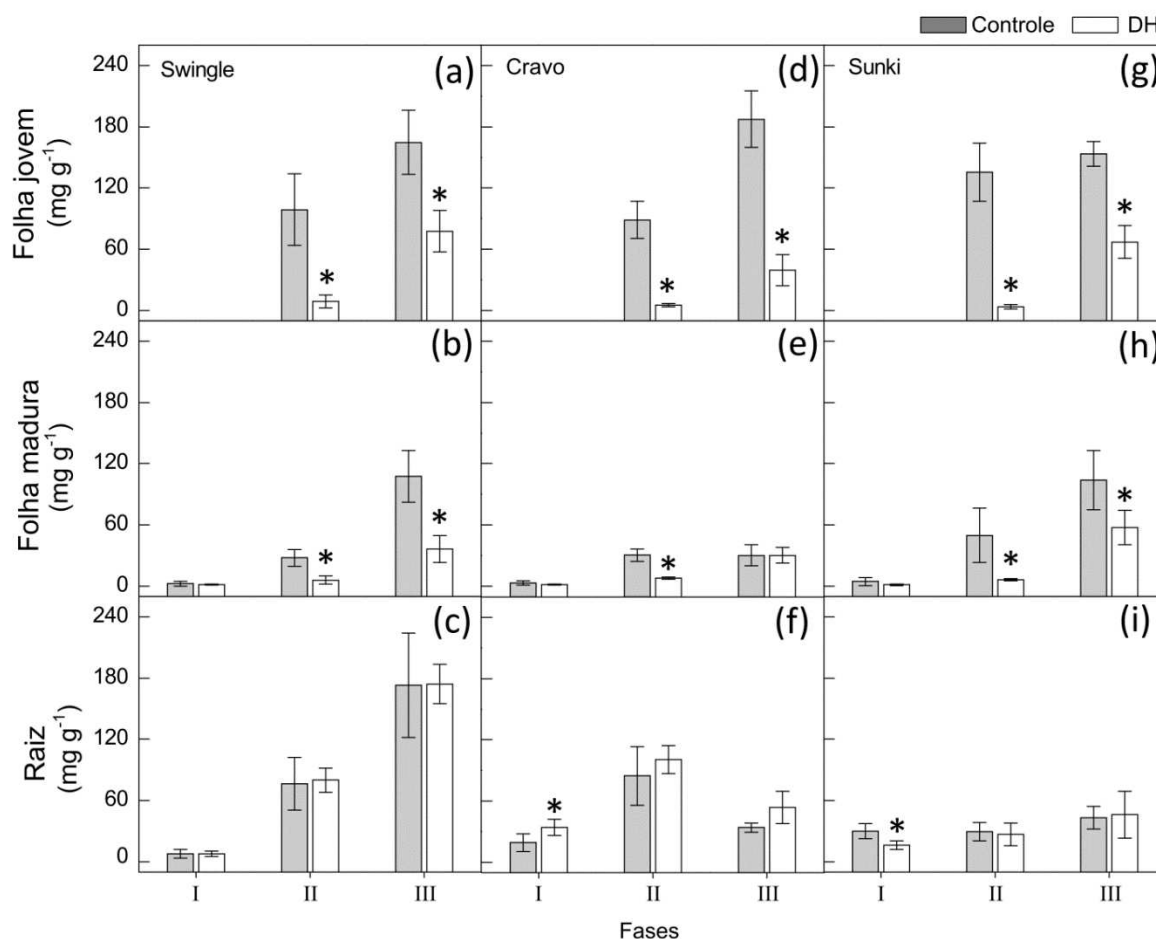


Figura 7. Teor de amido em folha jovem, folha madura e raiz fina de plantas de laranja Valência enxertadas em citrumeleiro Swingle, limoeiro Cravo ou tangerineira Sunki mantidas irrigadas (Controle) ou sob déficit hídrico (DH) nas três fases do período experimental. Histogramas representam médias ($n=4$) $\pm$ desvio padrão. Asteriscos indicam diferença estatística entre os tratamentos hídricos ($p < 0,05$).

Alterações metabólicas em raízes sob déficit hídrico

Um total de 54 metabólitos foi identificado nas raízes, incluindo, em sua maioria, aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares. Após 18 dias de suspensão da irrigação, final da fase I, 63% dos metabólitos identificados foram alterados em Cravo, enquanto Sunki e Swingle apresentaram alterações em 35% e 39%, respectivamente (Figura 8a). Em todos os porta-enxertos ocorreu acúmulo de prolina e de açúcares como glicose, frutose, trealose e maltose, com redução nos níveis de lactato (Figura 9a).

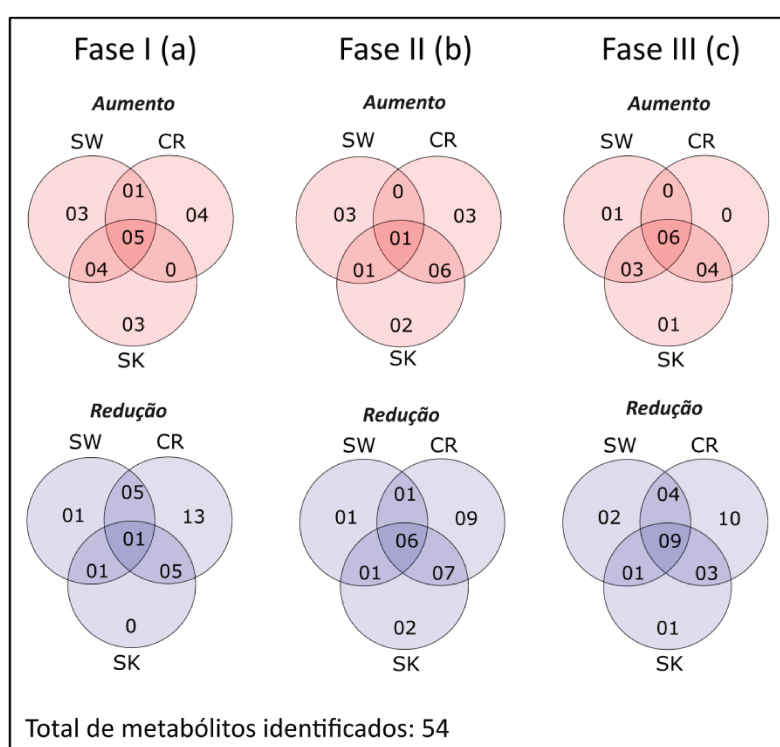


Figura 8. Diagramas de Venn indicando o número de metabólitos que aumentaram (vermelho) ou diminuíram (azul) em resposta ao déficit hídrico em tecido radicular de plantas de laranja Valência enxertadas em citrumeleiro Swingle (SW), limoeiro Cravo (CR) ou tangerineira Sunki (SK) sob déficit hídrico (DH) nas fases I, II e III.

As raízes do Cravo apresentaram acúmulo de arginina, citrulina, aminoácidos vinculados ao aspartato (asparagina e treonina) e hidroxiprolina. Porém, 71% dos metabólitos alterados apresentaram níveis reduzidos em resposta ao déficit hídrico. Houve redução em intermediários da glicólise (glicose-3P e piruvato) e derivados do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) como glutamato e aspartato, e metionina (via do aspartato). Os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) como a leucina, valina e isoleucina também apresentaram níveis reduzidos, assim como alguns integrantes da via do chiquimato, incluindo aminoácidos aromáticos (triptofano e fenilalanina) e fenilpropanóides (4-hidroxibenzoato, benzoato, ferulato, e ácido *p*-cumárico). Também houve redução do teor de açúcares, polióis e ácidos de

açúcar, integrantes do metabolismo de nucleotídeos (ácido maleico, nicotinato, uracila e adenina) e de ácido malônico e riboflavina (Figura 9a). Nas raízes de Sunki ocorreu acúmulo de xilose e eritrose e dos aminoácidos histidina, glutamina, beta-alanina, tirosina (aminoácido aromático) e putrescina (poliamina). Houve redução nos níveis de citrato (TCA), glutamato, rafinose, galactarato e ácido *p*-cumárico (fenilpropanóide) e metionina (Figura 9a). Assim como em Sunki, as raízes de Swingle apresentaram acúmulo de eritrose, histidina, glutamina, putrescine, sacarose, mio-inositol e uracila na fase I de déficit hídrico, com redução dos níveis de piruvato e intermediários do TCA, BCAAs e fenilalanina (Figura 9a).

Após o período de déficit hídrico controlado (Fase II), as raízes de Cravo mantiveram a maior porcentagem de alterações em resposta ao déficit hídrico (57%), enquanto Sunki apresentou alterações em 48% dos metabólitos identificados e Swingle apresentou alterações em 26% (Figura 8b). O acúmulo dos açúcares, glicose e frutose tornou-se menos evidente na fase II quando comparado à fase I. Em todos os porta-enxertos o acúmulo de prolina foi mantido, acompanhado de reduções em intermediários da glicólise, TCA e BCAAs, glicerol e riboflavina (Figura 9b).

As raízes de Cravo mantiveram o acúmulo em trealose, maltose, glicose, hidroxiprolina e asparagina, assim como de histidina, GABA e glicina. A uracila, reduzida na fase I, foi acumulada na fase II de déficit hídrico. Os fenilpropanóides e adenina permaneceram reduzidos nas raízes de Cravo na fase II de déficit hídrico, assim como alguns açúcares, polióis, metionina e ácido maleico (Figura 9b). Em Sunki, o acúmulo de prolina, trealose, maltose, eritrose, glutamina, histidina, asparagina, hidroxiprolina, triptofano e GABA também foram mantidos na fase II. Nessa fase, houve redução nos níveis de glutamato, alguns açúcares, polióis, ácidos de açúcar, ácido treonico e metionina também foram reduzidos em raízes de Sunki sob déficit hídrico (Figura 9b). Em Swingle, o acúmulo de glicose, frutose, trealose e maltose deixou de ser significativo na fase II de déficit hídrico. O acúmulo de putrescina foi mantido, acompanhado do acúmulo de intermediários do ácido chiquímico (triptofano e tirosina) e beta-alanina em raízes de Swingle. Houve redução nos níveis de ácido treonico e ácido malônico em Swingle sob déficit hídrico (Figura 9b).

De modo geral, houve acúmulo de açúcares e aminoácidos, com forte regulação de processos catabólicos como glicólise e ciclo TCA em resposta ao déficit hídrico. O acúmulo de açúcares em Sunki atingiu altos valores em relação às demais espécies, o que ficou mais evidente na fase I. Considerando o conjunto de alterações metabólicas durante todo o período de déficit hídrico (Fases I e II), foi possível identificar alterações diferenciadas entre Cravo e

às demais espécies, envolvendo principalmente a via do chiquimato, via do aspartato, metabolismo de nucleotídeos, acúmulo de arginina e citrulina (Figura 9b).

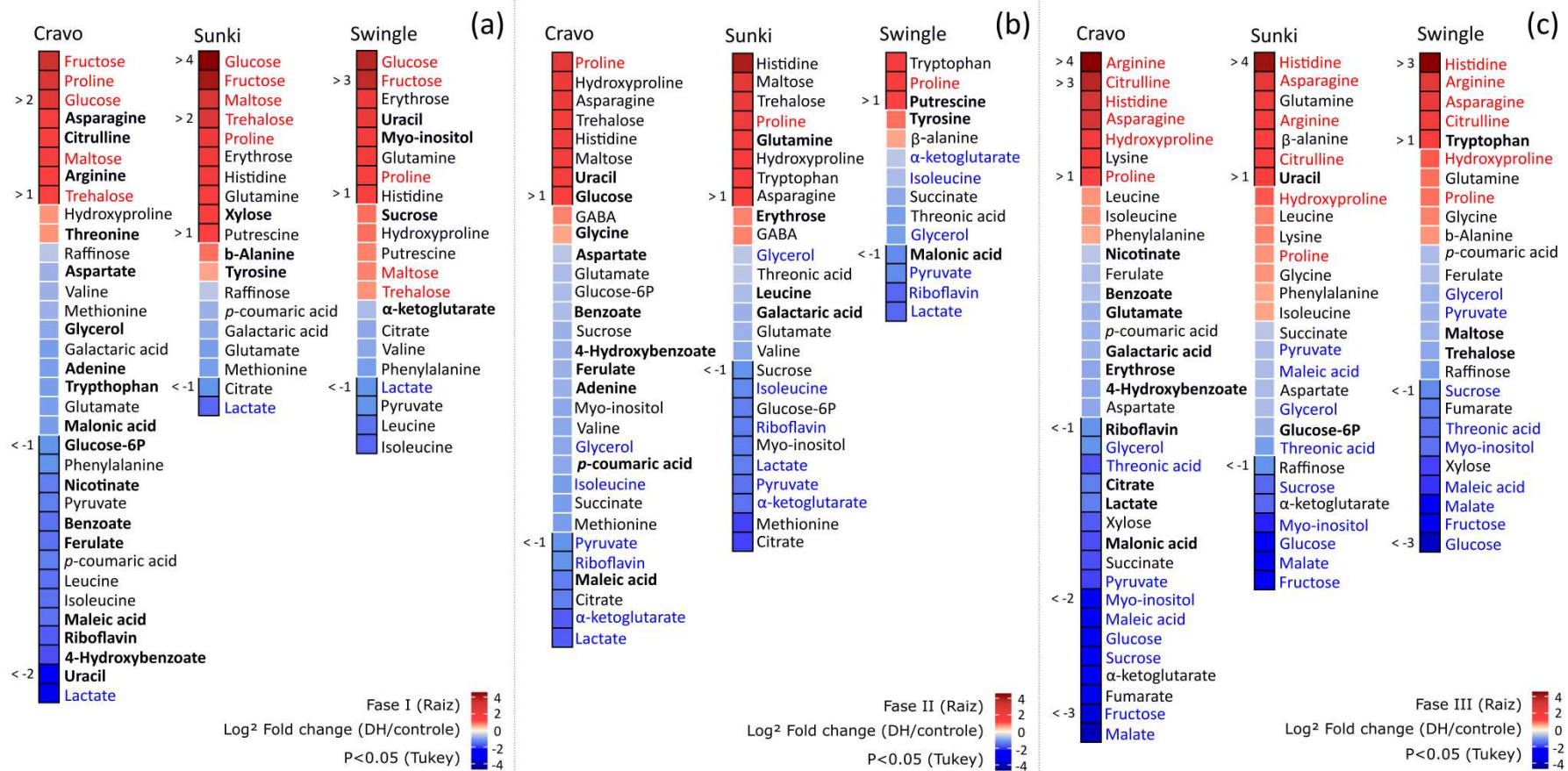


Figura 9. Heatmaps de intensidades médias relativizadas (n=4) de metabólitos identificados em tecido radicular de plantas de laranja Valência enxertadas em citrumeleiro Swingle, limoeiro Cravo ou tangerineira Sunki mantidas hidratadas (Controle) ou sob déficit hídrico (DH) nas fases I(a), II (b) e III (c). Todos os metabólitos apresentados nos heatmaps apresentaram alterações significativas e fold change ≥ 0.5 . Os metabólitos em negrito indicam alteração exclusiva da espécie e metabólitos em vermelho ou azul indicam alteração comum a todas as espécies.

Na análise multivariada referente à fase I, as duas primeiras componentes principais explicaram 66% da variância total. A PC1 separou as amostras de acordo com a condição hídrica e houve maior discriminação das amostras de Sunki sob déficit hídrico, a qual foi associada ao maior acúmulo de açúcares, principalmente de glicose (>4 fold) (Figura 10a). Na PC2, o agrupamento das amostras do Cravo sob déficit hídrico ocorreu devido ao acúmulo de citrulina e arginina, o que não ocorreu nos demais porta-enxertos. Na PCA referente à fase II, as duas primeiras componentes principais explicaram 59% da variância total. A PC1 apresentou maior discriminação das amostras de Swingle sob déficit hídrico em relação às demais, principalmente devido ao acúmulo de histidina, glicose e putrescina, porém houve acúmulo significativo apenas de putrescina. Nesta fase a distinção entre os tratamentos ficou menos evidente para os demais porta-enxertos (Figura 10b).

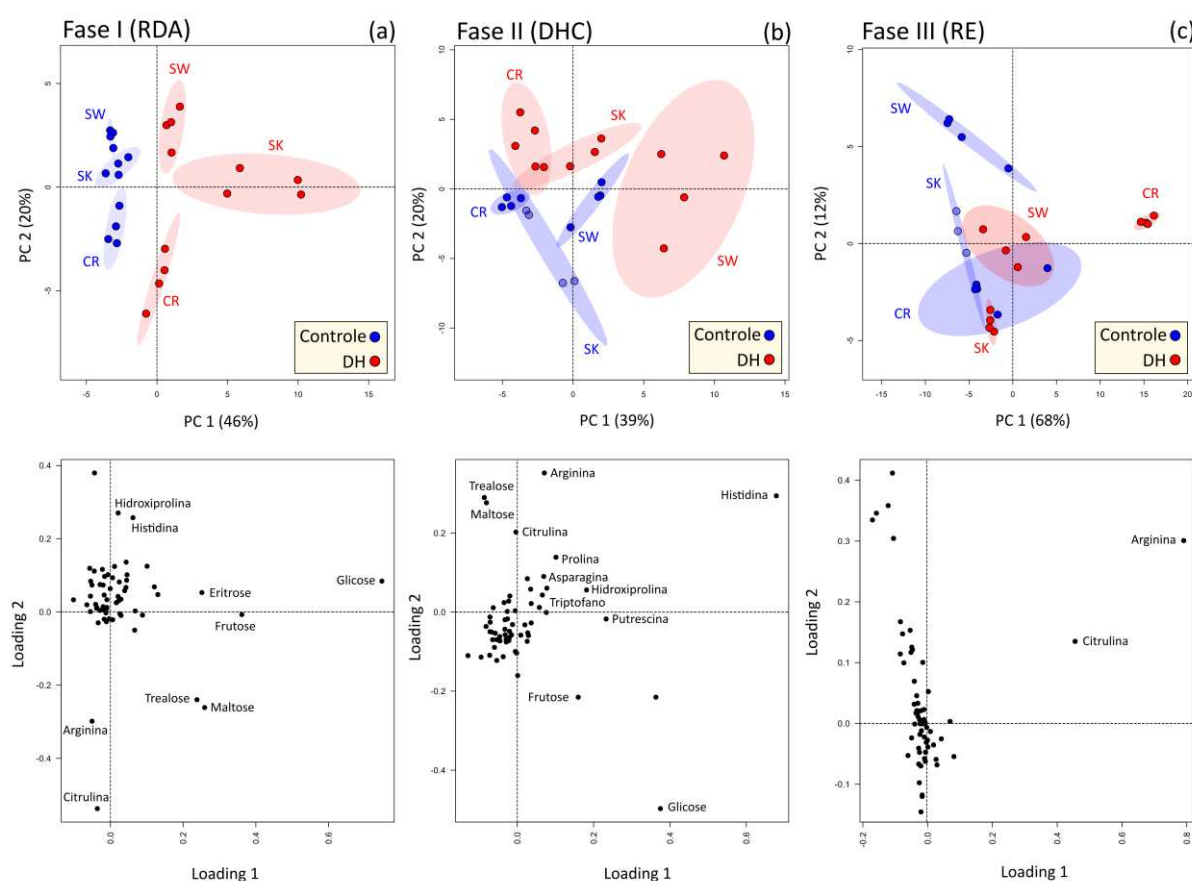


Figura 10. PCA (score plot e loading plot) de intensidades médias relativizadas (n=4) de metabólitos identificados em tecido radicular de plantas de laranja Valência enxertadas em citrumeleiro Swingle, limoeiro Cravo ou tangerineira Sunki mantidas hidratadas (Controle) ou sob déficit hídrico (DH) nas fases I, II e III. Elipses de confiança a 95%.

Alterações metabólicas em raízes em resposta à reidratação

O perfil metabólico radicular das plantas que passaram por déficit hídrico permaneceu alterado em relação às plantas irrigadas dos três porta-enxertos (Figura 9c). Em todos os porta-enxertos foi mantido o acúmulo de prolina, hidroxiprolina, histidina, asparagina, arginina e citrulina. Ao mesmo tempo, houve redução dos teores de polióis (glicerol e mio-inositol), açúcares (glicose, frutose e sacarose), piruvato, malato, ácido treonico e ácido maleico nas plantas que passaram por déficit hídrico (Figura 9c).

Em Cravo, o acúmulo de arginina (>4 fold) e citrulina (>3 fold) após a reidratação ocorreu em maior proporção em relação aos demais metabólitos. Também houve acúmulo de lisina, leucina, isoleucina e fenilalanina em raízes de Cravo. Além dos açúcares, a maioria dos metabólitos reduzidos em resposta ao déficit hídrico permaneceu reduzida após a reidratação (Figura 9c). Em Sunki, a histidina foi o metabólito acumulado em maior proporção (>3 fold) após a reidratação, somado ao acúmulo de glutamina, beta-alanina e uracila. Em menor proporção ocorreu o acúmulo de BCAAs, fenilalanina, lisina e glicina nas raízes de Sunki na fase III. Somados aos metabólitos já mencionados, também foram reduzidos intermediários do TCA (Figura 9c). Assim como em Sunki, a histidina foi o metabólito acumulado em maior proporção (>4 fold) nas raízes de Swingle, com acúmulo também de triptofano e, em menor proporção, de glicina, beta-alanina e glutamina. Os níveis de mio-inositol, acumulados em resposta ao déficit hídrico, foram reduzidos nas raízes de Swingle reidratadas, enquanto os níveis de BCAAs foram similares aos das plantas irrigadas. Além dos metabólitos já citados, também foram reduzidos os níveis de outros açúcares, fumarato (TCA) e fenilpropanóides (Figura 9c).

De modo geral, os açúcares acumulados em resposta ao déficit hídrico foram reduzidos na reidratação ou deixaram de ser acumulados, enquanto os BCAAs reduzidos em resposta ao déficit hídrico foram acumulados ou não apresentaram alterações. Porém, os principais aminoácidos acumulados durante o déficit hídrico mantiveram o mesmo nível de acúmulo ou apresentaram maior acúmulo após a reidratação, enquanto os metabólitos reduzidos em resposta ao déficit hídrico, em sua maioria, permaneceram reduzidos mesmo após a reidratação (Figura 9c).

Na PCA referente à fase III, as duas primeiras componentes principais explicaram 80% da variância total (Figura 10c). A PC1 apresentou maior discriminação das amostras de plantas enxertadas em Cravo e previamente submetidas ao déficit hídrico. A maior discriminação dessas amostras sugere que a resposta metabólica das raízes do Cravo à

reidratação diferiu das demais espécies, principalmente devido ao maior acúmulo de arginina e citrulina. Para as outras espécies nenhuma distinção clara entre os tratamentos foi observada apenas com base na alteração do perfil do metaboloma (Figura 10c).

Alterações metabólicas em folhas em resposta ao déficit hídrico

Devido ao crescimento das brotações ao longo do experimento e ao auto-sombreamento das folhas, apenas folhas completamente expandidas e expostas à luz foram avaliadas quanto às trocas gasosas e ao perfil metabólico. Assim, folhas maduras são aquelas avaliadas até o término da fase I (18 dias de déficit hídrico) e folhas jovens desenvolvidas durante o período experimental foram avaliadas nas fases II e III.

Um total de 45 metabólitos foi identificado em folhas, incluindo, em sua maioria, aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares. Após 18 dias de suspensão da irrigação, as folhas maduras de plantas enxertadas em Sunki apresentaram maior porcentagem de metabólitos alterados (40%), enquanto as plantas enxertadas em Cravo e Swingle apresentaram 36% e 16%, respectivamente (Figura 11a). Houve aumento nos níveis de aminoácidos (prolina, hidroxiprolina e glicina) e alfa-cetoglutarato como uma resposta comum ao déficit hídrico (Figura 12a).

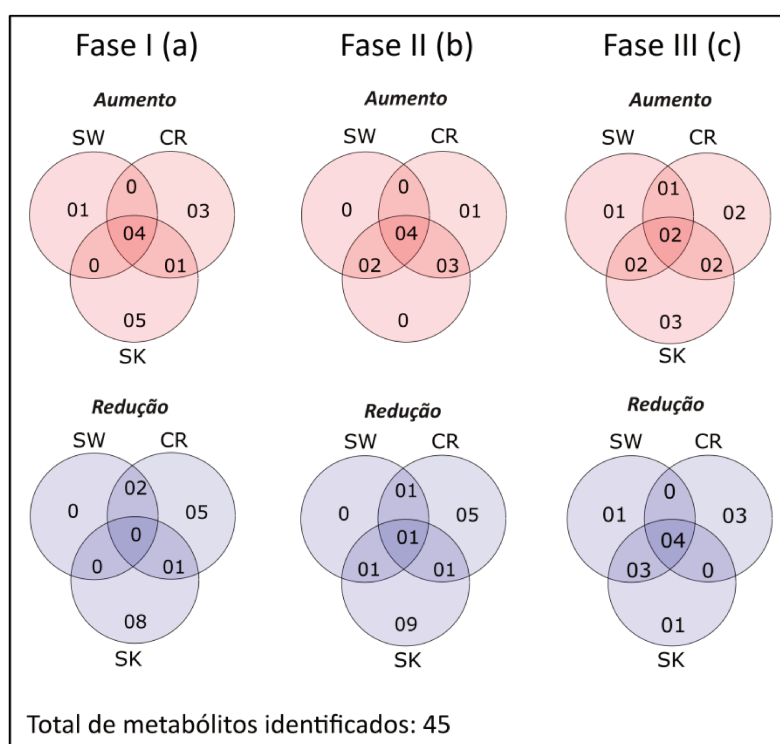


Figura 11. Diagramas de Venn indicando o número de metabólitos que aumentaram (vermelho) ou diminuíram (azul) em resposta ao déficit hídrico em tecido foliar de plantas de laranja Valência enxertadas em citrumeleiro Swingle (SW), limoeiro Cravo (CR) ou tangerineira Sunki (SK) sob déficit hídrico (DH) nas fases I, II e III.

Em folhas maduras de plantas enxertadas em Sunki e submetidas ao déficit hídrico, outros intermediários do TCA também foram acumulados, além de açúcares, triptofano e ácido maleico, enquanto que reduções foram notadas nos níveis de glutamato, ácido piroglutâmico, fenilpropanóides, galactarato, ácido isocítrico e adenina (Figura 12a). Em folhas maduras de plantas em Cravo, intermediários do TCA, GABA e arginina foram acumulados sob déficit hídrico. O acúmulo desses metabólitos foi acompanhado por reduções nos níveis de leucina, valina, lisina, metionina, fenilalanina, lactato, quinato e riboflavina (Figura 12a). Já em folhas maduras de plantas enxertadas em Swingle também ocorreu o acúmulo de rafinose e redução dos níveis de leucina e valina (Figura 12a).

Ao término da fase II de déficit hídrico, as folhas jovens de plantas enxertadas em Sunki apresentaram a maior porcentagem de metabólitos alterados (47%), enquanto as plantas enxertadas em Cravo e Swingle apresentaram 36% e 20%, respectivamente (Figura 11b). Os metabolomas revelaram aumento nos níveis de aminoácidos (prolina, hidroxiprolina e asparagina) e rafinose, acompanhado pela redução nos níveis de ácido treonico, como resposta comum ao déficit hídrico, independente do porta-enxerto (Figura 12b). Em folhas de plantas enxertadas em Sunki houve o acúmulo de fenilpropanóides e glicina, e redução nos níveis de açúcares, mio-inositol, BCAAs, metionina, triptofano, piruvato, succinato, GABA e adenina sob déficit hídrico (Figura 12b). Em folhas de plantas enxertadas em Cravo ocorreu acúmulo de fenilpropanóides e isoleucina (BCAA), e reduções nos níveis de sacarose, glutamina, glutamato e intermediários do TCA sob seca (Figura 12b). Acúmulo de ácido caféico e glicina, e redução nos níveis de metionina e malato foram encontrados em folhas jovens de plantas enxertadas em Swingle e submetidas ao déficit hídrico (Figura 12b).

As respostas metabólicas diferiram entre folhas madura e jovem, principalmente em relação às alterações no TCA. Enquanto os intermediários do TCA foram acumulados em folha madura, os mesmos foram reduzidos em folha jovem sob déficit hídrico (Figura 12a, b). As plantas enxertadas em Swingle foram aquelas que apresentaram menor número de metabólitos alterados sob déficit hídrico, independente da idade da folha. As folhas de plantas enxertadas em Cravo diferiram das demais espécies quanto à resposta ao déficit hídrico devido ao acúmulo de arginina, succinato e GABA e redução em fenilalanina em folhas maduras, e isoleucina em folhas jovens.

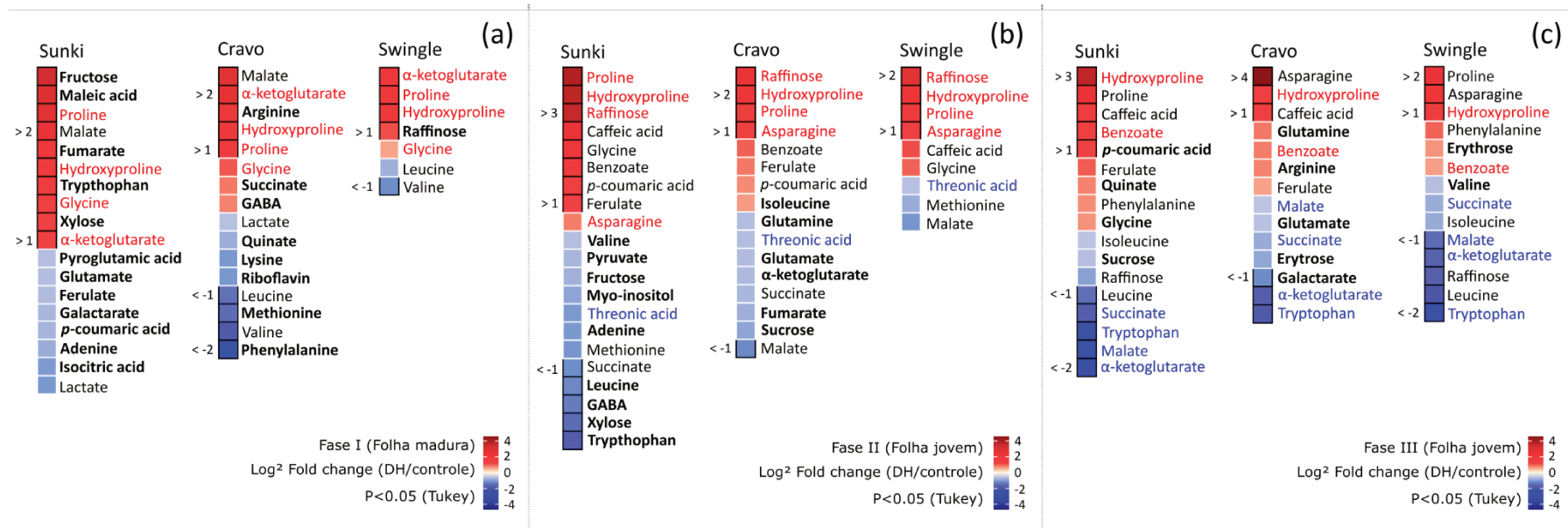


Figura 12. Heatmaps de intensidades médias relativizadas (n=4) de metabólitos identificados em tecido foliar de plantas de laranjeira Valência enxertadas em citrumeleiro Swingle, limoeiro Cravo ou tangerineira Sunki mantidas hidratadas (Controle) ou sob déficit hídrico (DH) na fases I (a), II (b) e III (c). Todos os metabólitos apresentados nos heatmaps apresentaram alterações significativas e fold change ≥ 0.5 . Os metabólitos em negrito indicam alteração exclusiva da espécie e metabólitos em vermelho ou azul indicam alteração comum a todas as espécies.

Na PCA referente à fase I, as duas primeiras componentes principais explicaram 63% da variância total (Figura 13a). Na PC1 houve maior discriminação das amostras das plantas enxertadas em Sunki sob déficit hídrico, o que ocorreu devido ao maior número de metabólitos acumulados à seca. A PC2 agrupou as amostras de Cravo sob déficit hídrico devido ao acúmulo de arginina. Na PCA referente à fase II, as duas primeiras componentes principais explicaram 72% da variância total (Figura 13b). Novamente ocorreu maior discriminação das plantas enxertadas em Sunki sob déficit hídrico pela PC1, motivada pelo maior acúmulo de prolina e rafinose. As amostras de Swingle não apresentaram uma distinção clara entre os tratamentos em ambas as fases (Figura 13a, b).

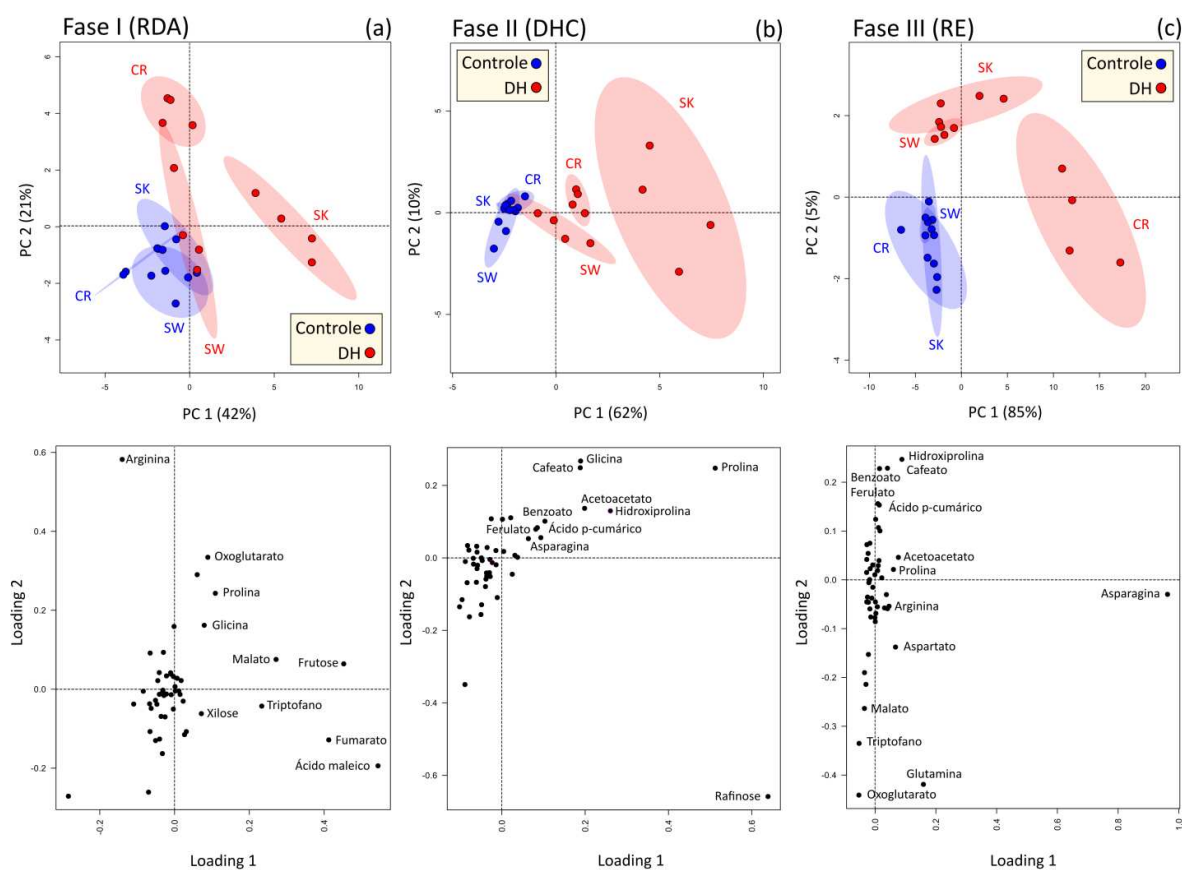


Figura 13. PCA (score plot e loading plot) de intensidades médias relativizadas (n=4) de metabólitos identificados em tecido foliar de plantas de laranjeira Valência enxertadas em citrumeleiro Swingle, limoeiro Cravo ou tangerineira Sunki mantidas hidratadas (Controle) ou sob déficit hídrico (DH) nas fases I, II e III. Elipses a 95% de confiança.

Alterações metabólicas em folhas em resposta à reidratação

Após seis dias de reidratação, fase III, o perfil metabólico das folhas jovens permaneceu alterado, independente do porta-enxerto (Figura 12c). Em resposta à reidratação, os níveis de rafinose foram reduzidos ou o composto deixou de ser acumulado, enquanto a maioria dos metabólitos acumulados em resposta ao déficit hídrico permaneceu acumulada mesmo após a reidratação. Independente do porta-enxerto, ocorreu o acúmulo de hidroxiprolina e benzoato, e redução de intermediários do TCA (Succinato e malato) e triptofano na fase de reidratação (Figura 12c).

Em folhas jovens de plantas enxertadas em Sunki foi mantido o acúmulo de prolina, fenilpropanóides, glicina, fenilalanina e quinato, com redução nos níveis de BCAAs (leucina e isoleucina) e sacarose na fase III (Figura 12c). Em folhas jovens de plantas enxertadas em Cravo ocorreu aumento no acúmulo de asparagina (>4 fold) e o acúmulo de fenilpropanóides foi mantido e somado ao acúmulo de glutamina e arginina após a reidratação. Já os níveis de glutamato, eritrose e galactarato em folhas de plantas enxertadas em Cravo que passaram por seca foram reduzidos na fase III (Figura 12c). Em folhas de plantas enxertadas em Swingle, o acúmulo em prolina e asparagina foi mantido e somado à de fenilalanina e eritrose, com redução nos níveis de BCAAs (Valina, leucina e isoleucina) na fase de reidratação (Figura 12c).

Na PCA referente à fase III, as duas primeiras componentes principais explicaram 90% da variância total (Figura 13c). Os agrupamentos de amostras coletadas de plantas irrigadas e submetidas ao déficit hídrico e reidratação indicaram divergência metabólica mesmo após a reidratação. Na PC1, com 85% da variância explicada, houve maior discriminação das amostras das plantas enxertadas em Cravo submetidas ao déficit hídrico seguido de reidratação, o que ocorreu devido ao maior acúmulo de asparagina. A PC2 discriminou as amostras reidratadas de Swingle e Sunki (Figura 13c).

Discussão

Comparando o desempenho das espécies de porta-enxerto, as plantas enxertadas em Cravo foram capazes de promover ajustes fisiológicos em resposta à variação inicial na disponibilidade de água no substrato, reduzindo a condutância estomática e interrompendo o desenvolvimento das ramificações antecipadamente em relação às demais espécies (Figuras 4e, 5e-h). Ao mesmo tempo, o crescimento radicular do Cravo foi favorecido durante o período de

suspensão da irrigação (Figura 6b). Em outras palavras, uma pequena variação na disponibilidade de água no substrato foi suficiente para induzir o fechamento estomático e gerar estímulos que culminaram na alteração da alocação de fotoassimilados priorizando o crescimento do sistema radicular nas plantas enxertadas em Cravo. O maior investimento e acúmulo de carboidratos em raízes e a habilidade para coordenar a relação fonte e dreno em períodos desfavoráveis já foi constatado indiretamente em limoeiro Cravo (Ribeiro & Machado, 2007; Magalhães Filho et al., 2008; Bueno et al., 2012; Pedroso et al., 2014). Área foliar reduzida e aumento da biomassa seca de raiz são respostas de aclimação apresentadas pelas plantas cítricas para limitar a perda de água através da transpiração e melhorar a absorção de água sob condições de déficit hídrico (García-Sánchez et al., 2007). Porém, foi a sensibilidade do sistema radicular de Cravo ao início do secamento do substrato que o diferenciou dos demais porta-enxertos. De fato, tem sido mostrado que o fechamento estomático está mais relacionado com a desidratação do solo, do que com o status hídrico da parte aérea da planta (Wilkinson & Davies, 2010; Chaves et al., 2003; Farooq et al., 2009). Desse modo, a estratégia do limoeiro Cravo parece ser de antecipar as respostas morfo-fisiológicas antes de uma redução mais drástica na disponibilidade de água, uma vez que, o crescimento da raiz e o desenvolvimento de raízes mais finas dependem de uma pressão de turgor suficiente para permitir o alongamento da parede celulósica (Hsiao & Xu, 2000; Sharp et al., 2004). O aumento de raízes finas pode não acrescentar muito no ganho em biomassa radicular, mas aumenta a superfície de absorção de água e o alcance de regiões mais úmidas do solo. Em seguida, durante o período de manutenção de baixa disponibilidade hídrica (Fase II, DHC) o crescimento da parte aérea sob Cravo foi retomado e permaneceu similar ao das plantas controle, sugerindo a aclimação da planta à nova condição hídrica (Figura 6c). Nas demais espécies o crescimento, tanto de raiz como de parte aérea, menos afetado na fase I, apresenta maior comprometimento na fase II (Figura 6).

Alterações metabólicas associadas ao ajustamento osmótico, metabolismo respiratório e estado redox sob déficit hídrico

De modo geral, o déficit hídrico induziu ajustes no metabolismo de carboidratos, de aminoácidos e ácidos orgânicos, indicando ajustes osmótico, energético e redox durante a aclimação à baixa disponibilidade hídrica. A recuperação do equilíbrio osmótico ocorre através do acúmulo de solutos que apresentam baixo peso molecular, alta solubilidade e compatibilidade com o metabolismo celular mesmo em altas concentrações, um processo

conhecido como ajustamento osmótico. O acúmulo desses solutos reduz o potencial osmótico celular e minimiza a perda de água, o que consequentemente promove o adiamento da desidratação e a preservação do turgor celular (Sanders and Arndt, 2012; Slama et al., 2015). Alguns dos solutos acumulados também favorecem a proteção e a estabilização de proteínas e auxilia na eliminação de espécies reativas de oxigênio (Chen & Jiang, 2010; Guo et al., 2018). A maioria dos metabólitos acumulados nos tecidos das plantas cítricas em resposta ao déficit hídrico atua no ajuste osmótico, tais como açúcares, polióis e aminoácidos (Figuras 9a, b, 12a, b).

Em relação aos aminoácidos, o acúmulo de prolina foi uma resposta comum tanto em raízes como em folhas das plantas sob déficit hídrico, independente do porta-enxerto. O acúmulo de prolina tem sido uma das principais respostas metabólicas ao déficit hídrico (Szabados & Savoure, 2010) e uma de suas principais características é a extrema solubilidade (LeRudulier et al., 1984). A prolina, conhecida pela sua contribuição no ajustamento osmótico, também fornece tamponamento redox e armazenamento ou transferência de energia e poder redutor (Szabados & Savoure, 2010; Per et al., 2017). Essas funções não estão relacionadas apenas ao acúmulo de prolina na célula, mas sim à dinâmica do seu metabolismo, promovendo a liberação ou utilização de energia e poder redutor no lugar e no momento adequado para atender às necessidades da planta (Sharma et al., 2011). A hidroxiprolina, derivada do metabolismo da prolina, também foi acumulada em raízes e folhas, independente do porta-enxerto. Como componentes das extensinas, a hidroxiprolina pode proporcionar resistência mecânica contra o estresse de parede celular causado pela seca, estabilizando a parede celular (Sugiyama et al., 2014).

O acúmulo de aminoácidos fornece precursores para a síntese de proteínas e metabólitos secundários, além da sua função osmoprotetora (Rai, 2002). Esse acúmulo é comum em plantas sob estresses abióticos, mas o fator que promove esse acúmulo pode diferir entre os tipos de aminoácidos (Batista-Silva et al., 2018). O acúmulo de asparagina em raiz e folha (Figuras 9a, b, 12a, b) representa uma resposta direta ao déficit hídrico quando atua na manutenção osmótica, ou pode ser uma consequência da restrição da síntese proteica sob estresse (Lea et al., 2007). A asparagina é um aminoácido que possui alta razão N/C e por esse motivo representa uma das principais formas de armazenamento e transporte de nitrogênio orgânico no organismo vegetal (Lea et al., 2007; Winter et al., 2015). Sobre a histidina, acumulada apenas em raízes (Figura 9a, b), existem poucas informações disponíveis, mas o que pode ser ressaltado é o alto gasto energético exigido para a sua biossíntese. A glicina, acumulada principalmente em folha (Figura 12a), é precursora da síntese de glutatona, a qual

desempenha um papel crítico na defesa antioxidante (Hasanuzzaman et al., 2017). As poliaminas, como a putrescina acumulada apenas em raízes de Swingle e Sunki (Figura 9a, b), atuam na estabilização de membranas através da eliminação de espécies reativas de oxigênio e produção de metabólitos antioxidantes (Minocha et al., 2014). O acúmulo de beta-alanina também ocorreu apenas nesses porta-enxertos, podendo ser um produto da oxidação de poliaminas ou catabolismo de BCAAs, ambos induzidos por estresses abióticos (Parthasarathy et al., 2019). Nas raízes de Cravo e Sunki na fase II houve o acúmulo de GABA (Figura 9b), o qual é amplamente e rapidamente produzido em resposta aos estresses abióticos e bióticos. Esse metabólito pode atuar na regulação do pH citosólico, no fluxo de carbono para o TCA e no metabolismo de nitrogênio, sendo uma proteção contra o estresse oxidativo e auxiliando na osmorregulação e sinalização (Bouché & Fromm, 2004).

O acúmulo de açúcares também ocorreu em resposta ao déficit hídrico, principalmente no início do déficit hídrico (Fase I). Em raízes, houve acúmulo de glicose, frutose, maltose e trealose (Figura 9a), enquanto em folhas prevaleceu o acúmulo de rafinose (Figura 12b). Os açúcares, além de atuarem no ajustamento osmótico, também atuam como moléculas sinalizadoras ativando a expressão de genes relacionados ao estresse e à manutenção do metabolismo energético (Roitsch, 1999; Rolland et al., 2006; Rosa et al., 2009; Smeekens et al., 2010). Os açúcares alimentam a via oxidativa da pentose fosfato, criando poder redutor (NADPH) para a produção de glutatona (GSH), contribuindo para a eliminação de espécies reativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio (Couée et al., 2006; Bolouri-Moghaddam et al., 2010). No entanto, a relação entre a estrutura do açúcar e a capacidade de eliminação de radicais hidroxila foi constatada *in vitro* (Peshev et al., 2013), indicando que os açúcares, especialmente aqueles que interagem com membranas, também podem atuar como sequestradores de espécies reativas de oxigênio (Van den Ende & Valluru, 2009; Keunen et al., 2013). O acúmulo de maltose sugere a degradação de amido (Thalmann & Santelia, 2017), no entanto, apenas nas raízes de plantas enxertadas em Sunki sob déficit hídrico houve menor teor de amido em relação às plantas irrigadas (Figura 7i). A trealose é um dissacarídeo osmoprotetor que possui a capacidade de estabilizar membranas e proteínas desidratadas de forma eficiente (Luo et al., 2010) e, em altas concentrações, evita a fusão da membrana mantendo o espaço entre as moléculas fosfolipídicas sob desidratação, o que proporciona propriedades físicas que se assemelham às do estado hidratado (Golovina et al., 2009). A rafinose, um oligossacarídeo, é um soluto compatível e antioxidante, mas o seu acúmulo também pode operar como um mecanismo de reserva temporária de carbono para substituir as reservas de amido (Gilbert et al. 1997; ElSayed et al., 2013). De fato, o acúmulo de rafinose ocorreu em folhas jovens, nas

quais o armazenamento de amido foi praticamente nulo (Figura 7a, d, g). Os póliois, como o mio-inositol acumulado apenas nas raízes do Swinge (Figura 9a), atuam no ajuste osmótico, na estabilização de macromoléculas e na eliminação de espécies reativas de oxigênio (Williamson et al., 2002; Conde et al., 2015).

Sob condições de déficit hídrico, a restrição no crescimento da parte aérea, ao menos inicialmente, promove um aumento do fornecimento de fotoassimilados para as raízes, o que resulta no acúmulo de açúcares nesse tecido, como foi constatado pela análise de perfil de metabólitos (Figura 9a). O acúmulo de açúcares, principalmente em raízes e folhas jovens foi acompanhado por redução nos níveis de ácidos orgânicos intermediários do TCA (Figura 9a,b). Os ácidos orgânicos representam formas transitórias ou armazenadas de carbono, os quais são formados dentro dos ciclos e vias metabólicas (Igamberdiev & Eprintsev, 2016). A estabilidade de um ciclo metabólico depende do acúmulo desses intermediários transitórios e seus derivados, os quais garantem a manutenção do ciclo quando o intermediário principal não é fornecido com eficiência, o que resulta na operação incompleta do ciclo. Modificações na operação dos ciclos metabólicos podem ocorrer a fim de modificar sua função em resposta às alterações ambientais, podendo ocasionar o acúmulo de ácidos orgânicos (Igamberdiev & Eprintsev, 2016). O ciclo do ácido cítrico (TCA) está envolvido com a oxidação de substratos respiratórios para síntese de ATP e fornecimento de esqueletos de carbono, o que pode ser influenciado pela demanda metabólica e fisiológica das células (Sweetlove et al., 2010). O ácido orgânico alfa-cetoglutarato, um intermediário do TCA, atua no fornecimento tanto de NADP como de esqueletos de carbono para a assimilação de nitrogênio inorgânico via biossíntese de glutamato (Araújo et al., 2014). Assim, modificações nos níveis de alfa-cetoglutarato alteram a regulação entre a atividade do TCA e o metabolismo de nitrogênio (Ferne et al., 2004) e mudanças no fluxo respiratório induzidas pelo déficit hídrico afetariam o fornecimento de substrato ou a demanda por ATP (Atkin & Macherel, 2009). A redução na assimilação líquida de CO₂ e o acúmulo de açúcares atuando principalmente como osmoprotetores sugere que a redução no fornecimento de carboidratos alterou o fluxo respiratório, o qual foi ajustado diante da nova condição hídrica. Nessa condição de baixa disponibilidade de carboidratos, metabólitos como os BCAAs, lisina e fenilalanina podem ser degradados e utilizados no TCA, como fonte alternativa de carbono (Taylor et al., 2004; Caldana et al., 2011). O consumo de substratos alternativos parece estar ocorrendo nas espécies avaliadas, uma vez que, em resposta ao déficit hídrico esses metabólitos foram, na maioria das vezes, reduzidos. Em raízes de porta-enxertos de videira sob déficit hídrico também foi constatado redução nos intermediários do TCA, o que foi associado à inibição desse ciclo (Prinsi et al., 2018). Tanto em raiz como em folha jovem, o

déficit hídrico parece inibir o TCA. Porém, intermediários do TCA, principalmente o alfa-cetoglutarato, foram acumulados nas folhas maduras durante a fase I do déficit hídrico (Figura 12a). Esse resultado sugere que o ajuste no metabolismo respiratório em resposta ao déficit hídrico pode diferir de acordo com o estágio de desenvolvimento do tecido, uma vez que, diferente das raízes e folhas jovens, o crescimento e a expansão foliar já haviam cessado em folhas maduras. O acúmulo em intermediários do TCA pode estar relacionado tanto com o metabolismo energético como também pode ser resultado de alterações nas vias biossintéticas associadas ao TCA, como o metabolismo de aminoácidos.

Os ácidos orgânicos do grupo fenilpropanóides, foram identificados tanto em raízes como em folhas (Figuras 9a, b, 12a, b). Em resposta ao déficit hídrico, esses metabólitos, quando alterados, foram reduzidos nas raízes e acumulados em folhas. Alterações no conteúdo de fenilpropanóides estão associadas à ação antioxidante e mudanças na composição e rigidez da parede celular, uma vez que estes compostos fenólicos são precursores de lignina ou podem estar diretamente ligados à parede celular (Hura et al., 2012; Arbona et al., 2013; Boba et al., 2017). Tanto a maior deposição de lignina como o aumento do conteúdo de fenólicos ligados à parede celular influenciam as propriedades mecânicas da parede, tornando-as menos elásticas e mais compactas. Esta alteração minimiza a perda de água, mas ao mesmo tempo dificulta o afrouxamento da parede, o que impede o alongamento celular e dificulta o crescimento (Wang et al., 2016). Ou seja, nas raízes a redução nos níveis de fenilpropanóides pode estar relacionada com o favorecimento do afrouxamento da parede celular, o que favorece o crescimento. Nas folhas jovens (Fase II) esses compostos foram acumulados (Figura 12b), o que foi mais significativo em plantas enxertadas em Sunki e em Cravo. Ao contrário do que ocorreu nas raízes, esse acúmulo pode estar associado à inibição da expansão foliar. O acúmulo de compostos fenólicos em folhas também aumenta o caráter hidrofóbico da parede celular reduzindo a transpiração cuticular e, além disso, podem atuar como fotoprotetores do aparelho fotossintético (Hura et al., 2012).

A redução nos níveis de lactato nas raízes de plantas sob déficit hídrico em relação às plantas controle não necessariamente representa uma resposta das plantas ao déficit hídrico. Esta redução é provavelmente resultado do aumento nos níveis de lactato nas plantas hidratadas devido ao excesso de água em algumas regiões radiculares causando hipóxia, condição de baixa disponibilidade de oxigênio. Sob privação de oxigênio, a fosforilação oxidativa mitocondrial é inibida, enquanto as vias de glicólise e fermentação são promovidas, levando ao acúmulo de compostos como o lactato (Sousa & Sodek, 2002).

É esperado que folha e raiz apresentem metabolomas diferenciados em resposta ao déficit hídrico, uma vez que respondem à seca com alterações metabólicas opostas. Enquanto o metabolismo é ativado nas raízes, o mesmo é desativado nas folhas (Gargallo-Garriga et al., 2014). Nesse estudo o acúmulo de prolina foi uma resposta comum ao déficit hídrico nos diferentes tecidos, assim como o acúmulo de asparagina ocorreu tanto em raiz como em folha jovem. Mas, em relação aos açúcares, as raízes apresentaram acúmulo de glicose, frutose, trealose e maltose, enquanto nas folhas jovens prevaleceu principalmente o acúmulo do açúcar rafinose. Os ácidos orgânicos do grupo dos fenilpropanóides apresentaram níveis reduzidos nas raízes, ao mesmo tempo em que foram acumulados nas folhas jovens. Os níveis dos ácidos orgânicos intermediários do TCA foram reduzidos tanto em raiz como em folha jovem, mas foram acumulados em folha madura. Esses resultados indicam que as alterações metabólicas podem diferir de acordo com o tipo de tecido e também com o estágio de desenvolvimento desse tecido.

As alterações metabólicas persistem mesmo após a reidratação das plantas

Após a reidratação, apesar da recuperação do potencial da água na folha e das trocas gasosas, o perfil metabólico de folhas e raízes que passaram por déficit hídrico foi mantido alterado em relação às plantas irrigadas (Figuras 9c, 12c). Independente do porta-enxerto, o acúmulo de açúcares foi revertido, indicando um redirecionamento do fluxo de carboidratos acumulados durante o déficit hídrico. A redução significativa desses açúcares sugere um rápido consumo, provavelmente necessário para gerar energia e reequilibrar os demais processos metabólicos (Peters et al., 2007). O acúmulo de BCAAs, lisina e fenilalanina os quais foram reduzidos em plantas que passaram por déficit hídrico, pode ser uma consequência da maior disponibilidade de carboidratos e da redução do consumo de substratos respiratórios alternativos (Araújo et al., 2011).

Tanto em raiz como em folha, o acúmulo de aminoácidos foi mantido ou mesmo aumentado após a reidratação (Figuras 9c, 12c), o que estaria associado à redução da síntese e aumento da degradação de proteínas induzidos pelo déficit hídrico (Lyon et al., 2016). A autofagia e a degradação de proteínas são altamente relevantes para o pool de aminoácidos livres durante a desidratação (Hildebrandt, 2018). O retorno de plantas sob déficit hídrico à condição hidratada envolve a ativação e desativação de diferentes vias metabólicas, o que altera a abundância e rotatividade de proteínas e, consequentemente, afeta o conteúdo de aminoácidos.

Desse modo, a ocorrência de nova síntese proteica no início da reidratação parece depender da capacidade de alocação de aminoácidos remanescentes na planta após o déficit hídrico. Um conteúdo mínimo de aminoácidos livres ou advindos da degradação de proteínas precisa estar disponível na planta para permitir a recuperação do estado metabólico inicial (Lyon et al., 2016). O acúmulo de aminoácidos, tanto durante o déficit hídrico como em resposta à reidratação, parece atuar como uma reserva de precursores para a renovação de proteínas, e com isso, garantir uma rápida recuperação após o estresse (Batista-Silva et al., 2018). Em geral, seis dias de reidratação não foram suficientes para reestabelecer o metabolismo celular de forma semelhante ao das plantas hidratadas, tanto em raiz como em folha, e o acúmulo de aminoácidos nesse período indica a importância do metabolismo do nitrogênio na recuperação do déficit hídrico. Ao mesmo tempo, um novo estado de homeostase metabólica pode ter sido alcançado após a fase de déficit hídrico, no entanto, seria necessário um período de reidratação mais longo para constatar essa reposta.

Perfil metabólico da tolerância à seca induzida pelo limoeiro Cravo

A análise de perfil de metabólitos das plantas cítricas permitiu a identificação de particularidades do porta-enxerto Cravo. As raízes do Cravo apresentaram maior porcentagem de metabólitos alterados pelo déficit hídrico (Figura 8), sugerindo um ajuste metabólico mais abrangente em relação às demais espécies. De acordo com os metabólitos diferencialmente alterados nas raízes de Cravo podemos citar modificações exclusivas no metabolismo de nucleotídeos, via do chiquimato, aspartato e derivados, arginina e citrulina. Estas alterações estão em maior destaque nas figuras 14 e 15.

Alterações em bases nitrogenadas, como uracila e adenina, sugerem alterações no metabolismo de nucleotídeos (Kafer et al., 2004; Zrenner et al., 2004). A base nitrogenada uracila foi acumulada em raízes de todos os porta-enxertos, mas em períodos diferenciados. Nas raízes do Cravo, os níveis de uracila diferiram significativamente nos períodos de déficit hídrico, apresentando redução na fase I e acúmulo na fase II (Figura 9a, b). Em Swingle, tende a ocorrer o contrário e em Sunki o acúmulo ocorreu na fase III, período em que os demais porta-enxertos apresentaram níveis de uracila similares aos das plantas irrigadas (Figura 9c). O metabolismo de nucleotídeos de pirimidina, o que inclui a uracila, está intimamente ligado ao metabolismo de carboidratos, uma vez que o substrato inicial para a síntese da maioria dos açúcares é a UDP-glicose (Kafer et al., 2004). Como a UDP é necessária para a síntese e

degradação da sacarose, o desbalanço no metabolismo de nucleotídeos de pirimidina é limitante para o uso de sacarose na síntese de amido e parede celular (Geigenberger et al., 2005; Mainguet et al., 2009). No início do déficit hídrico (Fase I), o acúmulo de açúcares em raízes foi proporcionalmente menor em Cravo em relação às demais espécies. No mesmo período, apenas em folhas de plantas enxertadas em Cravo não houve acúmulo significativo de nenhum tipo de açúcar, o que pode ser um indício de maior exportação foliar de fotoassimilados. Maior exportação e menor acúmulo de açúcares nas raízes podem indicar maior consumo desses carboidratos pelas vias respiratórias. As alterações no metabolismo de nucleotídeos podem estar associadas ao aumento da força de dreno, aumentando o consumo de açúcares nas raízes e estimulando a exportação nas folhas. Os níveis da base nitrogenada adenina foram reduzidos apenas nas raízes do Cravo. Os nucleotídeos de purina estão diretamente associados ao metabolismo energético (Zrenner et al., 2004). Na via de catabolismo, o metabólito intermediário alantoína desempenha papel importante na mediação da adaptação das plantas aos estresses abióticos, conferindo tolerância através da ativação sinérgica do metabolismo do ácido abscísico (ABA) e da reciclagem de nitrogênio (Watanabe et al., 2014; Takagi et al., 2016; Casartelli et al., 2019; You et al., 2019). O acúmulo de alantoína evita perdas de nitrogênio e representa uma porção significativa do nitrogênio solúvel prontamente disponível para a planta (Casartelli et al., 2019). A redução nos níveis de adenina também foi acompanhada pela redução nos níveis de nicotinato, ácido maleico e aspartato, metabólitos que também participam do metabolismo de nucleotídeos de purina.

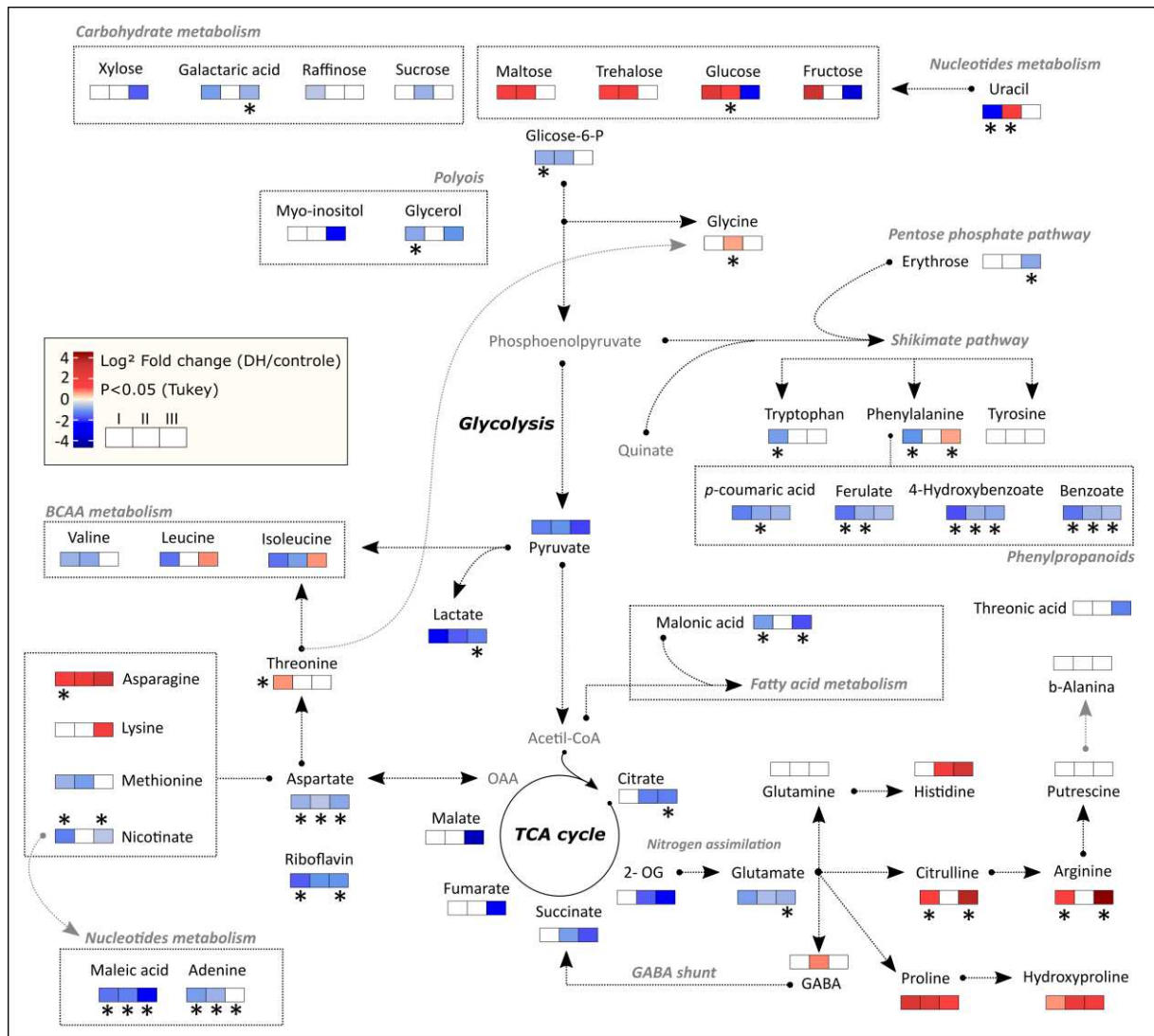


Figura 14. Mapa metabólico contendo os *Heatmaps* de intensidades médias relativizadas (n=4) de metabólitos alterados significativamente nas raízes de plantas de laranjeira Valência enxertadas em limoeiro Cravo sob déficit hídrico nas fases I, II e III. Asterisco indica alteração exclusiva desse porta-enxerto.

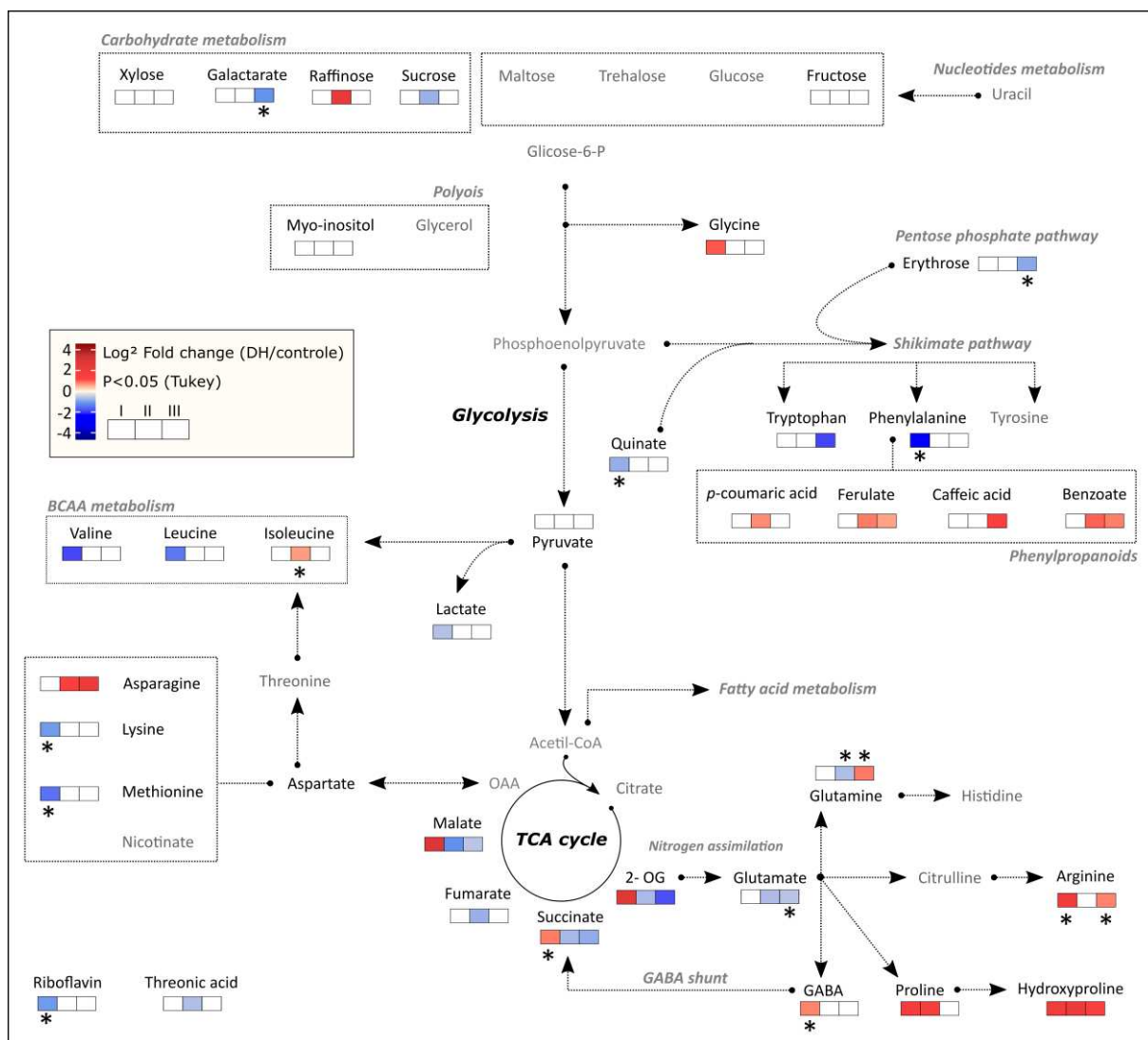


Figura 15. Mapa metabólico contendo os *Heatmaps* de intensidades médias relativizadas (n=4) de metabólitos alterados significativamente nas folhas de plantas de laranja Valência enxertadas em limoeiro Cravo sob déficit hídrico nas fases I, II e III. Asterisco indica alteração exclusiva desse porta-enxerto.

O aspartato, precursor de aminoácidos como lisina, treonina, metionina e isoleucina, foi reduzido apenas nas raízes do Cravo em todas as fases do período experimental. Sob déficit hídrico, há menor atividade da aspartato aminotransferase (AST), a qual catalisa a transferência do grupo amino do glutamato para o oxaloacetato para formar o aspartato e vice-versa, indicando que o metabolismo dos aminoácidos e a síntese de outros metabólitos derivados dos aminoácidos podem ser inibidos pela seca (Wang et al., 2016). O acúmulo de aminoácidos derivados do aspartato em resposta ao déficit hídrico ocorre como consequência da degradação proteica, seguida pela ativação do catabolismo desses aminoácidos, o que representa uma contribuição metabólica ao TCA quando o suprimento de carbono é limitado (Galili et al., 2016; Hildebrandt, 2018). Apenas as raízes do Cravo acumularam treonina, a qual

pode ser metabolizada em glicina (Galili et al., 2016), também acumulada apenas nas raízes do Cravo. O acúmulo de glicina, aminoácido precursor da glutatona, pode estar relacionado à defesa antioxidante (Hasanuzzaman et al., 2017).

Em raízes, metabólitos intermediários da via do chiquimato também diferiram o Cravo dos demais porta-enxertos. Essa via conecta o metabolismo primário à biossíntese de aminoácidos aromáticos, os quais são precursores de uma ampla variedade de metabólitos secundários com múltiplas funções biológicas, como auxinas, terpenóides, glicosídeos e precursores de lignina (Maeda & Dudareva, 2012). Em plantas vasculares, estima-se que aproximadamente 30% do carbono fotossinteticamente fixado são direcionados para essa via (Maeda & Dudareva, 2012). Eritrose, triptofano e tirosina, intermediários dessa via, foram acumulados nas raízes de Swingle e Sunki, ao passo que em Cravo os níveis de triptofano foram reduzidos e os de tirosina não foram alterados (Figura 9a, b). O triptofano é catabolizado em muitos metabólitos secundários como a auxina (ácido indol-3-acético) e a melatonina (Tzin & Galili, 2010). Enquanto a auxina atua nos processos de divisão e expansão celular, a melatonina pode atuar como antioxidante em respostas aos estresses abióticos (Zhang et al., 2015; Emenecker & Strader, 2020). O triptofano também possui função protetora contra espécies reativas de oxigênio, protegendo proteínas, especialmente a proteína D1 necessária para o reparo do fotossistema II (Köhl, 2016). Quanto à fenilalanina, os níveis tendem a reduzir nas raízes de todos os porta-enxertos, mas apenas em Cravo ocorre a redução significativa dos fenilpropanóides derivados desse aminoácido (Figura 9a, b). A inibição dessa via pode estar associada a modificações na composição e rigidez da parede celular, através da menor deposição de lignina, o que consequentemente facilitaria o afrouxamento da parede celular (Hura et al., 2012; Arbona et al., 2013; Wang et al., 2016; Boba et al., 2017). A continuidade do crescimento radicular quando há redução da disponibilidade hídrica depende basicamente do nível de afrouxamento da parede celular e do rápido ajuste osmótico, o qual é necessário para a manutenção de uma pressão de turgor e consequente alongamento da parede celulósica (Hsiao & Xu, 2000). A redução no conteúdo de fenilpropanóides nas raízes de Cravo pode estar contribuindo com a habilidade desse porta-enxerto em manter o crescimento radicular durante o déficit hídrico.

O acúmulo significativo de arginina e citrulina também foi uma particularidade do sistema radicular do Cravo no início da exposição ao déficit hídrico (Figura 9a). A arginina é o aminoácido que possui a maior razão N/C, e por esse motivo é uma das principais formas de armazenamento e transporte de nitrogênio orgânico. Além disso, a arginina também é precursora do óxido nítrico (NO), o qual desempenha papel crucial na regulação de processos

de desenvolvimento bem como respostas ao estresse abiótico (Winter et al., 2015). Em plantas sob déficit hídrico, o NO, como intermediário na sinalização regulada pela auxina, é capaz de promover o aumento da biomassa de raízes, o que consequentemente melhoraria a absorção de água e causaria maior hidratação da parte aérea das plantas (Silveira et al., 2016). Em geral, o sistema radicular percebe reduções na disponibilidade de água e produz sinais químicos que regulam o fluxo de água das raízes para a parte aérea (Tardieu, 1996). Nesse sentido, tem sido demonstrado que o NO é um desses sinais químicos e desempenha um papel crucial na estimulação da expansão e do desenvolvimento do sistema radicular (Silveira et al., 2016; Xu et al., 2017). O papel da arginina como precursora de NO é cada vez mais aparente e envolve uma suposta enzima que converte arginina em NO e citrulina, no entanto, o mecanismo molecular de produção de NO a partir da arginina permanece elusivo (Winter et al., 2015). O acúmulo de citrulina nas raízes do Cravo é mais um indício de produção de NO via arginina. A arginina sozinha também é considerada um aminoácido importante para a divisão celular, o que promove a sustentação do crescimento e desenvolvimento radicular (Xia et al., 2014; Frémont et al., 2013). Desse modo, o acúmulo de arginina e citrulina podem estar associados à maior taxa de crescimento radicular relativo do Cravo no início da exposição ao déficit hídrico (Figura 6b).

Em folhas, as alterações exclusivas de plantas sob Cravo envolveram principalmente a via GABA shunt, derivados do aspartato, intermediários da via do chiquimato (quinato e fenilalanina) e arginina (Figura 15). O acúmulo foliar de triptofano ocorreu apenas em plantas enxertadas em Sunki, enquanto as plantas enxertadas em Cravo apresentaram redução em fenilalanina e quinato. Quanto aos derivados do aspartato, a redução nos níveis de metionina e lisina ocorreram apenas em folhas de plantas sob Cravo, com acúmulo de GABA e succinato. O acúmulo de GABA associado ao succinato sugere a ativação da via de derivação do GABA (GABA shunt), pela qual o GABA é metabolizado em succinato e alimenta o TCA, promovendo a resistência das plantas a estresses abióticos por gerar mais energia (Hijaz & Killiny, 2019). Além disso, o GABA pode atuar na regulação do pH citosólico, no metabolismo de nitrogênio, na proteção contra o estresse oxidativo, na osmorregulação e na sinalização celular (Bouché & Fromm, 2004). A redução nos níveis de aminoácidos derivados do aspartato e ativação da via GABA shunt, somada à redução dos níveis de valina e leucina representam maior suprimento de intermediários ao TCA nas folhas de plantas enxertadas em Cravo. Em folha jovem (Fase II), houve acúmulo de isoleucina provavelmente devido à degradação proteica.

Na reidratação (Fase III), as espécies apresentaram um padrão semelhante, porém, a proporção de acúmulo de aminoácidos foi maior nas plantas enxertadas em Cravo, tanto em raiz como em folha. Este acúmulo de aminoácidos pode ser resultado de alterações diferenciadas na abundância e rotatividade de proteínas em resposta ao déficit hídrico, o que pode favorecer a nova síntese proteica no início da reidratação (Lyon et al., 2016). De fato, em resposta ao déficit hídrico, o Cravo apresentou aumento da abundância de proteínas envolvidas na proteólise (Santana-Vieira et al., 2016), o que possivelmente deve contribuir com o acúmulo de aminoácidos.

O acúmulo de arginina e asparagina, aminoácidos que representam as principais formas de armazenamento e transporte de nitrogênio orgânico, pode conferir ao porta-enxerto Cravo uma vantagem durante o processo de recuperação em relação as demais espécies. Durante o déficit hídrico, o metabolismo do nitrogênio é inibido devido à redução nos teores de carboidratos, a energia para a assimilação de nitrogênio é economizada e o nitrogênio reduzido passa a ser liberado a partir de aminoácidos degradados (Köhl, 2016). Se a recuperação do metabolismo depende da capacidade de alocação de aminoácidos para sustentar nova síntese proteica (Lyon et al., 2016), é possível que a retomada do crescimento após o déficit hídrico, tanto de raiz como de parte aérea, seja favorecido em plantas enxertadas em Cravo.

Conclusão

Comparando os porta-enxertos, a proporção de acúmulo de metabólitos em resposta ao déficit hídrico foi maior nas plantas enxertadas em Sunki, tanto em raiz como em folha, além de apresentar maior número de metabólitos acumulados. Sob déficit hídrico, o porta-enxerto Sunki parece investir mais energia em compostos de proteção, em número e proporção, o que pode comprometer o crescimento da planta (Santana-Vieira et al., 2016). Em plantas enxertadas em Swingle, as alterações foram mais brandas, principalmente em folhas, no entanto, este porta-enxerto também parece investir em compostos de proteção ao déficit hídrico, como putrescina, mio-inositol e triptofano. De acordo com Levitt (1972), estas espécies apresentam uma estratégia mais próxima da tolerância à seca, o que pode ser mais vantajoso em períodos de seca severa. As plantas enxertadas em Cravo responderam à variação inicial da disponibilidade de água no substrato a fim de amenizar os efeitos do déficit hídrico, priorizando o crescimento do sistema radicular e inibindo o aumento da superfície de transpiração, o que caracteriza uma estratégia de evitação. As alterações em plantas enxertadas no limoeiro Cravo parecem estar associadas ao uso eficiente dos recursos disponíveis já no início da redução da disponibilidade

de água, favorecendo o crescimento radicular inicialmente e, em um segundo momento a planta parece atingir uma nova homeostase diante da menor disponibilidade hídrica, momento em que retoma o crescimento da parte aérea. Essa estratégia de evitação e precaução parece ser mais vantajosa nas áreas de cultivo e devem estar associadas ao melhor desempenho de plantas enxertadas em limoeiro Cravo sob déficit hídrico. Nossos resultados revelam que ajustes metabólicos que desencadeiam essa reposta envolvem os metabolismos de nucleotídeos e energético, a via do aspartato, a inibição da via do chiquimato, a redução de fenilpropanóides e o acúmulo de arginina e citrulina. Esse porta-enxerto também apresentou maior eficiência no uso do nitrogênio, acumulando em maior proporção compostos com maior razão N/C (arginina e asparagina), o que fica ainda mais evidente após a reidratação. Estudos enfocando as vias metabólicas e metabólitos citados acima devem ser os próximos passos para o desenvolvimento de novos porta-enxertos cítricos resistentes à seca.

Considerações finais

As plantas enxertadas no limoeiro Cravo apresentaram uma resposta diferenciada sob déficit hídrico e reidratação em comparação com os porta-enxertos citrumeleiro Swingle e tangerineira Sunki. Entre as principais características observadas estão a habilidade em coordenar a relação fonte e dreno, aumentando a importação de fotoassimilados para as raízes sob déficit hídrico. A maior força-dreno provavelmente ocorreu devido a ajustes metabólicos na atividade das raízes, órgão dreno cujo crescimento foi priorizado sob déficit hídrico. De fato, o perfil de metabólitos primários das raízes do Cravo apresentou particularidades que parecem favorecer o crescimento radicular através de alterações no metabolismo energético e uso eficiente dos recursos disponíveis. Nas folhas, o limoeiro Cravo foi capaz de estimular maior suprimento alternativo de energia e acúmulo de arginina. A resposta à reidratação, tanto em raiz como em folha, foi mais significativa nas plantas enxertadas em Cravo, devido ao acúmulo elevado de aminoácidos com alta razão N/C, evidenciando a importância do metabolismo do nitrogênio durante a reidratação. Além disso, o limoeiro Cravo apresentou um sistema radicular sensível à variação inicial da disponibilidade de água, o que antecipa as suas respostas ao déficit hídrico.

Este estudo contribuiu com o levantamento de novas informações relevantes sobre as estratégias fisiológicas que proporcionam o melhor desempenho de plantas enxertadas no limoeiro Cravo sob déficit hídrico, as quais poderão direcionar novos estudos vinculados ao desenvolvimento de novas espécies de porta-enxertos cítricos, a fim de diversificar o uso de porta-enxertos resistentes à seca na citricultura.

Referências gerais

- Ahmed I, Ullah A, Rahman MH, Ahmad B, Wajid AS, Ahmad A, Ahmed S. 2019. Climate change impacts and adaptation strategies for agronomic crops. *Climate Change and Agriculture*, 1-14.
- Ainsworth EA, Bush DR. 2011. Carbohydrate export from the leaf: a highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiology* 155: 64-69.
- Amaral LIV, Gaspar M, Costa PMF, Aidar MPM, Buckeridge MS. 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* 34: 425-431.
- Amaro AA, Baptistella CSL. 2010. Viveiros de Citros - uma visão econômica. Textos para Discussão-IEA, 13p.
- Anjum SA, Xiel X, Wang L, Saleem MF, Man C, Lei W, 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research* 6: 2026-2032.
- Araújo WL, Martins AO, Fernie AR, Tohge T. 2014. 2-Oxoglutarate: linking TCA cycle function with amino acid, glucosinolate, flavonoid, alkaloid, and gibberellin biosynthesis. *Frontiers in Plant Science* 5: 552.
- Araújo WL, Tohge T, Ishizaki K, Leaver CJ, Fernie AR. 2011. Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends in Plant Science* 16: 489-498.
- Arbona V, Manzi M, Ollas C, Gómez-Cadenas A. 2013. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 4885-4911.
- Atkin, OK, Macherel D. 2009. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Annals of Botany* 103: 581-597.
- Basu S, Ramegowda V, Kumar A, Pereira A. 2016. Plant adaptation to drought stress. *F1000 Faculty Reviews*, 1554.
- Batista-Silva W, Heinemann B, Rugen N, Nunes-Nesi A, Araújo WL, Braun HP, Hildebrandt TM. 2018. The role of amino acid metabolism during abiotic stress release. *Plant, Cell and Environment* 42:1630-1644.
- Beadle CL. 1993. Growth analysis. In: Hall D.O., Scurlock J.M.O., Bolhàr-Nordenkamp H.R., Leegood R.C., Long S.P. (eds) *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*. Springer, Dordrecht, p.36-46.

- Beshir W, Alemayehu M, Dessalegn Y. 2019. Effect of grafting time and technique on the success rate of grafted Mango (*Mangifera indica* L.) in Kalu District of Amhara Region, North Eastern Ethiopia. *Cogent Food & Agriculture* 5: 1-19.
- Blum A. 2016. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *Osmotic adjustment and plant production*. *Plant, Cell and Environment* 40: 4-10.
- Boba A, Kostyn K, Kostyn A, Wojtasik W, Dziadas M, Preisner M, Szopa J, Kulma A. 2017. Methyl salicylate level increase in flax after *Fusarium oxysporum* infection is associated with phenylpropanoid pathway activation. *Frontiers in Plant Science* 7: 1-12.
- Bolouri-Moghaddam MR, Roy KL, Xiang L, Rolland F, Van den Ende W. 2010. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *The Ferbs Journal* 277: 2022-2037.
- Boscariol-Camargo RL, Berger IJ, Souza AA, Amaral AM, Carlos EF, Freitas-Astúa J, Takita MA, Targon MLPN, Medina CL, Reis MS, Machado MA. 2007. In silico analysis of ESTs from roots of Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) under water stress. *Genetics and Molecular Biology* 30: 906-916.
- Bouche N, Fromm H. 2004. GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science* 9: 1360-1385.
- Bové JM, Ayres AJ. 2007. Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo State: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. *IUBMB Life* 59: 346-354.
- Bueno ACR, Prudente DA, Machado EC, Ribeiro RV. 2012. Daily temperature amplitude affects the vegetative growth and carbon metabolism of orange trees in a rootstock-dependent manner. *Journal of Plant Growth Regulation* 31: 309-319.
- Caldana C, Degenkolbe T, Cuadros-Inostroza A, Klie S, Sulpice R, Leisse A, Steinhauser D, Fernie AR, Willmitzer L, Hannah MA. 2011. High-density kinetic analysis of the metabolomic and transcriptomic response of Arabidopsis to eight environmental conditions. *The Plant Journal* 67: 869-884.
- Carrer MC, Souza Filho HM de. 2016. Economias de escala e eficiência econômica na produção de laranja no estado de São Paulo. *Revista de Economia e Sociologia Rural* 54: 51–70.
- Casartelli A, Melino VJ, Baumann U, Riboni M, Suchecki R, Jayasinghe NS, Mendis H, Watanabe M, Erban A, Zuther E, Hoefgen R, Roessner U, Okamoto M, Heuer S. 2019. Opposite fates of the purine metabolite allantoin under water and nitrogen limitations in bread wheat. *Plant Molecular Biology* 99: 477-497.

- Chaves MM, Oliveira MM. 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* 55: 2365-2384.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. 2003. Understanding plant response to drought: from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239-26.
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103: 551-560.
- Chen H, Jiang JG. 2010. Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environmental Reviews* 18: 309-319.
- Cohen S, Naor A. 2002. The effect of three rootstocks on water use, canopy conductance and hydraulic parameters of apple trees and predicting canopy from hydraulic conductance. *Plant, Cell and Environment* 25: 17-28.
- Cominelli E, Galbiati M, Tonelli C, Bowler C. 2009. Water: the invisible problem. *EMBO reports* 10: 671-676.
- Conde A, Regalado A, Rodrigues D, Costa JM, Blumwald E, Chaves MM, Gerós H. 2015. Polyols in grape berry: transport and metabolic adjustments as a physiological strategy for water-deficit stress tolerance in grapevine. *Journal of Experimental Botany* 66: 889-906.
- Couée I, Sulmon C, Gouesbet G, El Amrani A. 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 57: 449-459.
- Cuadros-Inostroza A, Caldana C, Redestig H, Kusano M, Lisec J, Peña-Cortés H, Willmitzer L, Hannah MA. 2009. TargetSearch - a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. *BMC Bioinformatics* 10: 428.
- Cuadros-Inostroza A, Ruíz-Lara S, González E, Eckardt A, Willmitzer L, Peña-Cortés H. 2016. GC-MS metabolic profiling of Cabernet Sauvignon and Merlot cultivars during grapevine berry development and network analysis reveals a stage - and cultivar -dependent connectivity of primary metabolites. *Metabolomics* 12: 1-17.
- Dai A. 2011. Drought under global warming: a review. *Climatic Change* 2: 45-65.
- Donato SLR, Pereira CS, Barros ZJ, Siqueira DL, Salomão LCC. 2007. Respostas de combinações de variedades copa e porta-enxerto de citros à deficiência hídrica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 1507-1510.
- ElSayed AI, Rafudeen MS, Gollack D. 2013. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. *Plant Biology* 16: 1-8.
- Emenecker RJ, Strader LC. 2020. Auxin-abscisic acid interactions in plant growth and development. *Biomolecules* 10: 281.

- Erismann NM, Machado EC, Tucci MLS. 2008. Photosynthetic limitation by CO₂ diffusion in drought stressed orange leaves on three rootstocks. *Photosynthesis Research* 96: 163-172.
- Eslamian S, Ostad-Ali-Askari K, Singh VP, Dalezios NR, Ghane M, Yihdego Y, Matouq M. 2017. A Review of Drought Indices. *International Journal of Constructive Research in Civil Engineering* 3: 48-66.
- Farooq M, Wahid A, Kobayash N, Fujita D, Basra SMA. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* 29: 185-212.
- Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ. 2004. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 254-261.
- Flexas J, Ribas-Carbó M, Bota J, Galmés J, Henkle M, Martínez-Cañellas S, Medrano H. 2006. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytologist* 172: 73-82.
- Frémont N, Riefler M, Stolz A, Schmölling T. 2013. The arabidopsis TUMOR PRONE5 gene encodes an acetylornithine aminotransferase required for arginine biosynthesis and root meristematic maintenance in blue light. *Plant Physiology* 161: 1127-1140.
- Galili G, Amir R, Fernie AR. 2016. The Regulation of Essential Amino Acid Synthesis and Accumulation in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 67: 153-78.
- García-Sánchez F, Syvertsen JP, Gimeno V, Botía P, Perez-Perez JG. 2007. Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstocks with different water-use efficiency. *Plant Physiology* 130: 532-542.
- Gargallo-Garriga A, Sardans J, Pérez-Trujillo M, Rivas-Ubach A, Oravec M, Vecerova K, Urban O, Jentsch A, Kreyling J, Beierkuhnlein C, Parella T, Peñuelas J. 2014. Opposite metabolic responses of shoots and roots to drought. *Scientific Reports* 4: 6829.
- Geigenberger P, Stitt M. 1993. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta* 189: 329-339.
- Ghatak A, Chaturvedi P, Weckwerth W. 2017. Metabolomics in Plant Stress Physiology. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* 164: 187-236.
- Gilbert GA, Wilson C, Madore MA. 1997. Root-zone salinity alters raffinose oligosaccharide metabolism and transport in coleus. *Plant Physiology* 115: 1267-1276.
- Girardi EA, Cerqueira TS, Cantuarias-Avilés TE, Silva SR, Stuchi ES. 2017. Sunki mandarin and Swingle citrumelo as rootstocks for rain-fed cultivation of late-season sweet orange selections in northern São Paulo state, Brazil. *Bragantia, Campinas*, 76: 501-511.

- Golovina EA, Golovin AV, Hoekstra FA, Faller R. 2009. Water Replacement Hypothesis in Atomic Detail - Factors Determining the Structure of Dehydrated Bilayer Stacks. *Biophysical Journal* 97: 490-499.
- Gu Z, Eils R, Schlesner M. 2016. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32: 2847-2849.
- Gu Z, Gu L, Eils R, Schlesner M, Brors B. 2014. Circlize implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics* 30: 2811-2812.
- Guo R, Shi L, Jiao Y, Li M, Zhong X, Gu F, Liu Q, Xia X, Li H. 2018. Metabolic responses to drought stress in the tissues of drought-tolerant and drought-sensitive wheat genotype seedlings. *AoB Plants* 10:1-13.
- Hall RD. 2011. Plant metabolomics in a nutshell: potential and future challenges. *Annual Plant Reviews* 43:1-24.
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Anee TI, Fujita M. 2017. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 23: 249-268.
- Herbers K, Sonnewald U. 1998. Molecular determinants of sink strength. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 207-216.
- Hijaz F, Killiny N. 2019. Exogenous GABA is quickly metabolized to succinic acid and fed into the plant TCA cycle. *Plant Signaling & Behavior* 14: 1573096.
- Hildebrandt TM. 2018. Synthesis versus degradation: directions of amino acid metabolism during *Arabidopsis* abiotic stress response. *Plant Molecular Biology* 98: 121-135.
- Ho LC. 1988. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annual Review of Plant Biology* 39: 355-378.
- Hsiao TC, Xu L. 2000. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *Journal of Experimental Botany* 51: 1595-1616.
- Hummel I, Pantin F, Sulpice R, Piques M, Rolland G, Dauzat M, Christophe A, Pervent M, Bouteillé M, Stitt M, Gibon Y, Muller B. 2010. *Arabidopsis* plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiology*, 154: 357-372.
- Hura T, Hura K, Dziurka K, Ostrowska A, Bączek-Kwinta R, Grzesiak M. 2012. An increase in the content of cell wall-bound phenolics correlates with the productivity of triticale under soil drought. *Journal of Plant Physiology* 169: 1728-1736.

- Hussain S, Rao MJ, Anjum MA, Ejaz S, Zakir I, Ali MA, Ahmad N, Ahmad S. 2019. Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Plants Under Drought Conditions. *Plant Abiotic Stress Tolerance* 207-219.
- Igamberdiev AU, Eprintsev AT. 2016. Organic acids: The pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants. *Frontiers in Plant Science* 7: 1042.
- Iglesias DJ, Cercós M, Colmenero-Flores JM, Naranjo MA, Ríos G, Carrera E, Ruiz-Rivero O, Lliso I, Morillon R, Tadeo FR, Talon M. 2011. Physiology of citrus fruiting. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19: 333-362.
- IPCC 2013. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F. et al. (eds.)]. University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535p
- Kafer C, Zhou L, Santoso D, Guirgis A, Weers B, Park S, Thornburg R. 2004. Regulation of pyrimidine metabolism in plants. *Frontiers in Bioscience* 9: 1611-1625.
- Kang Y, Khan S, Maa X. 2009. Climate change impacts on crop yield, crop water productivity and food security - A review. *Progress in Natural Science* 19: 1665-1674.
- Keunen E, Peshev D, Vangronsveld J, Van Den Ende W, Cuypers A. 2013. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant, Cell and Environment* 36: 1242-1255.
- Köhl K. 2016. Metabolomics on Combined Abiotic Stress Effects in Crops. *Drought Stress Tolerance in Plants* 2: 251-276.
- Körner C. 2013. Growth controls photosynthesis - Mostly. *Nova Acta Leopoldina* 391: 273 - 283.
- Kuiper D. 1993. Sink strength: Established and regulated by plant growth regulators. *Plant, Cell and Environment* 16: 1025-1026.
- Kumar R, Bohra A, Pandey AK, Pandey MK, Kumar A. 2017. Metabolomics for Plant Improvement: Status and Prospects. *Frontiers in Plant Science* 8: 1302.1-27.
- Lea PJ, Sodek L, Parry MAJ, Shewry PR, Halford NG. 2007. Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology* 150: 1-26.
- Lemoine R, La Camera S, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain JL, Laloi M, Coutos-Thévenot P, Maurousset L, Faucher M, Girousse C, Lemonnier P, Parrilla J, Durand M. 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science* 4: 272.

- Le Rudulier D, Strom AR, Dandekar AM, Smith LT, Valentine RC. 1984. Molecular Biology of Osmoregulation. *Science* 224: 1064-1068.
- Levitt, J. 1972. Responses of plants to environmental stresses. New York: Academic press 698.
- Lisec J1, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR. 2006. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* 1: 387-396.
- Llanes A, Andradea A, Alemano S, Luna V. 2018. Metabolomic Approach to Understand Plant Adaptations to Water and Salt Stress. *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress* 133-144.
- Luo Y, Li F, Wang GP, Yang XH, Wang W. 2010. Exogenously-supplied trehalose protects thylakoid membranes of winter wheat from heat-induced damage. *Biologia Plantarum* 54: 495-501.
- Lyon D, Castillejo MA, Mehmeti-Tershani V, Staudinger C, Kleemaier C, Wienkoop S. 2016. Drought and recovery: independently regulated processes highlighting the importance of protein turnover dynamics and translational regulation in *Medicago truncatula*. *Molecular and Cellular Proteomics* 15: 1921-1937.
- Maeda H, Dudareva N. 2012. The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 63: 73-105.
- Magalhães Filho JR, Amaral LR, Machado DFSP, Medina CL, Machado EC. 2008. Deficiência hídrica, trocas gasosas e crescimento de raízes em laranjeira 'Valência' sobre dois tipos de porta-enxertos. *Bragantia* 67: 75-82.
- Mainguet ES, Gakière B, Majira A, Pelletier S, Bringel F, Guérard F, Caboche M, Berthomé R, Renou JP. 2009. Uracil salvage is necessary for early Arabidopsis development. *The Plant Journal* 60: 280-291.
- Marcelis LFM. 1996. Sink strength as a determinant of dry matter partitioning in the whole plant. *Journal of Experimental Botany* 47: 1281-1291.
- Mata AT, Jorge TF, Pires MV, Antonio C. 2016. Drought stress tolerance in plants: insights from metabolomics. In: Hossain M, Wani S, Bhattacharjee S, Burritt D, Tran LS (eds). *Drought Stress Tolerance in Plants*. Springer, Cham.
- Medina CL, Machado EC, Pinto JM. 1998. Fotossíntese de laranjeira 'Valência' enxertada sobre quatro porta-enxertos e submetida à deficiência hídrica. *Bragantia* 57: 1-14.
- Medina CL, Machado EC. 1998. Gas exchange and water relations of Valencia orange tree grafted on rangpur lime and Poncirus trifoliata submitted to a water deficit. *Bragantia* 57:15-22.

- Medina CL, Machado EC, Rena AB, Siqueira DL. Fisiologia dos citros. 2005. In: Mattos Júnior D, De Negri JD, Pio RM, Pompeu Júnior J. (Ed.). Citros. IAC, Campinas, pp.147-195.
- Michaletti A, Naghavi MR, Toorchi M, Zolla L, Rinalducci S. 2018. Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. *Scientific Reports* 8: 5710.
- Minchin PEH, Thorpe MR. 1996. What determines carbon partitioning between competing sinks? *Journal of Experimental Botany* 47: 1293-1296.
- Minocha R, Majumdar R, Minocha SC. 2014. Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. *Frontiers in Plant Science* 5: 175.
- Miranda MT, Silva SF, Moura BB, Hayashi AH, Machado EC, Ribeiro RV. 2018. Hydraulic redistribution in Citrus rootstocks under drought. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 30: 165-172.
- Mourão Filho F de AA, Espinoza-Núñez E, Stuchi ES, Ortega EMM. 2007. Plant growth, yield, and fruit quality of ‘Fallglo’ and ‘Sunburst’ mandarins on four rootstocks. *Scientia Horticulturae* 114: 45–49.
- Muller B, Pantin F, Génard M, Turc O, Freixes S, Piques M, Gibon Y. 2011. Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany* 62: 1715-1729.
- Parthasarathy A, Savka MA, Hudson AO. 2019. The Synthesis and Role of β -Alanine in Plants. *Frontiers in Plant Science* 10: 921.
- PBMC 2013. Contribuição do Grupo de Trabalho 2 ao Primeiro Relatório de Avaliação Nacional do Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas. Sumário Executivo do GT2. PBMC, Rio de Janeiro, Brasil 28p.
- Pedroso FKJV, Prudente DA, Bueno ACR, Machado EC, Ribeiro RV. 2014. Drought tolerance in citrus trees is enhanced by rootstock-dependent changes in root growth and carbohydrate availability. *Environmental and Experimental Botany* 101: 26-35.
- Per TS, Khan NA, Reddy PS, Masood A, Hasanuzzaman M, Khan MIR, Anjum NA. 2017. 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.
- Peters S, Mundree SG, Thomson JA, Farrant JM, Keller F. 2007. Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. *Journal of Experimental Botany* 58: 1947-1956.

- Pompeu Jr J, Salva R, Blumer S. 2004. Copas e porta-enxertos nos viveiros de mudas cítricas. *Laranja* 25: 413–236.
- Prinsi B, Negri AS, Failla O, Scienza A, Espen L. 2018. Root proteomic and metabolomic analyses reveal specific responses to drought stress in differently tolerance grapevine rootstocks. *BMC Plant Biology* 18: 126.
- Rai VK. 2002. Role of amino acids in plant response to stresses. *Biologia Plantarum* 45: 481-487.
- Ribeiro RV, Espinoza-Núñez E, Pompeu Junior J, Mourão Filho FAA, Machado EC. 2014. Citrus rootstocks for improving the horticultural performance and physiological responses under constraining environments. In: Ahmad, P. et al. (eds). *Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes*. Springer, New York, pp.1-37.
- Ribeiro RV, Machado EC, Brunini O. 2006. Ocorrência de condições ambientais para a indução do florescimento de laranjeiras no estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Fruticultura* 28: 247-253.
- Ribeiro RV, Machado EC, Habermann G, Santos MG, Oliveira RF. 2012. Seasonal effects on the relationship between photosynthesis and leaf carbohydrates in orange trees. *Functional Plant Biology* 39: 471-480.
- Ribeiro RV, Machado EC. 2007. Some aspects of citrus ecophysiology in subtropical climates: re-visiting photosynthesis under natural conditions. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19: 393-411.
- Roitsch, T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 198-206.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 675-709.
- Roose ML, Gmitter Jr FG, Lee RF, Hummer KE. 2015. Conservation of citrus germplasm: an international survey. *Acta horticulturae* 1101: 33-38.
- Rosa M, Prado C, Podazza G, Interdonato R, González JA, Hilal M, Prado FE. 2009. Soluble sugars - metabolism, sensing and abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior* 4: 388-393.
- Salem MA, Jüppner J, Bajdzienko K, Giavalisco P. 2016. Protocol: a fast, comprehensive and reproducible one-step extraction method for the rapid preparation of polar and semi-polar metabolites, lipids, proteins, starch and cell wall polymers from a single sample. *Plant Methods* 12:45.
- Sanders GJ, Arndt SK. 2012. Osmotic Adjustment Under Drought Conditions. *Plant Responses to Drought Stress*, pp. 199-229.

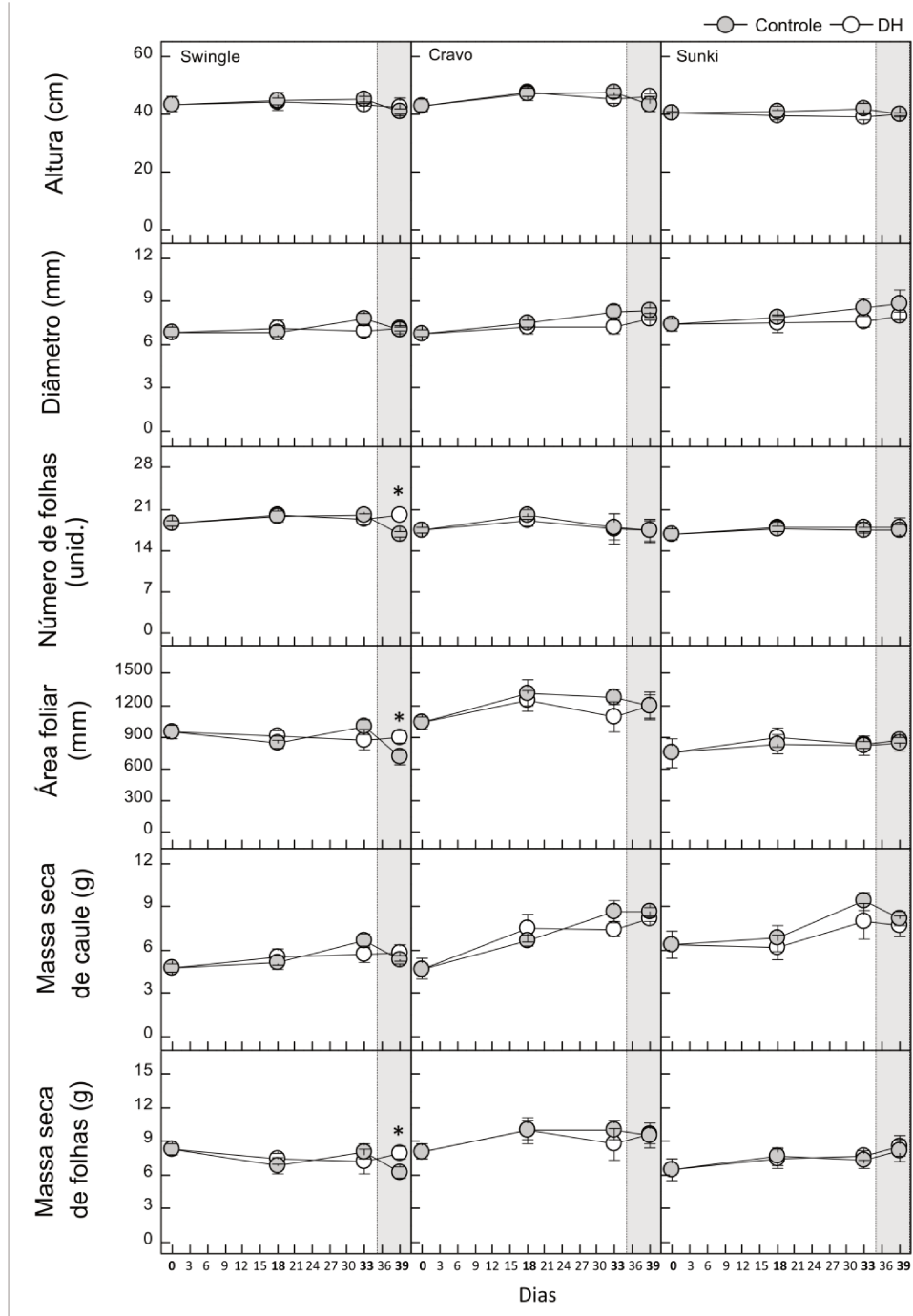
- Santana-Vieira DDS, Freschi L, Almeida LAH, Moraes DHS, Neves DM, Santos LM, Bertolde FZ, Soares Filho WS, Coelho Filho MA, Gesteira AS. 2016. Survival strategies of citrus rootstocks subjected to drought. *Scientific Reports* 6: 38775.
- Sharp RE. 2002. Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant Cell and Environment* 25: 211-222.
- Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert HJ, Nguyen HT. 2004. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany* 55: 2343-2351.
- Sharma K, Sarma S, Bohra A, Mitra A, Sharma NK, Kumar A. 2011. *Plant Metabolomics: An Emerging Technology for Crop Improvement*.
- Shulaev V, Cortesa D, Millerb G, Mittlerb R. 2008. Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum* 132: 199-208.
- Silveira NM, Frungillo L, Marcos FC, Pelegriño MT, Miranda MT, Seabra AB, Salgado I, Machado EC, Ribeiro RV. 2016. Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit. *Planta* 244: 181-190.
- Slama I, Abdelly C, Bouchereau A, Flowers T, Savouré A. 2015. Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Annals of Botany* 115: 433-447.
- Smeekens S, Ma J, Hanson J, Rolland F. 2010. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 273-278.
- Smith AM, Stitt M. 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell and Environment* 30: 1126-1149.
- Sousa CAF, Sodek L. 2002. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. *Brazilian Journal Plant Physiology* 14: 83-94.
- Sturm A, Tang GQ. 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science* 4: 401-107.
- Suguiyama VF, Silva EA, Meirelles ST, Centeno DC, Braga MR. 2014. Leaf metabolite profile of the Brazilian resurrection plant *Barbacenia purpurea* Hook. (Velloziaceae) shows two time-dependente responses during desiccation and recovering. *Frontiers in Plant Science* 5: 96.
- Sweetlove LJ, Beard KF, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Ratcliffe RG. 2010. Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in Plant Science* 15: 462-470.
- Szabados L, Savoure A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15: 89-97.

- Takagi H, Ishiga Y, Watanabe S, Konishi T, Egusa M, Akiyoshi N, Matsuura T, Mori IC, Hirayama T, Kaminaka H, Shimada H, Sakamoto A. 2016. Allantoin, a stress-related purine metabolite, can activate jasmonate signaling in a MYC2-regulated and abscisic acid-dependent manner. *Journal of Experimental Botany* 67: 2519-2532.
- Tardieu F, Simonneau T, Muller B. 2018. The physiological basis of drought tolerance in crop plants: a scenario-dependent probabilistic approach. *Annual Review of Plant Biology* 69: 733-759.
- Tardieu F. 1996. Drought perception by plants. Do cells of droughted plants experience water stress? *Plant Growth Regulation* 20: 93-104.
- Taylor NL, Heazlewood JL, Day DA, Millar AH. 2004. Lipoic acid-dependent oxidative catabolism of α -keto acids in mitochondria provides evidence for branched-chain amino acid catabolism in arabidopsis. *Plant Physiology* 134: 838-848.
- Thalmann M, Santelia D. 2017. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytologist* 214: 943-951.
- Tzin V, Galili G. 2010. New Insights into the Shikimate and Aromatic Amino Acids Biosynthesis Pathways in Plants. *Molecular Plant* 3: 956-972.
- USDA/FAS Foreign Agricultural Services. 2019. Citrus: World markets and trade. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>
- Van den Ende W, Valluru R. 2009. Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? *Journal of Experimental Botany* 60: 9-18.
- Verslues PE. 2017. Time to grow: factors that control plant growth during mild to moderate drought stress. *Plant, Cell and Environment* 40: 177-179.
- Wang X, Cai X, Xu C, Wang Q, Dai S. 2019. Drought-responsive mechanisms in plant leaves revealed by proteomics. *International Journal of Molecular Sciences* 17: 1706.
- Watanabe S, Matsumoto M, Hakomori Y, Takagi H, Shimada H, Sakamoto A. 2014. The purine metabolite allantoin enhances abiotic stress tolerance through synergistic activation of abscisic acid metabolism. *Plant, Cell and Environment* 37: 1022-1036.
- Wilkinson S, Davies WJ. 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell and Environment* 33: 510-25.
- Williamson JD, Jennings DB, Guo W, Pharr DM, Ehrenshaft M. 2002. Sugar alcohols, salt stress, and sugar sensing: polyols - multifunctional plant protection? *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 467-473.
- Winter G, Todd CD, Trovato M, Forlani G, Funck D. 2015. Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Frontiers in Plant Science* 6: 534.

- Xia J, Yamaji N, Ma JF. 2014. An appropriate concentration of arginine is required for normal root growth in rice. *Plant Signaling and Behavior* 9: e28717-2.
- Xu X-T, Jin X, Liao W-B, Dawuda MM, Li X-P, Wang M, Niu L-J, Ren P-J, Zhu Y-C. 2017. Nitric oxide is involved in ethylene-induced adventitious root development in cucumber (*Cucumis sativus* L.) explants. *Scientia Horticulturae* 215: 65-71.
- You J, Zhang Y, Liu A, Li D, Wang X, Dossa K, Zhou R, Yu J, Zhang Y, Wang L, Zhang X. 2019. Transcriptomic and metabolomic profiling of drought-tolerant and susceptible sesame genotypes in response to drought stress. *BMC Plant Biology* 19: 267.
- Zhang N, Sun Q, Zhang H, Cao Y, Weeda S, Ren S, Guo YD. 2015. Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *Journal of Experimental Botany* 66: 647-656.
- Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U, Boldt R. 2004. Pyrimidine and Purine Biosynthesis and Degradation in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 57: 805-36.

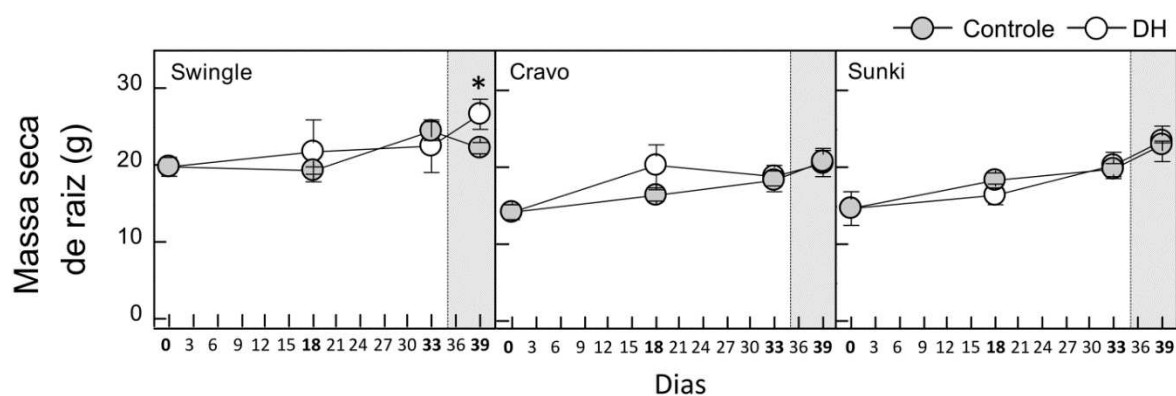
Anexo 1

Biometria do caule principal (altura, diâmetro e biomassa seca) e folhas maduras desenvolvidas antes da imposição dos tratamentos (número, área foliar e biomassa seca) de plantas de laranja Valência enxertadas em citrumeleiro Swingle, limoeiro Cravo ou tangerineira Sunki, mantidas irrigadas (control) ou sob déficit hídrico (WD). A área sombreada representa os valores obtidos após a reidratação do substrato das plantas do tratamento WD. Cada ponto representa o valor médio ($n=3$) $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatística entre os tratamentos ($p<0,05$). O período entre 0 e 18 dias corresponde à fase I, entre 18 e 33 dias corresponde à fase II e entre 33 e 36 dias corresponde à fase III.



Anexo 2

Biomassa de raiz de plantas de laranja Valência enxertadas em citrumeleiro Swingle, limoeiro Cravo ou tangerineira Sunki, mantidas irrigadas (control) ou sob déficit hídrico (WD). A área sombreada representa os valores obtidos após a reidratação do substrato das plantas do tratamento WD. Cada ponto representa o valor médio ($n=3$) $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatística entre os tratamentos ($p<0,05$). O período entre 0 e 18 dias corresponde à fase I, entre 18 e 33 dias corresponde à fase II e entre 33 e 36 dias corresponde à fase III.



Anexo 3



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Br
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada **O papel dos porta-enxertos cítricos no metabolismo e transporte de fotoassimilados em plantas sob déficit hídrico**, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais, ou temas afetos a Biossegurança.

Campinas, 10 de agosto de 2020.

Assinatura: 
Nome do(a) autor(a): **Simone Ferreira da Silva**
RG nº 43.521.806-2

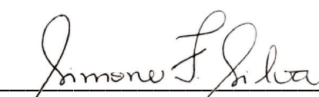
Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): **Rafael Vasconcelos Ribeiro**
RG nº 37.792.004-6

Profº. Drº. Rafael Vasconcelos Ribeiro
Depto. Biologia Vegetal / IB
Matrícula Unicamp 302656

Anexo 4**DECLARAÇÃO**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicadas ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos à arbitragem que constam da minha Tese de Doutorado, intitulada **O papel dos porta-enxertos cítricos no metabolismo e transporte de fotoassimilados em plantas sob déficit hídrico**, não infringem os dispositivos da Lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 10 de agosto de 2020.

Assinatura: 
Nome do(a) autor(a): **Simone Ferreira da Silva**
RG nº 43.521.806-2

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): **Rafael Vasconcelos Ribeiro**
RG nº 37.792.004-6

Prof. Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro
Depto. Biologia Vegetal / IB
Matricula Unicamp 302656