INSTITUTO AGRONÔMICO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

A RESPOSTA DA FOTOSSÍNTESE À BAIXA TEMPERATURA NOTURNA EM LARANJEIRA 'VALÊNCIA' É DEPENDENTE DO PORTA-ENXERTO

DANIELA FAVERO SÃO PEDRO MACHADO

Orientador: Eduardo Caruso Machado

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração em Tecnologia da Produção Agrícola

Campinas, SP
Abril 2009

Ficha elaborada pela bibliotecária do Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agronômico

M 149r Machado, Daniela Favero São Pedro
A resposta da fotossíntese à baixa temperatura noturna em laranjeira 'Valência' é dependente do porta-enxerto / Daniela Favero São Pedro Machado. Campinas, 2009. 58 fls.

Orientador: Eduardo Caruso Machado
Dissertação (Mestrado em Tecnologia da Produção Agrícola) - Instituto Agronômico

1. *Citrus sinensis* L. 2. *Citrus limonia* L. 3. *Citrus paradisi x Poncirus trifoliata* 4. Laranjeira 'Valência' 5. Porta-enxertos 6. Trocas gasosas 7. Fluorescência da clorofila I. Machado, Eduardo Caruso II. Título

CDD. 634.3

Aos meus pais
Nelva e Abílio (*in memorian*),
por todo amor e dedicação.
DEDICO

À minha filha Carolina e ao meu
marido Ricardo, por todo amor,
paciência e apoio durante a execução
deste trabalho,
OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- A Deus.

- Ao Dr. Eduardo Caruso Machado pela orientação e ensinamentos.

- A minha família, pelo apoio, paciência, em especial ao Ricardo pelo companheirismo, idéias e ajuda sempre que necessário.

- Ao Severino Nogueira pelas idéias e ajuda na montagem do experimento.

- Ao amigo José Rodrigues (Zé) pelo auxílio, idéias, conversas e risadas durante todo experimento e confecção da dissertação.

- Aos professores da área de concentração Tecnologia da Produção Agrícola da PG-IAC, pelos ensinamentos transmitidos.

- Ao Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro e à Dra. Norma de Magalhães Erismann pelas sugestões no decorrer do trabalho.

- A Dra. Ilana Urbano Bron pelas sugestões e conversas.

- Ao Dr. Cristiano Alberto de Andrade pelo auxílio nas análises estatísticas.

- Aos colegas da PG e em especial aos colegas da fisiologia (Marcelo Sekita, Rômulo Ramos, Cristina e Cíntia).

- Ao pessoal do Instituto de Botânica, em especial ao Dr. Emerson Alves da Silva e as alunas Vanessa Pires da Costa e Paola Mitie A. Garcia pelo conhecimento passado a mim nas análises de amido.

- À Pós-Graduação e ao Instituto Agronômico pela oportunidade.

- À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (Fapesp), pela bolsa de estudos concedida e financiamento do projeto.

- A todos aqueles que de uma forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

"Aonde chegamos depende do quanto
libertamos a arte de pensar."

(Augusto Cury)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS..... vii
ÍNDICE DE FIGURAS..... x
ÍNDICE DE TABELAS..... xiii
RESUMO..... xiv
ABSTRACT..... xvi
1 INTRODUÇÃO..... 1
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 2
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 9
3.1 Material Vegetal..... 9
3.2 Experimentos..... 9
3.2.1 Experimento I..... 9
3.2.2 Experimento II..... 9
3.3 Variáveis Medidas e Calculadas..... 12
3.3.1 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*..... 12
3.3.2 Curva A x C_i..... 13
3.3.3 Curva A x Luz..... 16
3.3.4 Limitação estomática da fotossíntese..... 17
3.3.5 Condutividade hidráulica..... 17
3.3.6 Potencial da água da folha..... 18
3.3.7 Teor de carboidratos..... 18
3.3.7.1 Determinação de açúcares solúveis totais..... 19
3.3.7.2 Determinação de sacarose..... 19
3.3.7.3 Determinação de amido..... 20
3.4 Delineamento Estatístico..... 20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 20
4.1 Experimento I..... 20
4.1.1 Curso diário das trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em ambiente natural..... 20
4.2 Experimento II..... 26
4.2.1 Trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e relações hídricas em ambiente controlado..... 26
4.2.2 Variação da assimilação de CO_2 na saturação de luz (A_{maxLuz}), da eficiência quântica (Φ), do ponto de compensação de luz (Γ) e da concentração de CO_2 no cloroplasto (C_c)..... 37
4.2.3 Variação da eficiência máxima de carboxilação ($V_{c,max}$) e da regeneração da RuBP (J_{max})..... 38
4.2.4 Variação dos teores de carboidratos..... 42
5 CONCLUSÕES..... 45
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS…….. 47

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Assimilação de CO_2 ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)
A_c	Fotossíntese limitada pela eficiência de carboxilação
A_i	Assimilação diária de CO_2 ($mmol\ m^{-2}\ d^{-1}$)
ABA	Ácido abscísico
AM	Amido [$mg\ (g\ MS)^{-1}$]
A_{maxCO2}	Assimilação máxima de CO_2 obtida através da curva A x C_i ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)
A_{maxLuz}	Assimilação máxima de CO_2 obtida através da curva A x Luz ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)
A_q	Fotossíntese limitada pela eficiência de regeneração da *RuBP*
AS	Açúcares solúveis [$mg\ (g\ MS)^{-1}$]
AT	Açúcares totais [$mg\ (g\ MS)^{-1}$]
ATP	Adenosina trifosfato
A/C_i	Eficiência aparente de carboxilação ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}\ Pa^{-1}$)
A/C_c	Eficiência de carboxilação ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}\ Pa^{-1}$)
C_a	Concentração de CO_2 no ar ($\mu mol\ de\ CO_2\ mol^{-1}$)
C_c	Concentração de CO_2 no cloroplasto ($\mu mol\ de\ CO_2\ mol^{-1}$)
C_i	Concentração intercelular de CO_2 ($\mu mol\ mol^{-1}$)
DAE	Drenos alternativos de elétrons
DFFFA	Densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)
$DPV_{folha\text{-}ar}$	Diferença de pressão de vapor entre a folha e o ar (kPa)
E	Transpiração ($mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$)
ETR	Transporte aparente de elétrons ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)
FBPase	Frutose-1,6-bisfosfatase
F_o	Fluorescência mínima em tecidos adaptados ao escuro
F_o'	Fluorescência mínima em tecidos iluminados
F_m	Fluorescência máxima em tecidos adaptados ao escuro
F_m'	Fluorescência máxima em tecidos iluminados
F_q'/F_m'	Eficiência operacional do fotossistema II
F_q'/F_v'	Fator de eficiência do fotossistema II
FSI	Fotossistema I
FSII	Fotossistema II
F_v	Fluorescência variável em tecidos adaptados ao escuro

F_v'	Fluorescência variável em tecidos iluminados
F_v/F_m	Eficiência quântica máxima do fotossistema II em tecidos adaptados ao escuro
F_v'/F_m'	Eficiência quântica máxima do fotossistema II em tecidos iluminados
GLU	Glicose
g_s	Condutância estomática (mol m^{-2} s^{-1})
g_i	Condutância interna (mol m^{-2} s^{-1})
K_c	Constante de Michaelis-Menten da Rubisco para carboxilação
K_o	Constantes de Michaelis-Menten da Rubisco para oxigenação
K_L	Condutividade hidráulica (mmol m^{-2} s^{-1} MPa^{-1})
J_C	Fluxo de elétrons destinados para carboxilação da RuBP
J_{max}	Transporte máximo de elétrons para regeneração de RuBP (μmol m^{-2} s^{-1})
J_O	Fluxo de elétrons destinados para oxigenação da RuBP
J_T	Fluxo total de elétrons
MS	Massa seca
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo de piridina fosfato reduzida
NPQ	Coeficiente de extinção não fotoquímica da fluorescência
NPQ_E	Componente de NPQ relacionado à extinção energética
NPQ_I	Componente de NPQ relacionado à extinção fotoinibitória
NPQ_T	Componente de NPQ relacionado à distribuição de energia de excitação entre os dois fotossistemas
O_i	Concentração de oxigênio interna da folha
Q_A	Quinona aceptora de elétrons
Q_A^-	Quinonas em estado reduzido
qP	Coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência
R	Respiração no escuro
R_d	Respiração mitocondrial à luz
Rubisco	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase
RuBP	Ribulose-1,5-bisfosfato
S	Especificidade da Rubisco
*S**	Especificidade aparente da Rubisco
SAC	Sacarose
SBPase	Sedoheptulose-1,7-bisfosfatase

S_L	Limitação estomática (%)
T_{ar}	Temperatura do ar (ºC)
T_f	Temperatura foliar (ºC)
$V_{c,max}$	Eficiência máxima de carboxilação (μmol m^{-2} s^{-1})
ΔpH	Gradiente de pH transtilacoidal
Φ	Eficiência quântica aparente [μmol CO_2 (μmol de fótons)$^{-1}$]
Γ	Ponto de compensação de luz (μmol m^{-2} s^{-1})
Γ^*	Ponto de compensação de CO_2 na ausência de respiração no escuro (μmol m^{-2} s^{-1})
Ψ_{WPD}	Potencial de água na folha medido antes do amanhecer (MPa)
Ψ_{W13}	Potencial de água na folha medido às 13:00 h (MPa)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de tratamentos e das variáveis medidas durante o decorrer do experimento em câmara de crescimento. Controle, temperatura noturna de 20 °C (11 h); frio, temperatura noturna de 8 °C (11 h) e recuperação, temperatura noturna de 20 °C (11 h). Em todos os tratamentos, uma hora antes de ligar as lâmpadas, a temperatura noturna foi elevada para 25°C. 10

Figura 2 - Fotografia ilustrando o experimento com laranjeira 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo' ou sobre citrumeleiro 'Swingle' em câmara de crescimento..... 11

Figura 3 - Exemplo de uma regressão linear forçada através da origem e ajustada por meio da relação entre J_C/J_O e C_i/O, onde J_C e J_O, representam respectivamente o fluxo de elétrons destinados para carboxilação e oxigenação da RuBP e C_i/O a razão entre a fração molar de CO_2 e O_2 no espaço intercelular..... 14

Figura 4 - Exemplo ilustrativo de uma curva A x C_c de laranjeira 'Valência' sobre 'Swingle' controle (20 °C) e após 12 horas de frio noturno (8 °C), a partir do qual se estimou $V_{c,max}$ na fase da curva limitada pela Rubisco (A) e J_{max} na fase limitada pela regeneração de RuBP (B)..... 16

Figura 5 - Curso diário da variação (A) da densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (*DFFFA*), (B) diferença de pressão de vapor entre a folha e o ar ($DPV_{folha-ar}$) e (C) temperatura da folha (T_f) durante o dia 05/02/2008. $DPV_{folha-ar}$ e T_f foram medidos em laranjeira 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle' após uma noite (12h) de tratamento à temperatura de 20 °C e 8 °C na parte aérea. Símbolos indicam a média de cinco repetições (± desvio padrão)..... 21

Figura 6 - Curso diário da assimilação de CO_2 (A) (A, B), condutância estomática (g_s) (C, D), transpiração (E) (E, F) e da eficiência aparente de carboxilação (A/C_i) (G,H) em laranjeira 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo' (A, C, E e G) ou citrumeleiro 'Swingle' (B, D, F e H) após uma noite (12h) de tratamento à temperatura de 20 °C e 8 °C na parte aérea. Símbolos indicam a média de cinco repetições (± desvio padrão)..... 23

Figura 7 - Resposta da assimilação de CO_2 diária (A_i) em laranjeira 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle' após uma noite (12 h) de tratamento à temperatura de 20 °C e 8 °C na parte aérea. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas (Tukey, $p<0,05$) entre as variedades e letras minúsculas as diferenças entre os tratamentos na mesma variedade de porta-enxerto. Colunas indicam a média de cinco repetições (±

desvio padrão)..... 24

Figura 8 - Resposta da (A, B) eficiência quântica máxima do *FSII* (F_v/F_m) e da (C, D) eficiência operacional do *FSII* (F_q'/F_m') em laranjeira 'Valência' sobre (A, C) limoeiro 'Cravo' ou (B, D) citrumeleiro 'Swingle' após uma noite (12 h) de tratamento à temperatura de 20 °C e 8 °C na parte aérea. Símbolos indicam a média de cinco repetições (± desvio padrão)..... 25

Figura 9 - Variação (A) da assimilação de CO_2 (*A*), (B) transpiração (*E*); (C) condutância estomática (g_s) e (D) condutância interna (g_i), (E) concentração de CO_2 no cloroplasto (C_c) e (F) eficiência instantânea de carboxilação (A/C_c), em *DFFFA* de 1300 μmol m^{-2} s^{-1}, em função da temperatura noturna em laranjeira 'Valência' enxertada em limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle', sendo o dia 1 controle (20 °C), dias 2 a 4 frio noturno (8 °C) e dias 5 a 6 retorno da temperatura para 20 °C. Símbolos indicam a média de cinco repetições (± desvio padrão)..... 27

Figura 10 - Variação da limitação estomática da fotossíntese (S_L, %) em função da temperatura noturna em laranjeira 'Valência' enxertada em limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle', sendo o dia 1 controle (20 °C), dias 2 a 4 frio noturno (8 °C) e dias 5 a 6 retorno da temperatura para 20 °C. Símbolos indicam a média de cinco repetições (± desvio padrão)..... 30

Figura 11 - Variação da (A) eficiência quântica máxima do *FSII* (F_v/F_m) e eficiência quântica máxima do *FSII* sob *DFFFA* (F_v'/F_m'), (B) eficiência operacional do *FSII* (F_q'/F_m'), (C) coeficiente de extinção não-fotoquímico (*NPQ*), (D) fator de eficiência do *FSII* (F_q'/F_v')), (E) transporte aparente de elétrons (*ETR*) e do (F) dreno alternativo de elétrons (*DAE*) , em *DFFFA* de 1300 μmol m^{-2} s^{-1}, em função da temperatura noturna em laranjeira 'Valência' enxertada em limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle', sendo o dia 1 controle (20 °C), dias 2 a 4 frio noturno (8 °C) e dias 5 a 6 retorno da temperatura para 20 °C. Símbolos indicam a média de cinco repetições (± desvio padrão)..... 33

Figura 12 - Variação da (A) assimilação máxima de CO_2 (A_{max}), (B) eficiência máxima de carboxilação ($V_{c,max}$)**,** (C) transporte máximo de elétrons para regeneração de *RuBP* (J_{max}) e da (D) razão $J_{max}/V_{c,max}$ em função da temperatura noturna em laranjeira 'Valência' enxertada em limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle', sendo o dia 1 controle (20 °C), dias 2 a 4 frio noturno (8 °C) e dias 5 a 6 retorno da temperatura para 20 °C. Símbolos indicam a média de cinco repetições (± desvio padrão)..... 39

Figura 13 - Variação dos (A) açúcares solúveis (*AS*), (B) sacarose (*SAC*), (C) amido (*AM*) e (D) açúcares totais (*AT*) em função da temperatura noturna em laranjeira 'Valência' enxertada em limoeiro 'Cravo' ou

citrumeleiro ‘Swingle’, sendo o dia 1 controle (20 °C), dias 2 a 4 frio noturno (8 °C) e dias 5 e 6 retorno da temperatura para 20 °C. Colunas indicam a média de seis repetições (± desvio padrão)..... 43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Variação do potencial hídrico foliar antes do amanhecer (Ψ_{WPD}, MPa) e às 13 horas (Ψ_{W13}, MPa) em função da temperatura noturna em laranjeira 'Valência' enxertada em limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle', sendo o dia 1 controle (20 °C), dias 2 e 4 frio noturno (8 °C) e dia 6, dois dias após retorno da temperatura para 20 °C. Média de três repetições..... 31

Tabela 2 - Variação da condutividade hidráulica (K_L, mmol m^{-2} s^{-1} MPa^{-1}) em função da temperatura noturna em laranjeira 'Valência' enxertada em limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle', sendo o dia 1 controle (20 °C), dias 2 e 4 frio noturno (8 °C) e dia 6 retorno da temperatura para 20 °C..... 32

Tabela 3 - Assimilação de CO_2 na saturação de luz (A_{maxLuz}, μmol m^{-2} s^{-1}), ponto de compensação de luz (Γ, μmol m^{-2} s^{-1}), eficiência quântica [Φ, mol de fótons (mol CO_2)$^{-1}$] e concentração de CO_2 no cloroplasto (C_c, μmol de CO_2 mol^{-1}) em laranjeira 'Valência' enxertada em limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle', submetidos a diferentes temperaturas noturnas por diferentes tempos e na recuperação..... 37

MACHADO, Daniela Favero São Pedro. **A resposta da fotossíntese à baixa temperatura noturna em laranjeira 'Valência' é dependente do porta-enxerto.** 2009. 58f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Pós-Graduação - IAC.

RESUMO

As laranjeiras apresentam folhas verdes em todas as estações, mantendo ativa sua capacidade de fotossintetizar durante todo o ano e é submetida à variação acentuada dos fatores ambientais. A ocorrência de baixa temperatura do ar durante o período noturno seguido de dia claro e quente ocorre freqüentemente no Estado de São Paulo, principalmente durante o inverno. Esta condição causa redução na assimilação de CO_2 em algumas espécies cultivadas, como a mangueira e o cafeeiro, afetando a produtividade. Este estudo tem como hipóteses que em laranjeiras: 1) a ocorrência de baixa temperatura noturna afeta a fotossíntese e b) diferentes porta-enxertos conferem diferentes respostas da fotossíntese a ocorrência de frio noturno. O objetivo foi analisar estas hipóteses avaliando o efeito da baixa temperatura noturna sobre os processos difusivos, bioquímicos e fotoquímicos da fotossíntese em laranjeira 'Valência' sobre dois porta-enxertos: limoeiro 'Cravo' e citrumeleiro 'Swingle'. Foram realizadas medidas do curso diário da fotossíntese em ambiente natural, em laranjeiras com seis meses, cultivadas em sacolas plásticas com capacidade para 5 L de substrato e submetidas a dois regimes de temperatura noturna somente na parte aérea: 20 °C e 8 ^{o}C. Em câmara de crescimento também foram feitas curvas de resposta da assimilação de CO_2 em função da variação da luz e da concentração de CO_2 no ar, em laranjeiras com seis meses submetidas a dois regimes de temperatura noturna na parte aérea somente: 25 °C/ 20 °C - dia/noite (controle) e 25 °C/ 8 °C - dia/noite (baixa temperatura noturna) durante três dias consecutivos, seguido de um período de recuperação de dois dias no regime 25/ 20 °C em todas as plantas. Foram realizadas medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, quantificação de açúcares solúveis, sacarose e amido em folhas totalmente expandidas. Durante o tratamento de baixa temperatura noturna a assimilação de CO_2 (A), a condutância estomática (g_s), condutância interna (g_i) e a transpiração (E) da laranjeira sobre 'Cravo' decresceram mais que sobre 'Swingle', tanto em campo quanto em câmara de crescimento. Sob baixa temperatura houve ainda redução da concentração de CO_2 no cloroplasto (C_c), do transporte máximo de elétrons (J_{max}) e da eficiência máxima de carboxilação da Rubisco ($V_{c,max}$) e aumento da concentração de

amido em ‘Cravo’. No retorno da temperatura noturna a 20 °C, no experimento em câmara de crescimento, A, g_s, g_i, E, C_c, $V_{c,max}$ e J_{max} *em* ‘Cravo’ não se recuperaram, já o amido retornou aos valores do controle. A laranjeira sobre ‘Cravo’ sofreu fotoinibição caracterizada pela queda da eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) e queda na eficiência operacional do fotossistema II (F_q'/F_m') durante o tratamento com frio, enquanto que em Swingle isto não ocorreu. Em laranjeira sobre ‘Swingle’ no retorno da temperatura noturna a 20 °C todas variáveis medidas recuperaram-se ao nível do controle, exceto $V_{c,max}$, que permaneceu abaixo do controle. O porta-enxerto ‘Swingle’ confere uma tolerância relativamente maior da fotossíntese ao frio noturno em laranjeira ‘Valência’ em relação ao porta-enxerto ‘Cravo’.

Palavras-Chave: *Citrus sinensis* L., *Citrus limonia* L., *Citrus paradisi x Poncirus trifoliata*, porta-enxertos, trocas gasosas, fluorescência da clorofila

MACHADO, Daniela Favero São Pedro. **The photosynthesis response in low night temperature in 'Valência' orange trees are rootstock dependents.** 2009. 58f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Pós-Graduação - IAC.

ABSTRACT

Orange trees have green leaves in all seasons, maintaining its ability to photosynthesis active throughout the year and is subjected to marked variation in environmental factors. The occurrence of low air temperature during the night followed by hot and clear day is frequently in the State of São Paulo, mainly during the winter. This condition causes the reduction of CO_2 assimilation in some crops such as mango and coffee, affecting productivity. This study has as hypothesis that in orange trees: 1) the occurrence of low night temperature affects photosynthesis and b) different rootstocks, give different photosynthesis responses to cold night occurrence. The objective was to examine these hypotheses by evaluating the effect of low night temperature on the diffusive, biochemical and photochemical processes of photosynthesis in 'Valencia' orange tree on two rootstocks: 'Cravo' and 'Swingle'. We measured the daily course of photosynthesis in natural environment, in orange trees with six months under two regimes of night temperature in shoots only: 20 °C and 8 °C. We also made the response curves of CO_2 assimilation as a function of light variation and CO_2 concentration in air in the growth chamber, in orange trees with six months, grown in plastic bags with 5 L substrate capacity and under two schemes of night temperature in the shoot only: 25 °C/ 20 °C - day / night (control) and 25 °C/ 8 °C - day/ night (low night temperature) for three consecutive days, followed by a recovery period of two days in the 25 °C/ 20 °C in all plants. We measured gas exchange and fluorescence of chlorophyll *a*, soluble sugars, sucrose and starch in fully expanded leaves. During the low night temperature the CO_2 assimilation (A), stomatal conductance (g_s), internal conductance (g_i) and transpiration (E) in 'Valencia' on 'Cravo' decreased more than on 'Swingle', both in the field and in the growth chamber. Under low temperature, there was also a reduction in the CO_2 concentration inside the chloroplast (C_c), the maximum electron transport (J_{max}) and the maximum carboxylation efficiency of Rubisco ($V_{c,max}$) and an increase in the starch concentration on 'Cravo'. Returning the night temperature to 20 °C in the growth chamber experiment, there was not a recovery of A, g_s, g_i, E, C_c, $V_{c,max}$ and J_{max} in 'Cravo', however starch returned to control values. The orange tree on 'Cravo' suffered

photoinhibition characterized by the decrease of the maximum quantum efficiency of photosystem II F_v/F_m and decrease in photosystem II operating efficiency (F_q'/F_m') during the cold treatment, but did not occur on ‘Swingle’. In orange trees on ‘Swingle’ after returning the night temperature to 20 °C, all measured variables recovered to the control values, except $V_{c,max}$, that remained lower than the control value. The rootstock ‘Swingle’ gives a relative higher photosynthesis tolerance to low night temperature to ‘Valencia’ orange trees than rootstock ‘Cravo’.

Key Words: *Citrus sinensis* L., *Citrus limonia* L., *Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*, rootstocks, gas exchange, chlorophyll fluorescence

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o principal produtor mundial de laranja sendo o Estado de São Paulo responsável por 80% da produção nacional. Devido em grande parte à produção paulista, o país ocupa posição de destaque internacional no mercado de citros, sendo responsável por aproximadamente 37% da produção de laranjas frescas (1º colocado), 51% da produção e 83% da exportação de suco concentrado de laranja (1º colocado) no mundo (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2005).

Apesar da importância da citricultura, a produtividade média dos pomares é baixa. Porém, a crescente competitividade pelo mercado de suco cítrico concentrado e por frutos com qualidade para consumo *in natura* requer melhorias na eficiência global do processo da produção.

A produtividade resulta de uma complexa cadeia de eventos relacionados aos efeitos das condições climáticas sobre a produção fotossintética, o crescimento da copa, a indução e a intensidade de florescimento, a fixação dos frutos e a massa e número final de frutos maduros colhidos, além da eficiência do uso de água e de nutrientes (GOLDSCHMIDT, 1999; PRADO, 2006; PRADO et al., 2007). Os conhecimentos básicos das interações dos processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares e os efeitos dos fatores ambientais sobre eles possibilitam-nos adotar técnicas de manejo da cultura de forma mais adequada visando à maior eficiência produtiva.

As laranjeiras apresentam folhas verdes em todas as estações, mantendo ativa sua capacidade de fotossintetizar durante todo o ano. No entanto, a planta em desenvolvimento é submetida à grande variação estacional na disponibilidade de água, de radiação solar, de temperatura do ar e do solo tendo assim desenvolvido mecanismos para adaptar-se a estas variações (GOLDSCHMIDT, 1999; MACHADO et al., 2002; RIBEIRO et al., 2006; RIBEIRO & MACHADO, 2007; RIBEIRO et al., 2009a, b). No decorrer de um ano, tais variações no ambiente acarretam variações nas respostas dos diversos processos fisiológicos incluindo a eficiência fotossintética (MACHADO et al., 2002; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO & MACHADO, 2007).

Sob condições de campo, a produtividade depende da capacidade das plantas se adaptarem às mudanças ambientais e a estresses, por meio de mecanismos que conferem tolerância. A instalação de novos pomares a propagação de laranjeiras ocorre com o uso de porta-enxertos de diversas espécies cítricas. Porta-enxertos diferentes conferem

diferentes adaptações e respostas às variações das condições ambientais e resistência a pragas e moléstias (POMPEU Jr., 2005).

Tem-se observado que a assimilação de CO_2 durante o inverno é significativamente menor que na primavera e verão (MACHADO et al., 2002; MEDINA et al., 1999; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO & MACHADO, 2007; RIBEIRO et al., 2009a, b). A redução da fotossíntese durante o inverno pode ser induzida por noites frias, quando as condições durante o dia não são limitantes (MACHADO et al., 2002; RIBEIRO et al., 2009a, b), como já se verificou em citros e outras espécies perenes (ALLEN & ORT, 2001; ALLEN et al., 2000; RIBEIRO et al., 2009a, b). Baixas temperaturas do solo causam efeitos sobre a fotossíntese e relações hídricas (MAGALHÃES FILHO, 2009).

Neste estudo examinaremos as hipóteses: 1) que a ocorrência de baixa temperatura noturna afeta a fotossíntese e 2) diferentes porta-enxertos conferem diferentes respostas da fotossíntese à ocorrência de frio noturno. Assim teve-se como objetivos analisar o efeito da baixa temperatura noturna na parte aérea da planta, sobre os processos difusivos, bioquímicos e fotoquímicos da fotossíntese em laranjeira 'Valência' sobre dois tipos de porta-exertos, limoeiro 'Cravo' e citrumeleiro 'Swingle'.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os citros são propagados preferencialmente sobre porta-enxertos. Diferentes porta-enxertos podem afetar a resposta da fotossíntese ao ambiente (MEDINA & MACHADO, 1999; POMPEU Jr., 2005). A adaptação das laranjeiras ao frio pode ser influenciada pelo uso de porta-enxertos. Esses porta-enxertos induzem à copa alterações no crescimento, tamanho, produção, precocidade de produção, teores de açúcares, componentes do suco, permanência de frutos na planta, síntese e utilização de nutrientes, transpiração, tolerância à salinidade, à seca, ao frio, a doenças e pragas. Plantas sobre citrumeleiro 'Swingle', tangerineira 'Cleópatra' e trifoliata são mais tolerantes ao frio que as enxertadas em limoeiro 'Cravo', 'Volkameriano' e 'Milan' (POMPEU Jr., 2005).

As fases fenológicas das laranjeiras estão condicionadas à variação climática (TUBELIS, 1995). No planalto paulista a partir de abril até agosto as precipitações e a temperatura do ar reduzem e, consequentemente, a atividade de crescimento é pouco

intensa. Após agosto-setembro, com o aumento da temperatura e ocorrência de precipitações acima de 20 mm iniciam-se as brotações e floração (TUBELIS, 1995). A partir de outubro, com temperaturas mais elevadas tem início a estação chuvosa que se estende até março. Neste período a planta frutifica, os ramos e os frutos crescem vigorosamente.

Em laranjeiras, ocorrem dois fluxos principais de crescimento da parte aérea. Nos ramos de primavera e de verão ocorrem o florescimento e frutificação. No fluxo de primavera há crescimento de ramos, inflorescência com folhas e inflorescência sem folhas (PRADO, 2006; PRADO et al., 2007). No fluxo de verão, se houver uma carga grande de frutos, o crescimento vegetativo é pequeno ou mesmo ausente, sugerindo prioridade do crescimento dos frutos. A presença de frutos afeta o florescimento, devido ao efeito aditivo da competição por fotoassimilados e o efeito inibitório dos frutos ao florescimento (GARCIA-LUIZ et al., 1995; GOLDSCHMIDT, 1999; PRADO, 2006; PRADO et al., 2007). O crescimento das raízes, por outro lado, ocorre nos períodos intercalares à parte aérea (BEVINGTON & CASTLE, 1985).

A fotossíntese é o principal mecanismo que transforma a energia solar em energia química utilizável (*ATP*, adenosina tri-fosfato) e em potencial redox (*NADPH*, nicotinamida adenina dinucleotídeo de piridina fosfato reduzida), nas membranas dos tilacóides no cloroplasto. No estroma dos cloroplastos, *ATP* e *NADPH* são utilizados na redução do CO_2 à triose-P. Em citros a sacarose é a principal forma de transporte de carboidrato das folhas para os demais órgãos. O amido é uma reserva estável e insolúvel de carboidratos presente nas plantas. Tanto a sacarose como o amido são sintetizados na folha a partir de triose-P geradas no Ciclo de Calvin (BECK & ZIGLER, 1989), quando a demanda de carboidratos pelos drenos é alta a triose-P é destinada preferencialmente para a síntese de sacarose. Por outro lado, baixa demanda de carboidratos favorece a utilização de triose-P na síntese de amido. A baixa demanda por carboidrato pelos drenos pode causar acúmulo de amido no cloroplasto tendo um efeito inibidor sobre a fotossíntese (IGLESIAS et al., 2003). O acúmulo de reservas na folha pode causar um decréscimo na atividade da fotossíntese. Por outro lado, alta demanda de carboidratos, como na época de enchimento de frutos e brotações intensas, estimula a atividade fotossintética (GOLDSCHIMIDT & KOCH, 1996; IGLESIAS et al., 2003; RIBEIRO & MACHADO, 2007).

Durante a fotossíntese há a tendência de maximizar a utilização da energia luminosa disponível para otimizar o uso de carbono e de nitrogênio e minimizar os

possíveis danos quando há excesso de absorção de energia (ÖQUIST & HUNER, 2003). Isto envolve mecanismos de regulação da fotossíntese no sentido de manter o balanço de energia entre a luz absorvida pelas reações primárias da fotossíntese nos fotossistemas I (*FSI*) e II (*FSII*), a síntese de *ATP* e *NADPH* e sua utilização no metabolismo e crescimento. Este balanço de energia entre os processos biofísicos e bioquímicos pode ser perturbado, por exemplo, se ocorrer abaixamento de temperatura e queda na atividade das enzimas do ciclo de Calvin. No entanto, as plantas apresentam mecanismos que tendem a manter a fotoestase, minorando os efeitos deletérios mesmo sob excesso de energia (ERISMANN et al., 2006; ÖQUIST & HUNER, 2003).

Em qualquer fase do desenvolvimento, quando a demanda por carboidratos for menor que a produção de fotoasssimilados o excesso é armazenado em folhas, ramos e raízes, e quando a demanda for maior as reservas podem ser remobilizadas para órgãos em crescimento (GOLDSCHMIDT, 1999). Há uma relação entre a produção fotossintética, o acúmulo de reservas e a remobilização das reservas durante o decorrer de um ano (GOLDSCHMIDT & GOLOMB, 1982; RIBEIRO, 2006). Obviamente a queda da fotossíntese em qualquer fase do desenvolvimento implica em prejuízo nos processos de crescimento da planta.

A fotossíntese máxima em laranjeiras nas condições do Estado de São Paulo ocorre nas estações quentes e úmidas (verão e primavera), decaindo progressivamente até alcançar valores mínimos nos meses de inverno, frio e seco (MACHADO et al., 2002; MEDINA, 2002; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO et al., 2009a, b). A produção fotossintética diária, em um dia claro de verão/primavera, varia entre 1,8 e 2,5 vezes maior que no inverno e entre 1,3 a 1,5 vezes maior que no outono, dependendo da região do Estado de São Paulo (MACHADO et al., 2001; 2002; MEDINA, 2002; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO & MACHADO, 2007). Estes valores foram observados em plantas sob irrigação, estando eles relacionados às variações na temperatura e no déficit de pressão de vapor de ar, ao comprimento do dia e à fase de desenvolvimento da planta (MACHADO et al., 2001; 2002; 2005; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO & MACHADO, 2007). Em plantas não irrigadas e sujeitas ao estresse hídrico estas diferenças tornam-se ainda maiores e mais importantes (MACHADO et al., 2001; MEDINA, 2002; RIBEIRO, 2006).

Neste trabalho temos interesse especial sobre o efeito causado pelo abaixamento da temperatura durante o inverno no processo fotossintético. No inverno ocorre abaixamento da temperatura tanto durante o dia como à noite. Os efeitos do frio na

presença de luz e no escuro acarretam respostas diferentes em alguns aspectos. Esse resfriamento pode atingir determinados processos, tais como, a fotofosforilação nas membranas dos tilacóides, o ciclo de redução do carbono no estroma, o uso de carboidratos e o suprimento de CO_2 do cloroplasto através do estômato (ALLEN & ORT, 2001). No inverno no Estado de São Paulo, principalmente na região Norte e Noroeste, onde se concentra a maior parte da citricultura, é freqüente a ocorrência de dias com temperaturas relativamente altas e noites frias durante o inverno. O estudo do efeito do abaixamento da temperatura à noite é importante, havendo dúvidas sobre os mecanismos envolvidos no controle da fotossíntese em laranjeiras nesta situação.

Nos meses de inverno, em plantas sob irrigação, a menor taxa de fotossíntese pode estar relacionada tanto com a menor demanda por fotoassimilados, devido à menor taxa de crescimento, como com a diminuição da temperatura do ar que ocorre principalmente durante a noite, da temperatura no solo e do comprimento do dia (MACHADO et al., 2001; 2002; 2005; RIBEIRO & MACHADO, 2007; RIBEIRO et al., 2009a, b).

BEVINGTON & CASTLE (1985) observaram que a variação do crescimento anual da parte aérea e das raízes de laranjeiras está relacionada com a variação da temperatura do ar e do solo. A menor taxa de fotossíntese no inverno pode estar relacionada com a menor capacidade de regeneração da ribulose-1,5- bisfosfato (*RuBP*), com a baixa eficiência de carboxilação, com processos fotoquímicos e processos difusivos (ALLEN & ORT, 2001; RIBEIRO & MACHADO, 2007; RIBEIRO et al., 2009a, b) .

Em uma escala temporal maior, i.e. sazonal, a atividade fotossintética dos citros pode ser regulada pelo metabolismo da planta, que por sua vez é influenciado pelo ambiente. Durante o inverno, o crescimento das laranjeiras diminui acentuadamente devido às baixas temperaturas (KHAIRI & HALL, 1976; REUTHER, 1973), evidenciando o papel regulatório da temperatura do ar em relação ao crescimento. Porém, há atividade fotossintética durante o inverno, mesmo que reduzida, frente à baixa demanda pode favorecer o acúmulo de reservas (fotoassimilados) e assim causar a inibição da taxa de assimilação de CO_2 (AZCÓN-BIETO, 1983; IGLESIAS et al., 2002). De fato, há um acúmulo de carboidratos nas folhas no período de inverno (PRADO, 2006; PRADO et al., 2007; RIBEIRO, 2006). Porém, em citros, observou-se que a taxa de assimilação de CO_2 está mais relacionada à dinâmica diária de produção e de consumo de carboidratos na folha e não propriamente ao maior teor de reservas

(RIBEIRO et al., 2005; RIBEIRO & MACHADO, 2007). No verão tanto a produção como o consumo e o teor de carboidratos, nas folhas, são bem mais elevados que no inverno. Assim, há pontos ainda conflitantes que necessitam serem esclarecidos na relação fonte-dreno em laranjeiras.

Sob baixa temperatura há decréscimo da condutância estomática em citros (MACHADO et al. 2002; 2005; MEDINA, 2002; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO et al., 2009a). Tal queda na condutância pode estar relacionada a dois aspectos: primeiro devido à queda na atividade fotossintética, com consequente aumento da concentração intercelular de CO_2 (*Ci*), causando fechamento parcial dos estômatos. Alternativamente, o estômato em si poderia ser o alvo inicial do resfriamento e seu fechamento causar redução em *Ci*, acarretando a queda na fotossíntese (ALLEN et al., 2000; ALLEN & ORT, 2001).

A condutividade hidráulica pode mudar mais ou menos rapidamente e reversivelmente, para se adaptar às mudanças ambientais e ao estresse. Em particular, a condutividade do ramo pode reagir ao estresse por um processo "rápido" – formação de embolismo que interrompe a coluna de água e reduz a condutividade (TYREE & SPERRY, 1989) e por um processo "lento" – modificações do crescimento radial dos vasos e, como consequencia, do tamanho dos vasos (LOVISOLO & SCHUBERT, 1998). Durante o inverno eventos de resfriar e aquecer pode induzir embolismo nos vasos do xilema e redução da condutividade hidráulica em plantas lenhosas de ambientes temperados (COCHARD & TYREE 1990, SPERRY & SULLIVAN 1992). Tem-se observado que a embolia induzida pelo congelamento pode limitar o crescimento, sobrevivência e distribuição geográfica das plantas (LANGAN et al., 1997; POCKMAN & SPERRY, 1997; SPERRY & SULLIVAN, 1992).

Outro fator que poderia estar relacionado à queda da fotossíntese no inverno é a menor temperatura do solo (sistema radicular) no inverno em relação ao verão e primavera (LYR, 1996; MAGALHÃES FILHO, 2009; RIBEIRO et al., 2009a, b). É comum observar no inverno dias com temperatura do ar relativamente alta durante o dia, porém devido ao abaixamento da temperatura noturna a temperatura do solo permanece baixa. Assim, situação de temperatura do ar alta e do solo baixa não é incomum durante o inverno. A baixa temperatura do solo pode afetar a fotossíntese de várias formas. Sob alta radiação pode ocorrer fotoinibição (DELUCIA et al., 1991), possivelmente devido à queda da absorção de água e favorecimento ao fechamento parcial dos estômatos, à semelhança do que ocorre sob déficit hídrico. DAY et al.

(1991) observaram em *Pinus* que sob temperatura baixa no sistema radicular há fechamento parcial dos estômatos causando queda da fotossíntese. Já outros autores, observaram também em *Pinus*, que sob baixa temperatura a queda da fotossíntese estava relacionada em parte a fatores estomáticos e em parte a fatores bioquímicos (STRAND et al., 2002). Em plantas com o sistema radicular sob baixa temperatura, há queda na condutância estomática, possivelmente relacionada com o decréscimo na atividade das raízes (DAY et al., 1991; STRAND et al., 2002).

É comum também, observar-se no Estado de São Paulo, durante o inverno, temperaturas noturnas baixas e durante o dia aumento da temperatura até valores relativamente altos (RIBEIRO, 2006). Observaram-se (ALLEN et al., 2000; FLEXAS et al., 1999; RIBEIRO et al., 2009a, b), em condições de temperaturas noturnas baixas, queda acentuada da fotossíntese em mangueira, videira e citros. Nestes casos a queda de fotossíntese parece estar relacionada tanto a fatores difusivos quanto metabólicos. RIBEIRO et al., (2009a, b), comparando a fotossíntese no inverno e verão em laranjeira 'Valência', em Piracicaba, SP concluíram que a queda da fotossíntese no inverno estaria relacionada com a queda da temperatura noturna do ar e do solo, uma vez que a variação da temperatura diária não era limitante à fotossíntese. Este experimento foi conduzido em plantas em vasos, de forma que as temperaturas do solo e do ar ficam aproximadamente iguais seguindo o padrão diário de variação da temperatura do ar. Desta forma, possivelmente os resultados observados por RIBEIRO et al. (2009a, b) representam o somatório dos efeitos do frio noturno na parte aérea mais a do substrato, não sendo possível, neste caso, isolá-los. No entanto, sob condições de campo, a variação diária e sazonal da temperatura do solo e do ar seguem padrões diferentes (PEREIRA et al., 2002; RIBEIRO, 2006), ou seja, podem-se observar temperaturas noturnas do ar e do solo diferentes. Assim é importante que se separe os efeitos da baixa temperatura noturna sobre a parte aérea e radicular da planta (ALLEN et al., 2000; ALLEN & ORT, 2001).

Outro aspecto importante relacionado com a queda da fotossíntese no inverno pode estar relacionado com a frutificação em laranjeiras. Durante o inverno, em laranjeira, apesar da queda na assimilação de CO_2, há acúmulo de reservas nas folhas (PRADO et al., 2007; RIBEIRO, 2006). Neste mesmo período há indução do florescimento, em função do déficit hídrico e/ou frio. O florescimento ocorre ao redor de setembro com o início das chuvas e aumento da temperatura. As laranjeiras florescem em abundância, mas o número de frutos finalmente colhidos, em geral,

representa menos que 2% das flores formadas (MONSELISE, 1986; PRADO et al., 2007). A massiva abscisão de flores e de frutos é interpretada como um mecanismo de ajuste do número de frutos à capacidade de suprimento de carboidratos pela planta (GOLDSCHMIDT & KOCH, 1996). No hemisfério sul, a abscisão dos frutos ocorre entre outubro e dezembro. Vários fatores estão envolvidos neste processo de abscisão, dentre eles destaca-se a disponibilidade de fotoassimilados e/ou de reservas (MACHADO et al., 2002; PRADO, 2006; PRADO et al., 2007; SYVERTSEN & LLOYD, 1994).

Variando-se artificialmente o suprimento de carboidratos na planta IGLESIAS et al. (2003) demonstraram que eles podem ser um dos fatores limitantes à fixação de frutos. Em São Paulo, verificou-se que a fixação de frutos também pode ser limitada pela disponibilidade de carboidratos (PRADO, 2006; PRADO et al., 2007). As reservas de carboidratos das folhas durante o período de queda fisiológica dos frutos decaem acentuadamente, evidenciando que este substrato foi utilizado neste processo. No entanto, as reservas disponíveis somadas à fotossíntese corrente não são suficientes para sustentar o grande número de frutos, mas as plantas com maiores teores de reservas apresentam maior percentagem de fixação de frutos (PRADO, 2006; PRADO et al., 2007). É possível, desta forma que condições que favoreçam uma maior fotossíntese no inverno possam favorecer uma maior fixação de frutos.

Parece assim que a queda na assimilação de CO_2 no inverno pode ser devida tanto a fatores relacionados ao estômato, como a fatores bioquímicos e fotoquímicos, ou ainda devido à queda da demanda por fotoassimilados no período de inverno (MACHADO et al., 2002). A baixa demanda de fotoassimilados devida à baixa temperatura pode afetar o consumo de carboidratos e causar aumento do teor de carboidratos solúveis, tendo assim um efeito retro inibidor sobre a fotossíntese (IGLESIAS et al., 2002; SOUZA et al., 2004). Porém, há poucos estudos investigando mais detalhadamente os efeitos da baixa temperatura em laranjeiras. Desta forma estudos que envolvam as relações entre fotossíntese e baixa temperatura assumem relevância.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Foram utilizadas laranjeiras 'Valência' (*Citrus sinensis* L.) sobre duas espécies de porta-enxertos: limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia* L.) ['Valência' sobre 'Cravo'] e citrumeleiro Swingle (*Citrus paradisi x Poncirus trifoliata*) ['Valência' sobre 'Swingle'] com seis meses de idade plantados em sacos plásticos pretos com perfurações e capacidade para 5L de substrato. As plantas foram obtidas pelo sistema de formação de mudas certificadas e permaneceram em casa de vegetação recebendo irrigação diariamente. Aplicou-se duas vezes por semana 400 mL de solução nutritiva diluída (10 mL de solução estoque por litro de água). A solução estoque era composta por: 80 g/ L de $Ca(NO_3)_2$, 33,2 g/ L $Mg(NO_3)_2$, 0,18 g/ L de $MnSO_4$, 0,106 g/ L de $ZnSO_4$, 1,54 g/ L de Fe EDTA, 5,58 mL/ L de Cu EDTA (líquido), 36 g/ L de KNO_3, 8g/ L de $NH_4H_2PO_4$ (fosfato monoamônio), 12 g/ L de K_2SO_4, 1 mL/ L de solução de $NaMoO_4$.

Foram conduzidos dois experimentos: um em condições naturais e outro em câmara de crescimento.

3.2 Experimentos

3.2.1 Experimento I

Neste experimento mediu-se o curso diário da fotossíntese (trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*) sob condições naturais no dia 05/02/08. Na noite anterior às medidas as laranjeiras 'Valência' sobre 'Cravo' e sobre 'Swingle' foram submetidas a dois tratamentos de temperatura na parte aérea somente durante 12 horas: a) temperatura noturna de 8 °C e b) temperatura noturna de 20 °C. A temperatura das raízes, em ambos os tratamentos, foram mantidas a temperatura de 20 °C. Na manhã seguinte (7:00 h) as plantas foram transferidas para condições naturais e as medidas de fotossíntese foram feitas em folhas totalmente expandidas, de aproximadamente 2 meses, em intervalos de 1,5 horas no período compreendido entre 8:00 e 16:00 h. A partir das dinâmicas diurnas de assimilação de CO_2, foram calculados os valores diários integrados (A_i, mmol $m^{-2}d^{-1}$).

3.2.2 Experimento II

As plantas (laranjeiras ‘Valência’ sobre ‘Cravo’ e ‘Valência’ sobre ‘Swingle’) foram transferidas da casa de vegetação para a câmara de crescimento (PGR14, Conviron, Canadá) onde permaneceram durante todo o experimento, nas condições descritas a seguir. No primeiro dia (controle) as condições ambientais na câmara de crescimento foram (dia/ noite): fotoperíodo 12h/ 12h, temperatura do ar 25±1/ 20±1 °C, umidade relativa de 65 %, densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (*DFFFA*) de 800 μmol m^{-2} s^{-1} (12 h). Em todos os dias seguintes do experimento as condições do ambiente no período de luz foram iguais, variando somente a temperatura noturna da seguinte forma: na segunda noite a temperatura noturna foi abaixada de 20 °C para 8 °C e mantida por 11 h seguidas, quando ainda no escuro foi elevada para 25±1 °C, permanecendo assim por uma hora no escuro, mantendo as outras variáveis ambientais inalteradas. O reaquecimento antes de ligar as lâmpadas foi para evitar o efeito da luz (fotooxidação) quando as plantas ainda estão à baixa temperatura (ALLEN et al., 2000). Esta condição de baixa temperatura noturna foi mantida por três noites consecutivas, ou seja, da 2ª até a 4ª noite (tratamento frio noturno). Em seguida, na 5ª e 6ª noites a temperatura noturna foi reajustada para 20 °C (recuperação). Ou seja, o ciclo experimental dentro da câmara de crescimento teve a duração de 6,5 dias consecutivos (Figura 1).

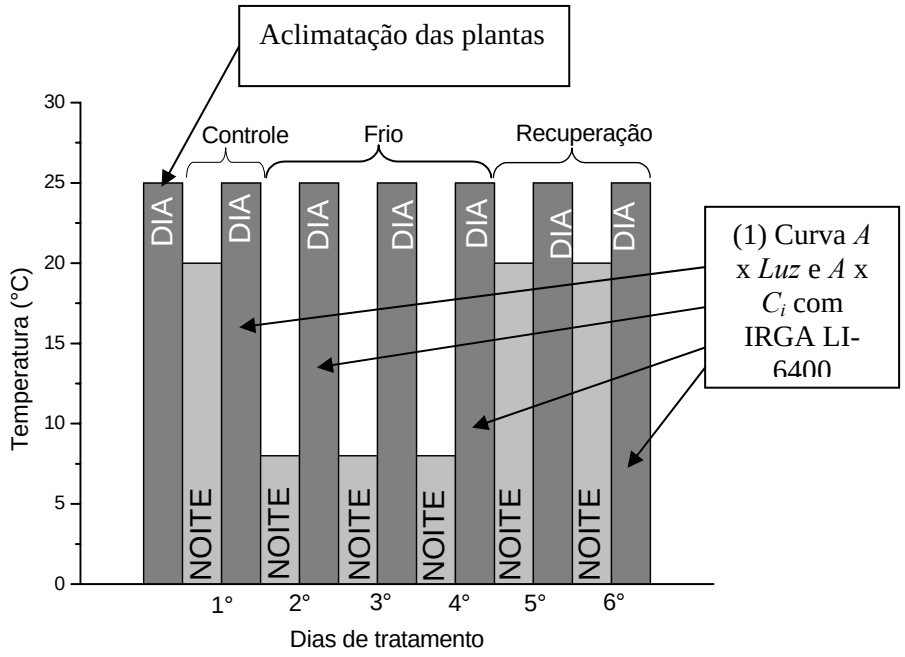

Figura 1- Representação esquemática do ciclo de tratamentos e das variáveis medidas durante o decorrer do experimento em câmara de crescimento. Controle, temperatura noturna de 20 °C (11 h); frio, temperatura noturna de 8 °C (11 h) e recuperação, temperatura noturna de 20 °C (11 h). Em todos os tratamentos, uma hora antes de ligar as lâmpadas, a temperatura noturna foi elevada para 25°C.

Em todo o período experimental, independente da temperatura do ar, o sistema radicular das plantas, protegido por sacos plásticos, ficou imerso dentro de um recipiente repleto de água para manter a temperatura das raízes e do substrato a 20 °C (Figura 2).

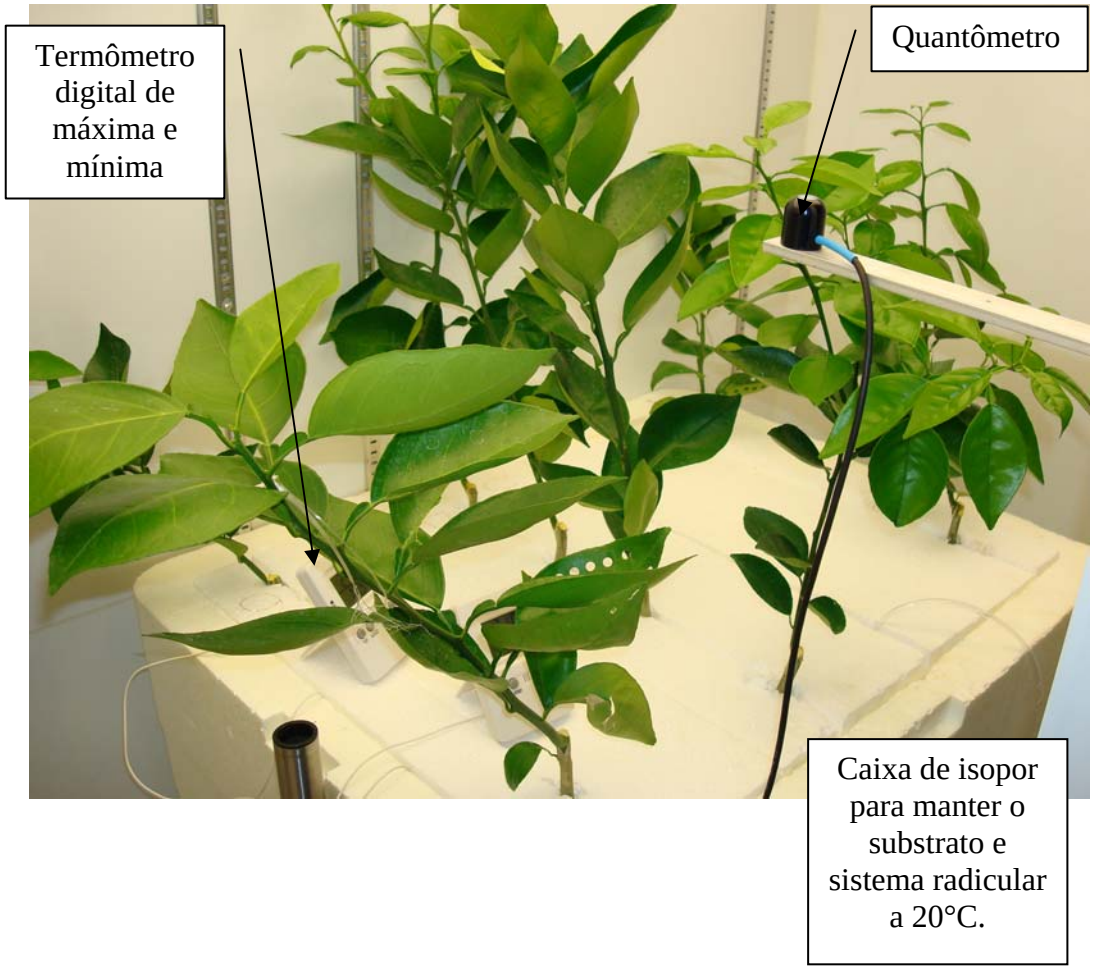

Figura 2- Fotografia ilustrando o experimento com laranjeira 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo' ou sobre citrumeleiro 'Swingle' em câmara de crescimento

Esta providência foi necessária para garantir que somente a parte aérea da planta fosse submetida ao tratamento de baixa temperatura, como ocorre no campo (ALLEN et al., 2000; ALLEN & ORT, 2001). Baixas temperaturas do solo causam efeitos sobre a fotossíntese e relações hídricas (MAGALHÃES FILHO, 2009) e nosso interesse nesta pesquisa, foi avaliar somente o efeito da temperatura do ar na parte aérea.

Nos dias seguintes à 1ª noite de experimento (temperatura noturna 20 °C), à 2ª e 4ª noites (temperatura a 8 °C) e à 6ª noite (temperatura noturna de 20 °C), foram realizadas em folhas totalmente expandidas (aproximadamente 2 meses de idade)

medidas de curvas de resposta da assimilação de CO_2 e da fluorescência da clorofila *a* em função da variação da concentração interna de CO_2 (A x C_i) e da variação de *DFFFA* (A x Luz). Também em folhas equivalentes mediu-se o potencial de água na folha, a condutividade hidráulica e os teores de carboidratos.

3.3 Variáveis Medidas e Calculadas
3.3.1 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

As medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram feitas simultaneamente por meio de um analisador de fotossíntese integrado com câmara de fluorescência e analisador de CO_2 por radiação infravermelha e fonte de luz (Li6400 acoplado com câmara de fluorescência 6400-40, da Licor, Inc. Lincoln - USA). Para as medidas que foram feitas em função da variação dos elementos naturais durante o dia (Experimento I), a *DFFFA* no início de cada medida específica foi fixada e utilizada para as demais réplicas de medidas equivalentes ao mesmo horário. As variáveis medidas em relação ao ambiente foram: temperatura do ar (T_{ar}) e da folha (T_f) e diferença de pressão de vapor entre folha e ar ($DPV_{folha\text{-}ar}$). Em relação às trocas gasosas mediu-se: assimilação de CO_2 (A, μmol m^{-2} s^{-1}), condutância estomática (g_s, mol m^{-2} s^{-1}) e transpiração (E, mmol m^{-2} s^{-1}). As variáveis em relação à fluorescência da clorofila *a* foram: fluorescência mínima (F_o) e máxima (F_m), medidas após adaptação no escuro e fluorescência no estado de equilíbrio dinâmico (F') e máxima (F_m') medidas após adaptação à luz (SCHREIBER et al., 1998). A fluorescência variável máxima no escuro e à luz foram calculadas, respectivamente, por $F_v=F_m-F_o$ e $F_v'=F_m'-F_o'$. O termo F_q' foi calculado por $F_q'=F_m'-F'$, representando a extinção fotoquímica da fluorescência da clorofila, causada pelos centros oxidados do *FSII* (BAKER et al., 2008). Estas variáveis foram utilizadas para calcular a eficiência quântica máxima (F_v/F_m); a eficiência máxima do *FSII* se todos centros do *FSII* estão abertos (Q_A oxidada) (F_v'/F_m'); o fator de eficiência do *FSII* (F_q'/F_v'); a eficiência operacional do *FSII* (F_q'/F_m'); o transporte aparente de elétrons ($ETR=F_q'/F_m'$ x $DFFFA$ x $0,5$ x $0,84$) (GENTY et al., 1989) e o coeficiente de extinção não fotoquímico da fluorescência [$NPQ=(F_m-F_m')/F_m'$] (BAKER et al., 2008). Para o cálculo de *ETR* considerou-se distribuição igual de elétrons entre o *FSI* e *FSII* (0,5) e a absorção de luz 0,84 (SCHREIBER et al., 1998). O cálculo do dreno alternativo de elétrons (*DAE*) foi feito pela seguinte relação (FRACHEBOUD, 2001): $DAE = (F_q'/F_m')/\Phi CO_2$, onde ΦCO_2 representa a quantidade

em μmol CO_2 assimilado (μmol de fótons absorvidos)$^{-1}$, sendo obtido pela equação: $\Phi CO_2 = (A+R)/(DFFFA \times \alpha_{leaf})$, onde $\alpha_{leaf} = 0{,}84$, é a absorção foliar e R a respiração mitocondrial. Os valores foram calculados para *DFFFA* de 1300 μmol m^{-2} s^{-1}.

3.3.2 Curva *A* x C_i

As curvas de A e de fluorescência da clorofila *a* em função da variação de C_i (concentração intercelular ou da cavidade subestomática) foram realizadas simultaneamente em folhas totalmente expandidas, com dois meses de idade, nas seguintes condições na câmara de medidas: *DFFFA* constante e saturante de 1200 μmol m^{-2} s^{-1} (MACHADO et al., 2005), $DPV_{ar\text{-}folha}$ de 1,4 kPa e temperatura do bloco de medida de 25 ^{o}C. A variação de C_i foi obtida pela variação da concentração de CO_2 (C_{ar}) (50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600 μmol mol^{-1}) do ar de entrada (referência) da câmara de medida do IRGA LI-6400, de acordo com o procedimento proposto por LONG & BERNACCHI (2003). A primeira medida foi feita em 400 μmol mol^{-1} de CO_2, diminuindo-se, em seguida, para as concentrações menores, até atingir 50 μmol mol^{-1}, depois disso, retornou-se para 400 μmol mol^{-1} e aumentou-se gradativamente até atingir a concentração final de 1600 μmol mol^{-1}.

A análise da resposta de A em função de C_i, de acordo com o modelo de FARQUHAR et al. (1980), permite estimar a eficiência máxima de carboxilação ($V_{c,max}$) e a capacidade máxima de transportar elétrons relativa à recuperação da RuBP (J_{max}) (FARQUAR & SHARKEY, 1982; VON CAEMMERER, 2000). Porém, tem-se utilizado este modelo considerando que C_i é igual à concentração de CO_2 no sítio catalítico da ribulose-1,5- bisfosfato (RuBP) carboxilase/oxigenase (Rubisco) (C_c), ou seja, considerando que a condutância interna ou do mesofilo (g_i) é infinita. Sabe-se que g_i é finito, baixo, principalmente para espécies arbóreas, e da mesma ordem de grandeza que g_s (LORETO et al., 1992; EPRON et al., 1995; WARREN & ADAMS, 2006; WARREN, 2008). O uso de C_i subestima os valores de $V_{c,max}$ e J_{max}, levando a interpretações errôneas, de forma que é recomendável o uso de C_c para estimar aqueles valores.

Desta forma, a partir dos valores de C_i dados pelo programa do sistema portátil de fotossíntese LI-6400, foram calculados os valores da pressão parcial de CO_2 no cloroplasto (C_c) a partir da seguinte relação (EPRON et al., 1995):

$C_c = C_i\ (S^*/S)$, (1)

onde S e S^* representam respectivamente a especificidade e especificidade aparente da Rubisco. Considerou-se S = 2950 mol mol^{-1} que é um valor típico para plantas C3, baseado em medidas *in vitro* (EPRON et al., 1995; MANTER & KERRIGAN, 2004). O valor da especificidade aparente da Rubisco *in vivo* (S^*) para cada tratamento foi estimado pelo coeficiente linear da regressão linear forçada através da origem e ajustada por meio da relação entre J_C/J_O e C_i/O, onde J_C e J_O, representam respectivamente o fluxo de elétrons destinados para carboxilação e oxigenação da RuBP e C_i/O a razão entre a fração molar de CO_2 e O_2 no espaço intercelular (CORNIC & BRIANTAIS, 1991) (Figura 3).

O fluxo total de elétrons [$J_T = ETR=Fq'/Fm'$ x $DFFFA$ x $0,5$ x $0,84$ (GENTY et al., 1989)] pode ser dividido em dois componentes (J_C e J_O):

$J_T = J_C + J_O$. (2)

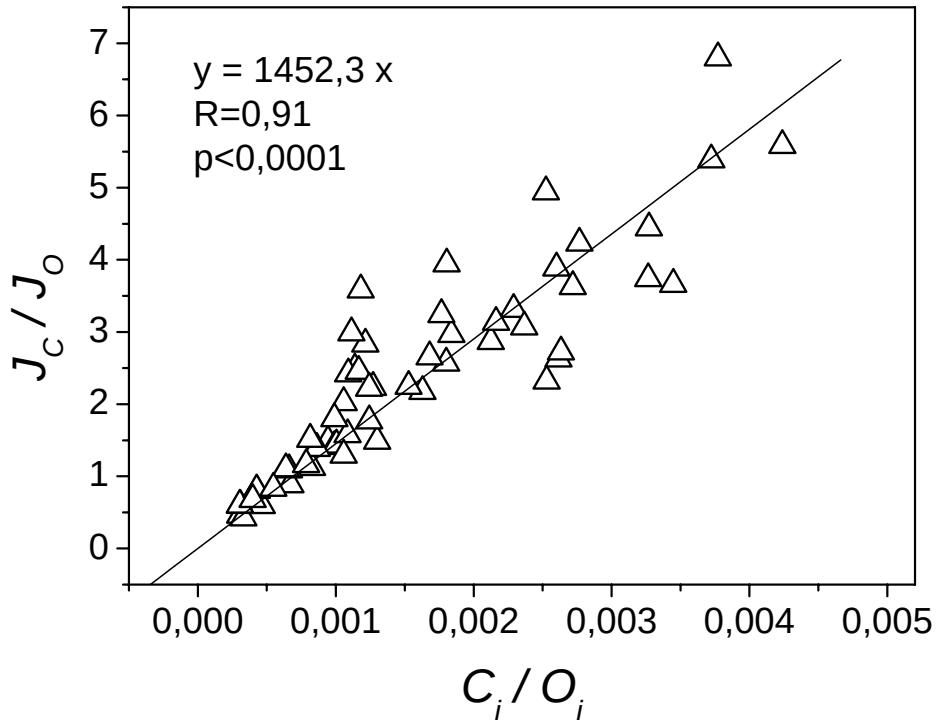

Figura 3- Exemplo de uma regressão linear forçada através da origem e ajustada por meio da relação entre J_C/J_O e C_i/O, onde J_C e J_O, representam respectivamente o fluxo de elétrons destinados para carboxilação e oxigenação da RuBP e C_i/O a razão entre a fração molar de CO_2 e O_2 no espaço intercelular.

Na fotossíntese 4 elétrons são necessários para uma carboxilação e ou oxigenação da RuBP, sendo um CO_2 liberado para cada ciclo de duas oxigenações, devido a descarboxilação da glicina durante a síntese de serina no ciclo da fotorrespiração (VON CAEMMERER, 2000). J_C pode ser expresso como:

$$J_C = 1/3[J_T+8(A+R_d)] \quad (3)$$

e

$$J_O = 2/3[J_T-4(A+R_d)]. \quad (4)$$

A estimativa da condutância interna (g_i) a partir das medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila foram feitas segundo o método descrito por EPRON et al. (1995) a partir da relação:

$$g_i = A / (C_i - C_c) . \quad (5)$$

O modelo de Farquhar (FARQUHAR et al., 1980; VON CAEMMERER, 2000) foi ajustado à curva de A em função de C_c a partir da qual calculou-se $V_{c,max}$ e J_{max}, utilizando o método dos quadrados mínimos do programa Origin 7.5 (OriginLab Corp., Northampton/MA, USA) (LONG & BERNACCHI, 2003). A partir da curva A x C_c (Figura 4), considerando a variação de A em função da variação de C_c até 250 μmol de CO_2 mol^{-1}, estimou-se $V_{c,max}$ na fase da curva limitada pela Rubisco através da equação,

$$A_c = \{V_{c,max} (C_c – \Gamma^*)/ (C_c + K_c[1 + (O_i/K_o)]\} -Rd, \quad (6)$$

J_{max} foi estimado (LONG & BERNACCHI, 2003) quando o incremento de A em função do aumento da concentração de CO_2 é limitado pela regeneração da RuBP pela equação,

$$A_j = [J_{max} (C_c – \Gamma^*)/(4,5C_c + 10,5\ \Gamma^*)] -Rd, \quad (7)$$

onde: A_c e A_j representam a fotossíntese limitada pela eficiência de carboxilação e regeneração da RuBP, respectivamente, K_c e K_o são constantes de Michaelis-Menten da Rubisco, respectivamente, para carboxilação e oxigenação, R_d é respiração mitocondrial à luz (considerada a respiração medida antes das luzes do fitotron acenderem); O_i é a

concentração de oxigênio interna da folha (considerada igual à externa à folha - 210000 μmol mol^{-1}), Γ^* é o ponto de compensação de CO_2 na ausência de respiração no escuro. Os valores de Γ^* e de K_c e K_o para a mesma temperatura da folha no momento das medidas de trocas gasosas foram calculadas de acordo com as equações dependentes da temperatura desenvolvidas por BERNACCHI et al. (2001).

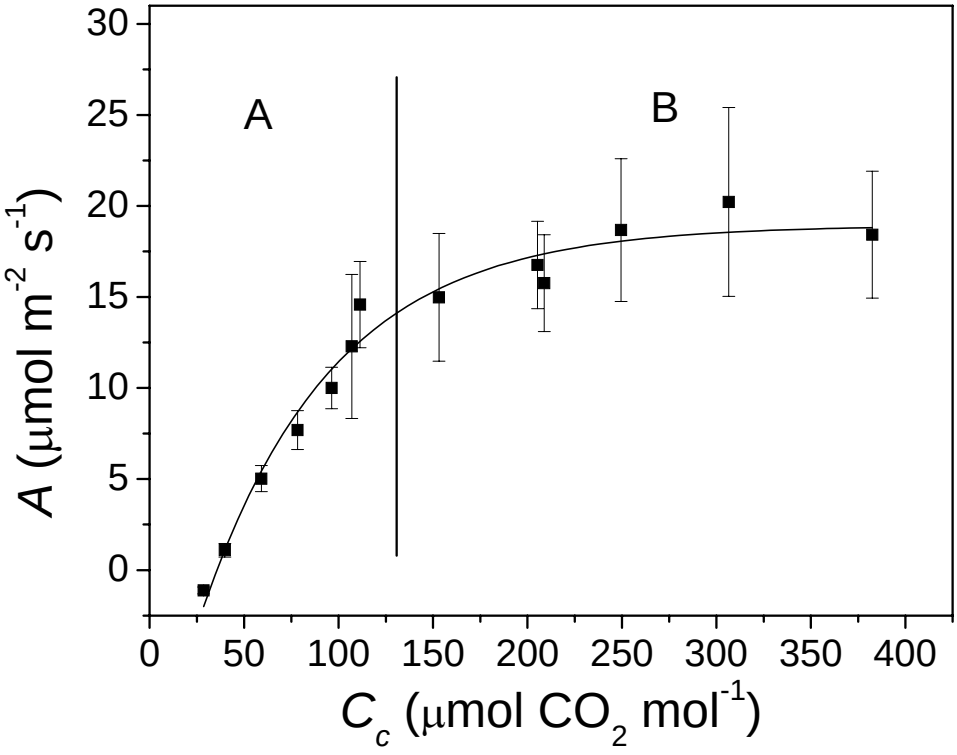

Figura 4- Exemplo ilustrativo de uma curva *A* x C_c de laranjeira 'Valência' sobre 'Swingle' controle (20 °C), a partir do qual se estimou $V_{c,max}$ na fase da curva limitada pela Rubisco (A) e J_{max} na fase limitada pela regeneração de RuBP (B).

3.3.3 Curva *A* x *Luz*

As curvas de reposta de *A* em função da variação da luz foi medida com o sistema portátil de fotossíntese Li-6400 acoplado com câmara de fluorescência 6400-40, (Licor, Inc. Lincoln - USA). Foi utilizada a rotina de curva de luz do equipamento aplicando-se 13 *DFFFA*, de forma decrescente: 1600, 1300, 1000, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50 e 0 μmol m^{-2} s^{-1}. O tempo mínimo de equilíbrio para cada medida em cada *DFFFA* foi 180 s e o máximo 300 s, ou até que a medida apresentasse um coeficiente de variação de 0,5 %. A concentração de CO_2 e a $DPV_{folha-ar}$ no ar foram

de 400 μmol CO_2 mol^{-1} e 1,5 kPa, respectivamente. A temperatura das folhas foi mantida a 25 °C. Os valores obtidos de *A* em função de *DFFFA* foram ajustados à equação:

$$A = A_{maxLuz}\,[1\text{-}e^{-k\,(Q\,-\,\Gamma)}], \quad (8)$$

onde A_{maxLuz} é a assimilação máxima de CO_2, Γ é o ponto de compensação de luz, Q é a *DFFFA* e k um coeficiente de ajuste (IQBAL et al., 1997). A eficiência quântica aparente foi estimada pela equação $\Phi = (k\,A_{maxLuz})\,e^{(k\,\Gamma)}$, que é a primeira derivada da equação 1. A medida de respiração (*R*) foi obtida antes de se ligar o sistema de iluminação da câmara de crescimento. A curva de resposta de *A* em relação à luz, e as medidas de respiração foliar no escuro foram realizadas com cinco repetições, por espécie de porta-enxerto (citrumeleiro 'Swingle' e limoeiro 'Cravo') e por tratamento (controle, baixa temperatura noturna e recuperação).

Os cálculos de C_c e g_i para a curva *A* x *Luz* foram feitos com uso das equações 1 e 5, respectivamente, conforme descrito no item anterior (3.3.2).

3.3.4 Limitação estomática da fotossíntese

A limitação estomática (S_L, %) da fotossíntese foi estimada a partir da curva *A* x C_i, de acordo com LONG & BERNACCHI (2003), considerando a relação entre a assimilação de CO_2 (*A'*) em C_a (CO_2 referência) de 400 μmol mol^{-1} e um valor hipotético (*A"*) que seria obtido se C_i=C_a:

$$S_L = (A"\text{-}A')/A". \quad (9)$$

3.3.5 Condutividade hidráulica

A condutividade hidráulica (K_L, mmol m^{-2} s^{-1} MPa^{-1}) foi estimada de acordo com HUBBARD et al. (2001):

$$K_L = E_{13}/(\Psi_{WPD} - \Psi_{W13}), \quad (10)$$

onde E é a transpiração às 13:00h e Ψ_{WPD} e Ψ_{W13} são respectivamente o potencial hídrico antes do amanhecer e às 13 horas.

3.3.6 Potencial da água na folha

Em cada um dos dias de medidas das trocas gasosas também foram realizadas medidas do potencial da água na folha (Ψ_w, MPa) com câmara de pressão (modelo 3005, Soil Moisture Equipment Corp., EUA), segundo método proposto por KAUFMANN (1968), antes das lâmpadas serem acesas (pré manhã) e às 13:00 horas.

3.3.7 Teor de carboidratos

No primeiro dia de medidas de trocas gasosas relativas à primeira noite a 20 °C, após a 3ª noite a 8 °C e após o 2º dia de recuperação à 20 °C coletou-se folhas para análises de carboidratos. As mesmas foram imersas em CO_2 sólido (-70 °C) imediatamente após a coleta e foram mantidas em freezer (-80 °C) até o momento das análises. Antes da elaboração do extrato para análise, as folhas foram secas em estufa (modelo MA032, Marconi) com circulação forçada de ar à temperatura de 50 °C por 4 dias ou até massa constante. As amostras foram então maceradas em almofariz e armazenadas em frascos de vidro até que as análises de açúcares fossem realizadas.

O extrato para quantificação de sacarose e açúcares solúveis totais foi obtido a partir de extração pelo método do MCW, descrito por BIELESK & TURNER (1966) onde foram transferidos para um tubo de rosca contendo 75 mg de amostra, 3 mL de MCW (metanol, clorofórmio e água na proporção 12:5:3 v/v) que ficaram sob refrigeração por 2 dias. Após a separação de fases obtida pela adição de clorofórmio e água, coletou-se o sobrenadante que em seguida foi concentrado em banho-maria (50 °C), para evaporação do metanol e resíduos de clorofórmio. Os extratos foram então armazenados em freezer (-20 °C) até o momento da quantificação.

Para o extrato utilizado na quantificação de amido utilizou-se o método descrito por AMARAL et al. (2007). Em eppendorf contendo 10 mg de amostra, foram realizadas quatro extrações com 500 μL de etanol 80 % a 80 °C (em banho-maria) por 20 minutos, para retirada de açúcares, pigmentos, fenóis e outras substâncias. O precipitado foi então seco a temperatura ambiente até completa evaporação do resíduo

de etanol. Em seguida foram adicionados 500 μL (120U mL^{-1}) de α-amilase (EC 3.2.1.1) termoestável de *Bacillus licheniformis* (cód. E-ANAAM, MEGAZYME, Irlanda), diluída em tampão MOPS 10 mM e pH 6,5. As amostras foram incubadas a 75 °C (em banho-maria) por 30 minutos. Este passo foi repetido por mais uma vez, totalizando 120 unidades de enzima. Em seguida adicionou-se 500 μL (30U mL^{-1}) de amiloglucosidase (EC 3.2.1.3) de *Aspergillus Níger* (cód. E-AMGPU, MEGAZYME, Irlanda) em tampão acetato de sódio 100 mM e pH 4,5. As amostras foram incubadas a 50 °C (em banho-maria) por 30 minutos. Este passo foi repetido por mais uma vez, totalizando 30 unidades de enzima. Foram acrescentados então, 100 μL de ácido perclórico ($HClO_4$) 0,8 M para parar a reação e precipitar proteínas.

3.3.7.1 Determinação de açúcares solúveis totais

Determinou-se a concentração de açúcares solúveis totais pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Em tubo de ensaio adicionou-se 5 μL de extrato e 495 μL de água destilada, 500μL de solução de fenol 5 % e 2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Agitou-se bem e após resfriar, fez-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro (Micronal, modelo B342II) a 490nm. As concentrações de açúcares solúveis foram calculadas a partir de uma curva-padrão obtida com leituras de soluções contendo 5, 10, 20, 30, 40 e 50 μg de glicose. Como branco, colocou-se água no lugar da amostra.

3.3.7.2 Determinação de sacarose

Determinou-se a concentração de sacarose pelo método descrito por HANDEL (1968) e a dosagem feita pelo método do fenol-sulfúrico. Em tubo de ensaio adicionou-se 5 μL de extrato, 495 μL de água destilada e 500 μL de solução de hidróxido de potássio (KOH) 30 %. Os tubos foram vedados e levados ao banho-maria 100 °C por 10 minutos. Em seguida adicionou-se 500 μL de solução de fenol 5 % e 2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Agitou-se bem e após resfriar, fez-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro (Micronal, modelo B342II) a 490 nm. As concentrações de sacarose foram calculadas a partir de uma curva-padrão obtida com

leituras de soluções contendo 5, 10, 20, 30, 40 e 50 μg de sacarose. Como branco, colocou-se água no lugar da amostra.

3.3.7.3 Determinação de amido

A dosagem de amido procedeu-se da seguinte forma: em eppendorf contendo 10 μL de extrato foi adicionado 40 μL de água destilada e 750 μL do reagente glicose PAP Liquiform (Labtest Diagnóstica S.A.). A mistura foi levada ao banho-maria a 37 °C por 15 minutos. O teor de glicose foi determinado em leitor de microplacas de ELISA (modelo EL307C, Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont) em comprimento de onda de 490 nm. As concentrações de glicose foram calculadas a partir de uma curva-padrão obtida com leituras de soluções contendo 5, 10, 15, 25 e 30 μg de glicose. Como branco, colocou-se água no lugar da amostra.

3.4 Delineamento Estatístico

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com parcelas subdivididas no tempo, sendo os fatores de variação os dias de tratamento (controle, baixa temperatura noturna e recuperação) e o porta-enxerto (limoeiro 'Cravo' e citrumeleiro 'Swingle'). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) sendo as médias provenientes de cinco ou seis repetições. Quando encontradas diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento I

4.1.1 Curso diário das trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em ambiente natural

A figura 5 mostra a variação da *DFFFA* (Figura 5 A), de T_f (Figura 5 C) e de $DPV_{folha\text{-}ar}$ (Figura 5 B) durante o dia 05/02/2008, quando foram feitas as medidas de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a* sob condições naturais.

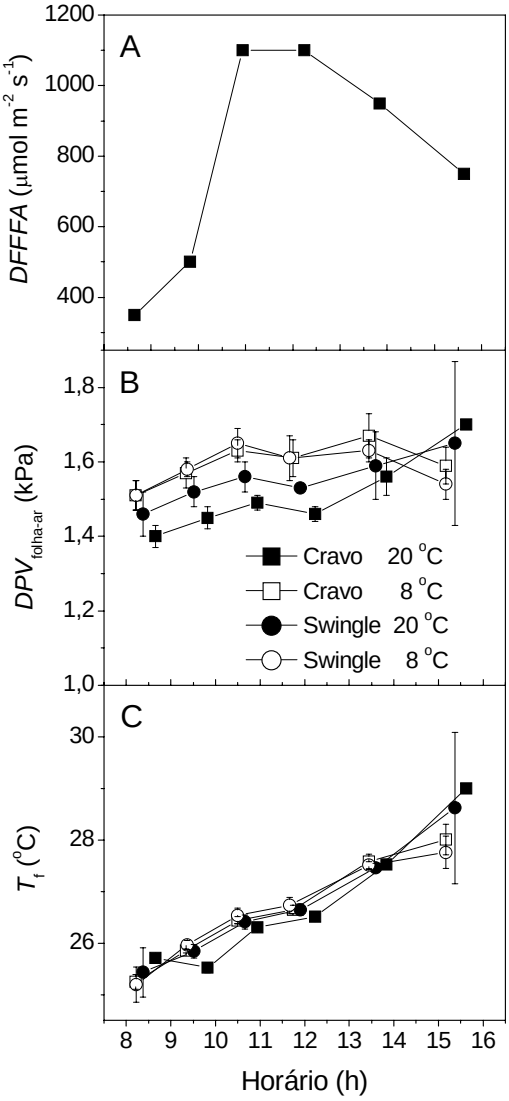

Figura 5 - Curso diário da variação (A) da densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (*DFFFA*), (B) diferença de pressão de vapor entre a folha e o ar ($DPV_{folha-ar}$) e (C) temperatura da folha (T_f) durante o dia 05/02/2008. $DPV_{folha-ar}$ e T_f foram medidos em laranjeira 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle' após uma noite (12h) de tratamento à temperatura de 20 °C e 8 °C na parte aérea. Símbolos indicam a média de cinco repetições (± desvio padrão).

O curso diário da assimilação de CO_2 (A), da condutância estomática (g_s) e da transpiração (E) seguiu o padrão normalmente observado para laranjeiras (MACHADO et al., 2001; MEDINA et al., 1999; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO & MACHADO 2007) (Figura 6). Em todos os tratamentos, no decorrer do dia, os maiores valores de A ocorreram na parte da manhã, decaindo ao redor do meio-dia devido ao aumento de T_f e de $DPV_{folha-ar}$ (Figura 5 B e C), conforme já foi verificado por outros autores (HABERMANN et al., 2003; MACHADO et al., 1994, 2001; MEDINA et al., 1999; MEDINA, 2002; RIBEIRO & MACHADO, 2007).

A diminuição da fotossíntese durante o curso de um dia está relacionada ao fechamento parcial dos estômatos (Figura 5 C e D). Ao redor do meio-dia, devido ao aumento de T_f e, consequente, aumento de $DPV_{folha-ar}$ e da radiação solar, há um aumento da demanda evaporativa. Em função das resistências ao fluxo da água no sistema solo-planta-atmosfera, há uma defasagem entre a demanda e o fornecimento de água pelo sistema radicular, causando o fechamento parcial dos estômatos e queda de *A* (LEVY, 1980; MACHADO et al., 2001, 2002, MEDINA & MACHADO, 1999; MEDINA, 2002; RIBEIRO & MACHADO, 2007).

Comparativamente as plantas submetidas ao tratamento de frio noturno apresentaram decréscimo de *A*, de g_s, de *E* e de A/C_i, em relação as plantas controle (temperatura noturna 20 °C) já no início da manhã e em praticamente todos os horários de medidas (Figura 6). Este resultado diferiu daquele encontrado em mangueira e em cafeeiro (ALLEN et al., 2000; BAUER et al., 1985), em que os decréscimos dessas variáveis ocorreram somente ao redor das 12:00 h.

A atividade fotossintética pode ser afetada pela variação da abertura estomática (avaliada por g_s) e/ou pela capacidade bioquímica (avaliada pela eficiência aparente de carboxilação, A/C_i) e fotoquímica (FARQUHAR & SHARKEY, 1982). Após a aplicação de uma noite de frio, tanto g_s como A/C_i decresceram significativamente em laranjeiras sobre ambos porta-enxertos, constituindo-se assim as duas causas aparentes da queda de *A*.

A temperatura das folhas no controle foram menores que nas plantas submetidas ao frio noturno proporcionando valores menores de $DPV_{folha-ar}$, possivelmente devido à maior abertura estomática (g_s) e de *E* (Figura 5B, 6E e F). A transpiração tem um efeito refrigerante nas folhas. Como todas as condições de medidas e de cultivo foram semelhantes, exceto a aplicação de frio noturno os menores valores de g_s estão relacionados a este fato.

A assimilação de CO_2 diária (A_i) no controle foi maior em laranjeira 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo' ('Cravo') que em laranjeira 'Valência' sobre 'Swingle' ('Swingle') (Figura 7).

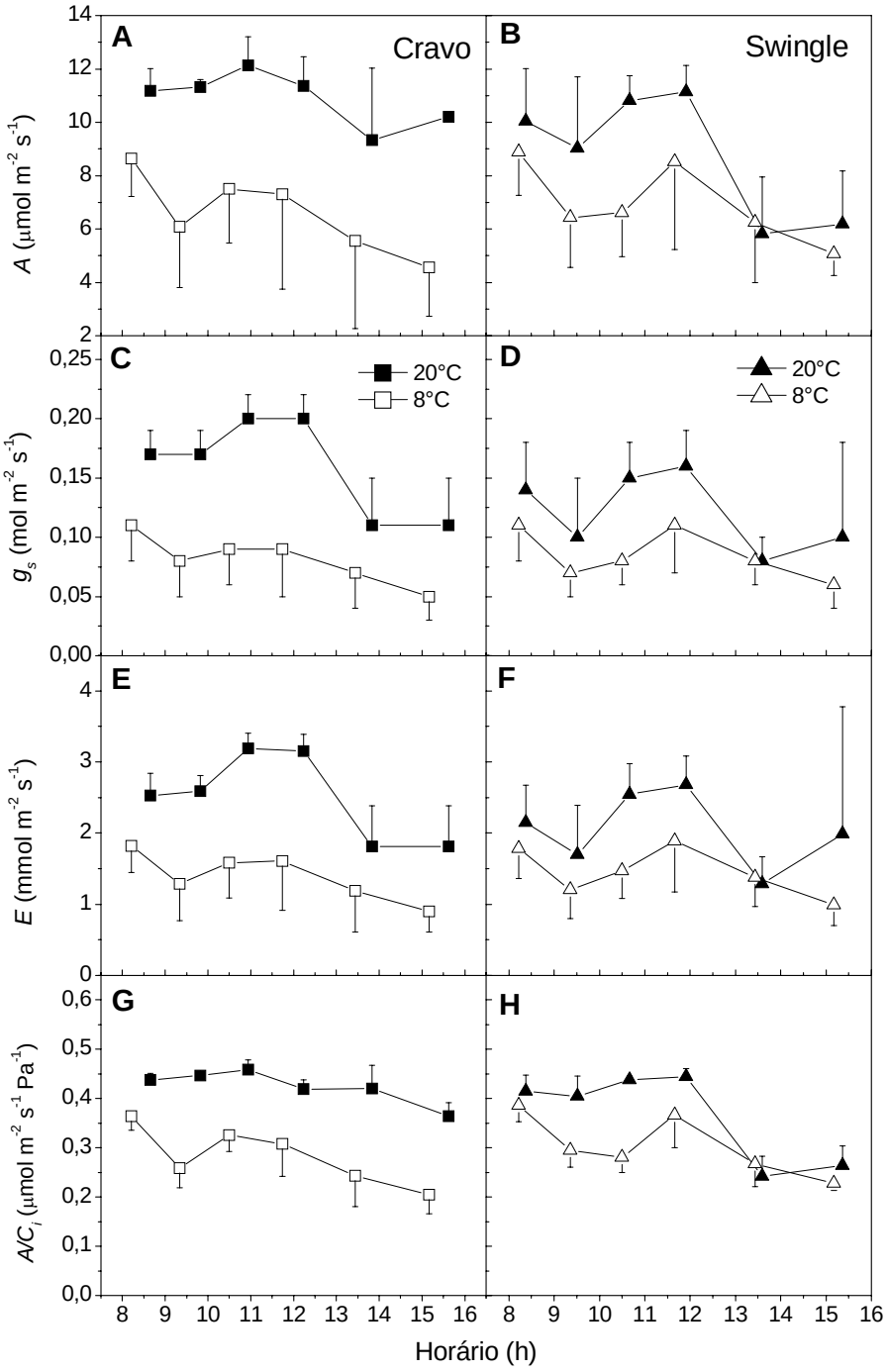

Figura 6- Curso diário da assimilação de CO_2 (*A*) (A,B), condutância estomática (g_s) (C, D), transpiração (*E*) (E, F) e da eficiência aparente de carboxilação (A/C_i) (G,H) em laranjeira 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo' (A, C, E e G) ou citrumeleiro 'Swingle' (B, D, F e H) após uma noite (12h) de tratamento à temperatura de 20 °C e 8 °C na parte aérea. Símbolos indicam a média de cinco repetições (± desvio padrão).

Após uma noite de frio, tanto 'Cravo' como 'Swingle' tiveram decréscimo significativo ($p<0,05$) em A_i, porém esse decréscimo foi maior em 'Cravo' (32%) que em 'Swingle' (22%), fazendo com que A_i em ambos os porta-enxertos apresentassem

valores semelhantes nas plantas que foram submetidas ao frio noturno. RIBEIRO & MACHADO (2007) também relatam decréscimos em A, A_i e g_s no inverno, em relação à primavera e verão em região subtropical.

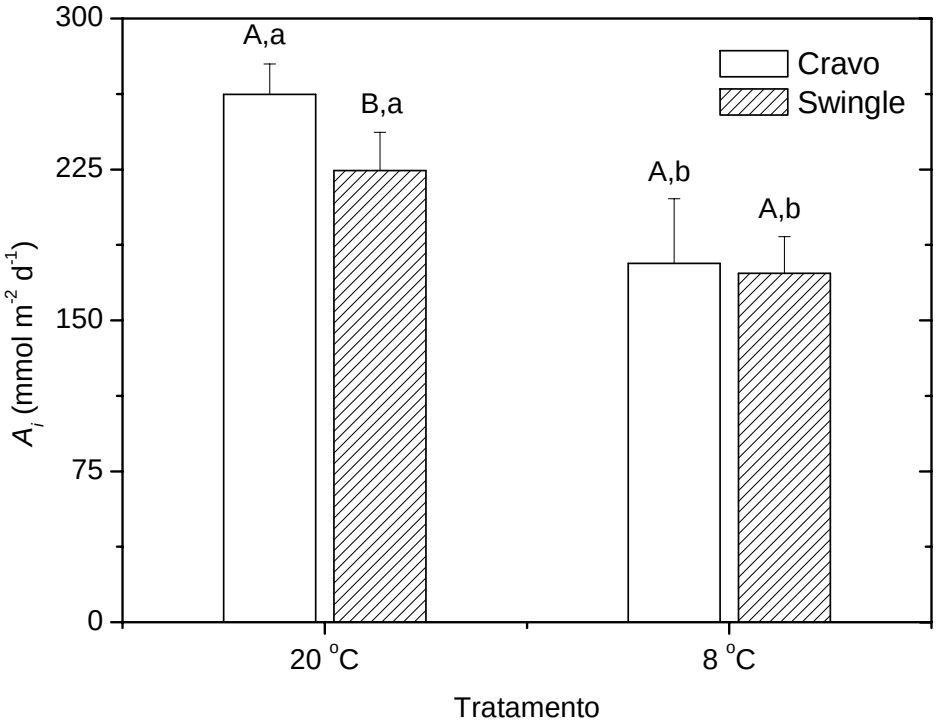

Figura 7- Resposta da assimilação de CO_2 diária (A_i) em laranjeira 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle' após uma noite (12 h) de tratamento à temperatura de 20 °C e 8 °C na parte aérea. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas (Tukey, $p<0,05$) entre as variedades e letras minúsculas as diferenças entre os tratamentos na mesma variedade de porta-enxerto. Colunas indicam a média de cinco repetições (± desvio padrão).

Após uma única noite de frio a eficiência quântica máxima do *FSII* (F_v/F_m) das plantas sobre o porta-enxerto 'Cravo' e 'Swingle' apresentaram valores acima de 0,78 e 0,80 (Figura 8 A e B), respectivamente, portanto demonstrando que esta variável não foi afetada no início da manhã (CRITCHLEY, 1998). Porém, conforme o curso do dia foi passando e a *DFFFA* e a temperatura aumentou, F_v/F_m em 'Cravo' no tratamento de frio noturno apresentou um decréscimo significativo ($p<0,05$) em dois horários (11:00 e 13:00 h) que nas plantas controle (Figura 8 A). F_v/F_m nas plantas sobre 'Swingle' não foram afetadas pelo frio noturno em nenhum horário (Figura 8 B).

A eficiência operacional do *FSII* (F_q'/F_m') decresceu tanto em 'Cravo' quanto em 'Swingle' após uma noite a 8°C, porém numa intensidade maior em 'Cravo' (Figura

8 C e D). F_q'/F_m' representa a proporção de luz absorvida que é utilizada nas reações fotoquímicas, ou seja, que é utilizada na redução de Q_A (BAKER, 2008; MAXWELL & JONHSON, 2000). F_q'/F_m' decresceu com o aumento de *DFFFA*, refletindo em maior quantidade de Q_A reduzida (fechada) e dissipação não fotoquímica de energia (BAKER, 2008). Esta queda na eficiência operacional ocorreu em todos os tratamentos com aumento de *DFFFA*, porém de forma mais intensa nas plantas que foram submetidas ao frio noturno (Figura 8 C e D).

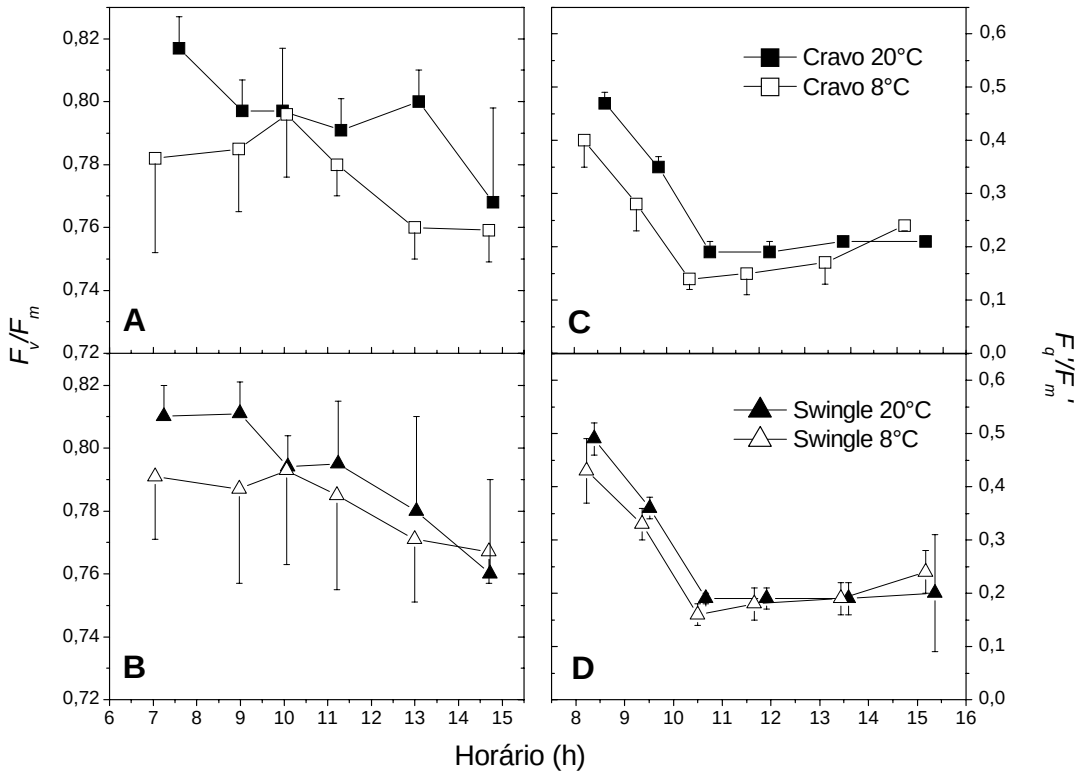

Figura 8- Resposta da (A,B) eficiência quântica máxima do *FSII* (F_v/F_m) e da (C,D) eficiência operacional do *FSII* (F_q'/F_m') em laranjeira 'Valência' sobre (A,C) limoeiro 'Cravo' ou (B,D) citrumeleiro 'Swingle' após uma noite (12 h) de tratamento à temperatura de 20 °C e 8 °C na parte aérea. Símbolos indicam a média de cinco repetições (± desvio padrão).

Como *A* decresceu mais intensamente no tratamento frio, há também uma maior dissipação não fotoquímica (resultado não mostrado) do excesso de energia não utilizada, causando um maior decréscimo em F_q'/F_m'. Este mecanismo de dissipação de energia é fotoprotetor, e está relacionado com o ciclo da xantofila (DEMMING-ADAMS & ADAMS, 1992), não devendo, no entanto, comprometer a assimilação de CO_2 neste caso. A queda de F_q'/F_m' é responsiva ao aumento de *DFFFA*, mantendo uma quantidade de transporte de elétrons ainda compatível para fixação de CO_2. A

diminuição de F_q'/F_m' devido ao frio noturno, causou queda no transporte linear de elétrons. De fato, este valor depende da eficiência com a qual a energia absorvida é doada para o centro de reação e a proporção de centros de reação abertos (oxidado).

Assim, em laranjeira 'Valência' sobre 'Cravo' e sobre 'Swingle', sob condições naturais a queda de *A,* devido ao tratamento de frio noturno parece estar relacionado à queda de g_s e da eficiência aparente de carboxilação (A/C_i), ou seja, fatores estomáticos e metabólicos. Porém a queda relativa de g_s e de A/C_i foi mais pronunciada em 'Cravo' que em 'Swingle'. Em 'Valência' sobre 'Cravo', apesar de F_v/F_m e F_q'/F_m' ter decrescido mais que em 'Swingle' sob baixa temperatura noturna, isso não deve ter contribuído de forma significativa na queda de *A*.

Estes resultados confirmam a hipótese de que a ocorrência de frio noturno afeta o metabolismo fotossintético de laranjeira 'Valência'.

4.2 Experimento II

Neste experimento analisou-se de forma mais detalhada sob condições controladas o efeito da aplicação de frio noturno (8 °C) sobre a fotossíntese por 3 noites consecutivas e a sua recuperação após retorno da temperatura noturna a 20 °C, por dois dias consecutivos.

4.2.1 Trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e relações hídricas em ambiente controlado

A figura 9 foi elaborada com os resultados observados nas curvas *A* x Luz em *DFFFA* = 1300 μmol m^{-2} s^{-1}, exceto A/C_c que foi calculado a partir da curva *A* x C_c. No primeiro dia de medida (controle a 20 °C), *A* foi máximo em 'Cravo' (10,3 μmol m^{-2} s^{-1}) e em 'Swingle' (7,6 μmol m^{-2} s^{-1}), ou seja, no controle *A* em Cravo foi 1,35 vezes maior que em 'Swingle' (Figura 9A). Após a primeira noite de frio (8 °C), *A* decresceu significativamente ($p<0,05$) na laranjeira sobre ambos os porta-enxertos, porém de forma mais acentuada em 'Cravo' (decréscimo de 64 %) do que em 'Swingle' (decréscimo de 26 %). Após mais duas noites de frio não houve progressão na queda de *A*, tanto em 'Cravo' como em 'Swingle'. Este resultado confirma aqueles observados sob condições naturais (Figura 6), ou seja, *A* em laranjeira tanto sobre o porta-enxerto 'Cravo' como no 'Swingle', diminuem após uma noite fria, sendo que a queda mais acentuada foi em 'Cravo'. Após o

retorno à temperatura noturna de 20 °C, *A* em 'Cravo' não se recuperou enquanto em 'Swingle' recuperou-se totalmente ($p<0,05$) após a segunda noite a 20 °C, mostrando também neste aspecto maior tolerância ao frio em 'Swingle'.

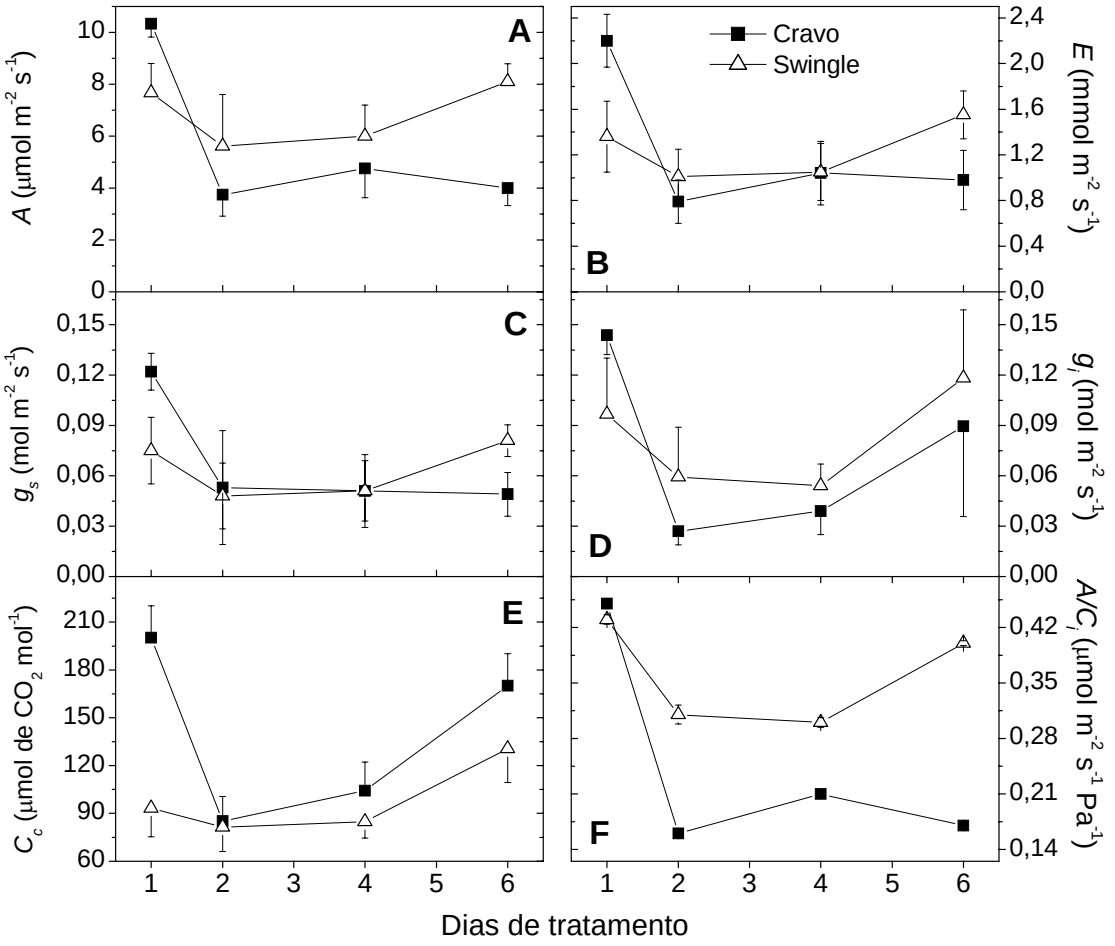

Figura 9- (A) Variação da assimilação de CO_2 (*A*), (B) transpiração (*E*); (C) condutância estomática (g_s) e (D) condutância interna (g_i), (E) concentração de CO_2 no cloroplasto (C_c) e (F) eficiência de carboxilação (A/C_c), em *DFFFA* de 1300 µmol m^{-2} s^{-1}, em função da temperatura noturna em laranjeira 'Valência' enxertada em limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle', sendo o dia 1 controle (20 °C), dias 2 a 4 frio noturno (8 °C) e dias 5 a 6 retorno da temperatura para 20 °C. Símbolos indicam a média de cinco repetições (± desvio padrão).

A queda em *A* pode estar relacionada tanto a aspectos difusivos (g_s *e* g_i) como metabólicos e fotoquímicos (FARQUHAR & SHARKEY, 1982). Para ocorrer a fixação de CO_2 no ciclo de Calvin através da ação da enzima Ribulose-1,5-bisfosfato (*RuBP*) carboxilase/oxigenase (*Rubisco*) o CO_2 movimenta-se, desde a atmosfera ao redor das folhas, através da camada limite e do ostíolo dos estômatos para a cavidade subestomática e daí para o sítio de carboxilação dentro do estroma do cloroplasto, através do mesofilo da

folha. Este caminho pode ser descrito pela 1ª lei de Fick de difusão e da assimilação líquida de CO_2, sendo $A = g_s\ (C_a - C_i) = g_i\ (C_i - C_c)$, onde g_s *e* g_i representam, respectivamente, a condutância estomática e interna ou do mesofilo e C_a, C_i e C_c a concentração de CO_2, respectivamente no ar, cavidade subestomática e no estroma do cloroplasto (LONG & BERNARCCHI, 2003).

Em 'Cravo' e em 'Swingle' houve decréscimo em g_s, atingindo o valor mínimo já no primeiro dia após o frio noturno (Figura 9 C). Os decréscimos acentuados tanto de A como de g_s nas plantas submetidas ao resfriamento noturno, indicam que o fechamento dos estômatos é parcialmente responsável pelo decréscimo de A. A redução de g_s ocorreu conforme se aplicou o abaixamento da temperatura noturna. Sob frio noturno também se observou queda em g_s em cafeeiro, videira e em mangueira (BAUER et al., 1985; FLEXAS et al., 1999; ALLEN et al., 2000). O fechamento parcial dos estômatos pode ser devido à inibição direta do frio sobre a fotossíntese diminuindo-a, o que causaria o aumento da concentração intercelular de CO_2 (C_i) (ALLEN et al., 2000). Alternativamente, o estômato poderia ser o alvo direto do resfriamento, causando o abaixamento de C_i, precipitando o declínio de A (ALLEN & ORT, 2001; MACHADO et al, 2002: MEDINA et al., 2002). Porém, neste experimento, C_i, dentro do mesmo tipo de porta-enxerto, foi semelhante para o período submetido ou não ao resfriamento noturno (dados não mostrados). O fechamento parcial dos estômatos causa diminuição do fluxo de CO_2 na cavidade subestomática, mas a concentração de C_i não variou, possivelmente devido a uma queda na atividade fotossintética. De fato, a eficiência de carboxilação (A/C_c) decaiu significativamente ($p<0,05$) (Figura 9 F) para ambos os porta-enxertos. Assim, o fluxo de CO_2 para dentro da célula diminuiu em função da queda de g_s, mas o consumo de CO_2 no cloroplasto também diminuiu (Figuras 9 A, C e E). Assim, é possível que a queda em g_s seja devida a ação direta do frio sobre o estômato (ALLEN et al, 2000).

Além da resistência dos estômatos ao fluxo de CO_2 para o interior da folha (cavidade subestomática), antes de atingir o estroma dentro do cloroplasto, o CO_2 tem que percorrer o caminho através do mesofilo, cuja maior ou menor facilidade de difusão é descrita pela condutância interna (g_i). A condutância interna variou entre 0,14, em condições de noites a 20 °C e 0,02 mol m^{-2} s^{-1}, em noites com temperatura noturna de 8 °C (Figura 9 D). Este valor de g_i está de acordo com os publicados para espécies arbóreas sempre verdes (FLEXAS et al., 2008; WARREN, 2008). Logo no primeiro dia seguido de frio noturno (8 °C) houve um decréscimo significativo ($p<0,05$) em g_i em ambos porta-enxertos, sendo mais acentuada em 'Cravo' que em 'Swingle'. O g_i da

laranjeira sobre ‘Cravo’ não se recuperou totalmente, mesmo após dois dias seguidos de temperatura noturna de 20 °C (Figura 9 D), indicando sensibilidade desta variável à variação de temperatura.

De fato, vários autores mostram que g_i aumenta com a temperatura com coeficiente de resposta (Q_{10}) igual a 2,2 sugerindo que o processo não é somente físico, mas também mediado por proteínas, possivelmente envolvendo anidrase carbônica e aquaporinas (BERNACCHI et al., 2002; FLEXAS et al., 2008; WAREN, 2008). Sobre o aspecto difusivo verificou-se que tanto g_s como g_i contribuem para a queda em A em laranjeira sobre dois tipos de porta-enxerto, porém com queda mais acentuada em plantas sobre ‘Cravo’ em relação ao g_s.

Após o período de recuperação com a temperatura noturna do ar a 20 °C, g_s de ‘Swingle’ recuperou-se totalmente, porém o g_s de ‘Cravo’ manteve-se baixo, não se recuperando. Também a limitação estomática da fotossíntese (S_L) aumentou após a primeira noite de frio em laranjeira sobre ambos os porta-enxertos (Figura 10). Em ‘Cravo’ não retornou aos valores iniciais, mesmo após dois dias de recuperação, sugerindo aqui um efeito residual. Em ‘Swingle’ S_L iniciou a recuperação já na segunda noite de frio, mostrando certa capacidade de aclimatação.

A concentração intercelular de CO_2 (C_i) não variou durante os tratamentos. Observou-se ainda que C_i em ‘Swingle’ foi significativamente menor que em ‘Cravo’ (dados não mostrados). Tanto em ‘Cravo’ como em ‘Swingle’, assim como em A e g_s houve um decréscimo significativo ($p<0,05$) da eficiência aparente de carboxilação, dada pela relação A/C_c, após a terceira noite de frio em ‘Swingle’ e primeira noite de frio em ‘Cravo’ (Figura 9 F). Em ‘Cravo’, ao contrário do ‘Swingle’, A/C_c não se recuperou ($p<0,05$) mesmo após dois dias de retorno da temperatura noturna para 20 °C, evidenciando um efeito residual. O decréscimo da relação A/C_c indica uma limitação bioquímica da fotossíntese em ambos porta-enxertos, durante o período de aplicação do tratamento.Também neste aspecto ‘Swingle’ mostrou-se mais tolerante à ocorrência de frio noturno em relação ao ‘Cravo’. Este aspecto relacionado com processos metabólicos da fixação de CO_2 e regeneração de RuBP será discutido mais à frente.

Observou-se em ‘Cravo’ um decréscimo significativo ($p<0,05$) e acentuado na transpiração (E) já no primeiro dia seguido de frio noturno, permanecendo assim mesmo após dois dias de recuperação, este decréscimo está relacionado com o fechamento estomático em ‘Cravo’ (Figura 9 B). Em ‘Swingle’ E permaneceu praticamente constante até o segundo dia de retorno da temperatura a 20 °C quando houve um aumento de E e de

g_s. Observou-se ainda que *E* em 'Cravo' foi maior que em 'Swingle' apenas no dia controle.

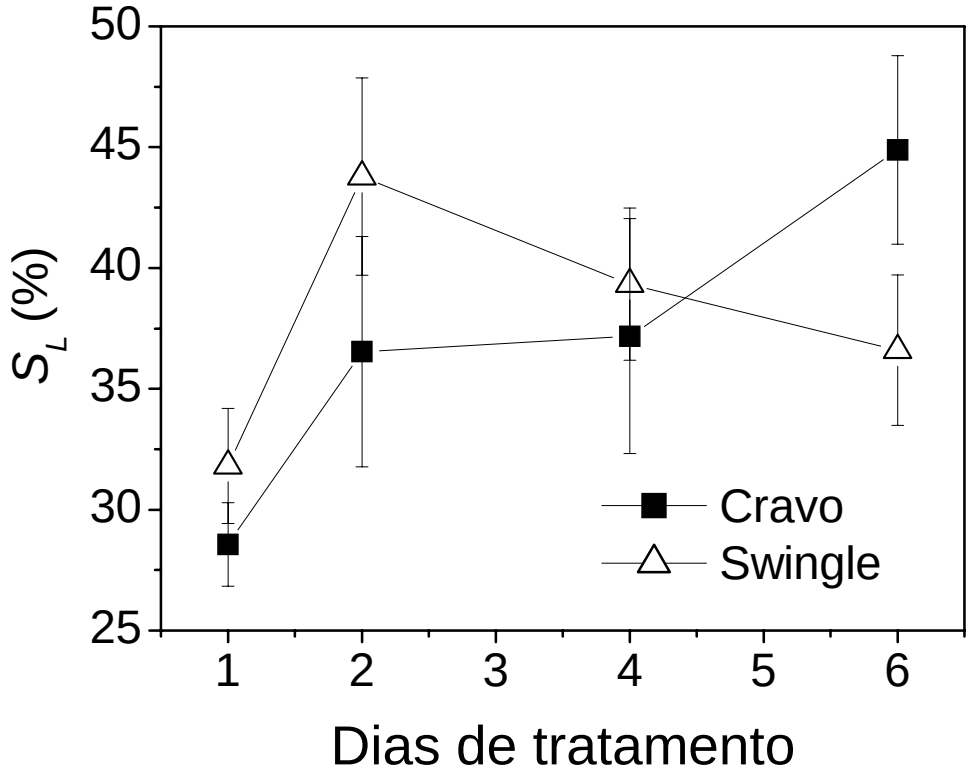

Figura 10- Variação da limitação estomática da fotossíntese (S_L, %) em função da temperatura noturna em laranjeira 'Valência' enxertada em limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle', sendo o dia 1 controle (20 °C), dias 2 a 4 frio noturno (8 °C) e dias 5 a 6 retorno da temperatura para 20 °C. Símbolos indicam a média de cinco repetições (± desvio padrão).

Outro fator que poderia influenciar a abertura estomática seria o estado hídrico da folha, no entanto, não se observou qualquer variação no seu potencial hídrico (Tabela 1), não estando, portanto a queda de g_s relacionada a este fator. Ou seja, os estômatos fecharam parcialmente sem que houvesse perda relativamente maior de água nas plantas sob temperatura noturna de 8 °C. Esta resposta está de acordo com a observada em mangueira e em café (ALLEN et al., 2000; BAUER et al., 1985) cujos autores também não observaram queda no potencial da água. Porém, em videira a ocorrência de frio noturno, mesmo em plantas com o sistema radicular aquecido, a queda em g_s estava associada à queda no conteúdo relativo de água (FLEXAS et al., 1999).

Tabela 1- Variação do potencial hídrico foliar antes do amanhecer (Ψ_{WPD}, MPa) e às 13 horas (Ψ_{W13}, MPa) em função da temperatura noturna em laranjeira 'Valência' enxertada em limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle', sendo o dia 1 controle (20 °C), dias 2 e 4 frio noturno (8 °C) e dia 6, dois dias após retorno da temperatura para 20 °C. Média de três repetições.

	Controle (20 °C)		**Frio noturno (8 °C)**				**Recuperação (20 °C)**	
	Dia 1		**Dia 2**		**Dia 4**		**Dia 6**	
	Ψ_{WPD}	Ψ_{W13}	Ψ_{WPD}	Ψ_{W13}	Ψ_{WPD}	Ψ_{W13}	Ψ_{WPD}	Ψ_{W13}
Cravo	- 0,33	- 0,80	- 0,30	- 0,63	- 0,22	- 0,85	- 0,37	- 0,78
Swingle	- 0,37	- 0,75	- 0,28	- 0,73	- 0,27	- 0,90	- 0,45	- 0,92

A queda de g_s na laranjeira pode estar relacionada com a condutividade hidráulica (K_L, Tabela 2). HUBBARD et al. (2001) observaram uma relação direta entre K_L e g_s e entre K_L e A, que também ocorreu aqui (resultado não mostrado). No dia controle (após 1ª noite à temperatura noturna de 20 °C), K_L de 'Cravo' foi maior que de 'Swingle' ($p<0,05$). Após a 1ª noite a 8 °C, houve um decréscimo significativo ($p<0,05$) de K_L em ambos os porta-enxertos, os quais permaneceram baixos até a 3ª noite de frio. Porém após o segundo dia de recuperação (20 °C), somente o 'Swingle' recuperou-se totalmente ($p<0,05$) (Tabela 2). Observa-se uma coincidência das respostas de K_L e de g_s (relação linear, dados não mostrados), inclusive considerando-se a recuperação destas variáveis em 'Swingle'. A queda de K_L com o frio está relacionada com o aumento da viscosidade da água e da queda da permeabilidade do protoplasma (SELLIN & KUPPER, 2007) e redução do fluxo através dos vasos do xilema (KRAMER, 1983). A baixa temperatura na parte aérea pode incrementar a cavitação dos vasos do xilema reduzindo K_L (SPERRY et al., 1988). Em videira FLEXAS et al. (1999) atribuíram que a queda de A em função da queda em g_s estaria relacionada com as propriedades hidráulicas do xilema, causando queda do conteúdo relativo de água nas folhas. Ainda outro aspecto que poderia afetar a resposta de g_s seria o aumento na concentração de carboidratos solúveis promovendo um ajustamento osmótico. Porém, como será mostrado mais adiante, não ocorreu a concentração de açúcares solúveis durante a aplicação do tratamento de frio. Ou seja, neste experimento, parece que ocorreu um efeito direto do frio no mecanismo de controle de abertura dos estômatos (ALLEN et al., 2000; ALLEN & ORT, 2001) potencializado pela diminuição de K_L (FLEXAS et al., 1999; HUBBARD et al., 2001).

Tabela 2- Variação da condutividade hidráulica (K_L, mmol m^{-2} s^{-1} MPa^{-1}) em função da temperatura noturna em laranjeira 'Valência' enxertada em limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle', sendo o dia 1 controle (20 °C), dias 2 e 4 frio noturno (8 °C) e dia 6 retorno da temperatura para 20 °C.

	Controle (20°C)	**Frio noturno (8°C)**		**Recuperação (20°C)**
	Dia 1	**Dia 2**	**Dia 4**	**Dia 6**
	$\boldsymbol{K_L}$(mmol m^{-2} s^{-1} MPa^{-1})			
Cravo	4,72 ± 0,49	2,36 ± 0,58	1,64 ± 0,45	2,35 ± 0,62
Swingle	3,54 ± 0,80	2,24 ± 0,53	1,65 ± 0,40	3,31 ± 0,44

A figura 11 mostra a resposta das variáveis da análise de fluorescência relativa aos tratamentos com frio noturno em laranjeira 'Valência' sobre 'Cravo' ou 'Swingle'. No primeiro dia de medida após uma noite a 20 °C (controle), a eficiência quântica máxima (F_v/F_m) foi estatisticamente semelhante nas laranjeiras independente do porta-enxerto (Figura 11 A). Em 'Cravo' a queda em F_v/F_m iniciou após a segunda noite de frio atingindo um valor mínimo após a terceira noite ($p<0,05$). Após o retorno da temperatura noturna a 20 °C não houve recuperação de F_v/F_m, sugerindo que ocorreu algum tipo de dano no *FSII*, como perda da proteína D1, como relataram BERTAMINI et al. (2005) em videira. Em 'Swingle', F_v/F_m não foi afetada, mantendo-se ao redor de 0,82 durante todo experimento, apesar de *A* ter diminuído significativamente. Ou seja, os processos de fotoproteção, como aumento de *NPQ* (dissipação de energia por calor na forma de radiação infravermelha) e decréscimo de F_v'/F_m' (Figura 11 A e C) foram eficientes. F_v/F_m representa a eficiência máxima que a luz absorvida pela antena do *FSII* é convertida em energia química (redução de Q_A) e é um indicador da ocorrência de fotoinibição, quando plantas estão sujeitas a vários tipos de estresses do ambiente, incluindo o frio (BAKER & ROSENQVIST, 2004; CRITCHLEY, 1998). Quando a energia absorvida é maior do que a capacidade de utilização pelas reações fotoquímicas e/ou bioquímicas da fotossíntese ocorre fotoinibição (BARBER & ANDERSSON, 1992; LONG et al., 1994; OSMOND, 1994) indicada por F_v/F_m menor que 0,725 (CRITCHLEY, 1998). Portanto o decréscimo de F_v/F_m em 'Cravo', apresentando valores entre de 0,703 ± 0,03 e 0,718 ± 0,05 à partir da 3ª noite até a segunda noite de retorno da temperatura a 20 °C indicam a ocorrência de fotoinibição discreta (CRITCHLEY, 1998).

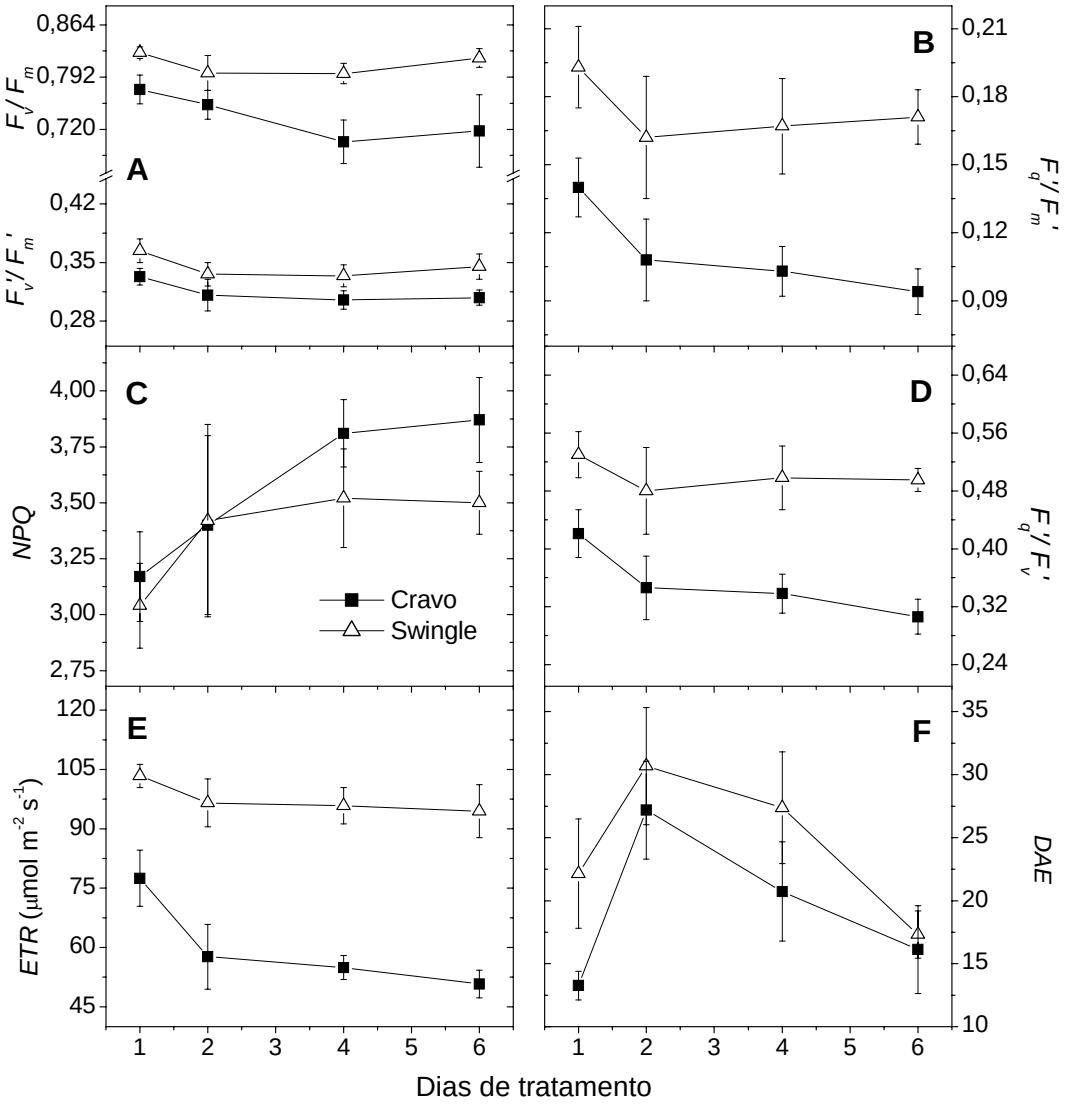

Figura 11- (A) Variação da eficiência quântica máxima do *FSII* (F_v/F_m) e eficiência quântica máxima do *FSII* sob *DFFFA* (F_v'/F_m'), (B) eficiência operacional do *FSII* (F_q'/F_m'), (C) coeficiente de extinção não-fotoquímico (*NPQ*), (D) fator de eficiência do *FSII* (F_q'/F_v'), (E) transporte aparente de elétrons (*ETR*) e do (F) dreno alternativo de elétrons (*DAE*) , em *DFFFA* de 1300 μmol m^{-2} s^{-1}, em função da temperatura noturna em laranjeira 'Valência' enxertada em limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle', sendo o dia 1 controle (20 °C), dias 2 a 4 frio noturno (8 °C) e dias 5 a 6 retorno da temperatura para 20 °C. Símbolos indicam a média de cinco repetições (± desvio padrão).

Esta queda em F_v/F_m provavelmente tenha sido devido a redução significativa ($p<0,05$) de F_m que ocorreu somente em 'Cravo' (dados não mostrados), estando associados à energização da membrana dos tilacóides motivada pelo aumento do gradiente de pH transtilacoidal (*ΔpH*) e pela extinção não fotoquímica de energia de excitação (KRAUSE & WEIS, 1991). A queda de F_v/F_m ainda pode ser uma consequência da baixa fixação de CO_2, indicando uma retro-regulação da atividade fotoquímica para manter um

suprimento adequado de elétrons e ao mesmo tempo evitar quantidade excessiva de energia radiante nos fotossistemas, capaz de levar à fotoinibição crônica mais acentuada (FLEXAS et al., 2001). A queda de F_v/F_m em 'Cravo' possivelmente não foi a causa da queda de *A* e sim uma conseqüência, visto que a queda de *A* (Figura 9 A) já tinha ocorrido logo após a primeira noite de frio, quando em 'Cravo' e em 'Swingle' F_v/F_m eram iguais ao controle (Figura 11 A).

A partir do primeiro dia seguido do frio noturno, observou-se um decréscimo gradativo de F_q'/F_m' em 'Cravo', continuando mesmo após os dias de recuperação (Figura 11 B). Em 'Swingle' houve também decréscimo em F_q'/F_m' porém com recuperação no segundo dia com temperatura a 20 °C, coincidindo com a recuperação de *A* (Figura 9A). F_q'/F_m' estima a eficiência na qual a luz absorvida pelo *FSII* é usada na redução de Q_A, ou seja, nos processos de dissipação fotoquímica. Sob luz esse parâmetro é uma estimativa da eficiência quântica do fluxo linear de elétrons através do *FSII* (BAKER, 2008). Portanto, o decréscimo gradativo de F_q'/F_m' em 'Cravo', mesmo após o retorno da temperatura noturna a 20 °C, esta relacionado com o fechamento (redução) dos centros de reação do *FSII*, refletindo o acúmulo de quinonas em estado reduzido (Q_A^-), em função da não recuperação de *A* (Figura 9 A). A taxa de consumo de *NADPH* e *ATP* é o principal fator na determinação da eficiência operacional do *FSII*.

Variações na eficiência de carboxilação, na regeneração da *RuBP*, no suprimento de CO_2 da atmosfera até o sítio de carboxilação via estômato, na fotorrespiração e na taxa de transporte de carboidratos influem na utilização de *NADPH* e *ATP* e, consequentemente, afetam F_q'/F_m' (BAKER, 2008). Assim, o frio noturno, diminuiu *A*, g_s e também veremos mais à frente, causou queda na eficiência máxima de carboxilação ($V_{c,max}$), na regeneração de *RuBP* (J_{max}) e na exportação de carboidratos da folha, justificando a queda de F_q'/F_m'.

A eficiência máxima do *FSII* sob *DFFFA* (F_v'/F_m'), significa a eficiência operacional do *FSII* quando todas Q_A estão oxidadas. Em 'Swingle' F_v'/F_m' foi maior em todos os dias de tratamento. Em ambos porta-enxertos, observou-se um decréscimo de F_v'/F_m' ($p<0,05$) no primeiro dia seguido de frio noturno, porém diferente do 'Cravo', em 'Swingle' houve a tendência de recuperação após o retorno da temperatura noturna a 20 °C (Figura 11 A). Geralmente a queda de F_v'/F_m' indica aumento em *NPQ*, demonstrando decréscimo na capacidade de oxidar Q_A, à semelhança do que ocorreu neste experimento com 'Cravo' e 'Swingle' (Figura 11 C).

No 1º dia controle, *NPQ* em ambos porta-enxertos foram estatisticamente iguais. Após a primeira noite de frio noturno, observou-se em 'Swingle' um aumento ($p<0,05$) do *NPQ*, enquanto em 'Cravo' ocorreu um aumento ($p<0,05$) somente no dia de máximo estresse (Figura 11 C), ou seja, terceiro dia seguido de frio noturno, quando houve também um decréscimo de F_v/F_m (Figura 11 A).

Basicamente *NPQ* é composto por três componentes: NPQ_E (relacionado ao gradiente de H^+ através da membrana do tilacóide), NPQ_T (relacionado à distribuição de energia de excitação entre os dois fotossistemas, regulada pela fosforilação e desfosforilação do centro de reação) e NPQ_I (relacionado à fotoinibição da fotossíntese) (KRAUSE & WEIS, 1991). NPQ_E é o principal componente de dissipação não-fotoquímico (dissipação da energia não-radiativa), está linearmente relacionado à concentração de H^+ dentro dos tilacóides dos cloroplastos, é responsável pela redução de até 90% de F_v (BRIANTAIS et al., 1979; KRAUSE & WEIS, 1991). Em alta intensidade luminosa ou quando há queda no consumo de redutores e *ATP* um alto gradiente de prótons (ΔpH) é formado dentro dos tilacóides. A diminuição do pH no lúmen causa ativação do ciclo das xantofilas que está envolvido na dissipação de energia através do aumento do conteúdo de zeaxantina, seja pela conversão enzimática da violaxantina ou pelo próprio aumento da síntese desse pigmento (DEMMIG-ADAMS et al., 1999; SCHINDLER & LICHTENTHALER, 1996). O aumento em *NPQ* esta associado ao aumento no conteúdo de zeaxantina (DEMMIG-ADAMS et al., 1999; SCHINDLER & LICHTENTHALER, 1996), sendo considerado um mecanismo de fotoproteção (DEMMIG-ADAMS et al., 1999). No entanto, em muitas situações de estresse o aumento do *NPQ* pode ser acompanhado pela fotoinibição dos centros de reação do *FSII*, como ocorreu em 'Cravo' quando F_v/F_m foi reduzido a valores abaixo de 0,72 no qual há preferencialmente dissipação de energia como calor e não como fotoquímica. Neste caso o aumento de *NPQ* em 'Cravo' pode ter sido ocasionado pelo NPQ_E e NPQ_I.

O fator de eficiência do *FSII* (F_q'/F_v') se manteve praticamente inalterado em 'Swingle', enquanto em 'Cravo' houve um decréscimo ($p<0,05$) no primeiro dia seguido de frio noturno, permanecendo assim mesmo após dois dias de recuperação (Figura 11 D). F_q'/F_v' indica a fração dos centros de reação do *FSII* com Q_A oxidada, isto é a fração dos centros de reação do *FSII* que estão abertos. F_q'/F_v' é determinado pela capacidade do aparelho fotossintético de manter Q_A em estado oxidado, que é função das taxas relativas de redução e oxidação (BAKER, 2008), ou seja, está relacionado com a taxa de utilização de redutores e *ATP*. Decréscimos acentuados de

F_q'/F_v' em *DFFFA* saturante (>800 μmol m^{-2} s^{-1}), quando *NPQ* é máximo, estão relacionados à redução excessiva de Q_A, determinando aumento da fotoinibição (KRAUSE & WEIS, 1991), verificado pelo decréscimo de F_v/F_m. O efeito primário da temperatura baixa foi a redução da fixação fotossintética de CO_2 (Figura 9 A) (ALLEN et al. 2000; ALLEN & ORT, 2001; ORT, 2002) o qual resulta no decréscimo de consumo dos produtos do transporte de elétrons, o *ATP* e *NADPH*, e consequentemente de F_q'/F_m'. O decréscimo na utilização de redutores e de ATP causa a queda de fator de eficiência do *FSII* (F_q'/F_v') e é acompanhada do aumento do *NPQ* da energia de excitação, refletindo um decréscimo de F_v'/F_m' (ANDREWS et al., 1995; GROOM & BAKER, 1992). A resposta mais acentuada de todas estas variáveis em 'Cravo' em relação à 'Swingle' indicam que o porta-enxerto pode conferir tolerância ao frio do enxerto, no caso a laranjeira 'Valência'. Em outras espécies obtiveram-se evidências de diferença de tolerância ao frio relacionado com F_v/F_m, F_v'/F_m', F_q'/F_m' (BAKER & ROSENQVIST, 2004). BAKER & ROSENQVIST (2004) sugeriram que estas variáveis (F_v/F_m, F_v'/F_m', F_q'/F_m') podem ser utilizadas na seleção e comparação de cultivares com diferentes capacidades de tolerância ao frio, e outros estresses abióticos.

A partir do conhecimento de F_q'/F_m' pode-se calcular a transporte de elétrons através do *FSII* (BAKER, 2008). Em 'Cravo' foi observado um decréscimo significativo ($p<0,05$) do transporte aparente de elétrons (*ETR*) no primeiro dia seguido de frio noturno, continuando assim mesmo após o segundo dia de retorno da temperatura noturna. Em 'Swingle' houve um decréscimo significativo ($p<0,05$) de *ETR* apenas no segundo dia de recuperação (Figura 11 E).

Em ambos porta-enxertos houve um aumento significativo ($p<0,05$) dos drenos alternativos de elétrons (*DAE*) no primeiro dia seguido de frio noturno e recuperaram os valores após a segunda noite de retorno da temperatura noturna (Figura 11 F). O valor de *DAE* depende da proporção de redutores produzidos durante o transporte linear de elétrons que é utilizado na assimilação de CO_2 (BAKER, 2008; FRYER et al., 1998). Os elétrons produzidos nos processos fotoquímicos são usados para fixação de carbono, porém outros processos são também dependentes. Em condições onde a fixação de carbono é limitada, como no caso presente, nas plantas sob frio, drenos alternativos como fotorrespiração, reação de Mehler (ciclo água-água) e metabolismo de nitrogênio passam a serem drenos valorizados (BAKER et al., 2007; KRALL & EDWARDS, 1992). Alto valor de *DAE* indica que a proporção de elétrons direcionados a outros drenos (fotorrespiração, reação de Mehler) aumenta. Interessante notar que o aumento

relativo do *DAE* foi maior que a queda de *ETR*. Alto *DAE* e *NPQ* constituem-se estratégias protetoras contra o fotodano e já foram descritos em citros (MEDINA et al., 2002; RIBEIRO et al. 2003)

4.2.2 Variação da assimilação de CO_2 na saturação de luz (A_{maxLuz}), da eficiência quântica (Φ), do ponto de compensação de luz (Γ) e da concentração de CO_2 no cloroplasto (C_c)

A partir da curva *A* x Luz foram calculados A_{maxLuz}, Φ e Γ e C_c (Tabela 3). Não houve diferença significativa na eficiência quântica (Φ) entre os dois porta-enxertos e nem em relação aos dias de tratamento, sendo o rendimento quântico igual 15,5 mol de fótons/mol CO_2 ($RQ = 1/\Phi$). Verificou-se também, em 'Cravo' que logo após a 1ª noite de resfriamento, o ponto de compensação de luz (Γ) aumentou em relação ao controle e ao 'Swingle' permanecendo assim, mesmo após o retorno da temperatura a 20 °C (Tabela 3), mostrando um aumento relativo na fotorrespiração.

Tabela 3- Assimilação de CO_2 na saturação de luz (A_{maxLuz}, μmol m^{-2} s^{-1}), ponto de compensação de luz (Γ, μmol m^{-2} s^{-1}), eficiência quântica [Φ , μmol CO_2 (μmol de fótons)$^{-1}$] e concentração de CO_2 no cloroplasto (C_c, μmol de CO_2 mol^{-1}) em laranjeira 'Valência' enxertada em limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle', submetidos a diferentes temperaturas noturnas por diferentes tempos e na recuperação.

		Controle	Frio noturno		Recuperação
		1º dia 20 °C	1º dia a 8 °C	3º dia a 8 °C	2º dia 20 °C
Cravo	A_{maxLuz}	9,79 ± 1,35	4,93 ± 1,78	4,69 ± 1,19	3,92 ± 0,69
	Γ	43,90 ± 14,64	57,50 ± 10,68	68,40 ± 21,28	69,11 ± 11,62
	Φ	0,061 ± 0,006	0,059 ± 0,013	0,058 ± 0,021	0,055 ± 0,007
	Cc	200,3±19,9	85,2±15,4	104,3±18	170,2±20,0
Swingle	A_{maxLuz}	8,50 ± 1,52	5,42 ± 2,37	5,63 ± 1,97	8,13 ± 0,85
	Γ	43,99 ± 25,18	49,09 ± 19,77	45,87 ± 7,88	44,91 ± 10,88
	Φ	0,065 ± 0,014	0,074 ± 0,01	0,073 ± 0,01	0,070 ± 0,01
	Cc	93,3±18,0	81,4±15,4	84,8±10,3	130,6±21,2

Houve um decréscimo significativo ($p<0,05$) em A_{maxLuz} no primeiro dia seguido de frio noturno em ambos os porta-enxertos, porém em 'Swingle', A_{maxLuz} se recuperou no segundo dia de retorno da temperatura a 20 °C enquanto o 'Cravo' não se recuperou

durante todo período experimental. A queda de A_{maxLuz} está relacionada tanto a queda de g_s quanto de g_i (Figura 9 C e D), o que causam queda no C_c (concentração de CO_2 no cloroplasto). A queda de C_c favoreceu o aumento de *DAE* (Figura 11 F) e queda de A/C_c (Figura 9 F) em ambos porta-enxertos.

Após a segunda noite de recuperação g_s e g_i recuperaram-se em 'Swingle' (Figura 9 C e D) proporcionando aumento novamente em C_c. Porém, somente 'Swingle' recuperou A_{maxLuz}, indicando que a não recuperação de A_{maxLuz} em 'Cravo' está relacionado com aspectos metabólicos.

4.2.3 Variação da eficiência máxima de carboxilação ($V_{c,max}$) e da regeneração da RuBP (J_{max})

As variáveis $V_{c,max}$ ou J_{max} mostradas abaixo foram derivadas das curvas A x C_c.

Em plantas C_3, sob luz saturante, a fotossíntese é limitada pela Rubisco. Em valores de *Ci* acima do típico para a espécie, a fotossíntese será limitada pela regeneração da *RuBP* via transporte de elétrons e pela utilização da triose fosfato (SAGE, 1994; VON CAEMMERER, 2000).

A fotossíntese pode ser limitada pela eficiência máxima de carboxilação ou pela capacidade máxima de regeneração de *RuBP* numa faixa de variação de temperatura entre 10 e 35 °C (ONODA et al., 2005; PIMENTEL et al., 2007). $V_{c,max}$ e J_{max} não possuem a mesma dependência da temperatura (FARQUHAR & VON CAEMMERER, 1980) e a relação entre estes dois processo muda com a temperatura e também com a espécie (ONODA et al., 2005; RIBEIRO et al., 2009b). Os valores de $V_{c,max}$ observados para as plantas controle foram respectivamente 137,7 ± 13,4 e 87,99 ± 11,77 μmol m^{-2} s^{-1} e o de J_{max} 137,47 ± 25,21 e 129,75 ± 15,75 μmol m^{-2} s^{-1} respectivamente, para 'Swingle' e 'Cravo'. Estes valores estão na mesma ordem de grandeza dos observados em citros por RIBEIRO & MACHADO (2007) e SYVERTSEN & LLOYD (1994), porém maiores em relação aos publicados, também em citros, por PIMENTEL et al. (2007).

Logo no primeiro dia seguido de frio noturno, em ambos os porta-enxertos houve um decréscimo significativo ($p<0,05$) da assimilação máxima sob saturação de CO_2 no cloroplasto (A_{maxCO2}) e de J_{max} (Figura 12 A e C). 'Cravo' não recuperou os valores de A_{maxCO2} e J_{max}, mesmo após o retorno da temperatura noturna a 20 °C (recuperação) enquanto que 'Swingle' recuperou ambos, após a terceira noite de frio.

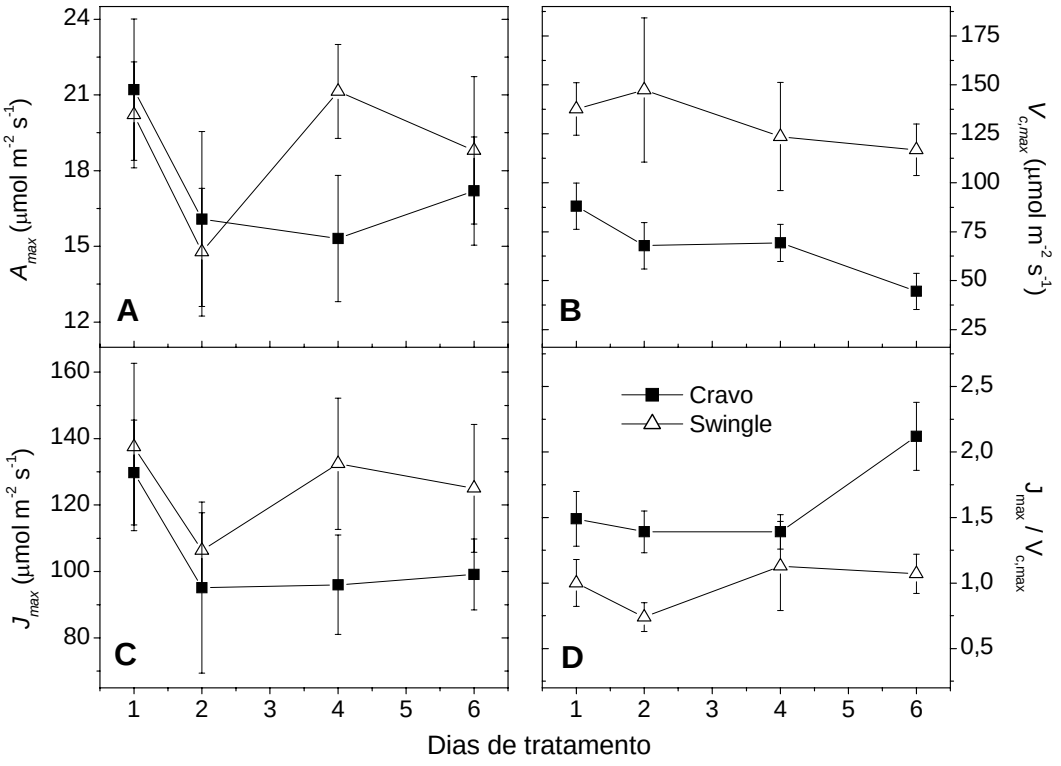

Figura 12- Variação da (A) assimilação máxima de CO_2 (A_{max}), (B) eficiência máxima de carboxilação ($V_{c,max}$)**,** (C) transporte máximo de elétrons para regeneração de *RuBP* (J_{max}) e da (D) razão $J_{max}/V_{c,max}$ em função da temperatura noturna em laranjeira 'Valência' enxertada em limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle', sendo o dia 1 controle (20 °C), dias 2 a 4 frio noturno (8 °C) e dias 5 a 6 retorno da temperatura para 20 °C. Símbolos indicam a média de cinco repetições (± desvio padrão).

Também em 'Cravo', não houve recuperação da abertura estomática (g_s, Figura 9 C), mas recuperou parcialmente g_i (Figura 9 D). Durante a execução da curva A x C_c, com o aumento da concentração de CO_2 no ar e no cloroplasto, é esperado que haja recuperação de A_{maxCO2}, se a limitação da fotossíntese for somente de ordem difusiva. Porém, em 'Cravo' a não recuperação de A_{maxCO2} deve estar relacionada também ao metabolismo da fotossíntese (Figura 12 A). De fato, ao analisarmos $V_{c,max}$ e J_{max} observamos que ambos tiveram seus valores diminuídos ($p<0,05$) (Figura 12 B e C). $V_{c,max}$ e J_{max} decresceram, respectivamente 49% e 27% em relação ao controle a 20 ^oC. Em 'Cravo' mesmo após o retorno da temperatura noturna de 8 para 20 °C, não houve recuperação dos valores de J_{max} nem de $V_{c,max}$ (Figura 12 B e C). Na figura 9, observou-se que A e g_s [medido sob condições normais de CO_2, em *DFFFA* saturante (Figura 9 A, C)] não restabeleceram os valores do controle, mesmo após o período de dois dias de recuperação a 20 ^oC. A condutância interna foi menor durante a aplicação do

tratamento, mas recuperou-se após o segundo dia de retorno à temperatura noturna de 20 °C (Figura 9 D). Estes resultados indicam, portanto, que a fotossíntese em 'Cravo' foi afetada negativamente com a aplicação de frio tanto devido a fatores relativos aos processos difusivos (g_s e g_i) como metabólicos ($V_{c,max}$ e J_{max}).

Fazendo-se a mesma análise em relação ao 'Swingle' observamos que A_{maxCO2} teve um decréscimo grande ($p<0,05$) após a primeira noite de frio, mas recuperou-se ainda durante o tratamento, após a 3ª noite de frio e assim permaneceu até o final do experimento, após o período de recuperação (Figura 12 A). J_{max} também teve uma queda significativa ($p<0,05$) após a 1ª noite de frio, mas também se recuperou na 3ª noite e permaneceu assim até o final do experimento a semelhança de A_{maxCO2}, mostrando uma relação positiva entre estas duas variáveis. A variação de J_{max} deve estar relacionada com a variação da atividade de enzimas do ciclo de Calvin, como frutose-1,6-fosfatase (FBPase) e sedoheptulose-1,7-bisfosfatase (*SBPase*) (ALLEN & ORT, 2001; BASSHAM & KRAUSE, 1969; VAN HEERDEN et al., 2003; ZHOU et al., 2007).

$V_{c,max}$ diminuiu somente na 3ª noite ($p<0,05$, Figura 12 B), tanto em 'Cravo' como em 'Swingle', sob baixa temperatura e não recuperou-se, sugerindo que a recuperação da Rubisco não ocorreu. A queda de $V_{c,max}$ apesar de significativa foi da ordem de 16% em 'Swingle' em relação ao controle. Assim, em 'Swingle' a primeira noite de frio afetou a fotossíntese (A_{maxCO2}) devido a fatores difusivos e metabólicos. Já na segunda e terceira noite de frio J_{max} recuperou-se e A_{maxCO2} igualou-se ao controle. Isto indica que a laranjeira sobre 'Swingle' adaptou seu metabolismo fotossintético ao frio. Assim a queda de A observada nas medidas efetuadas na concentração normal no ar de CO_2 a 1300 μmol m^{-2} s^{-1} de *DFFFA* foi devida na primeira noite a fatores difusivos e metabólicos e a partir da 2ª noite de frio somente a fatores difusivos (Figura 9 A, C e D). Logo, após o retorno da planta a 20 °C, no período de recuperação, g_s recuperou-se e A recuperou-se também.

Observamos que a razão $J_{max}/V_{c,max}$ em 'Swingle' aumentou significativamente ($p<0,05$) no dia de máximo estresse, ou seja, terceiro dia seguido de frio noturno, voltando aos valores controle no segundo dia de recuperação (temperatura noturna 20 °C) (Figura 12 D). Em 'Cravo' durante os dias de baixa temperatura esta razão manteve-se praticamente constante devido ao $V_{c,max}$ que não teve alterações significativas, porém após dois dias de recuperação houve aumento significativo ($p<0,05$) desta razão acompanhado de decréscimo do $V_{c,max}$ (Figura 12 B e D).

Variações de temperatura alteram o balanço entre a carboxilação e a regeneração da *RuBP*, afetando o estímulo do CO_2 à fotossíntese. HIKOSAKA et al. (1999) observaram que a fotossíntese foi limitada pela regeneração da *RuBP* em *Q. myrsinaefolia* exposta por um curto período à baixa temperatura, semelhante à resposta observada tanto em 'Cravo' como em 'Swingle' após o primeiro dia seguido de frio noturno (Figura 12 C). Porém essa limitação em *Q. myrsinaefolia*, foi melhorada pelo aumento da razão $J_{max}/V_{c,max}$ com aclimatação à temperatura baixa. 'Swingle' também recuperou J_{max} e com ele A_{maxCO2} (Figura 12 C). De fato em algumas espécies, como *Poligonum cuspidatum* e espinafre, por exemplo, quando crescem em temperaturas baixas a razão J_{max} e $V_{c,max}$ aumenta (ONODA et al., 2005; YAMORI et al., 2005).

Em resumo em laranjeira 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle' o frio noturno afetou os componentes da fotossíntese incluindo o transporte de elétrons nos tilacóides, o ciclo de redução do carbono, e o controle da condutância estomática e condutância interna ou do mesofilo. A queda de *A* foi relacionada tanto por fatores difusivos (queda de g_s e g_i) como por fatores metabólicos (queda de $V_{c,max}$, J_{max}). A queda de g_s parece estar relacionada com a queda de K_L, que ocorreu durante o tratamento de frio noturno e do efeito direto do frio sobre o estômato (ALLEN & ORT, 2001). Notou-se que em 'Swingle' houve recuperação de g_s e em 'Cravo' não. A recuperação de g_s em 'Swingle' pode, em parte, estar relacionada com a recuperação de K_L. Mas alguns autores sugerem que a queda de g_s devido ao frio está relacionada com a quantidade de ABA enviado pelas raízes para parte aérea (ZHANG et al., 2008; ZHOU et al., 2007) e com a queda do teor de citocinina na parte aérea (VESELOVA et al., 2005; ZHOU et al., 2007).

Também se observou que J_{max} recuperou-se em 'Swingle' mas não em 'Cravo'. A regeneração da *RuBP* é descrita somente em termos de taxa máxima de transporte de elétrons, do qual provém a energia (*ATP*) e o poder redutor (*NADPH*). No entanto, sabe-se que a atividade e quantidade de enzimas no estroma como bisfosfatases estromais, *SBPase* e *FBPase*, podem variar sob frio e afetar o ciclo de Calvin (ALLEN & ORT, 2001; BASSHAM & KRAUSE, 1969; VAN HEERDEN et al., 2003; ZHOU et al., 2007). Ambas as enzimas citadas são ativadas pelo sistema ferredoxina-tiorredoxina e sob condições ótimas, suas atividades são fortemente ligadas ao estado redox do cloroplasto (ALLEN & ORT, 2001).

A queda de $V_{c,max}$ ocorreu nos dois porta-enxertos, porém de forma mais acentuada em 'Cravo'. O declínio da fotossíntese após frio noturno tem sido atribuído

em parte a baixa atividade da *Rubisco* (ALLEN et al., 2000; ALLEN & ORT, 2001; BERTAMINI et al., 2005).

ZHOU et al. (2007) observaram que espécies mais tolerantes ao frio apresentam menor queda no teor de citocinina. Estes autores (ZHOU et al., 2007) sugeriram que a queda do teor de citocinina pode ser um dos fatores fisiológicos que explicariam parcialmente os decréscimos de $V_{c,max}$, do conteúdo e da atividade de *Rubisco*, uma vez que a citocinina pode aumentar o teor de mRNA relacionados a síntese e atividade da *Rubisco* e *FBPase* (DAVIS & ZHANG, 1991).

Importante destacar que o porta-enxerto 'Swingle' caracteriza-se por melhorar a performance de laranjeiras sob clima mais frio (POMPEU Jr., 2005). No caso presente ficou evidenciado que o processo fotossintético em laranjeira 'Valência' sobre citrumeleiro 'Swingle' foi mais tolerante a ocorrência de frio noturno do que a mesma laranjeira 'Valência' sobre 'Cravo'. Estes resultados mostraram que o porta-enxerto 'Swingle', por intermédio de seu sistema radicular, transmitiu à parte aérea algum 'comando' ou substância que influenciou a reposta da fotossíntese ao frio noturno. Outros autores também observaram que o sistema radicular afeta a resposta da fotossíntese ao frio. Por exemplo, o desempenho de pepineiro durante o frio foi melhorado em plantas enxertadas sobre *Curcubita ficifoliata* Buché, uma curcubiacea tolerante ao frio (AHN et al, 1999; ZHANG et al, 2008; ZHOU et al. 2007). A característica de tolerância ao frio em *Curcubita ficifoliata* Buché foi relacionada com a maior atividade de antioxidantes, menor quantidade de ABA, maior quantidade de citocinina, menor queda de *gs*, maior $V_{c,max}$ e *A*, em relação ao pepineiro sob frio de 7 ^{o}C. Em pepineiro enxertado sobre *Curcubita ficifoliata* Buché todos os efeitos do frio sobre a fotossíntese do pepineiro foram abrandados, evidenciando a influência do sistema radicular sobre as características de tolerância ao frio. ZHOU et al. (2007) sugeriram que os sinais vindo da raiz (ABA e citocinina) estão relacionados a fatores de proteção da fotossíntese contra os efeitos do frio.

4.2.4 Variação dos teores de carboidratos

As determinações dos teores de carboidratos foram feitos em folhas coletadas ao redor das 13:00 h, isto é, 7 h após início do período luz. Os açúcares solúveis (*AS*) são representados pelos açúcares redutores (glicose e frutose, *AR*) e não redutores (sacarose,

ANR), e os insolúveis pelo amido (*AM*). O conteúdo total de carboidratos nas folhas (*AT*) é constituído pela soma dessas duas frações (*AT=AS+AM*).

Em 'Cravo' houve um decréscimo significativo ($p<0,05$) de *AS* e da sacarose (*SAC*) na recuperação, ou seja, com o retorno da temperatura noturna a 20 °C (Figura 13 A e B), enquanto em 'Swingle' somente *SAC* diminuiu com o retorno da temperatura para 20°C.

Houve um aumento significativo ($p<0,05$) de *AM* e *AT* após o abaixamento da temperatura noturna (8 °C) em 'Cravo', retornando a valores semelhantes ao controle após a recuperação (Figura 13 C e D).

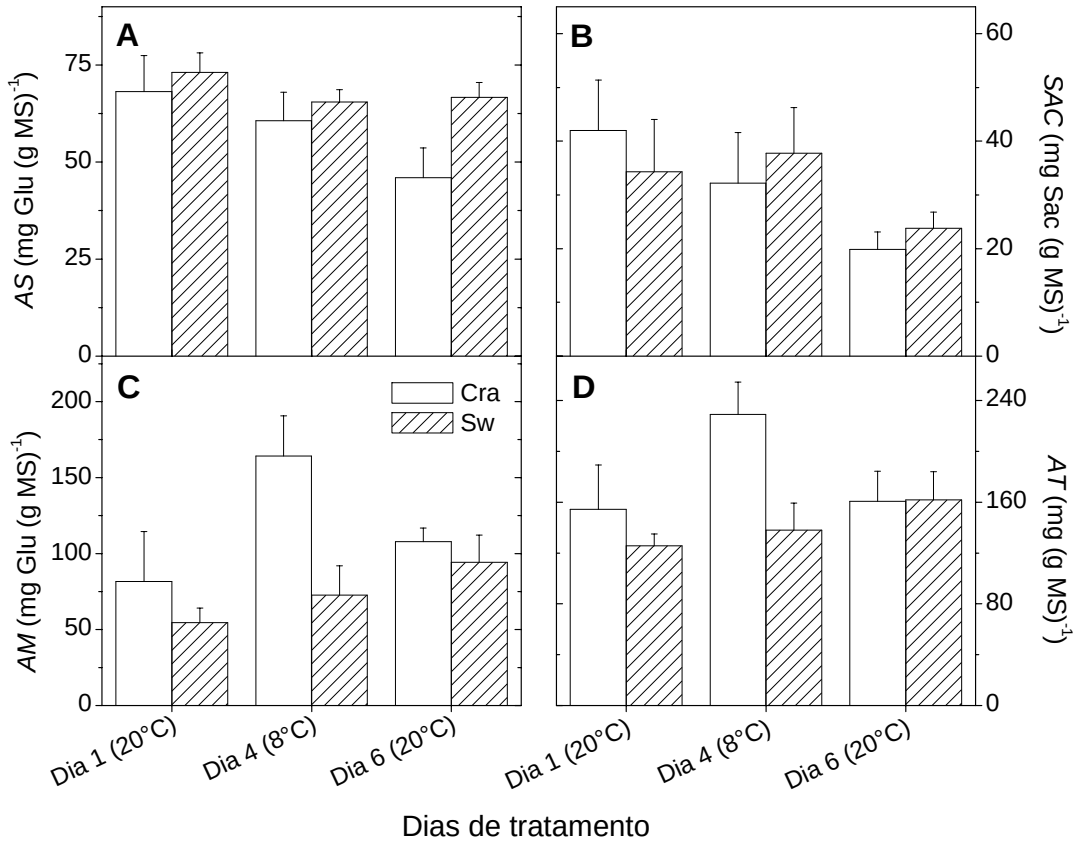

Figura 13- Variação dos (A) açúcares solúveis (*AS*), (B) sacarose (*SAC*), (C) amido (*AM*) e (D) açúcares totais (*AT*) em função da temperatura noturna em laranjeira 'Valência' enxertada em limoeiro 'Cravo' ou citrumeleiro 'Swingle', sendo o dia 1 controle (20 °C), dias 2 a 4 frio noturno (8 °C) e dias 5 e 6 retorno da temperatura para 20 °C. Colunas indicam a média de seis repetições (± desvio padrão).

Durante o dia o carbono fixado pela fotossíntese é direcionado para síntese de amido no cloroplasto ou de sacarose no citoplasma (DICKSON, 1991), sendo a primeira

via acionada preferencialmente quando o crescimento é reduzido, ao passo que a segunda via é mais ativa quando há drenos ativos.

O amido é normalmente degradado durante a noite, sendo os açúcares resultantes (açúcares livres) convertidos em sacarose para manter a translocação de fotoassimilados para os drenos ativos. Duas causas podem ser responsáveis pelo aumento do teor de amido à noite em 'Cravo': 1) a baixa temperatura noturna inibiu a atividade das enzimas de mobilização de amido (LEEGOOD & EDWARD, 1996) e/ ou 2) sob baixa temperatura houve redução da demanda por carboidratos devido à possível queda no crescimento (IGLESIAS et al., 2002; RIBEIRO & MACHADO, 2007). A queda de demanda pode causar queda em *A* (IGLESIAS et al., 2002). O crescimento em citros é praticamente nulo às temperaturas abaixo de 13 °C (REUTHER, 1973).

Por outro lado, no período de recuperação, após duas noites à temperatura de 20 °C, o teor de amido em 'Cravo' diminui aos valores iniciais, ou seja, do controle. O retorno a 20 °C deve ter ativado as enzimas de remobilização de amido e o crescimento. No entanto, no período de recuperação, em 'Cravo', tanto os açúcares solúveis como sacarose não atingiram os teores observados no controle, possivelmente porque *A* também não retornou aos valores do controle (Figura 9 A). Talvez este decréscimo esteja relacionado com o aumento da demanda por carboidrato estimulado pelas condições mais favoráveis de hidrólise do amido e consumo de carboidratos solúveis pelo crescimento reativado. Como não houve recuperação de *A* em 'Cravo' a fonte de carboidratos para o crescimento foi por meio da remobilização de reservas e foi mantido um menor teor de *SAC* em função da translocação da folha para outras partes da planta.

Em relação aos citros, IGLESIAS et al. (2002) sugerem que a elevada concentração de açúcares, *per se,* induz a inibição da fotossíntese. No entanto, os teores de sacarose e açúcares redutores após as noites frias não diferiram do controle, possivelmente não sendo uma das causas em 'Cravo' da queda em *A*. Entretanto, RIBEIRO et al. (2005) demonstraram que a dinâmica diária de carboidratos em citros está mais relacionada à inibição ou estímulo da fotossíntese do que aos valores absolutos, i.e. concentração de açúcares nas folhas (RIBEIRO & MACHADO, 2007). A relação entre concentração de reservas e fotossíntese tem sido verificada indiretamente através de relações entre crescimento e produção de frutos e atividade fotossintética em plantas cítricas. Dessa forma tem-se encontrado maior atividade fotossintética quando há aumento na força de dreno das plantas, sendo essa conclusão proveniente de estudos em que o crescimento da parte aérea foi manipulado pela remoção de ramos

(SYVERTSEN & LLOYD, 1994) ou de estudos em que as plantas foram desbastadas (SYVERTSEN et al., 2003).

Em ‘Swingle’ os teores de *AS*, *AM*, *SAC* e *AT* mantiveram-se igual independente da temperatura noturna (Figura 13). Ou seja, se em ‘Cravo’ houve um aumento no teor de *AM* devido à queda na remobilização em função da diminuição da temperatura noturna, o mesmo não aconteceu em ‘Swingle’ sugerindo diferentes sensibilidades das enzimas. Porém, após o retorno das plantas para temperatura noturna de 20 °C, os teores de *AS* e *SAC* foram menores em relação ao controle, e o de *AM* maior que o controle ($p<0,05$) (Figura 13 C). Desta forma, os *AST* não apresentaram variação. A menor variação dos teores de carboidratos em ‘Swingle’ podem estar em parte relacionados com a menor variação de *A*, que apresentou uma queda relativamente menor durante o período de tratamento de frio noturno, além de recuperar-se no período de retorno da temperatura a 20 °C (Figura 9 A).

5 CONCLUSÕES

a) A ocorrência de baixa temperatura noturna causa queda na fotossíntese em laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ e citrumeleiro ‘Swingle’ devido a seus efeitos inibitórios sobre os processos difusivos e metabólicos.

b) Sobre ambos os porta-enxertos, a queda de *A* em laranjeira ‘Valência’ em função do frio noturno relaciona-se com a queda da condutância estomática (g_s) e interna (g_i). A queda em g_s, por sua vez, em parte, é devida a ação direta do frio sobre as células estomáticas e em parte devida a queda na condutância hidráulica da planta (K_L).

c) Em laranjeira ‘Valência’ sobre ‘Swingle’, a temperatura noturna baixa causa queda na eficiência operacional (F_q'/F_m') e aumento na dissipação não fotoquímica (*NPQ*), porém sem limitar a fotossíntese, caracterizando-se como mecanismos fotoprotetores. Em laranjeira ‘Valência’ sobre ‘Cravo’ ocorreu fotoinibição, ou seja, o decréscimo da eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) no dia de estresse máximo, queda em F_q'/F_m' e aumento em *NPQ* devidos ao resfriamento, mas estas variáveis não são as responsáveis primárias pela queda de *A* e sim uma consequência.

d) Em laranjeira ‘Valência’ em ambos os porta-enxertos sob baixa temperatura, os decréscimos na assimilação de CO_2 máxima sob condição de saturação de CO_2 (A_{maxCO2}), na eficiência máxima de carboxilação ($V_{c,max}$) e na taxa máxima de

regeneração de RuBP (J_{max}) indicam que os processos metabólicos da fotossíntese são afetados. No entanto, a intensidade dos danos é diferente em cada porta-enxerto. Ou seja, em 'Cravo' as variáveis A, g_s, g_i, $V_{c,max}$ e J_{max}, foram baixas durante todo tempo de tratamento sob baixa temperatura (3 dias a 8 °C) e não recuperaram-se com o retorno das plantas à temperatura de 20 °C. Em 'Swingle' a queda de A, g_s, g_i, $V_{c,max}$ e J_{max} são relativamente menores e recuperam-se após o retorno das plantas à temperatura de 20 ^{o}C.

f) Durante o período de tratamento com frio noturno, o teor de amido na folha aumenta em 'Cravo' devido à provável redução do crescimento e queda na sua remobilização noturna e durante o período de retorno da temperatura noturna para 20 °C, com a reativação do crescimento e aumento da demanda de carboidratos, novamente o teor de amido decresce.

g) Sob baixa temperatura noturna (8 °C), o porta-enxerto citrumeleiro 'Swingle' conferiu à laranjeira 'Valência' maior tolerância da fotossíntese em relação ao porta-enxerto limoeiro 'Cravo', pois a assimilação de CO_2 tem menor queda sob o frio e tem capacidade de recuperação após retorno à temperatura noturna de 20 ^{o}C.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS III, W.W.; DEMMIG-ADAMS, B.; ROSENSTIEL, T.N.; BRIGHTWELL, A.K.; EBBERT, V. Photosynthesis and photoprotection in overwintering plants. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 4, p. 545-557, 2002.

AHN, S.J.; IM, Y.J.; CHUNG, G.C.; CHO, B.H.; SUH, S.R. Physiological responses of grafted-cucumber leaves and rootstock roots affected by low root temperature. **Scientia Horticulturae**, Local, v. 81, p. 397 – 408, 1999.

ALLEN, D.J.; RATNER, K.; GILLER, Y.E.; GUSSAKOVSKY, E.E.; SHAHAK, Y.; ORT, D.R. An overnight chill induces a delayed inhibition of photosynthesis at midday in mango (*Manguifera indica* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p.1893-1902, 2000.

ALLEN, D.J.; ORT, D.R. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 6, p. 36-42, 2001.

AMARAL, L.I.V.; GASPAR, M.; COSTA, P.M.F.; AIDAR, M.P.M.; BUCKERIDGE, M.S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, São Paulo v. 34, p. 425-431, 2007.

ANDREWS JR, FRYER MJ, BAKER NR. Characterization of chilling effects on hotosynthetic performance of maize crops during early season growth using chlorophyll fluorescence. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, p. 1195–1203, 1995.

AZCÓN-BIETO, J. Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.73, p. 681-686, 1983.

BAKER, N.R.; ROSENQVIST, E. Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1607-1621, 2004.

BAKER, N.R.; HARBINSON, J.; KRAMER, D.M. Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 30, p. 1107-1125, 2007.

BAKER, N.R. Chlorophyll Fluorescence: A probe of photosynthesis *in vivo*. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.59, p. 89-113, 2008.

BARBER, J.; ANDERSSON, B. Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. **Trends in Biochemical Sciences**, London, v. 17, p. 61-66, 1992.

BASSHAM, J.A.; KRAUSE, G.H. Free energy changes and metabolic regulation in steady state photosynthesis carbon reduction. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.189, p. 207–221, 1969.

BAUER, H.; WIERER, W.H.; HATHEWAY, H.; LARCHER, W. Photosynthesis of *Coffea arabica* after chilling. **Physiologya Plantarum**, Copenhagen, v. 64, p. 449-454, 1985.

BECK, E.; ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 95-118, 1989.

BERNACCHI, C.J.; SINGSAAS, E.L.; PIMENTEL, C.; PORTIS, A.R.; LONG, S.P. Improved temperature response functions for models of Rubisco-limited photosynthesis. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, p. 253-259, 2001.

BERNACCHI, C.J.; PORTIS, A.R.; NAKANO, H.; VON CAEMMERER, S.; LONG, S.P. Temperature response of mesophyll conductance. Implications for the determination of Rubisco enzyme kinetics an for limitations to photosynthesis in vivo. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 1992-1998, 2002.

BERTAMINI, K. MTHUCHELIAN, K.; RUBINIGG, M. ZORER, R. NEDUNCHEZHIAN, N. Low-night temperature (LNT) induce changes of photosynthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.) plants. **Plant Physiology and Biochemistry,** Local, v. 43, p. 693-699, 2005.

BEVINGTON, K.B.; CASTLE, W.S. Annual roots growth pattern of young citrus trees in relation to shoot growth, soil temperature and soil water content. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 110, p. 840-845, 1985.

BIELESKI, R.L.; TURNER, A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical biochemistry**, Amsterdam, v. 17, p. 278-293, 1966.

BILGER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**, New York, v. 102, p. 425-432, 1995.

BRIANTAIS, J.M.; VERNOTTE, C.; PICAUD, M.; KRAUSE, G.H. Quantitative study of the slow decline of chlorophyll alpha-fluorescence in isolated chloroplasts. **Biochemica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 548, p. 128-138, 1979.

BRÜGGEMANN W.; LINGER P. Long-term chilling of young tomato plants under low light. IV. Differential responses of chlorophyll fluorescence quenching coefficients

in *Lycopersicon* species of different chilling sensitivity. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 35, p. 585–591, 1994.

COCHARD, H.; TYREE, M.T. Xylem dysfunction in *Quercus*: vessel sizes, tyloses, cavitation and seasonal changes in embolism. **Tree Physiology**, Victoria, v. 6, p. 393–407, 1990.

CORNIC, G.; BRIANTAIS, J.M. Partitioning of photosynthetic electron flow between CO_2 e O_2 reduction in a C3 leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO_2 concentration and during drought stress. **Planta**, New York, v. 183, p. 178-184, 1991.

CRITCHLEY, C. Photoinhibition. In: RAGHAVENDRA, A.S. Photosynthesis: a comprehensive treatise. Cambridge: Cambridge University Press. 1998. chap. 20, p. 264-272.

DAVENPORT, T. L. Citrus flowering. **Horticultural Reviews**, Westport, v. 12, p. 349-408, 1990.

DAVIS, W,J,; ZHANG, J. Root signals and regulation of growth and development of plants in drying soil. **Annual Review of Plant and Molecular Biology,** Boca Raton, v. 42, p. 55-76, 1991.

DAY, T.A.; HECKATHORN, S.A.; DELUCIA, E.H. Limitations of photosynthesis in *Pinus taeda* L. (Loblolly-Pine) at low soil temperatures. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, p. 1246-1254, 1991.

DELIEU, J.T.; WALKER, D.A. Polarographic measurement of photosynthesis oxygen evolution by leaf discs. **New Phytologist**, Oxford, v. 89, p. 165-178, 1981.

DELUCIA E.H.; DAY, T.A.; ÖQUIST, G. The potential for photoinhibition of pinus-sylvestris seedlings exposed to high light and low soil-temperature. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, p. 611-617, 1991.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS III, W.W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 599-626, 1992.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W.W. III; EBBERT, V.; LOGAN, B.A. Ecophysiology of the xanthophyll cycle. In: Advances in Photosynthesis. The photochemistry of Carotenoids. 1999. v.8, p. 245-269.

DICKSON, R.E. Assimilate distribution and storage. In: Phisiology of trees. Ed. A.S. Raghvendra. John Wiley & Sons Inc, New York, p. 51-85, 1991.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n.30, p. 350-356, 1956.

EPRON, D.; GODARD, D.; CORNIC, G.; GENTY, B. Limitation of net CO2 assimilation rate by internal resistances to CO2 transfer in the leaves of two tree species (*Fagus sylvatica* L. and *Castanea sativa* Mill.). **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 18, p. 43-51, 1995.

ERISMANN, N.M; MACHADO, E.C.; GODOY, I.J. Capacidade fotossintética de genótipos de amendoim em ambiente natural e controlado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 1099-1108, 2006.

FARQUHAR, G.D.; VON CAEMMERER, S.; BERRY, J.A. a biochemical model of photosynthetic CO_2 assimilation in leaves of C_3 species. **Planta**, New York, v. 149, p. 78-90, 1980.

FARQUHAR, G.D.; SHARKEY, T.D. Stomatal conductance and photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 33, p. 317-345, 1982.

FLEXAS, J.; BADGER, M.; CHOW, W.S.; MEDRANO, H.; OSMOND, C.B. Analysis of the relative increase in photosynthetic O_2 uptake when photosynthesis in grapevine leaves is inhibited following low night temperatures and/or water stress. **Plant Physiology**, Rockville, v. 121, p. 675-684, 1999.

FLEXAS, J.; GULIAS, J.; JONASSON, S.; MEDRANO, H.; MUS, M. Seasonal patterns and control of gas exchange in local populations of the Mediterranean evergreen shrub *Pistacia lentiscus* L. **Acta Oecologica**, Paris, v. 22, p. 33-43, 2001.

FLEXAS, J.; RIBAS-CARÓ, M.; DIAZ-ESPEJO, A.; GALMÉS, J.; MEDRANO, H. Mesophyll conductance to CO_2: current knowledge and future prospects. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 31, p. 602-621, 2008.

FNP CONSULTORIA e COMÉRCIO. Agrianual 2005: Anuário da Agricultura Brasileiras. São Paulo, p.520, 2005.

FRACHEBOUD, Y. Using chlorophyll fluorescence to study photosynthesis. http://www.ab.ipw.agrl.ethz.ch/~yfracheb/flex.htm, 2001. (03 fevereiro 2009)

FRYER, M.J.; ANDREWS, J.R.; OXBOROUGH, K.; BLOWER, D.A.; BAKER, N.R. Relationship between CO_2 assimilation, photosynthetic electron transport and active O_2 metabolism in leaves of mayze in the field during periods of low temperature. **Plant Physiology**, Rockville, v.116, p. 571-580, 1998.

GARCIA-LUIZ, A.; FORNÉS, F. & GUARDIOLA, JL. Leaf carbohydrate and flower formation in *Citrus*. **Journal of the American Society for Horticulturae Science**, Alexandria, v. 120, p. 222-227, 1995.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.-M.; BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 990, p. 87-92, 1989.

GOLDSCHIMIDT, E.E.; GOLOMB, A. The carbohydrate balance of alternate-bearing citrus trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 107, p. 206-208, 1982.

GOLDSCHMIDT, E.E.; KOCH, K.E. Citrus. In: ZAMSKI, E.; SCHAFFER, A.A. (Eds.) Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-sink relationships. Marcel Dekker, Inc. New York, 1996. p. 797-823.

GOLDSCHMIDT, E. E. Carbohydrate supply as a critical factor for citrus fruit development and productivity**. HortScience**, Alexandria, v. 34, p. 1020-1024, 1999.

GROOM QJ, BAKER NR. Analysis of light-induced depressions of photosynthesis in leaves of a wheat crop during the winter. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, p. 1217–1223, 1992.

HABERMANN, G; MACHADO, E. C. ; RODRIGUES, J D ; MEDINA, C L . Gas exchange rates at different vapor pressure deficits and water relations of 'Pera' sweet orange plants with citrus variegated chlorosis (CVC). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 98, p. 233-245, 2003.

HANDEL, E. V. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v. 22, p. 280-283, 1968.

HAVAUX, M.; NIYOGI, K.K. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 96, p. 8762-8767, 1999.

HIKOSAKA, K.; MURAKAMI, A.; RIROSE, T. Balancing carboxylation and regeneration of ribulose-1,5-bisphosphate in leaf photosynthesis: temperature acclimation of an evergreen tree, *Quercus myrsinaefolia*. V. 22, p. 841-849, 1999.

HORTON, P.; RUBAN, A.V.; WALTERS, R.G. Regulation of light harvesting in green plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 655-684, 1996.

HUBBARD, R.M., RYAN, M.G., STILLER, V., SPERRY, J.S. Stomatal conductance and photosynthesis vary linearly with plant hydraulic conductance in ponderosa pine. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, p. 113-121, 2001.

IGLESEAS, D.J.; LLISO, I.; TADEO, F.R.; TALON, M. Regulation of photosynthesis throught source-sink imbalance in citrus is mediated by carboydrate content in leaves. **Physiologia Plantarun**, Copenhagen, v. 116, p. 563-572, 2002.

IGLESIAS, D.J.; TADEO, F.R.; PRIMO-MILLO, E.; TALON, M. Fruit set dependence on carbohydrate availability in citrus trees. **Tree Physiology**, Victoria, v. 2, p. 199-204, 2003.

IQBAL, R.M.; RAO, AUR-R.; RASUL, E.; WAHID, A. Mathematical models and response functions in photosynthesis: an exponencial model. In: Pessaraki, M. (Ed.), Handbook of photosynthesis. Marcel Dekker Inc., New York , USA , 1997. p. 803-810.

JACOB, J.; LAWLOR, D.W. Stomatal and mesophyll limitations of photosynthesis in phosphate deficient sunflower, maize and wheat plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, p. 1003-1011, 1991.

KAUFMANN, M.R. Evaluation of the pressure chamber method for measurement of water stress in citrus. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 93, p. 186-190, 1968.

KHAIRI, M.M.; HALL, A.E. Temperature and humidity effects on net photosynthesis and transpiration of citrus. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 36, p. 29-34, 1976.

KRALL, J.P.; EDWARDS, G.E. Relationship between photosystem II activity and CO_2 fixation in leaves. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 86, p. 180-187, 1992.

KRAMER, P.J. Water relations of plants. New York: Academic Press, 1983. 489 p.

KRAMER, P.J.; BOYER, J. Water Relations of Plants and Soils. New York: Academic Press. 1995.

KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 5, p. 139-157, 1984.

KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 313-349, 1991.

LANGAN, S.J.; EWERS, F.W.; DAVIS, S.D. Xylem dysfunction caused by water tress and freezing in two species of co-occurring chaparral shrubs. **Plant, Cell and Environment**, Oxford**,** v. 20, p. 425–437, 1997.

LEEGOOD, R.C.; EDWARDS, E.G. Carbon metabolism and photorespiration: temperature dependence in relation to other environmental factors. In: Photosynthesis and the Environment (Baker, N.R., ed.), p. 191-221, Kluwer Academic, 1996.

LOVISOLO, C.; SCHUBERT, A. Effects of water stress on vessel size and xylem hydraulic conductivity in *Vitis vinifera* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 321, p. 693-700, 1998.

LEVY, Y. Effect of evaporative demand on water relations of *Citrus limon*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 46, p. 695-700, 1980.

LONG, S.P.; HUMPHRIES, S.; FALKOWSKI, P.G. Photoinhibition of photosynthesis in nature. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 45, p. 633-662, 1994.

LONG, S.P., BERNACCHI, C.J. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. **J.ournal of Experimental Botany**. Oxford, v. 54, p. 2393-2401, 2003.

LORETO, F.; HARLEY, P.C.; MARCO, G.D.; SHARKEY, G.D. Estimation of mesophyll conductance to CO_2 flux by three different methods. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, p. 1437-1443, 1992.

LYR, H. Effect of the root temperature on growth parameters of various European tree species. **Annales des Sciences Forestieres,** Champenoux, v. 53, p. 317-323, 1996.

MACHADO, E.C.; QUAGGIO, J.A.; LAGÔA, A.M.M.A.; TICELLI, M.; FURLANI, P.R. Trocas gasosas e relações hídricas de laranjeiras com clorose variegada dos citros. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 6, p. 53-57, 1994.

MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F.; MEDINA, C.L.; SOUZA, R.P.; RIBEIRO, R.V.; SILVA, J.A.B.; STUCHI, E.S.; PAVANI, L.C. Respostas fisiológicas de laranjeira 'Natal' com clorose variegada dos citros (CVC) sob irrigação em condições de campo, em diferentes meses do ano. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISIOLOGIA VEGETAL, 8., Ilhéus, 2001. Cd-Rom.

MACHADO, E.C.; MEDINA, C.L.; GOMES, M.M.A.; HABERMANN, G. Variação sazonal da fotossíntese, condutância estomática e potencial da água na folha de laranjeira 'Valência'. **Scientia Agrícola,** Piracicaba, v. 59, p. 53-58, 2002.

MACHADO, E.C. SCHMIDT, P.T.; MEDINA, C.L.; RIBEIRO, R.V. Respostas da fotossíntese a fatores ambientais em três espécies de citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v. 40, p. 1161-1170, 2005.

MAGALHÃES FILHO, J,R. Resposta da fotossíntese à variação da temperatura no sistema radicular em laranjeira 'Valência'. 2009. 50 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agronômico, Campinas.

MANTER, D.K.; KERRIGAN, J. A/Ci curve analysis across a range of wood plant species: influence of regression analysis parameters and mesophyill conductance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, p. 2581-2588, 2004.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 659-668, 2000.

MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C.; PINTO, J.M. Fotossíntese de laranjeira 'Valencia' enxertada sobre quatro porta-enxertos e submetida à deficiência hídrica. **Bragantia**, Campinas, v. 57, p. 1-14, 1998.

MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeira 'Valência' enxertada sobre limoeiro 'Cravo' e 'Trifoliata' e submetida à deficiência hídrica. **Bragantia**, Campinas, v.57, p. 15-22, 1999.

MEDINA, C. L.; MACHADO, E. C.; GOMES, M. M. A. Condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranjeira "Valencia" sob deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, p. 29-34, 1999.

MEDINA, C.L. Fotossíntese, relações hídricas e alterações bioquímicas em laranjeira 'Pêra' com CVC e submetida à deficiência hídrica. Campinas, 2002. 147p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.

MEDINA, C. L.; SOUZA, R. P.; MACHADO, E. C.; RIBEIRO, R. V.; SILVA, J. A. B. Photosynthetic response of citrus grown under reflective aluminized polypropylene shading nets. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 96, p. 115-125, 2002.

MELIS A. Photosystem II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? **Trends in Plant Science,** London, v. 4, p.130-135, 1999.

MONSELISE, S.P. Citrus. In: HALEVY, A.H. Handbook of fruit set and development. Boca Raton: CRC Press, 1986. p. 87-108.

NORISADA M.; HARA, M.; YAGI. H.; TANGE, T. Root temperature drives winter acclimation of shoot water relations in cryptomeria japonica seedlings. **Tree Physiology**, Victoria, v. 25, p. 1447-1455, 2005.

ÖQUIST, G. & HUNER, N.P.A. 2003. Photosynthesis of overwintering evergreen plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 329–55, 2003.

ORT, D.R.; BAKER, N.R. A photoprotective role for O_2 as an alternative electron sink in photosynthesis? **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.5, p. 193-198, 2002.

OSMOND, C.B. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of sun and shade plants. In: BAKER, N.R.; BOWYER, J.R. Photoinhibition and photosynthesis: from molecular mechanisms to the field. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1994. chap. 1, p.1-24.

ONODA, Y.; HIKOSAKA, K.; HIROSE, T. The balance between RuBP carboxylation and RuBP regeneration: a mechanism underlying the interspecific variation in acclimation of photosynthesis to seasonal change in temperature. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 32, p. 903-910, 2005.

PEREIRA, A.R.; ANGELOCCI, L.R.; SENTELHAS, P.C. Agrometeorologia. Fundamentos e Aplicações Práticas. Livraria e Editora Agropecuária, 2002. 478 p.

PIMENTEL, C.; BERNACCHI, C.; LONG, S. Limitations to photosynthesis at different temperatures in the leaves of *Citrus limon*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 19, p. 141-147, 2007

POCKMAN, W.T.; SPERRY, J.S. Freezing-induced xylem cavitation and the northern limit of *Larrea tridentata*. **Oecologia**, New York, v. 109, p.19–27, 1997.

POMPEU Jr., J. Porta-enxertos. In: Mattos Jr., D.; Denigri, J.D. Pio, R.M.; Pompeu Jr, J. (Eds). Citros. Campinas, p. 61-104, 2005.

PRADO, A.K.S. Florescimento, frutificação e teores de carboidratos em laranjeiras 'Valência' com diferentes níveis de produtividade e submetidas à irrigação. 2006. 46 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agronômico, Campinas.

PRADO, A.K.S.; MACHADO, E.C.; MEDINA, C.L.; MACHADO, D.F.S.P.; MAZZAFERA, P. Florescimento e frutificação em laranjeiras 'Valência' com diferentes cargas de frutos e submetidas ou não à irrigação. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 2, p. 173-182, 2007.

REUTHER, W. Climate and citrus behavior. In: The Citrus Industry. Riverside: University of California, 1973. v. 3, chap. 9, p. 280-337.

REUTHER, W. Citrus. In: Alvim, P.T.; Kozlowski, T.T. Ecophysiology of tropical crops. London: Academic Press, 1977. chap. 15, p. 409-439.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F. Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 62, p. 167-173, 2003.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; SANTOS, M.G.; OLIVEIRA, R.F. Variação sazonal e diária do conteúdo de carboidratos em folhas de laranjeira 'Valência'. In: Congresso Brasileiro De Fisiologia Vegetal, 10. Congresso Latino Americano De Fisiologia Vegetal sazonal da fotossíntese e relações hídricas de laranjeira 'Valência**'**. 2006. 157f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; BRUNINI, O. Ocorrência, 12., 2005, Recife. Recife. Resumos expandidos. CD-ROM.

RIBEIRO, R.V. MAHADO, E.C.; BRUNINI, O. Ocorrência de condições ambientais para a indução de florescimento de laranjeiras no Estado de São Paulo. **Revista Brasiléia de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, p. 247-253, 2006.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C. Some aspects of citrus ecophysiology in subtropical climates: re-visting photosynthesis under natural conditions. **Brazilian Journal of Plant Physiology,** Londrina, v.19, p. 393-411, 2007.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; SANTOS, M.G.; OLIVEIRA, R.F. Photosynthesis and water relations of well-watered orange plants as affected by winter and summer conditions. **Photosynthetica**, Praga, 2009a (no prelo).

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; SANTOS, M.G.; OLIVEIRA, R.F. Seasonal and diurnal changes in photosynthetic limitation of young sweet orange trees. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, 2009b (no prelo).

RUIZ, A.; GARCIA-LUIS, C.; MONERRI, C.; GUARDIOLA, J.L. Carbohydrate availability in relation to fruitlet in Citrus. **Annals of Botany**, Oxford, v. 87, p. 805-812, 2001.

SAGE, R.F. Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO_2: the gas exchange perspective. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 39, p. 351-368, 1994.

SCHINDLER, C.; LITCHTENTHALER, H.K. Photosynthetic CO_2-assimilation, chlorophyll fluorescence and zeaxanthin accumulation in field grown maple trees in the course of a sunny and cloudy day. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 148, p. 399-412, 1996.

SCHREIBER, U.; BILGER, W.; HORMANN, H.; NEUBAUER, C. Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. In: Raghavendra, A.S. Photosynthesis: a comprehensive treatise. Cambridge: Cambridge

University Press. 1998. chap. 24, p. 320-336

SELLIN, A.; KUPPER, P. Temperature, light and leaf hydraulic conductance of little-leaf linden (*Tilia cordata*) in a mixed forest canopy. **Tree Physiology**, Victoria, v. 27, p. 679-688, 2007.

SOUZA, R.P.; MACHADO, E.C; SILVA, J.A.B.; LAGÔA, A.M.M.A. SILVEIRA J.A.G. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmental and Experimental Botany** , Oxford, v. 51, p. 45–56, 2004.

SPERRY, J.S.; DONNELLY, J.R.; TYREE, M.T. Seasonal occurrence of xylem embolism in sugar maple (*Acer saccharum*). **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 75, p. 1212-1218, 1988.

SPERRY, J.S.; SULLIVAN, J.E.M. Xylem embolism in response to freeze–thaw cycles and water stress in ring-porous, diffuse-porous, and conifer species. **Plant Physiology,** Rockville, v. 100, p. 603–613, 1992.

STHAPIT, B.R.;WITCOMBE, J.R.; WILSON, J.M. Methods of selection for chilling tolerance in nepalese rice by chlorophyll fluorescence analysis. **Crop Science**, Hoboken, v. 35, p. 90–94. 1995.

STRAND, M.; LUNDMARK, T.; SODERBERGH, I. & MELLANDER, P.E. Impacts of seasonal air and soil temperatures on photosynthesis in Scots pine trees. **Tree Physiology**, Victoria, v. 22, p. 839-847, 2002.

SYVERTSEN, J.P.; LLOYD, J. Citrus. In: SCHAFFER, B.; ANDERSEN, P.C. Handbook of environmental physiology of fruit crops: sub-tropical and tropical crops. Boca Raton: CRC Press, 1994. v. 2, chap. 4, p.65-99.

SYVERTSEN, J.P.; GOÑI, C.; OTERO, A. Fruit load and canopy shading affect leaf characteristics and net gas exchange of 'Spring' navel orange trees. **Tree Physiology**, Victoria, v. 23, p. 899-906, 2003.

TUBÉLIS, A. Clima: fator que afeta a produção e qualidade da laranja. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 16, p. 179-211, 1995.

TYREE, M.T.; SPERRY, J.S. Vulnerabily of xylem to cavitation and embolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p.19-38, 1989.

VAN HEERDEN, P.D.R.; KRÜGER, G.H.J.; LOVELAND, J.E.; PARRY, M.A.J.; FOYER, C.H. Dark chilling imposes metabolic restrictions on photosynthesis in soybean. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 26, p. 323-337, 2003

VESELOVA, S.V.; FARHUTDINOV, R.G.; VESELOV, S.Y.; KUDOYAROVA, G.R.; VESELOV, D.S.; HARTUNG, W. The effect of root cooling on hormone content, leaf conductance and root hydraulic conductivity of durum wheat seedlings (*Triticum durum* L.). **Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.162, p.21-16, 2005.

VON CAEMMERER, S. Biochemical models of leaf photosynthesis. In: Techniques in Plant Science. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, 165 p., 2000.

WARREN, C.R.; ADAMS, M.A. Internal conductance does not scale with photosynthetic capacity: implications for carbon isotope discrimination and the economics of water and nitrogen use in photosynthesis. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, p. 192-201, 2006.

WARREN, C.R. Does growth temperature affected the the temperature responses of photosynthesis and internal conductance to CO_2? A test with *Eucalyptus regnans*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 28, p. 11-19, 2008.

YAMORI, W.; NOGUCHI, K.; TERASHIMA, I. Temperature acclimation of photosynthesis in spinach leaves: analyses of photosynthetic components and temperature dependencies of photosynthetic partial reactions. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, p. 536-547, 2005

ZHANG, Y.P.; QIAO, Y.X; ZHANG, Y.L.; ZHOU, Y.H.; YU, Y.Q. Effects of root temperature on leaf gas exchange and xylem sap abscisic acid concentrations in six Curcubitaceae species. **Photosynthetica**, Praga, v. 46, p. 356-362, 2008.

ZHOU, Y.; HUANG, L.; ZHANG, Y, SHI, K.; YU, J.; NOGUÉS, S. Chill-induced decrease in capacity of RuBP carboxylation and associated H_2O_2 accumulation in cucumber leaves are alleviated by grafting onto figleaf gourd. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, p. 839-848, 2007.