

## Doses de adubação nitrogenada e teor de prolina em laranjeiras ‘Pera’

SANTOS, M E Renata<sup>1</sup>; CARVALHO, Luciana M<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Graduanda em Ciências dos Alimentos, bolsista Pibic/CNPq/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup> Bióloga, Pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

**Resumo** – O presente trabalho visou determinar os efeitos de quatro doses de adubação nitrogenada no acúmulo de prolina em folhas de laranjeiras ‘Pera’ enxertadas no limoeiro ‘Cravo’, tangerineira ‘Sunki Tropical’ e citrandarim ‘San Diego’ nas condições de Tabuleiros Costeiros da Bahia. Com esse fim, removeu-se amostras de folhas do 3º ou 4º nó de ramo terminal de laranjeira, no período úmido e seco do ano de 2019. Procedeu-se a extração e determinação colorimétrica do teor de prolina nas folhas. Verificou-se que, independentemente do porta-enxerto, todas as laranjeiras apresentaram acúmulo de prolina no período úmido e no seco. Houve efeito significativo das doses apenas no período úmido. No período seco, maior acúmulo de prolina foi determinado nas laranjeiras enxertadas no limoeiro ‘Cravo’. Conclui-se que o porta-enxerto ‘Cravo’ induz maior potencial de tolerância à seca às laranjeiras e que as doses de nitrogênio exercem efeito significativo no acúmulo de prolina apenas no período úmido.

**Termos para indexação:** *Citrus sinensis*, porta-enxertos, aminoácido, extração química.

### Introdução

Nos pomares do Nordeste brasileiro predomina a laranjeira ‘Pera’ (*Citrus sinensis*) enxertada no limoeiro ‘Cravo’. Nos últimos anos tem sido demandada pelo setor citrícola a diversificação dos pomares com a utilização de porta-enxertos alternativos ao ‘Cravo’, a exemplo da tangerineira ‘Sunki Tropical’ e do citrandarim ‘San Diego’. Daí a necessidade de desenvolver recomendações de adubação para novas combinações copa x porta-enxerto de citros. Dentre os nutrientes minerais, o nitrogênio (N) é um dos que é requerido em maior quantidade pelas laranjeiras, o que motivou esse estudo com avaliação do efeito de doses de N.

Syvetsen e Levy (2005) verificaram que a tolerância ao déficit hídrico em plantas de citros varia grandemente com o porta-enxerto. Como os pomares nordestinos são cultivados sem irrigação, dependem das chuvas para atender seu requerimento hídrico. Portanto, é necessário avaliar a tolerância à seca de novas combinações copa/ porta-enxerto a fim de verificar qual delas teria maior potencial de tolerância ao déficit hídrico nas condições locais de clima e solo.

É largamente conhecido que, em condições de déficit hídrico, o acúmulo do aminoácido prolina aumenta, o que seria devido ao papel de soluto osmo-compatível nos processos de tolerância à seca (Garcia Sanchez et al., 2007). Por esse motivo tem sido considerado como marcador de tolerância à seca. O presente estudo teve como objetivo determinar o efeito de quatro doses de adubação nitrogenada no acúmulo de prolina de folhas de laranjeiras ‘Pera’ sobre três porta-enxertos nas condições edafoclimáticas dos Tabuleiros Costeiros da Bahia.

### Material e métodos

Os estudos relativos à extração e determinação de prolina foram feitos a partir de amostras foliares obtidas a partir de laranjeiras ‘Pera’ de seis anos de idade, no período mais úmido (agosto) e no período seco (novembro) de 2019.

As laranjeiras foram enxertadas nos porta-enxertos limoeiro ‘Cravo’, citrandarim ‘San Diego’ e tangerineira ‘Sunki Tropical’, cultivadas, sem irrigação, em fazenda comercial situada no município de Rio Real-Bahia. De 2013 (ano do plantio) até 2015 foram adubadas anualmente e igualmente pelo citricultor de acordo com recomendação para laranjeiras ‘Pera’ sobre ‘Cravo’ (Sobral et al., 2000). Em 2016 foi feita análise do solo para verificar necessidade de correção e ajustes na adubação. Feito isso, de 2016 a 2019 o nitrogênio, fornecido como ureia aplicada no solo, na área de projeção da copa, teve sua dose alterada entre as plantas com o fim de estabelecer tratamento de doses de N, enquanto a adubação dos demais nutrientes seguiu recomendação para ‘Pera’ sobre ‘Cravo’, desde que não há recomendação para demais porta-enxertos. Foram avaliadas quatro doses de N: testemunha (0 kg ha<sup>-1</sup>),

dose recomendada para laranjeira ‘Pera’ sobre limoeiro ‘Cravo’ (300 kg ha<sup>-1</sup>), uma dose inferior (200 kg ha<sup>-1</sup>) e outra acima do valor de referência (400 kg ha<sup>-1</sup>). Essas doses foram definidas a partir da tabela de recomendação de N para a laranjeira ‘Pera’ sobre limoeiro ‘Cravo’, para cada idade da planta (Sobral et al. 2007), corrigida para plantas sobre ‘San Diego’ e ‘Sunki Tropical’ em função de seus dados anuais de produtividade. Os tratamentos de adubação foram aplicados anualmente no período úmido. Análises do solo e folhas foram feitas anualmente para orientar possíveis ajustes na adubação. A linha de plantio foi mantida sem interferência de ervas daninhas por meio da aplicação periódica de herbicidas permitidos para a cultura, enquanto a entrelinha foi roçada periodicamente. O controle químico de pragas e doenças foi feito durante todo o ensaio com produtos indicados para a cultura.

A extração e determinação de prolina foi realizada em laboratório da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju-Sergipe, de agosto de 2019 a março de 2020. A determinação do teor de prolina nas folhas seguiu o protocolo de Bates et al. (1973). A verificação da adequação da metodologia se deu em testes preliminares conduzidos ao longo de cerca de dois meses, com extrações e determinações, realizadas em duplicata.

Em agosto de 2019, quando as laranjeiras estavam com muitos frutos pequenos, coletaram-se duas folhas completamente expandidas do 3º ou 4º nó de ramos com fruto (de 2 a 4 cm de diâmetro). Em novembro de 2019, quando as plantas estavam em outra fase de desenvolvimento e não tinham frutos no mesmo tamanho, coletou-se amostra foliar de ramo sem fruto. Nesse último caso optou-se por coletar discos foliares (5 discos de 8mm) ao invés da folha inteira. As folhas coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos de polietileno previamente identificados, enquanto no segundo caso, os discos foliares foram acondicionadas em frascos plásticos tipo eppendorf com 3 mL de ácido sulfosalicílico. As amostras foliares foram imediatamente resfriadas em freezer portátil a aproximadamente -20°C e posteriormente armazenadas no laboratório, em freezer horizontal na mesma temperatura, enquanto aguardava realização da extração e determinação do teor de prolina. Em cada um dos períodos de coleta, as avaliações do teor de prolina foram conduzidas em Delineamento de Blocos ao acaso, em esquema de parcela subdividida, com 12 tratamentos (três combinações de copa x porta-enxerto, nas parcelas, e quatro doses de adubação nitrogenada, nas subparcelas) e cinco repetições, totalizando 60 amostras.

Por meio de testes preliminares, determinou-se a massa foliar necessária a ser utilizada na extração e quantificação de prolina nas folhas de laranjeiras ‘Pera’. Padronizou-se a massa de cerca de 0,012 g de folha, removida da região central da folha (área sem nervuras). Após o preparo das soluções necessárias, ou seja, ácido fosfórico 6 N, ácido sulfo-salicílico a 3% e ninidrina ácida, as extrações foram realizadas. A extração de prolina se deu em cadinho (das amostras de agosto de 2019), mantido em bandeja com gelo a fim de assegurar que a temperatura se mantivesse baixa, em torno de 4°C. Em conformidade com a metodologia de Bates et al. (1973), a prolina foi extraída das folhas e/ou discos foliares a partir da maceração de cada amostra com 10 mL de ácido sulfo-salicílico a 3%, e posterior filtragem à vácuo.

Em alternativa a esse processo extrativo, as amostras (discos foliares) coletadas em novembro de 2019 foram extraídas segundo modificação sugerida por Levy (1980), segundo a qual essas amostras são imediatamente acondicionadas em frascos com 2 mL de ácido sulfo-salicílico a 3%, mantidos a -20°C por no mínimo 48 horas. A extração se completou com agitação por duas horas a 200 rpm das amostras congeladas a temperatura ambiente (reduzida a cerca de 23°C por meio de ar-condicionado). Antes de se adotar essa metodologia foi feito um teste preliminar onde se comparou os resultados obtidos com ambas as metodologias e verificou-se não ter diferença significativa, daí optou-se pelo segundo método por ser mais prático e rápido.

Logo após a extração, iniciou-se o processo de determinação colorimétrica do teor de prolina proposto por Bates et al. (1973). Para isso, em tubos de vidro com tampa rosqueável previamente identificados, foi adicionado 1 a 2 mL do filtrado juntamente com 1 a 2 mL de ácido acético e 1 a 2 mL de ninidrina ácida, que foram submetidos a banho maria à 100°C por 60 minutos. Após esse período, os tubos foram imediatamente resfriados ao gelo para paralisar a reação. Quando os tubos atingiram a temperatura ambiente, 4mL de tolueno foi adicionado a cada tubo de vidro para separação das fases cromófora e não cromófora. A fase cromófora foi recolhida com pipeta Pasteur e levada ao cromatógrafo para leitura da absorvância a 520 nm. Os dados de prolina foram registrados, analisados por meio do programa estatístico computacional Sisvar. Os dados foram submetidos à análise de variância, seguida

por teste de comparação entre médias Scott Knott 5 %, para variáveis qualitativas, e teste de regressão para variáveis quantitativas.

## Resultados e Discussão

Verificou-se acúmulo de prolina nas folhas de laranja ‘Pera’, independente do porta-enxerto, no período chuvoso (Agosto) e no seco (Novembro). Carvalho et al. (2021) também constataram acúmulo de prolina em laranjeiras ‘Pera’ tanto no período úmido quanto no seco. A análise de variância revelou que a interação cultivar porta-enxerto x doses de N foi significativa apenas para dados de agosto (Tabela 1). O desdobramento da interação ‘Cultivar’ x ‘Doses’ para os dados de agosto indicou ocorrência de diferença significativa entre as combinações copa/ porta-enxerto apenas na dose de 300 g de nitrogênio por planta, na qual houve maior acúmulo de prolina nas plantas sobre ‘San Diego’ (Tabela 2). Em contraste, Carvalho et al. (2021) encontraram maiores acúmulos de prolina no período úmido nas folhas das laranjeiras ‘Pera’ enxertadas em ‘Cravo’ do que naquelas sobre ‘San Diego’. Sugere-se que nesse trabalho o acúmulo tenha sido afetado pela ocorrência de algum veranico, o que é comum durante período úmido nessa região.

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância para dados de prolina obtidos em agosto e novembro de 2019 em ensaio com laranja ‘Pera’ sobre três porta-enxertos cultivadas sob quatro doses de adubação nitrogenada. Rio Real, 2019.

Fontes de variação	Graus de Liberdade	Quadrado médio	
		Agosto/ 2019	Novembro/ 2019
Rep	4	3.306,68 ns	2.381,04 ns
Cultivar (CVA)	2	888,37 ns	9.897,44**
Erro 1	8	1.099,58	1.262,42
Doses (DS)	3	100.377,69**	114.755,19**
CVA x DS	6	5.602,00**	3.752,85 ns
Erro 2	36	1.771,57	2.120,38
CV 1 (%)		16,31	15,03
CV 2 (%)		20,70	19,48
Média geral		203,32	236,43

Os valores seguidos por \*, \*\* e ns são, respectivamente, significativos a 5%, 1% ou não significativos pelo teste F.

**Tabela 2.** Acúmulo de prolina ( $\mu$ Moles de prolina/ g massa fresca) em laranjeiras ‘Pera’ enxertadas em três cultivares porta-enxerto, em função da dose de adubação nitrogenada. Rio Real. Agosto, 2019.

Doses de adubo nitrogenado (kg de N/planta)	Cultivares porta enxerto		
	‘Cravo’	‘San Diego’	‘Sunki Tropical’
0	106,92 <sup>a</sup>	111,93 <sup>a</sup>	129,23 <sup>a</sup>
200	186,06 <sup>a</sup>	160,51 <sup>a</sup>	159,99 <sup>a</sup>
300	196,05 <sup>b</sup>	282,18 <sup>a</sup>	183,30 <sup>b</sup>
400	311,53 <sup>a</sup>	289,60 <sup>a</sup>	322,81 <sup>a</sup>

Os números seguidos pela mesma letra, nas linhas, indicam que as medias não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%.

A análise dos dados de prolina obtidos com a amostragem realizada em novembro 2019, período seco, revelou que não houve efeito significativo das doses sobre teor de prolina nesse período. Procedeu-se, portanto, a avaliação do acúmulo de prolina entre as combinações copa/ porta-enxerto independente das doses (Tabela 3). No período seco constatou-se maior acúmulo nas

laranjeiras ‘Pera enxertadas no limoeiro ‘Cravo’. Considerando que a prolina é tida como marcador de tolerância à seca, o maior acúmulo nessas plantas sugere maior potencial de tolerância para as laranjeiras enxertadas no ‘Cravo’, combinação copa/ porta-enxerto que predomina nos pomares do polo citrícola do Nordeste.

**Tabela 3.** Acúmulo médio de prolina em laranjeiras ‘Pera’ enxertadas em três cultivares porta-enxerto, independente da dose de nitrogênio. Rio Real. Novembro, 2019.

Cultivares porta-enxerto	Prolina ( $\mu$ Moles de prolina/ gmassa fresca)
Limoeiro ‘Cravo’	212,40 <sup>b</sup>
Citrandarín ‘San Diego’	240,59 <sup>a</sup>
Tangerineira ‘Sunki Tropical’	256,30 <sup>a</sup>
Media geral	236,43

As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% pelo teste Scott Knott.

### Conclusões

Conclui-se que, no período mais úmido, o acúmulo de prolina nas folhas das laranjeiras ‘Pera’ é afetado pela dose de adubo nitrogenado aplicado no solo. Os maiores acúmulos de prolina, no período seco, verificados nas laranjeiras enxertadas no limoeiro ‘Cravo’ sugerem maior potencial de tolerância à seca para essas plantas.

### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de iniciação científica e a EMBRAPA Tabuleiros Costeiros pelo apoio nos trabalhos.

### Referências

- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973. DOI: 10.1007/BF00018060.
- CARVALHO, L. M., ARAÚJO, S. B., CARVALHO, H. W. L., GIRARDI, E. A.; SOARES FILHO, W. S. Leaf proline accumulation and fruit yield of ‘Pera’ sweet orange trees under natural water stress. **Bragantia**, 80, e1121, 2021. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.2020034>.
- GARCÍA-SÁNCHEZ, F.; SYVERTSEN, J.; GIMENO, V.; BOTÍA, P.; PEREZ-PEREZ, J. G. Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water-use efficiency. **Physiologia Plantarum**, v. 130, n. 4, p. :532-42, 2007.
- LEVY, Y. Field determination of free proline accumulation and water-stress in lemon trees. **HortScience**, v. 15, p. 302-303, 1980.
- SYVERTSEN, J.; LEVY, Y. Salinity interactions with other abiotic and biotic stresses in citrus. **HortTechnology**, v. 15, p. 100-103, 2005.