

Universidade do Algarve

Unidade de Ciências e Tecnologias Agrárias

Caracterização fisiológica e nutritiva da clorose férrica em citrinos

- Avaliação dos mecanismos de resistência aos efeitos do HCO_3^- -

Maribela Fátima de Oliveira Pestana Correia

Faro, 2000

Universidade do Algarve
Unidade de Ciências e Tecnologias Agrárias

Caracterização fisiológica e nutritiva da clorose férrica em citrinos

- Avaliação dos mecanismos de resistência aos efeitos do HCO_3^- -

Dissertação apresentada na Universidade do Algarve para efeitos de prestação de Provas de Doutoramento no ramo das Ciências Agrárias, na especialidade de Produção Vegetal.

Maribela Fátima de Oliveira Pestana Correia

Faro, 2000

Caracterização fisiológica e nutritiva da clorose férrica em citrinos

- Avaliação dos mecanismos de resistência aos efeitos do HCO_3^- -

*aos meus pais,
ao meu marido e
à nossa família.*

"Tudo o que está provado foi
outrora apenas imaginado."

WILLIAM BLAKE

AGRADECIMENTOS

Concluída esta tese, não posso deixar de manifestar o meu sincero agradecimento a todos os amigos e a todos aqueles que, de algum modo, contribuíram para a sua realização e enriqueceram os meus conhecimentos. Que cada um encontre aqui o testemunho do meu reconhecimento.

Ao Professor Catedrático Eugénio de Araújo Faria, o meu reconhecido agradecimento por ter aceite a orientação desta tese, pelas oportunidades e condições de trabalho proporcionadas e pelos ensinamentos transmitidos ao longo de todos os anos de trabalho conjunto. Agradeço ainda as sugestões e valiosas críticas na revisão atenta desta tese.

À Professora Catedrática Amarilis de Varennes, agradeço o apoio na elaboração dos artigos científicos publicados no âmbito desta tese. A sua ajuda e amizade, sempre presente, em muito contribuíram para a minha formação científica, profissional e pessoal.

Não posso deixar de manifestar o meu apreço à equipa do Departamento de Nutrición Vegetal da Estación Experimental de Aula Dei, em Zaragoza – Espanha, pelo carinho e amizade com que me receberam. Em especial, ao Javier Abadía por todos os conhecimentos científicos transmitidos e pela revisão cuidada de alguns dos artigos conjuntos que resultaram desta tese. À Monona Abadía, Iolanda Gogorcena, Fermín Morales e Manuel Sanz, agradeço os valiosos comentários aos trabalhos publicados em conjunto. À Monona, Aurora Poc, Elena González-Vallejo e Luis Montañés, pela amizade sempre presente. A todos o meu obrigado pela colaboração imprescindível.

Ao Pedro Beja, pela prontidão com que me ajudou a ultrapassar um dos momentos mais difíceis desta tese, por tudo o que me ensinou sobre componentes principais e pela cuidada revisão do capítulo 3. Muito obrigado.

Aos bolsiros Pedro Ferreira, Diogo Gonçalves e João Longo agradeço todo o apoio técnico e em especial a amizade e paciência com que sempre partilharam os trabalhos experimentais. Não posso deixar de agradecer à Sandra Sanchez, à Julieta Costa, ao João Entrudo e ao Camilo Portela que pontualmente, mas sempre que solicitado, me apoiaram. Ao bolsiro Nuno Fernandes e às técnicas do DQAA-ISA, Carla Galvão, Paula Silva e Marie-Christine Morais, agradeço a execução de grande parte das análises foliares e florais referidas nesta tese. Aos técnicos do Horto, pela ajuda prestada nos trabalhos experimentais que decorreram na estufa. Aos Srs. Nuno Correia e José Dias Rafael, por permitirem a realização dos ensaios de campo nas suas propriedades.

O meu apreço sincero a toda a colaboração prestada pela Manuela David, na determinação dos parâmetros de eficiência fotoquímica e de capacidade fotossintética e pela Graça Miguel, na

quantificação do ácido ascórbico. Agradeço ainda a oportunidade de, pontualmente, utilizar o laboratório e algum do equipamento da área da Fisiologia Vegetal.

Aos colegas e amigos Carlos Guerrero e Luis Miguel Neto, o meu mais profundo reconhecimento pela amizade e paciência com que leram toda a tese. Ao Amílcar Duarte tenho que agradecer as preciosas sugestões efectuadas nos aspectos relacionados com os citrinos. Ao Nuno Loureiro, agradeço a correcção dos parágrafos referentes aos dados climáticos. À Emília Costa, pelo incentivo e motivação sempre presentes. À minha amiga Néni agradeço todos os conselhos que me deu no decorrer dos trabalhos experimentais e o carinho com que sempre me ouviu. Por tudo, o meu obrigado.

À Doutora Corina Carranca da Estação Agronómica Nacional agradeço todas as referências bibliográficas que me enviou, e à Engenheira Maria Mendes da Direcção Regional de Agricultura do Algarve agradeço a prontidão com que me disponibilizou os dados climáticos apresentados nesta tese.

Agradeço ao Sr. Andre Welsh por tão gentilmente me ter oferecido algumas das sementes utilizadas nos ensaios em estufa, e às empresas Ellos e Frutalgarve pelo fornecimento dos preços apresentados neste trabalho. O meu sincero agradecimento aos Viveiros Sevilla, em especial do Manuel e Domingos, pela prontidão com que responderam a todas as minhas solicitações.

Quero expressar o meu agradecimento ao Sr. Reitor da Universidade do Algarve, Professor Catedrático Adriano Pimpão, pelas facilidades que me proporcionou ao longo da realização desta tese e, em especial, pelo último ano de dispensa de serviço docente que possibilitou a escrita desta tese em tempo útil.

À Unidade de Ciências e Tecnologias Agrárias da Universidade do Algarve, assim como a todos os colegas e pessoal ao serviço desta instituição, gostaria de agradecer as facilidades e o apoio facultados durante a realização deste trabalho.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia agradeço a concessão da bolsa (Prodep, Accção 5.2), que permitiu a minha dispensa de serviço docente e inteira dedicação à realização do trabalho experimental da tese.

Este trabalho foi financeiramente suportado pelo projecto Europeu (AIR3-CT94-1973) coordenado por Eugénio de Araújo Faria e Javier Abadía e pelo projecto Nacional (Praxis XXI-3/3.2/HORT/2160/95) coordenado por Amarilis de Varennes e Eugénio de Araújo Faria.

RESUMO

A clorose férrica induzida pelo ião bicarbonato afectou diversos parâmetros e processos fisiológicos dos porta-enxertos de citrinos estudados, nomeadamente a clorofila total, a biomassa total e parcial, a eficiência fotoquímica e o teor nutritivo da parte aérea e radicular. Estas respostas permitiram diferenciar o nível de tolerância destes porta-enxertos, sendo a citranjeira ‘Troyer’ o mais tolerante, seguido do *Citrus taiwanica* Tan. e apresentando-se o citrumeleiro ‘Swingle’ como o mais susceptível à clorose férrica. A susceptibilidade do citrumeleiro ‘Swingle’ está essencialmente associada à maior necessidade de Fe na solução nutritiva de modo a contrariar os efeitos do ião bicarbonato. O aumento da actividade da quelato de Fe(III)-reductase ocorreu nas plantas cloróticas de laranjeira da cultivar ‘Newhall’, enxertadas em citranjeira ‘Troyer’, e esteve associado a alterações morfológicas ao nível do sistema radicular. As relações encontradas entre a composição mineral das folhas, das flores e a clorofila total permitem concluir que é possível efectuar o diagnóstico da clorose férrica através da composição mineral das flores de laranjeira ‘Valencia late’ na plena floração (Abril), antecipando deste modo a data de colheita foliar recomendada para citrinos, de Outubro para Abril. Foram estabelecidos intervalos de diagnóstico baseados nos valores médios da razão nutritiva Mg/Zn, nas flores. Determinaram-se valores de referência, ou níveis adequados, para a concentração de alguns nutrientes nas flores associados com a produção de frutos com um calibre comercialmente favorável (> 76 mm). O diagnóstico precoce ou prognóstico da clorose férrica possibilita uma correcção atempada, prevenindo o aparecimento dos sintomas da rebentação seguinte (Verão) com a consequente melhoria da qualidade da produção. As aplicações foliares de ferro em árvores de laranjeira ‘Valencia late’ e de tangerineira ‘Encore’ permitiram controlar os decréscimos de produção e de qualidade do fruto provocados pela clorose férrica induzida em solos calcários. Para além disso, estes tratamentos podem ser efectuados com produtos economicamente mais viáveis como sejam as soluções com sulfato de Fe(II). A clorose férrica afectou não só os parâmetros de qualidade da produção anual de fruto, como também os novos crescimentos vegetativos e florais que surgem durante a Primavera. Adicionalmente, verificou-se um atraso na maturação dos frutos das árvores cloróticas das duas espécies de citrinos estudadas.

Palavras chave: Análise nutritiva, Biomassa, Capacidade fotossintética, Citrinos, Clorose férrica, Fluorescência, Métodos de diagnóstico, Parâmetros de crescimento, Qualidade da produção, Quelato de Fe(III)-reductase, SPAD, Tratamentos foliares.

ABSTRACT

Lime-induced chlorosis affects several physiological parameters and processes of citrus rootstocks namely total chlorophyll, shoot and root biomass, chlorophyll fluorescence parameters and mineral contents of roots and shoots. These responses may indicate differential tolerance to iron chlorosis with Citrange Troyer as the most tolerant rootstock, followed by *Citrus taiwanica* Tan. and Citrumelo Swingle in increasing order of susceptibility. A 2.5-fold increase of ferric chelate reductase activity over control was found only when plants of Newhall were grown with low levels of Fe and in the presence of calcium carbonate. Based on the relationship between leaf and flower mineral composition and leaf chlorophyll concentration, it is possible to diagnose iron chlorosis in Citrus (cv. 'Valencia Late') using mineral composition of flowers at full bloom (April). A Mg/Zn ratio in flowers smaller than 100 indicated that the trees developed iron chlorosis 90 days after full bloom (July). When the ratio was greater than 200, the trees remained green in the same date (July). Intermediary values meant a latent chlorosis with no apparent symptoms. The mineral composition of flowers at full bloom could be used to estimate quality parameters of fruits the following year, namely fresh weight and maturation index. Reference values were determined for the mineral composition of flowers corresponding to trees where fruits had a diameter greater than 76 mm. An earlier diagnosis can benefit commercial fruit growers since it allows them to detect potential deficiencies earlier and implement treatments to prevent loss of fruit quality. Iron chlorosis caused a delay in fruit ripening in both citrus species. Foliar sprays with Fe could prevent yield and quality losses caused by Fe chlorosis in citrus orchards. Furthermore, these treatments could be done with relatively cheap materials such as solutions containing Fe(II) sulphate. The addition of citric acid to iron (II) sulphate further improved the results of the treatment.

Keywords: Biomass, Citrus, Diagnosis, Ferric chelate reductase, Fluorescence, Foliar treatments, Fruit quality, Lime-induced chlorosis, Mineral composition, Photosynthetic capacity, SPAD, Root/shoot ratio.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	ácido carboxílico 1-aminociclopropano
ALA	ácido δ -aminolevulínico
ATP	adenosina 5'-trifosfato
ATPase	adenosina 5'-trifosfatase
BPDS	“bathophenantrolinedisulfonate”
C ref	concentração foliar de referência
CTC	capacidade de troca catiónica
CTCR	capacidade de troca catiónica radicular
DAPF	dias após plena floração
DGDG	digalactosildiglicerol
DNA	ácido desoxirribonucleico
DOP	“desviación del optimo percentual”
DRIS	“diagnosis and recomendation integrated system”
Fe-EDDHA	ácido etileno-diamina di-orto-hidroxi-fenil de ferro
Fe-EDTA	ácido etileno-diamino tetraacético de ferro
F _m	fluorescência máxima
F _o	fluorescência basal
F _v	fluorescência variável
GA ₃	ácido giberélico
IAA	ácido indolacético
IDH	isocitrato desidrogenase
MGDG	monogalactosildiglicerol
NAA	ácido naftalo-acético
NAD(P) ⁺	nicotinamina-adenina-dinucleótido-fosfato oxidado
NADH	nicotinamina-adenina-dinucleótido reduzido
NADPH	nicotinamina-adenina-dinucleótido-fosfato reduzido
PAB	produto agrícola bruto
PAR	radiação fotossinteticamente activa
PEPC	fosfoenolpiruvato carboxilase
PF	plena floração
PFD	densidade de fluxo quântico
Pi	fósforo inorgânico
PSI	fotossistema I
PSII	fotossistema II
QF-R	quelato de Fe(III)-redutase
RPA	razão do peso da parte aérea
RPR	razão do peso radicular
RRPA	razão entre a parte radicular e aérea
RuBP	ribulose-1,5-bifosfato carboxilase
SOD	superóxido dismutase
VAZ	ciclo da violaxantina (V), anteroxantina (A) e zeaxantina (Z)

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii

PARTE I - INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 1

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2. O FERRO	4
1.2.1. Dinâmica do ferro no solo	4
1.2.2. Dinâmica do ferro na planta	5
1.2.2.1. Absorção do ferro	5
1.2.2.2. Translocação do ferro	6
1.2.2.3. Metabolismo do ferro na planta	8
1.3. CLOROSE FÉRRICA	10
1.3.1. Factores indutores da clorose férrica	10
1.3.2. Efeito da clorose férrica nas plantas	13
1.3.3. Mecanismos de resposta à clorose férrica	16
1.3.3.1. Estratégia I	19
1.3.3.2. Estratégia II	23
1.3.3.3. Grau de tolerância das espécies vegetais	24
1.3.4. Diagnóstico da clorose férrica	26
1.3.5. Correção da clorose férrica	29
1.4. OS CITRINOS	35
1.4.1. A citricultura no Algarve	35
1.4.2. Ciclo produtivo	36
1.4.3. Composição mineral dos citrinos	39
1.4.4. Tolerância dos porta-enxertos de citrinos	40
1.5. PROGRAMAS DE MELHORAMENTO	42
1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

PARTE II – DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 2 – Efeito da clorose férrica em alguns parâmetros fisiológicos

RESUMO	61
ABSTRACT	62

2.1. INTRODUÇÃO	63
2.1.1. Objectivos	64
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	64
2.2.1. Material vegetal	65
2.2.2. Sistema de cultura	65
2.2.3. Delineamento experimental	66
2.2.4. Métodos	67
2.2.4.1. Quantificação da clorofila total (SPAD)	67
2.2.4.2. Parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i>	71
2.2.4.3. Biomassa parcial e total	72
2.2.4.4. Parâmetros de crescimento	72
2.2.4.5. Análise nutritiva	73
2.2.4.6. Capacidade fotossintética	74
2.2.4.7. Actividade da quelato de Fe(III)-redutase	75
2.2.5. Procedimento estatístico	76
2.3. RESULTADOS	77
2.3.1. Ensaio 1	77
2.3.1.1. Parâmetros de crescimento	77
2.3.1.2. Clorofila total	80
2.3.1.3. Fluorescência da clorofila <i>a</i>	83
2.3.1.4. Teor nutritivo da parte aérea e da raíz	87
2.3.1.5. Distribuição dos teores nutritivos entre a parte aérea e a raíz	92
2.3.1.6. Relação entre o equilíbrio nutritivo da parte aérea e a clorofila total	94
2.3.2. Ensaio 2	96
2.3.2.1. Altura e peso seco da parte aérea	96
2.3.2.2. Clorofila total	96
2.3.2.3. Parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i>	98
2.3.2.4. Capacidade fotossintética	99
2.3.2.5. Actividade da quelato de Fe(III)-redutase	100
2.3.2.6. Análise nutritiva	102
2.4. DISCUSSÃO	103
2.4.1. Parâmetros de crescimento	103
2.4.2. Clorofila total	104
2.4.3. Eficiência fotossintética	105
2.4.4. Composição mineral	106
2.4.5. Actividade da quelato de Fe(III)-redutase	107
2.4.6. Tolerância do material vegetal	108
2.5. CONCLUSÕES	109
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

CAPÍTULO 3 – Diagnóstico da clorose férrica em citrinos

RESUMO	115
ABSTRACT	116
3.1. INTRODUÇÃO	117
3.1.1. Objectivos	118
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	119
3.2.1. Caracterização do pomar	119

3.2.1.1. Localização	119
3.2.1.2. Caracterização climática	119
3.2.1.3. Caracterização física e química do solo	121
3.2.1.4. Sistema de rega	122
3.2.2. Delineamento experimental	123
3.2.3. Parâmetros estudados	123
3.2.3.1. Análise da composição mineral das folhas e flores	123
3.2.3.2. Quantificação da clorofila total (SPAD)	124
3.2.3.3. Parâmetros de qualidade dos frutos	125
3.2.4. Procedimento estatístico	126
3.3. RESULTADOS	129
3.3.1. Composição mineral das folhas	129
3.3.2. Variação sazonal da concentração nutritiva das folhas	131
3.3.3. Composição mineral das flores	133
3.3.4. Variação da concentração nutritiva das flores	134
3.3.5. Comparação entre a composição mineral das folhas e das flores	136
3.3.6. Variação sazonal da clorofila total	137
3.3.7. Relação entre a clorofila total e a composição mineral das folhas e flores	138
3.3.8. Modelação das relações entre os nutrientes na flor e a clorofila total nas folhas	140
3.3.8.1. Validação do modelo	142
3.3.9. Qualidade da produção	144
3.3.10. Modelação das relações entre a composição mineral das flores e a qualidade da produção	145
3.3.10.1. Validação dos modelos 1 e 2	147
3.3.11. Valores de referência para a composição mineral das flores	148
3.4. DISCUSSÃO	150
3.4.1. Composição mineral das folhas e das flores	150
3.4.2. Variação sazonal da clorofila e da composição mineral das folhas e flores	151
3.4.3. A utilização das flores como método de diagnóstico da clorose férrica	154
3.5. CONCLUSÕES	157
3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	158

CAPÍTULO 4 – Práticas alternativas de controlo da clorose férrica

RESUMO	163
ABSTRACT	164
4.1. INTRODUÇÃO	165
4.1.1. Objectivos	166
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	166
4.2.1. Caracterização do pomar	166
4.2.1.1. Localização	166
4.2.1.2. Caracterização climática	167
4.2.1.3. Caracterização física e química do solo	169
4.2.1.4. Sistema de rega	170
4.2.2. Delineamento experimental	170
4.2.3. Parâmetros estudados	173
4.2.3.1. Quantificação da clorofila total (SPAD)	173

4.2.3.2. Parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i>	176
4.2.3.3. Análise da composição mineral das folhas e flores	177
4.2.3.4. Parâmetros de qualidade dos frutos	178
4.2.4. Procedimento estatístico	179
4.3. RESULTADOS	180
4.3.1. Ensaio 1	180
4.3.1.1. Clorofila total	180
4.3.1.2. Parâmetros de qualidade dos frutos	181
4.3.2. Ensaio 2	183
4.3.2.1. Clorofila total	183
4.3.2.2. Composição mineral das folhas e das flores	184
4.3.2.3. Parâmetros de qualidade dos frutos	185
4.3.2.4. Efeito residual dos tratamentos	187
4.3.3. Ensaio 3	189
4.3.3.1. Clorofila total	189
4.3.3.2. Parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i>	190
4.3.3.3. Composição mineral das folhas e flores	192
4.3.3.4. Parâmetros de qualidade dos frutos	193
4.3.4. Comparação entre os ensaios realizados	195
4.3.5. Estimativas do peso fresco do fruto	197
4.4. DISCUSSÃO	198
4.4.1. Recuperação da clorose férrica	198
4.4.2. Eficiência fotoquímica	198
4.4.3. Composição mineral	199
4.4.4. Parâmetros de qualidade da produção	200
4.4.5. Comparação entre as duas espécies	201
4.4.6. Análise económica	202
4.4.7. Perspectivas futuras	203
4.5. CONCLUSÕES	203
4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	204

PARTE III – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

CAPÍTULO 5 – Discussão e conclusões finais

5.1. DISCUSSÃO GERAL	209
5.2. CONCLUSÕES FINAIS	216
5.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	218
PERSPECTIVAS FUTURAS	223

Parte I

Introdução

CAPÍTULO 1

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com o crescimento demográfico que se tem vindo a verificar, a população mundial é cada vez mais confrontada com a necessidade de aumentar e, sobretudo, melhorar qualitativamente a produção agrícola. Neste sentido, considera-se importante dispensar uma crescente atenção ao estudo dos principais factores envolvidos no processo produtivo. Embora os factores genéticos continuem a ser, basicamente, os que mais influenciam a quantidade e, principalmente, a qualidade dos produtos obtidos, julgamos importante realçar os factores ambientais, pois serão estes em última análise que irão permitir que os primeiros manifestem, ou não, toda a sua potencialidade intrínseca.

Para o efeito, considera-se indispensável estudar, de forma dinâmica, o papel dos elementos nutritivos na planta salientando a sua participação nas diversas reacções bioquímicas envolvidas no crescimento e na produção. De entre estes nutrientes, o Fe é um elemento mineral essencial para as plantas superiores, na medida em que, quando não se encontra disponível em quantidades suficientes, é susceptível de limitar severamente as produções agrícolas (Marschner, 1995).

Quando apresenta actividade biológica, o Fe desempenha funções como micronutriente em diversos processos metabólicos, associadas à sua capacidade de mudar de valência e de formar complexos octaédricos estáveis com vários ligandos naturais (Marschner, 1995; Welch, 1995).

O processo de absorção do Fe nas dicotiledóneas, onde se incluem os citrinos, inicia-se pela sua redução na membrana plasmática (Buckhout *et al.*, 1989; Brüggemann *et al.*, 1990; Holden *et al.* 1991; 1992; 1994), através da acção de uma quelato de Fe(III)-redutase, cuja actividade decresce rapidamente para valores de pH acima de 6,5. Uma vez no simplasto do sistema radicular, o Fe(II) é oxidado e complexado pelo ácido cítrico a Fe(III)-citrato, forma em que é translocado, *via* xilema, para a parte aérea (Brown e Jolley, 1989). O transporte do Fe para os tecidos jovens, especialmente para os ápices caulinares em crescimento, pode ser efectuado através do floema e/ou do xilema (Kosegarten *et al.*, 1999). O Fe(III)-citrato transportado pela seiva xilémica, das raízes para as folhas, pode passar para o floema (Stephan e Scholz, 1993). O passo crucial nesta troca é o transporte do Fe através da membrana plasmática, que é iniciado pela redução do Fe(III). Esta redução pode ocorrer ao longo do sistema vascular nas interfaces apoplasto/simplasto. O Fe²⁺ que entra no citoplasma é complexado pela nicotianamina e nesta forma é uniformemente distribuído no simplasma, permitindo a sua participação nos diversos processos metabólicos.

Como resultado de um desequilíbrio nutritivo, a clorose férrica afecta numerosas espécies vegetais ocorrendo sobretudo em solos calcários das regiões áridas e semi-áridas (Chen e Barak, 1982). Os solos calcários caracterizam-se pela presença de carbonato de cálcio que, apesar de ser muito pouco solúvel, pode originar quantidades apreciáveis do ião bicarbonato na rizosfera devido à maior pressão parcial do dióxido de carbono nas camadas superficiais do solo. O ião bicarbonato é um dos principais factores indutores da clorose férrica e cuja acção parece interferir tanto ao nível da disponibilidade do Fe no solo, como através da sua mobilidade na planta (Mengel *et al.*, 1984; Mengel, 1995). O aumento do pH do apoplasto radicular motivado pelo ião bicarbonato diminui a actividade da quelato de Fe(III)-redutase, limitando a absorção de Fe pela planta (Romera *et al.*, 1991a; Toulon *et al.*, 1992). Posteriormente, após o transporte do Fe para a parte aérea, pensa-se que o processo de entrada deste elemento para o interior das células foliares é inibido, ficando o Fe impossibilitado de participar nos diversos processos metabólicos onde é necessário (Mengel, 1995) o que resulta no aparecimento dos sintomas de clorose férrica.

Devido à pouca mobilidade do Fe na planta, os sintomas desta deficiência manifestam-se inicialmente nas folhas mais jovens e caracterizam-se pelo aparecimento de um fino reticulado no qual apenas as nervuras permanecem verdes. A clorose do limbo parece ser devida, sobretudo, ao facto do Fe ser essencial para a formação das membranas dos tilacóides (Abadía, 1992; Miller *et al.*, 1995). O teor em carotenóides também diminui com a deficiência em Fe mas numa extensão menor que o das clorofilas (Terry, 1980; Abadía e Abadía, 1993).

As diferentes espécies vegetais e por vezes algumas cultivares apresentam comportamentos distintos face à clorose férrica o que permite classificá-las, em espécies eficientes, pela sua capacidade de adaptação à deficiência de Fe e espécies não eficientes, que por não apresentarem qualquer mecanismo de resposta, morfológico ou fisiológico, desenvolvem os sintomas característicos de clorose férrica (Mengel *et al.*, 1984; Bienfait *et al.*, 1985; Marschner *et al.*, 1986; Römheld, 1987a; 1987b; Marschner e Römheld, 1994; 1995). Estes autores constataram ainda que nas dicotiledóneas (Estratégia I) há um aumento da extrusão hidrogeniónica, do poder redutor das raízes e a excreção de agentes redutores ou quelatantes por células especializadas localizadas nas zonas apicais das raízes, denominadas por células de transferência.

A interpretação dos resultados obtidos pela análise foliar constitui o meio, correntemente, mais utilizado para avaliar o estado nutricional das plantas. No entanto, em muitos casos, não existe correlação entre a concentração de Fe nos tecidos vegetais e o grau de deficiência (Mengel, 1995). Diversos autores (Sanz *et al.*, 1993; 1994; Sanz e Montañés, 1995a; 1995b) sugerem que a análise floral pode ser utilizada como método de avaliar o estado nutricional em fruteiras,

nomeadamente em pessegueiro e em pereira, permitindo diagnosticar o aparecimento dos sintomas de clorose férrica antes da produção estar irremediavelmente afectada.

Actualmente, a correcção da clorose férrica em fruteiras faz-se sobretudo recorrendo a aplicações massivas ao solo de quelatos férricos sintéticos, como o ácido etileno-diamina di-orto-hidroxi-fenil de ferro (Fe-EDDHA). Devido à rápida imobilização do Fe em solos calcários estas aplicações repetem-se, quase sempre anualmente, para as mesmas árvores. Os custos da correcção da clorose férrica são muito elevados podendo chegar a representar 60% dos custos totais da fertilização (Tagliavini *et al.*, 2000). Por outro lado, desconhece-se o impacto ambiental destas aplicações. Sabe-se, no entanto, que os agentes quelatantes sintéticos podem ser responsáveis, sobretudo em solos calcários, por uma maior absorção de outros metais, como o manganês, o cobre e o níquel (Wallace e Wallace, 1992). É possível desenvolver práticas de correcção baseadas num diagnóstico precoce, tal como foi desenvolvido para o pessegueiro (Sanz *et al.*, 1994), associadas à utilização de menores quantidades de fertilizantes como seja a aplicação foliar de soluções ácidas diluídas que permitem mobilizar o Fe já existente na parte aérea (Sahu *et al.*, 1987; Tagliavini *et al.*, 1995c).

O Algarve é a principal região produtora de citrinos em Portugal onde ocupam uma área de 17000 ha, 70% da área total nacional de citrinos, contribuindo com cerca de 30 % para o produto agrícola bruto (PAB) regional (Freitas *et al.*, 1998; Duarte *et al.*, 1999). O Algarve dispõe de condições climáticas favoráveis à produção de citrinos de qualidade diferenciada. Contudo, a maioria dos pomares encontra-se instalado em solos de origem calcária. Quando cultivados nestes solos, os citrinos apresentam clorose férrica (Alcántara e Romera, 1990; Sudahomo *et al.*, 1994) e consequentemente a produção pode ser reduzida e a qualidade do fruto afectada (El-Kassa, 1984).

Sabe-se que existe variabilidade genética na tolerância à clorose férrica induzida em solos calcários em relação aos porta-enxertos de citrinos. Em estudos preliminares, vários autores (Hamzé e Nimah, 1982; Hamzé *et al.*, 1986) classificaram alguns porta-enxertos de citrinos desde os mais tolerantes como sejam, algumas tangerineiras, (*Citrus reticulata* Blanco, *Citrus nobilis* Lour., *Citrus depressa* Hay), limas (*Citrus limonia* Osbeck) e limoeiros (*Citrus jambhiri* Tan.), laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), híbridos de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (citraneira ‘Troyer’ e ‘Carrizo’) até ao mais susceptível, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf..

O presente trabalho teve como **objectivo** geral a melhoria do controlo da clorose férrica, em citrinos estabelecidos em solos calcários. Pretendeu-se caracterizar os processos fisiológicos inerentes à resposta de porta-enxertos e de uma combinação de porta-enxerto/garfo representativa na região do Algarve. Pretendeu-se desenvolver técnicas de selecção que permitam seleccionar

porta-enxertos e combinações mais tolerantes a utilizar na instalação de novos pomares. Tentou-se desenvolver técnicas de diagnóstico que permitam uma detecção precoce da deficiência em pomares já estabelecidos e testaram-se práticas alternativas de correção que, para além de reduzirem a clorose férrica, não apresentem os impactos ambientais negativos associados às práticas correntes.

1.2. O FERRO

O conhecimento prévio dos princípios gerais subjacentes à dinâmica do Fe no solo e na planta, quando disponível em quantidades suficientes às necessidades das espécies agrícolas, permite uma melhor compreensão da clorose férrica.

1.2.1. Dinâmica do ferro no solo

O Fe é o quarto elemento mais abundante na litosfera depois do oxigénio, silício e alumínio (Loeppert, 1986). Os mecanismos geoquímicos envolvidos na formação das rochas ígneas determinam que a quantidade de Fe existente nos basaltos é superior à dos granitos embora estes apresentem uma relação Fe^{3+}/Fe^{2+} mais elevada (Krauskopf, 1983). Por outro lado, nas rochas sedimentares o xisto prevalece como sendo a rocha com mais Fe na sua constituição.

O Fe existente nos minerais primários encontra-se principalmente no estado reduzido, incorporado em silicatos ferromagnesianos (piroxenas, olivinas, anfíbolos e biotite) (Lindsay, 1995). A forma de Fe mais abundante na superfície terrestre é a hematite (Fe_2O_3) devido à sua estabilidade termodinâmica e insolubilidade elevadas (Krauskopf, 1983). De um modo geral, estes minerais são instáveis e a sua decomposição ocorre através de reacções de hidrólise e de oxidação, com a libertação do Fe^{2+} , que rapidamente precipita na forma de óxidos e hidróxidos secundários de Fe(III) e apenas uma pequena percentagem do Fe libertado é que poderá ser incorporado em minerais silicatados ou complexado com a matéria orgânica do solo (Loeppert, 1986; Lindsay, 1991; 1995).

A quantidade total de Fe existente nos vários tipos de solos varia entre 0,02%, nos solos arenosos, até valores superiores a 10%, nos solos ferralíticos (Chen e Barak, 1982). Na maioria dos solos, a concentração de Fe na forma iónica (Fe^{3+} e Fe^{2+}) existente na solução do solo é muito

baixa e inferior a 10^{-15} M (Marschner, 1995). Os quelatos férricos e, ocasionalmente, os ferrosos, são as formas solúveis que predominam na solução do solo (Krauskopf, 1983; Marschner, 1995).

A actividade do Fe na solução do solo é determinada pela taxa de solubilidade e de dissolução destes compostos (Marschner, 1991) que por sua vez é controlada por diversos parâmetros ao nível da fase sólida (tipo de óxido, superfície específica, cristalinidade, química do mineral) e da fase líquida do solo (potencial redox, pH, concentração de reagentes), função dos processos de redução, complexação e protonização (Schwertmann, 1991).

As condições existentes tanto na rizosfera como na superfície radicular são diferentes das existentes na solução do solo e podem determinar a mobilidade e a difusão do Fe solúvel, factor determinante no movimento do Fe para a proximidade das raízes (Lindsay, 1995). Estas diferenças são devidas à actividade microbiana e à absorção diferencial entre catiões e aniões, que desencadeiam alterações no potencial redox e no pH da rizosfera (Römheld e Marschner, 1986b; Marschner, 1991). Da actividade microbiana podem resultar pequenas zonas de anaerobiose bem como a acumulação de sideróferos na rizosfera (Uren, 1993), complexos determinantes na biodisponibilidade do Fe (Masalha *et al.*, 2000). A importância destes mecanismos, existentes na rizosfera e na superfície radicular, acentua-se nos solos caracterizados por uma baixa actividade de Fe na solução do solo, como nos solos de origem calcária (Marschner, 1991).

1.2.2. Dinâmica do ferro na planta

De um modo geral, a assimilabilidade dos nutrientes pelas plantas é determinada tanto pelos factores que afectam a capacidade do solo em fornecer os nutrientes como por factores que afectam a capacidade das plantas em os utilizar. Assim, apesar de nos solos bem arejados prevalecer o Fe na forma oxidada (Fe^{3+}) as plantas dicotiledóneas apenas têm capacidade de absorver o Fe^{2+} (Chaney *et al.*, 1972; Wang e Peverly, 1999).

1.2.2.1. Absorção do ferro

O processo de absorção do Fe inicia-se pela sua redução através da acção de uma redutase “standard” existente na membrana plasmática, que transfere electrões de compostos redutores citoplasmáticos para o meio exterior (Buckout *et al.*, 1989; Brüggemann *et al.*, 1990; Holden *et al.*, 1991; 1992; Rubinstein e Luster, 1993; Grusak *et al.*, 1999; Schmidt, 1999). A dependência

desta enzima do NADH (nicotinamina-adenina-dinucleótido reduzido) ou do NADPH (nicotinamina-adenina-dinucleótido-fosfato reduzido) como dadores de electrões ainda não está definida, havendo resultados contraditórios na bibliografia (Schmidt e Janiesch, 1991; Moog e Brüggemann, 1994; Schmidt, 1994; Schmidt e Schuck, 1996; Schmidt e Bartels, 1998). Este sistema enzimático constitutivo (“standard”) tem afinidade para substratos com baixo potencial (Ex.: ferricianamida) e está sempre presente tanto nas dicotiledóneas como nas monocotiledóneas, independentemente da disponibilidade de Fe no meio. Para além do seu papel biológico na absorção do Fe, tem também outras funções como sejam, a polarização da membrana e o controlo da alongação e multiplicação celular (Moog e Brüggemann, 1994; Welch, 1995; Schmidt, 1999).

A redução do Fe^{3+} medida em raízes intactas ocorre a valores de pH baixos, próximo de 5, (Toulon *et al.*, 1992; Susín *et al.*, 1996) o que difere dos resultados obtidos em vesículas do plasmalema onde é referido um pH de 6,8 óptimo para cevada (Brüggemann *et al.*, 1993) e de 6,5 para tomate (Holden *et al.*, 1991), diferenças que podem ser devidas à ruptura de algumas membranas com saída do citosol (Abadía, 1998).

Para além deste sistema “standard” de reductases localizado nos ápices radiculares, o Fe ligado a sideróferos ou a quelatos sintéticos pode ser absorvido em menor extensão, via apoplasto, isto é através dos plasmodesmos, processo que ocorre preferencialmente na zona basal ou de inserção das raízes laterais (Marschner *et al.*, 1987; Marschner, 1991). Por esta via, pode também ser absorvido o Fe existente no apoplasto do córtex, adsorvido aos locais de troca da parede celular, e/ou precipitado na forma de óxidos com pouca estabilidade (Bienfait *et al.*, 1985; Zhang *et al.*, 1999).

Depois de ser absorvido pela raiz, o Fe^{2+} atravessa radialmente as células corticais em direcção aos vasos xilémicos (**Figura 1.1**). Neste movimento, intra e intercelular, o Fe(II) está provavelmente complexado pela nicotianamina (Stephan e Scholz, 1993; Higuchi *et al.*, 1995; Stephan *et al.*, 1995) de forma a evitar a sua adsorção à parede das células endodérmicas e a deterioração oxidativa das células radiculares resultante da interacção entre os catiões de Fe livres (Fe^{2+} e Fe^{3+}) e as formas activadas de oxigénio (Grusak *et al.*, 1999).

1.2.2.2. Translocação do ferro

Antes de entrar nos vasos xilémicos, o Fe(II) ligado à nicotianamina é novamente oxidado e complexado pelo ácido cítrico a Fe(III)-citrato, forma pela qual é, provavelmente, translocado

através do xilema para a parte aérea (Brown e Jolley, 1989) (**Figura 1.1**). Em estudos recentes, Rombolà *et al.* (2000) referem que o ácido cítrico pode ser o complexante preferencial para o Fe apenas quando todos os outros ácidos orgânicos existentes no xilema estão na mesma concentração. Quando esta proporcionalidade se altera é natural que outros ácidos orgânicos consigam também complexar o Fe, como seja o caso do ácido málico, que foi detectado em concentrações elevadas na seiva xilémica de várias espécies vegetais (Clark e Gross, 1986; Bialczyk e Lechowski, 1992; Rombolà *et al.*, 1998a).

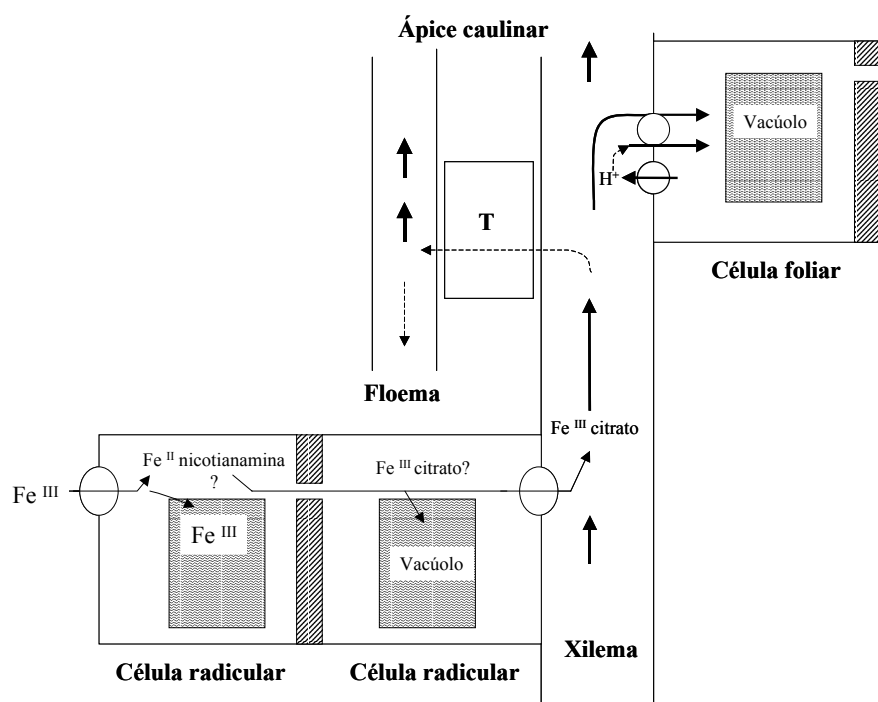


Figura 1.1 – Modelo que descreve o transporte radial do Fe no simplasma radicular e a translocação deste elemento para a parte aérea. Está ainda apresentado esquematicamente, a distribuição foliar do Fe e o processo de transferência do xilema para o floema, via célula transferência. T- célula de transferência; \ominus^+ - redutases. Adaptado de Marschner (1991).

O fluxo de Fe translocado através do xilema para a parte aérea é regulado pela transpiração, transporte passivo, e em menor escala pela pressão radicular, transporte activo (Welch, 1995). A transpiração regula essencialmente o transporte de Fe para as folhas jovens totalmente expandidas, sem grandes necessidades neste elemento. Por sua vez, o transporte do Fe regulado pela pressão radicular, confinado a períodos de baixa transpiração (nocturnos), é direccionado para as zonas de crescimento na parte aérea (ápices caulinares, folhas, frutos e sementes em desenvolvimento) com elevadas necessidades em Fe (Marschner, 1991; Welch, 1995).

O ferro pode ser translocado para os meristemas, em especial para os ápices caulinares em crescimento, através do floema e/ou do xilema (Grusak *et al.*, 1999). O Fe(III)-citrato proveniente do xilema pode ser a principal fonte de Fe durante os primeiros estádios de crescimento foliar (área foliar de 800 mm²) associados a elevadas taxas de transpiração (Kosegarten *et al.*, 1999). Para que o Fe seja transportado através do floema (**Figura 1.1**), provavelmente complexado a uma proteína de baixo peso molecular, é necessário que ocorra a sua transferência do xilema para o floema (Stephan e Scholz, 1993; Welch, 1995). Segundo Landsberg (1984) este processo é efectuado por células altamente especializadas, células de transferência, e pode ocorrer ao longo do sistema vascular nas interfaces apoplasto/simplasto.

1.2.2.3. Metabolismo do ferro na planta

O Fe translocado na forma de citrato férrico, uma vez na parte aérea, é novamente reduzido antes da entrada no mesófilo das células foliares (Nikolic e Römheld, 1999). Esta redução é regulada por uma enzima, a quelato de Fe(III)-redutase (QF-R), que foi pela primeira vez identificada por Brüggemann *et al.* (1993) em *Vigna unguilata* L. Walp..

Este mecanismo de redução, existente no plasmalema das células foliares, apresenta algumas analogias com o existente na raiz uma vez que depende essencialmente da actividade metabólica da planta e do pH apoplástico (Mengel e Geurtzen, 1988; Brown e Jolley, 1989). A máxima taxa de redução do Fe(III) em folhas intactas foi obtida para um pH apoplástico de 5,0, estando de acordo com a capacidade tampão das paredes celulares ($pK_a = 5$) (Kosegarten *et al.*, 1999). A QF-R tem capacidade de reduzir o Fe(III) proveniente quer do citrato quer do malato (Rombolà *et al.*, 1998a), confirmando a hipótese, anteriormente colocada, do Fe poder ser transportado para a parte aérea complexado a outros ácidos orgânicos para além do citrato. Ao contrário do verificado na raiz, a redução e absorção dos complexos férricos são estimuladas pelo aumento da razão NAD(P)H : NAD(P)⁺ a nível foliar (Brüggemann *et al.*, 1993; Rubinstein e Luster, 1993; Nikolic e Römheld, 1999). A fotoredução do Fe(III) pode ter também um papel significativo na sua absorção pelas células do mesófilo (Pushnik e Miller, 1989; Alcántara *et al.*, 1994) e contrariamente ao observado na raiz, o Fe é mais facilmente absorvido nas formas não quelatadas, com excepção do citrato de ferro (Römheld e Marschner, 1983).

Após a entrada no citoplasma, o Fe²⁺ é supostamente complexado pela nicotianamina, forma na qual é distribuído pelos vários processos metabólicos no simplasma, onde é necessário (Scholz

et al., 1992; Stephan e Scholz, 1993). Os dados actualmente disponíveis indicam que a entrada do Fe no cloroplasto, destino de uma grande parte do Fe existente na planta (Terry e Abadía, 1986), ocorre através de um transporte activo (Abadía, 1998).

O Fe participa em diversos processos metabólicos das plantas superiores nomeadamente na fotossíntese, na respiração, na fixação do azoto atmosférico e na redução dos iões nitrato pois pertence ao grupo dos metais de transição, o que lhe confere a capacidade de mudar de valência, modificando o seu estado de oxidação e de formar complexos octaédricos com vários ligandos (Ex.: ácidos orgânicos e fosfato inorgânico) (Welch, 1995).

Em situações normais, a maior parte do Fe foliar (cerca de 63%) está associado a algumas proteínas que se podem agrupar em três categorias (Miller *et al.*, 1995): i) proteínas com grupo heme onde se incluem os citocromos, a catalase, a peroxidase e a nitrato redutase, correspondendo a cerca de 9% do Fe foliar; ii) proteínas sem grupo heme, tais como a ferredoxina, nitrogenase, nitrito redutase, aconitase, xantina oxidase, totalizando cerca de 19% e iii) a fitoferritina, uma proteína de reserva que contém cerca de 35% do Fe existente nas folhas.

Os citocromos são constituintes dos sistemas redox dos cloroplastos e das mitocôndrias (Abadía e Abadía, 1993). A catalase e a peroxidase participam em várias reacções catalíticas na planta como seja a dismutação do peróxido de oxigénio e a polimerização dos compostos fenólicos, respectivamente (Nenova e Stoyanov, 1995). A ferredoxina é uma proteína em que o Fe está ligado a cisteínas ou a enxofre inorgânico permitindo a transferência de electrões em diversos processos metabólicos nomeadamente na fotossíntese e na redução dos iões nitrato (Smith, 1984; Miller *et al.*, 1995). A aconitase é uma enzima que catalisa a isomerização do ácido cítrico a ácido isocítrico no ciclo de Krebs (ciclo dos ácidos tricarboxílicos) onde o Fe é requerido como grupo prostético para a sua estabilidade e actividade (Smith, 1984). A xantina oxidase participa no metabolismo das purinas (Ricardo e Teixeira, 1983). A fitoferritina para além de actuar como uma reserva de Fe na parte aérea, evita a acumulação do Fe na forma iónica, prevenindo portanto a fitotoxicidade causada por esta forma de ferro (Smith, 1984; Macur *et al.*, 1991; Briat *et al.*, 1995; Abadía, 1998). As vias metabólicas das estruturas porfirínicas das clorofilas, dos citocromos e do grupo heme são muito semelhantes (Teixeira e Ricardo, 1983) e apesar do Fe não ser constituinte da molécula de clorofila é cofactor de algumas das enzimas que participam em diversos passos da síntese deste pigmento nomeadamente na síntese do ácido δ -aminolevulínico (ALA) e na conversão do coproporfirinogénio a protoporfirina IX, do Mg-protoporfirina IX a protoclorofilídio (Pushnick *et al.*, 1984; Miller *et al.*, 1995). Por outro lado, o Fe parece ser necessário para a formação de proteínas associadas à estrutura lamelar do cloroplasto (Abadía *et al.*, 1989).

1.3. CLOROSE FÉRRICA

Numa situação de deficiência de Fe, as plantas superiores desenvolvem sintomas de clorose férrica, resultantes do decréscimo da concentração dos pigmentos fotossintéticos nas folhas. Devido à baixa mobilidade do Fe na planta, os sintomas desta deficiência nutritiva surgem nas folhas mais jovens, caracterizando-se pelo aparecimento de um fino reticulado no qual apenas as nervuras permanecem verdes.

Apesar de pouco frequente, a clorose férrica pode resultar apenas da falta de Fe no meio, o que ocorre em solos ácidos, em especial nos solos arenosos, solos orgânicos ou em solos intensivamente cultivados (Chaney, 1984; Mengel e Geurtzen, 1986). Geralmente, a clorose férrica é induzida por factores desfavoráveis à mobilização, absorção, transporte e metabolismo do Fe, podendo dever-se à conjugação de um ou vários factores, tanto ao nível da planta como do solo.

O conhecimento dos factores indutores e dos efeitos da clorose férrica no metabolismo vegetal permite estabelecer métodos de diagnóstico e de correcção desta deficiência nutritiva, visando as implicações ambientais e económicas inerentes de todo este processo.

1.3.1. Factores indutores da clorose férrica

A clorose férrica pode ser induzida por diversos factores como sejam: ião bicarbonato (Mengel *et al.*, 1984); a temperatura do solo (Chapman, 1968; Wei *et al.*, 1994; Welkie, 1995), o potencial redox do solo (Chaney *et al.*, 1989; Kolesh *et al.*, 1987; McCray e Matocha, 1992) a permeabilidade e/ou compactação do solo (Loeppert, 1986), a matéria orgânica existente ou adicionada ao solo (Chen e Barak, 1982), a actividade microbiana (Masalha *et al.*, 2000), a competição nutritiva (Wallace *et al.*, 1992) e a água de rega com elevados teores de ião bicarbonato (Loeppert *et al.*, 1988).

A clorose férrica pode ser também induzida ou agravada devido à interacção do Fe com alguns nutrientes que podem diminuir a disponibilidade deste elemento, como sejam: azoto, fósforo, magnésio, cálcio, manganês, zinco e cobre.

O efeito do **azoto** depende da forma e das condições em que é adicionado podendo diminuir ou favorecer a clorose férrica. O fornecimento de azoto apenas na forma de ião nitrato induz ao aparecimento da clorose férrica (Wallace *et al.*, 1992; Mengel *et al.*, 1994). A absorção do ião nitrato, pode conduzir a valores de pH elevados tanto na superfície radicular como no apoplasto

radicular, uma vez que a absorção deste ião é efectuada através do co-transporte H^+/NO_3^- existente na membrana plasmática (Ulrich, 1991; Kosegarten e Englisch, 1994; Kosegarten *et al.*, 1998b). Por sua vez, o ião nitrato reduz também a mobilidade do Fe nas folhas devido ao seu efeito no pH apoplástico (Mengel e Geurtzen, 1988; Kosegarten e Englisch, 1994). Por outro lado, a absorção do azoto na forma de ião amónio, pelo seu efeito acidificante pode aumentar a disponibilidade de Fe na planta (Hoffmann *et al.*, 1992).

Segundo diversos autores (Jolley *et al.*, 1988; Hughes *et al.*, 1990; 1992; Wallace *et al.*, 1992), o papel do **potássio** na diminuição da clorose férrica deve-se ao seu efeito na acidificação da rizosfera uma vez que a absorção deste ião é acompanhada pela libertação de hidrogeniões para a rizosfera beneficiando a acumulação de ácidos orgânicos assim como a absorção e a mobilidade do Fe na planta.

Numerosos estudos (Mengel *et al.*, 1984; Wallace *et al.*, 1992) confirmam que a interacção do **fósforo** no solo e na planta com o Fe acentua-se sobretudo em solos de origem calcária (Aktas e van Egmond, 1979). Ayed (1970) observou que, na cultura de tomateiro, as quantidades de Fe e de fósforo adicionadas concentravam-se nas raízes, sugerindo a formação de fosfato de Fe nas raízes.

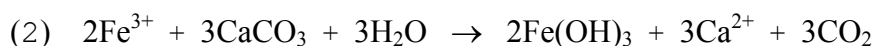
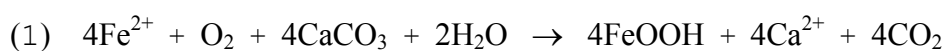
Os restantes micronutrientes pertencentes ao grupo dos metais de transição (**manganês, cobre e zinco**) agravam a clorose férrica pelo seu excesso, interacção que pode ser limitante tanto ao nível do solo, pela diminuição da mobilidade dos quelatos até às raízes como no interior da planta, pela possibilidade de substituírem o Fe nos seus centros de actividade fisiológica (Mengel *et al.*, 1984; Natt, 1992; Wallace *et al.*, 1992). Quantidades elevadas de **manganês** podem induzir a clorose férrica devido ao antagonismo a nível da actividade enzimática uma vez que o Mn compete pelas mesmas posições metabólicas ocupadas pelo Fe, especialmente na enzimas peroxidase e catalase como verificado por diversos autores em plantas de citrinos (Chapman, 1968; Zaharieva, 1995; Thomas *et al.*, 1998; Lavon e Goldshmidt, 1999). O **zinco e o cobre** competem com o Fe pelos agentes quelatantes diminuindo a disponibilidade do Fe na solução do solo (Jolley e Brown, 1994; Alva e Chen, 1995; Schmidt *et al.*, 1997). No entanto, Lindsay e Schwab (1982) referem que nos solos calcários a actividade de Cu na solução do solo é baixa pois está, na sua maioria, imobilizado pela matéria orgânica.

Os metais pesados, como o **crómio** e o **alumínio**, podem também induzir ou agravar a clorose férrica, parecendo o crómio interferir apenas no metabolismo do Fe ao nível das raízes (Schmidt *et al.*, 1996). Por sua vez, um excesso de alumínio, frequente em solos ácidos, induz a

clorose férrica em gramíneas (trigo e sorgo) porque inibe a biossíntese e a excreção de fitosideróferos (Brown e Jolley, 1989; Chang *et al.*, 1998).

A clorose férrica que ocorre na região Mediterrânea pode ser predominantemente induzida pelo ião bicarbonato que se forma em níveis elevados nos solos calcários, agravada por valores de precipitação anual inferiores a 500 mm, característicos das regiões áridas e semi-áridas (Chen e Barak, 1982). Mundialmente cerca de 30 % dos solos cultivados são calcários e de acordo com a classificação da FAO, os solos onde há maior probabilidade de ocorrer clorose férrica (Vose, 1982) são: Rendzinas (17%), Arenosolos (10%), Chernozems (3%), Xerosolos (7%) e Solonetz (2%).

Os **solos calcários** são caracterizados por elevadas concentrações de carbonatos (>20%), de cálcio e de magnésio, o que resulta num pH alcalino (entre 7,4 a 8,5). Os sais férricos e ferrosos existentes nos solos calcários reagem rapidamente com o carbonato de cálcio, em condições oxidantes, dando origem aos óxidos de ferro de baixa solubilidade de acordo com as seguintes reacções (1 e 2) propostas por Loeppert (1986):



O tipo de óxido formado depende das condições de precipitação, da superfície específica do carbonato de cálcio e da pressão parcial de O_2 e de CO_2 . De entre as condições de precipitação salienta-se o pH do meio: para um pH inferior a 7,4 domina a ferrihidrita; de 7,4 a 8,5 (característico dos solos calcários) a goetite; e superior a 8,5 o hidróxido férrico (Schwertmann, 1991; Lindsay, 1995). Segundo Lindsay e Schwab (1982), para cada aumento de uma unidade de pH acima de 7 a solubilidade do Fe iónico decresce de 1000 vezes. Para os valores de pH característicos dos solos calcários a concentração de equilíbrio do Fe^{3+} dissolvido é de aproximadamente 10^{-17} M, consideravelmente inferior ao intervalo de valores, entre 10^{-4} e 10^{-8} M, necessários ao crescimento normal das espécies vegetais (Lindsay, 1991; Haleem *et al.*, 1995; Welch, 1995).

O ião bicarbonato existente na solução dos solos calcários resulta da dissolução do carbonato de cálcio, na presença de H_2O e CO_2 e frequentemente, atinge concentrações superiores aos 200 g kg^{-1} (Chen e Barak, 1982; Loeppert e Hallmark, 1985; Loeppert, 1986). O ião bicarbonato

acumula-se particularmente na superfície radicular devido ao CO₂ libertado pela respiração radicular e que é necessário à dissolução do CaCO₃ (Mengel, 1995).

A seguir ao ião bicarbonato, o ião nitrato é o principal anião indutor da clorose férrica nos solos calcários (Bar e Kafkafi, 1992; Kosegarten e English, 1994; Smolders *et al.*, 1997; Kosegarten *et al.*, 1998a; 1999) porque nos solos calcários o azoto encontra-se quase exclusivamente na forma de ião nitrato uma vez que tanto a conversão do ião amónio em ião nitrato (nitrificação) como a volatilização do amónio na forma de NH₃ ocorrem mais rapidamente para valores de pH entre 7 e 8.

1.3.2. Efeito da clorose férrica nas plantas

O ião bicarbonato para além de diminuir a disponibilidade de ferro no solo e na rizosfera, pode também afectar a absorção radicular, a translocação para a parte aérea e a distribuição do Fe nas folhas jovens induzindo o aparecimento da clorose férrica (Loeppert, 1986; Marschner, 1991; Mengel *et al.*, 1994; Mengel, 1995; Grusak *et al.*, 1999).

A nível radicular, a redução do Fe(III) na membrana plasmática é o processo mais sensível ao efeito do ião bicarbonato no pH apoplástico (Romera *et al.*, 1991a; Toulon *et al.*, 1992; Mengel *et al.*, 1994). Contudo, diversos autores mencionam que a menor absorção do Fe, observada nas dicotiledóneas cultivadas em solos calcários, pode ser apenas devida ao efeito indirecto do ião bicarbonato no crescimento radicular (Alhendawi *et al.*, 1997) ou à diminuição das reservas de Fe no apoplasma radicular (Zhang *et al.*, 1999). Diversos autores (Bienfait *et al.*, 1985; Mengel e Geurtzen, 1988; Longnecker e Welsh, 1990; Kosegarten *et al.*, 1998a; 1998b) observaram que, algumas espécies vegetais quando deficientes em Fe, apresentavam teores de Fe radicular superiores aos encontrados nas folhas e por outro lado, em muitos casos, não verificaram qualquer correlação entre a concentração de Fe nos tecidos vegetais e o grau de deficiência. Baseado nestes factos, Mengel (1995), refere que a mobilização do Fe nos solos calcários e a absorção radicular não são os únicos processos críticos que levam ao aparecimento dos sintomas na parte aérea. Posteriormente, Alhendawi *et al.* (1997) verificaram que a presença do ião bicarbonato resulta na acumulação de ácidos orgânicos nas raízes, com o prejuízo da translocação do Fe para a parte aérea.

Segundo Mengel *et al.* (1994), o aumento do pH da seiva xilémica e do apoplasto foliar deve-se à presença do ião bicarbonato. Contudo, Nikolic e Römheld (1999) verificaram que o

aumento do pH apoplástico motivado pela clorose férrica não é dependente do estado nutricional de Fe nem é motivado pelo íon bicarbonato. De acordo com estes autores, o HCO_3^- absorvido pelas células radiculares dificilmente se acumula na parte aérea porque é rapidamente metabolizado nas raízes com a formação de ácidos orgânicos, tais como o ácido málico que foi detectado por Bialczyk e Lechowski (1992) na parte aérea.

O aumento do pH apoplástico do xilema de folhas intactas foi também observado por Kosegarten *et al.* (1999) mas exclusivamente na presença do íon nitrato e limitado a pequenos micrositios localizados na zona interveinal das folhas jovens em crescimento, com elevadas necessidades de N e de Fe. Estes resultados permitem também fundamentar a ausência de sintomas de clorose férrica em folhas velhas pois estas, para além de não terem grandes necessidades de N (Aktas e van Egmond, 1979) apresentam elevadas taxas de fotossíntese aparente que fornecem a energia necessária ao funcionamento das bombas protónicas responsáveis pela regulação do pH apoplástico (Kosegarten *et al.*, 1999). Pelo contrário, o íon amónio (NH_4^+) origina uma acidificação do pH apoplástico porque durante a absorção deste catião há despolarização da membrana plasmática, processo que estimula a actividade da enzima H^+ -ATPase (Kosegarten *et al.*, 1999).

O decréscimo da actividade da QF-R, localizada no mesófilo, que ocorre em folhas jovens com clorose férrica é motivado pelo aumento do pH apoplástico (González-Vallejo *et al.*, 1999), afectando não só a translocação do Fe para a parte aérea como também a distribuição foliar do Fe. Consequentemente, o Fe acumula-se no apoplasto foliar, onde permanece fisiologicamente inactivo (Morales *et al.*, 1998b; Kosegarten *et al.*, 1999; González-Vallejo *et al.*, 2000). Segundo Stephan e Scholz (1993), esta imobilização do Fe pode também reflectir, pelo menos em parte, uma diminuição no processo de “xylem unloading”.

Em folhas deficientes em Fe, o volume e o teor proteico do cloroplasto diminuem, acompanhados por um decréscimo no teor de todos os componentes da membrana, incluindo os transportadores fotossintéticos de electrões e os pigmentos antena (Spiller e Terry, 1980; Terry, 1980; Pushnik e Miller, 1989; Terry e Abadía, 1986; Quílez *et al.*, 1992; Abadía e Abadía, 1993; Guller e Krucká, 1993; Monge *et al.*, 1993; Nedunchezian *et al.*, 1997). O efeito mais evidente da deficiência de Fe é o decréscimo no teor dos pigmentos fotossintéticos, em especial das clorofilas e do β -caroteno (Miller *et al.*, 1984; Terry e Abadía, 1986; Bassi *et al.*, 1990; Morales *et al.*, 1990), enquanto que o teor de algumas xantofilas do ciclo VAZ, como a violaxantina (V), a anteroxantina (A) e a zeaxantina (Z) pode até aumentar, resultando na cor amarela característica

das folhas deficientes em Fe (Terry e Abadía, 1986; Quílez *et al.*, 1992; Abadía e Abadía, 1993; Morales *et al.*, 1994; 1998b).

Hellín *et al.* (1995) detectaram em folhas cloróticas de limoeiro que conjuntamente com alterações na ultra-estrutura dos cloroplastos e diminuição da clorofila total ocorria um decréscimo significativo na actividade da superóxido dismutase (SOD) de Fe em simultâneo com acréscimos das SOD de Cu e Zn, provavelmente estimuladas pelo aumento dos radicais livres de oxigénio. Apesar de diversos autores (Alcaraz *et al.*, 1985; Huang *et al.*, 1992) terem verificado que os níveis de ferredoxina decresceram simultaneamente com os de clorofila em folhas cloróticas de tabaco e de citrinos, Terry e Zayed (1995) referem que a quantidade de ferredoxina existente numa situação de clorose férrica é suficiente para a redução do carbono e do azoto.

Os lípidos são uma parte integrante da matriz da membrana dos tilacóides, nos quais os complexos supramoleculares proteína-pigmentos estão inseridos (Abadía, 1992) e numa situação de deficiência de ferro a razão MGDG (mono-galactosildiglicerol)/DGDG (di-galactosildiglicerol) decresce nos tilacóides (Monge *et al.*, 1993). Os tilacóides de plantas deficientes em Fe estão enriquecidos em ácidos gordos saturados em prejuízo dos ácidos gordos insaturados, originando o decréscimo da fluidez de diversas membranas plasmáticas (Abadía *et al.*, 1989; Abadía, 1992).

A diminuição das taxas fotossintéticas em plantas deficientes em Fe, medidas através das trocas gasosas (CO₂ ou O₂) foi observada em diversas espécies cultivadas em campo e em estufa como sejam: beterraba sacarina (Spiller e Terry, 1980; Terry, 1980; 1983), soja (Davis *et al.*, 1986), tabaco (Miller *et al.*, 1985; Pushnik e Miller, 1989), milho (Nenova e Stoyanov, 1993), macieira (Ji *et al.*, 1984), pereira (Morales *et al.*, 1992) e pessegueiro (Pérez *et al.*, 1995). Estes resultados estão associados com o decréscimo coordenado de vários componentes da cadeia fotossintética como, do PSI (fotossistema I) e dos citocromos (Morales *et al.*, 1990). O decréscimo sustentado do PSII (fotossistema II), indicador de fotoinibição, apenas é apreciável nas folhas com uma clorose intensa (Belkhodja *et al.*, 1998a; Morales *et al.*, 1998a).

Adicionalmente, o processo de fixação fotossintética do carbono também é prejudicado (Terry, 1980; 1983; Terry e Zayed, 1995) devido à menor capacidade de carboxilação da RuBP (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase) (Winder e Nishio, 1995). Consequentemente, a densidade de fluxo luminoso absorvida por plantas deficientes em Fe é muito superior às suas necessidades fotossintéticas. Abadía *et al.* (1999) descrevem os mecanismos protectores presentes nas folhas cloróticas: i) aumento da radiação total reflectida e transmitida em prejuízo da radiação absorvida; ii) dissipação na forma de calor pelo PSII, provavelmente facilitada pelo aumento relativo dos

pigmentos do ciclo VAZ; iii) aumento da concentração relativa das enzimas e dos compostos envolvidos na transformação dos radicais livres de oxigénio.

Ainda não é conhecido o processo primário que necessita de Fe e que induz à diminuição do crescimento foliar (Mengel, 1995) que segundo Kosegarten *et al.* (1998b) é motivado pela baixa translocação do Fe para a parte aérea e pela pouca eficiência de utilização desse Fe. Um dos processos necessários ao crescimento e divisão celulares é a redução do ribonucleótido a desoxirribonucleótido, pré-requisito para a síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA), efectuado por uma redutase na qual o Fe tem um papel essencial (Reichard, 1993). Adicionalmente, a actividade da enzima ATPase (adenosina 5'-trifosfatase) existente na membrana plasmática é afectada pela deficiência de Fe (Bañuls *et al.*, 1993; Mengel, 1995).

1.3.3. Mecanismos de resposta à clorose férrica

As espécies vegetais e, por vezes, algumas cultivares evidenciam comportamentos distintos face à deficiência de Fe o que permite agrupá-las em espécies eficientes, pois apresentam mecanismos de resposta que promovem a disponibilidade de Fe e espécies não eficientes, que por não apresentarem capacidade de adaptação aquela deficiência desenvolvem os sintomas característicos de clorose férrica (Miller *et al.*, 1984).

Os diferentes mecanismos de resposta que contribuem para um melhor estado nutricional em Fe e portanto para uma maior tolerância à clorose férrica, actuam através da mobilização do Fe na rizosfera e do aumento da taxa de absorção e de translocação deste elemento na planta (Brown, 1978).

Segundo Römheld (1987b), os vários processos que promovem a solubilidade e disponibilidade do Fe na rizosfera podem ser classificados (**Tabela 1.1**) como mecanismos não específicos, quando estão presentes na planta independentemente do estado nutricional do Fe e mecanismos específicos, que surgem quando a concentração de Fe nos tecidos vegetais decresce abaixo do nível crítico, sendo desactivados assim que é alcançado o nível de Fe necessário para a planta, prevenindo a absorção excessiva deste nutriente.

Tabela 1.1 - Mecanismos específicos e não específicos, que aumentam a absorção do ferro (Römheld, 1987b).

A - Mecanismos não específicos
<ul style="list-style-type: none"> • Decréscimo do pH devido a uma absorção radicular catiónica preferencial. • Exsudação de ácidos orgânicos, conduzindo a um decréscimo do pH e/ou complexação do ferro. • Aumento da actividade microbiana na rizosfera devido à exsudação radicular, o que afecta o pH e deste modo a redução do Fe(III) e concentração de quelatos. • Simbiose com microrganismos que sejam altamente eficientes na absorção de ferro.
B - Mecanismos específicos
<ul style="list-style-type: none"> • Redução do Fe(III). (Redutase induzida) • Libertação de protões. (ATPase induzida e dependente da bomba protónica) • Exsudação de compostos fenólicos. (Agentes redutores e quelatantes) • Exsudação de substâncias quelatantes específicas para o ferro. (Fitosideróferos) • Síntese de sistemas específicos para absorção do ferro. (Proteínas de transporte)

Os **mecanismos não específicos** estão sempre presente nas plantas superiores e podem favorecer a absorção do Fe, independentemente da planta se encontrar em deficiência.

A acidificação da rizosfera pode ser motivada pela absorção catiónica (K^+ e NH_4^+), uma vez que para manter o potencial eléctrico das células é necessário que simultaneamente ocorra extrusão de protões (Römheld *et al.*, 1984; Marschner, 1995).

Os compostos orgânicos libertados pelas raízes podem ser agrupados em compostos de alto peso molecular, como a mucilagem que protege as raízes da dessecação e aumenta as zonas de contacto entre a raiz e o solo, e em compostos de baixo peso molecular (aminoácidos, açúcares, ácidos orgânicos, fenóis) que para além de complexarem o Fe podem ser uma fonte de carbono para os microorganismos (Marschner *et al.*, 1986; Masalha *et al.*, 2000).

A fauna microbiana pode aumentar a absorção de Fe de diversas formas nomeadamente através da libertação de agentes complexantes (ácidos orgânicos, açúcares e sideróferos) e criando pequenas zonas de anaerobiose favoráveis à redução do Fe (Powell *et al.*, 1982; Cress *et al.*, 1986; Lindsay, 1991; Jurkevitch *et al.*, 1992; Marschner e Römheld, 1994; Awad *et al.*, 1995b).

A simbiose com micorrizas aumenta a zona de contacto entre o solo e a raiz (Treeby, 1992) e permite a acumulação de sideróferos na rizosfera, compostos muito eficientes na complexação e solubilização do Fe (Powel *et al.*, 1982; Marschner *et al.*, 1997). No entanto, Treeby (1992), salienta que a simbiose com micorrizas apenas melhora o fornecimento de Fe para a parte aérea do hospedeiro (plântulas de citrinos) em ambientes ácidos e não na presença de $CaCO_3$.

Os efeitos benéficos da simbiose com rizobactérias (Ex.: *Pseudomonas*) está também relacionada com a capacidade destes microrganismos produzirem sideróferos (Bar-Ness *et al.*, 1991; Walter *et al.*, 1994). No entanto, os microrganismos podem ter efeito negativo na absorção deste elemento, competindo pelo Fe disponível na rizosfera, decompondo os compostos complexantes de Fe existentes na rizosfera e produzindo fitotoxinas que inibem o crescimento radicular (Marschner *et al.*, 1986).

A capacidade de troca catiónica radicular (CTCR) é uma característica presente em todas as espécies vegetais que pode permitir a adsorção de catiões e de quelatos férricos, processo prévio à absorção do Fe (Bakker e Nys, 1999). As espécies calcícolas têm uma CTCR superior à das espécies calcífugas (Chen e Barak, 1982), tendo Hamzé *et al.* (1980) observado que dos porta-enxertos de citrinos estudados, os mais tolerantes apresentavam uma CTCR superior, apesar de não ser uma característica desencadeada pela clorose férrica.

Os **mecanismos específicos** estão dependentes do estado nutricional da planta em Fe, que transformado num “sinal”, provavelmente na forma de auxinas, induz às alterações bioquímicas e morfológicas que ocorrem a nível radicular e permitem regular a absorção de Fe (Landsberg, 1981b; Bienfait *et al.*, 1983; Römheld e Marschner, 1986b; Rubinstein e Luster, 1993; Grusak e Pezeshgi, 1996).

Resultados obtidos por Romera *et al.* (1996; 1999) indicam que o etileno, através do seu precursor, ácido carboxílico 1-aminociclopropano (ACC), está também envolvido na regulação destes mecanismos de resposta. Schmidt (1999) refere ainda a existência de um sistema hormonal múltiplo e complexo uma vez que as auxinas e as citocininas estimulam a produção de etileno e por sua vez, as giberelinas afectam a expansão radial das raízes, processo regulado pelo etileno. A natureza transitória das respostas radiculares à deficiência de Fe em espécies eficientes apontam ainda para a existência de um mecanismo de retroacção (“feedback”) activado após o reverdecimento das folhas cloróticas (Marschner *et al.*, 1986; Schmidt *et al.*, 1996).

Face ao aparecimento da deficiência de Fe, as espécies eficientes caracterizam-se por desenvolverem diferentes mecanismos específicos de resposta o que permite agrupá-las em duas estratégias: a Estratégia I, encontrada nas dicotiledóneas e em algumas monocotiledóneas e a Estratégia II, característica das gramíneas.

1.3.3.1. Estratégia I

Conforme descrito por diversos autores (Bienfait *et al.*, 1985; Römheld e Marschner, 1986a; 1986b; Römheld, 1987a; 1987b; Jolley e Brown, 1994; Marschner e Römheld, 1994; Welch, 1995; Grusak *et al.*, 1999; Schmidt, 1999), a Estratégia I é genericamente caracterizada por apresentar, conjuntamente com alterações morfológicas da raiz, exsudação protónica, libertação de compostos redutores e/ou complexantes e aumento da redução do Fe(III).

Em condições de deficiência de Fe, a **acidificação da rizosfera** e do apoplasto das células radiculares resulta da excreção de hidrogeniões originados pelo aumento da actividade das ATPases existentes na membrana plasmática, distinguindo-se da acidificação não específica anteriormente descrita uma vez que ocorre em zonas localizadas do sistema radicular (Vos *et al.*, 1986; Serrano, 1989; Welkie e Miller, 1993; Susín *et al.*, 1994).

Este mecanismo de acidificação favorece a libertação de substâncias redutoras e/ou complexantes do Fe para a rizosfera, tais como compostos fenólicos, flavinas, ácidos orgânicos e polipéptidos, que favorecem a solubilização dos compostos férricos inorgânicos e a absorção do Fe (Bienfait *et al.*, 1983; Marschner *et al.*, 1986; Römheld, 1987a; 1987b; Buckhout *et al.*, 1989; Vempati *et al.*, 1995).

Os **compostos fenólicos** libertados, diferem entre espécies vegetais, sendo os mais comuns o ácido cafeico, o ácido fenílico e o ácido clorogénico (Römheld e Marschner, 1983; Alhendawi *et al.*, 1997). A síntese destes compostos ocorre devido à inibição da actividade da enzima peroxidase, motivada pela deficiência de Fe, resultando numa menor suberificação da raiz e na acumulação dos precursores aromáticos dos fenóis (Sijmons *et al.*, 1985). A acumulação e a excreção radicular de **flavinas** foram detectadas em pimenteiro (Welkie *et al.*, 1990) e em beterraba sacarina (Susín *et al.*, 1993; 1994). Segundo Susín *et al.* (1994) a libertação de flavinas ocorre apenas quando o pH da rizosfera desce, uma vez que em condições alcalinas estes compostos acumulam-se nas raízes chegando a alcançar concentrações de 1 mM. A sua função nas raízes não está esclarecida, sabendo-se apenas que em presença de NADH ou NADPH têm capacidade de reduzir compostos férricos e interagir com a QF-R (González-Vallejo *et al.*, 1998a).

A acumulação de **ácidos orgânicos** a nível radicular, como o ácido cítrico e o ácido málico, foi comprovado por diversos autores (Fournier *et al.*, 1992; Gerke *et al.*, 1994; Alhendawi *et al.*, 1997; Rombolà *et al.*, 1998a) e parece estar associada ao aumento da actividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) (Landsberg, 1981c; Sijmons e Bienfait, 1984; Rabotti e

Zocchi, 1994; Andaluz *et al.*, 2000), conjuntamente com outras enzimas como sejam: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, formato desidrogenase, ascorbato peroxidase (Suzuki *et al.*, 1995; Abadía, 1998; González-Vallejo *et al.*, 1998b; López-Millán *et al.*, 1998). Estes ácidos orgânicos favorecem não só a redução e a translocação do Fe para a parte aérea como a regulação do pH celular (Marschner *et al.*, 1986).

Numa situação de deficiência de Fe, as espécies vegetais incluídas na Estratégia I, apresentam maiores taxas de redução do Fe(III) ligado aos quelatos, motivadas pelo aumento da actividade da QF-R, localizada na membrana plasmática, referenciada por diversos autores como redutase induzida ou “**turbo-redutase**” (Römheld, 1987b; Brüggemann *et al.*, 1990; Romera *et al.*, 1991b; Moog e Brüggemann, 1994). As raízes de plantas deficientes em Fe podem apresentar uma capacidade de reduzir o Fe(III) existente no meio de cultivo até 10 a 20 vezes superior aos valores do controlo (Moog e Brüggemann, 1994; Susín *et al.*, 1996). O potencial redutor acoplado a esta enzima ainda não está esclarecido. Enquanto Sijmons *et al.* (1984) propuseram o NADPH como dador de electrões, Moog e Brüggemann (1994) verificaram que, em membranas isoladas, a QF-R recebia os electrões preferencialmente do NADH.

De acordo com os resultados obtidos por diversos autores (Bagnaresi e Pupillo, 1995; Schmidt *et al.*, 1996; Susín *et al.*, 1996), a QF-R parece interagir com os componentes da membrana plasmática como parte de uma cadeia de transporte de electrões. Robinson *et al.* (1997) identificaram uma flavoproteína necessária à actividade da QF-R em *Arabidopsis*.

A localização deste sistema enzimático na raiz parece dependente das espécies vegetais (Grusak *et al.*, 1999). Algumas plantas apresentam actividade redutora na zona subapical das raízes (Marschner *et al.*, 1982; Römheld e Marschner, 1986b; Chaney *et al.*, 1992), enquanto que noutras espécies ocorre ao longo de toda a raiz (Grusak *et al.*, 1993). Por vezes esta actividade está confinada ao pêlos radiculares (Römheld 1987a; 1987b), associação no entanto nem sempre encontrada (Moog e Brüggemann, 1994).

Exceptuando-se os resultados obtidos por Susín *et al.* (1994) em beterraba sacarina, o aumento da actividade da QF-R está dependente da existência de pequenas quantidades de Fe no meio (Romera *et al.*, 1996; Grusak *et al.*, 1999; Schmidt, 1999) observado em diversas espécies nomeadamente, feijão (Chaney *et al.*, 1972), soja (Tipton e Thowsen, 1985), girassol (Romera *et al.*, 1992), ervilha (Grusak *et al.*, 1993) e pessegueiro (Gogorcena *et al.*, 1998; 2000). Foram apresentadas duas hipóteses para explicar a necessidade de Fe na actividade da QF-R induzida: i) pelo efeito indirecto do Fe na actividade da enzima ACC sintetase que participa na biossíntese de etileno, que por sua vez regula este mecanismo de resposta (Romera *et al.*, 1996; Abadía, 1998) e

ii) pela necessidade de Fe como componente e/ou cofactor da própria enzima. Esta última possibilidade está associada com o facto da actividade da QF-R na ausência de Fe ser inferior à obtida em plantas verdes (Rubinstein e Luster, 1993; Romera *et al.*, 1996) e dos acréscimos de actividade da QF-R obtidos com membranas plasmáticas isoladas terem sido inferiores aos obtidos com raízes intactas (Abadía, 1998).

De um modo geral, o aumento da actividade da QF-R é evidente em diversas árvores de fruto como sejam: videira (Bavaresco *et al.*, 1991; Brancadoro *et al.*, 1995) macieira (Ao *et al.*, 1985), pessegueiro (Romera *et al.* 1991a; 1991b; Egilla *et al.*, 1994; Cinelli *et al.*, 1995; de la Guardia *et al.*, 1995; Gogorcena *et al.*, 1998; 2000), marmeleiro (Viti e Cinelli, 1993; Cinelli, 1995; Tagliavini *et al.*, 1995b), pereira (Tagliavini *et al.*, 1995b), kiwi (Vizzotto *et al.*, 1997; 1999) e citrinos (Manthey e McCoy, 1993; Treeby e Uren, 1993; Manthey *et al.*, 1994; 1996). O facto de diversos autores (Romera *et al.*, 1991a; Tagliavini *et al.*, 1995b) não terem registado aumentos da actividade da QF-R em algumas situações é atribuído por Gogorcena *et al.* (2000) à utilização de diferentes metodologias.

Apesar de terem sido efectuados diversos progressos na caracterização bioquímica da QF-R existem algumas discrepâncias entre os resultados obtidos com raízes intactas e com membranas plasmáticas isoladas (Grusak *et al.*, 1999; Schmidt, 1999). Por exemplo, a máxima actividade desta enzima foi obtida para valores diferentes de pH consoante os estudos foram efectuados *in vivo* ou *in vitro* sendo, respectivamente de 5,5 e 7 (Moog e Brüggemann, 1994).

Na definição original deste sistema (Rubinstein e Luster, 1993), baseada no diferente potencial dos substractos requeridos, o aumento da redução do Fe é atribuído a uma mesma enzima, no entanto, os dados disponíveis e reunidos por diversos autores (Grusak *et al.*, 1999; Schmidt, 1999) apontam para um aumento da expressão da QF-R, em situação de deficiência de Fe, enzima bioquimicamente diferente da redutase “standard” que não é regulada pela necessidade de Fe. Ainda não foi possível identificar os dois sistemas de enzimas redox (“standard” e “turbo”) envolvidos na absorção do Fe pelas plantas superiores, contudo estão a ser realizados estudos bioquímicos baseados na especificidade estereoquímica destas enzimas para o α - NADH ou β - NADH (Schmidt, 1999).

Ao nível foliar, ainda não foi identificado qualquer mecanismo de indução da actividade da quelato de Fe(III)-redutase em situação de deficiência de Fe (Brüggemann *et al.*, 1993; de la Guardia e Alcántara, 1996; Nikolic e Römheld, 1999; Rombolà *et al.*; 2000).

Vários autores (Römheld e Marschner, 1981; Welkie e Miller, 1993; Romera e Alcántara, 1994; Landsberg, 1995; Schmidt e Bartels, 1996) verificaram que as modificações fisiológicas

desencadeadas pela deficiência de Fe eram acompanhadas por **alterações morfológicas** tais como: i) uma dilatação das zonas subapicais da raiz devido a um alargamento do córtex originado por uma divisão adicional das células da epiderme da raiz e ii) um maior número de pêlos radiculares de comprimento superior. Estas alterações na morfologia radicular estão quase sempre associadas ao desenvolvimento de células de transferência que, espacialmente, coincidem com a zona subapical da raiz onde ocorre a redução do Fe (Römheld e Marschner, 1979; Landsberg, 1982; Egilla *et al.*, 1994).

A formação de células de transferência, caracterizadas por possuírem protuberâncias mais ou menos desenvolvidas na parede celular acompanhadas pelo plasmalema envolvente, conduz a um alargamento da superfície de ligação entre a parede celular e o citoplasma (Kramer *et al.*, 1980; Landsberg, 1982; 1984; Welkie e Miller, 1993; Schmidt e Bartels, 1996). Estas células são citoplasmaticamente densas, com um número particularmente elevado de mitocôndrias polarizadas no sentido das invaginações e com um retículo endoplasmático rugoso denso (Landsberg, 1981a; 1984).

As células de transferência podem também diferenciar-se a partir das células parênquimatosas do xilema e são funcionalmente idênticas às que ocorrem nas células rizodérmicas, mas apresentam um papel significativo na entrada do Fe para o sistema condutor e posterior translocação deste elemento para a parte aérea (Kramer *et al.*, 1980; Römheld e Marschner, 1981; Marschner *et al.*, 1986). Na parte aérea podem existir em diversos locais como sejam: i) nos nós dos caules permitindo a troca de nutrientes entre os feixes vasculares adjacentes não conectados; ii) nas nervuras secundárias das folhas desviando o Fe já existente na seiva xilémica dos vasos condutores para o simplasto das células adjacentes que apresentam elevadas taxas de crescimento e necessidades de Fe e iii) na zona de conexão entre o xilema e o floema possibilitando a absorção do Fe através do fluxo transpiratório e posterior distribuição deste elemento, via floema, especialmente nos tecidos meristemáticos da região apical que apresentam uma baixa taxa de transpiração (Landsberg, 1984).

A coincidência espacial e temporal dos mecanismos de resposta característicos da Estratégia I a nível radicular foi frequentemente encontrada por diversos autores (Landsberg, 1984; Marschner *et al.*, 1986) que classificaram este sistema de cooperativo. No entanto, Grusak *et al.* (1990) estimaram que apenas 17% do Fe reduzido por este processo é absorvido pelas raízes sendo portanto um sistema muito pouco eficiente em termos de custos energéticos.

1.3.3.2. Estratégia II

A Estratégia II está confinada às gramíneas (tribo *Poaceae*) as quais, face a uma deficiência de Fe, libertam fitosideróferos para a rizosfera e possuem um sistema de absorção do Fe, proteína de transporte, com elevada especificidade para os fitosideróferos férricos (Takagi *et al.*, 1984; Römheld e Marschner, 1986a; Römheld, 1987a; 1987b; Brown e Jolley, 1989; Chaney *et al.*, 1989; Römheld e Marschner, 1990; Welch, 1995).

Diversos autores (Sugiura e Nomoto, 1984; Takagi *et al.*, 1984; Mishashi *et al.*, 1991; Kawai *et al.*, 1995; Alhendawi *et al.*, 1997) identificaram vários **fitosideróferos**, complexantes específicos para o Fe(III), tal como o ácido mugénico e o ácido avénico. Estes compostos têm o mesmo precursor químico que a nicotianamina, aminoácido que existe nas plantas superiores (Sugiura e Nomoto, 1984; Römheld, 1987a; Higuchi *et al.*, 1995). A produção de fitosideróferos aumenta gradualmente com a deficiência em Fe, é regulada pelo ritmo diurno e atinge o máximo poucas horas após o período luminoso (Takagi *et al.*, 1984; Kanazawa *et al.*, 1995). O Fe, depois de reduzido, entra na planta através de um sistema de transporte específico. Simultaneamente o fitosiderófero é libertado, permanecendo disponível para tornar a complexar mais Fe existente na rizosfera (Marschner e Römheld, 1994; Wang e Peverly, 1999).

Ao contrário da libertação de fitosideróferos, o **sistema de transporte** parece ser muito menos afectado pela adição do Fe complexado pelo EDTA (ácido etileno-diamino tetraacético), como foi verificado em plantas de cevada deficientes em Fe (Römheld, 1987a). Ambos os mecanismos da Estratégia II estão restritos às células rizodérmicas e ao conjunto de pêlos radiculares das zonas apicais (Römheld e Marschner, 1986a; Römheld, 1987a).

A elevada especificidade deste sistema para o Fe foi comprovada por diversos investigadores (Römheld e Marschner, 1983; 1986a; Römheld, 1987a; 1987b; Marschner e Römheld, 1994) pois verificaram que a taxa de absorção do ferro ligado a fitosideróferos é cerca de 1000 vezes superior à taxa de absorção de quelatos sintéticos (Fe-EDDHA) ou sideróferos (ferrioxamina-Fe(III)) de origem microbiana. Consequentemente, quando o Fe está ligado a fitosideróferos, são requeridas baixas concentrações de ferro solúvel, inferiores aos valores críticos necessários para o crescimento de plantas não cloróticas (Römheld e Marschner, 1986a; 1990).

Surpreendentemente, a taxa de absorção do Fe ligado a fitosideróferos é também elevada nas plantas com níveis adequados deste elemento nutritivo, indicando que a especificidade deste sistema de absorção está sempre presente nas gramíneas e que a sua bioregulação é determinada

preferencialmente pela taxa de produção de fitosideróferos e não pelo sistema de transporte através da membrana plasmática (Römheld, 1987a; 1987b).

Estes mecanismos de resposta, típicos das gramíneas (Estratégia II), apresentam também uma regulação hormonal que, no entanto, é diferente da verificada nas plantas da Estratégia I. Esta diferença pode vir a distinguir taxonomicamente as duas estratégias (Schmidt, 1999), o que ainda não é possível (Wallace, 1990a).

1.3.3.3. Grau de tolerância das espécies vegetais

Marschner *et al.* (1986) referem que uma comparação ecológica entre as duas estratégias, revela que as gramíneas (Estratégia II) apresentam vantagens relativamente às espécies eficientes da Estratégia I: uma maior capacidade de mobilizar o Fe(III) inorgânico existente na rizosfera e uma menor sensibilidade a substratos com elevado pH, pois nestas condições apenas se verifica um decréscimo ligeiro na produção de fitosideróferos. Estas considerações foram recentemente comprovadas por Zhang *et al.* (1999) pois constaram que as dicotiledóneas estudadas (soja e pepino) apenas acumulavam Fe no espaço apoplástico do córtex radicular quando existiam quantidades suficientes de Fe disponível no meio. Em solos calcários, estas plantas dicotiledóneas não apresentaram capacidade de mobilizar o Fe existente no solo mas pelo contrário, as gramíneas (trigo) mantiveram a reserva de Fe radicular, independentemente da disponibilidade do Fe.

Entre espécies vegetais e mesmo cultivares existe uma grande diversidade de expressão, qualitativa e quantitativa, dos mecanismos específicos activados por uma deficiência de Fe (Marschner *et al.*, 1986). A presença destes mecanismos num determinado genótipo nem sempre está associada a uma maior tolerância à clorose férrica induzida uma vez que esta potencialidade fisiológica pode ou não expressar-se nos solos calcários. (Römheld e Marschner, 1986a). Deste modo, os porta-enxertos de citrinos provenientes de *C. macrophylla*, *C. aurantium* ou de *C. jambhiri* são tolerantes à clorose férrica enquanto que os de *Poncirus trifoliata* são susceptíveis (Hamzé *et al.*, 1986; Sudahomo *et al.*, 1994). Dos porta-enxertos de videira (*Vitis* sp.) utilizados, os híbridos de *V. berlandieri* x *V. rupestris* '140 Ru' e de *V. berlandieri* x *V. riparia* 'SO4' são tolerantes enquanto que o híbrido *V. riparia* x *V. rupestris* são susceptíveis (Bavaresco *et al.*, 1995b). Segundo Shi e Byrne (1995) entre os porta-enxertos mais tolerantes das espécies de *Prunus* sp. encontram-se os híbridos de *P. persica* x *P. amygdalus* ou o genótipo de *P. persica* 'Swat' e entre os susceptíveis está o genótipo de *P. persica* 'Nemaguard'. Cordeiro (1997)

conseguiu diferenciar o grau de tolerância de duas variedades de oliveira, ‘Hojiblanca’ e ‘Lechín de Sevilla’, utilizadas em Espanha e genericamente classificadas como susceptíveis à clorose férica.

Para além dos mecanismos específicos anteriormente referidos, Bavaresco *et al.* (1994) referem que alguns dos porta-enxertos de videira tolerantes à clorose férica podem apresentar um mecanismo de protecção em relação à clorose férica. Estas plantas, quando privadas de Fe, têm uma baixa taxa de crescimento, quer da parte aérea quer do sistema radicular, conjuntamente com uma elevada produção de biomassa ao nível da parte aérea, denotando uma maior eficiência de utilização de cada unidade de Fe absorvido.

Posteriormente, Wei *et al.* (1995) observaram que numa situação de deficiência de Fe, as espécies de trevo (*Trifolium* sp.) tolerantes à clorose férica apresentavam comparativamente com as espécies susceptíveis: i) uma relação entre a raiz e a parte aérea mais elevada; ii) um balanço nutricional mais equilibrado; iii) mecanismos de mobilização do Fe mais efectivos; iv) menores necessidades metabólicas de Fe e v) uma maior eficiência de utilização do Fe na parte aérea.

A actividade fisiológica responsável pela diferente tolerância dos porta-enxertos de pessegueiros, de acordo com Egilla *et al.* (1994) envolve a capacidade das plantas manterem uma área de superfície radicular suficiente para a redução e a absorção do Fe em condições de baixa solubilidade de Fe no meio de crescimento. Por outro lado, Han *et al.* (1998) constataram que, numa situação de deficiência de Fe, a cultivar de macieira mais tolerante à clorose férica apresentava uma capacidade de troca catiónica radicular superior, uma maior condutividade eléctrica e capacidade de baixar o pH da rizosfera, apresentando conseqüentemente um maior teor de Fe no apoplasto radicular. Longnecker e Welsh (1990) sugerem que a capacidade de acumular Fe no apoplasto radicular pode vir a ser utilizada como método de selecção de génotipos tolerantes à clorose férica. Outra proposta, é a utilização da actividade da QF-R, método testado na selecção de génotipos de soja (*in vitro*) por Jolley *et al.* (1992) e de porta-enxertos de pessegueiro (*in vivo*) por Gogorcena *et al.* (2000).

O grau de tolerância, quantitativa e qualitativamente, à clorose férica é geneticamente controlado e é transmitido entre gerações de uma mesma espécie e/ou cultivar variando no entanto consoante as espécies estudadas. Em plantas de *Glycine max.* L. foi atribuída a genes múltiplos com acção aditiva (Cianzio, 1991; Cianzio e Voss, 1994), enquanto que em *Avena byzantina* L. e *Lycopersicum esculentum* L. a um gene dominante (Cianzio, 1995), tal como em *Beta vulgaris* L. (Campbell e Nishio, 2000). Em *Phaseolus vulgaris* L. está associada com genes dominantes de

acção complementar (Zaiter e Ghlayini, 1994) e em *Helianthus annuus* L. o controlo é efectuado por dois genes dominantes (Alcántara *et al.*, 1988).

1.3.4. Diagnóstico da clorose férrica

Numa primeira análise, o diagnóstico da clorose férrica passa pela identificação do grau de incidência e da gravidade dos sintomas de clorose férrica. Diversos autores (McKenzie *et al.*, 1984; Romera *et al.*, 1991b; Sanz e Montañés, 1997) propõem o uso de uma escala de clorose visual, ainda que subjectiva, baseada na intensidade dos sintomas.

O método mais correntemente utilizado para avaliar o estado nutricional de fruteiras é a interpretação dos resultados obtidos pela **análise foliar** apesar das limitações que apresenta (Moreno *et al.*, 1998). A quantidade de nutrientes absorvidos por uma planta é determinada por diversos factores, como sejam as características genótípicas da espécie, as técnicas culturais utilizadas e as condições edafoclimáticas e conseqüentemente, a concentração de um elemento na folha pode não reflectir as necessidades actuais da planta (Drossopoulos *et al.*, 1994).

Por outro lado, existem duas limitações que inviabilizam o uso da concentração foliar de Fe para diagnosticar a clorose férrica, induzida em solos calcários, denominadas por Römheld (1997) como o “**paradoxo da clorose**”. A primeira resulta do facto das folhas cloróticas apresentarem frequentemente, concentrações de ferro elevadas, por vezes superiores às das folhas verdes (Hamzé e Nimah, 1982; Mengel *et al.*, 1984; Loeppert e Hallmark, 1985; Rashid *et al.*, 1990; Fernandez-Lopez *et al.*, 1993) o que pode dever-se à imobilização do Fe; recentemente, Morales *et al.* (2000) verificaram que a proporção de Fe situada nos pecíolos e nas nervuras, principal e secundárias, de folhas de pessegueiro cloróticas tinha aumentado e pelo contrário, o Fe fisiologicamente activo, localizado no limbo tinha decrescido. A segunda limitação da análise foliar, consequência da primeira dificuldade, traduz-se pela falta de correlação entre a concentração foliar de Fe e a clorofila total nas folhas (Aktas e van Egmond, 1979; Deckock *et al.*, 1979; Terry e Low, 1982; Morales *et al.*, 1990; Abadía, 1992; Bavaresco *et al.*, 1993; 1995b; Mengel, 1995; Morales *et al.*, 1998b; Bavaresco *et al.*, 1999).

De um modo geral, a data recomendada para a análise foliar em árvores de fruto está próximo da data de colheita do fruto o que atrasa o diagnóstico, a prevenção e/ou a correcção atempada da clorose férrica (Igartua *et al.*, 2000). O paradoxo da clorose férrica é frequente nas árvores de fruto, tornando imprescindível o estabelecimento de métodos alternativos de

diagnóstico da clorose férrica, que permitam corrigir este problema nutritivo antes da produção ter sido afectada (Mengel e Geurtzen, 1986; Mengel, 1995).

Diversos estudos têm sido efectuados com o objectivo de determinar a interacção nutritiva existente em folhas cloróticas de diversas fruteiras, como por exemplo, de macieira (Tagliavini *et al.*, 1992), de pessegueiro (Abadía *et al.*, 1985; Alcántara e Romera, 1990; Köseoglu, 1995a), de marmeleiro (Tagliavini *et al.*, 1995b), de pereiras (Tagliavini *et al.*, 1993), de laranjeiras (Wallace, 1990b), de videira (Bavaresco, 1997) e de limoeiro (Hellín *et al.*, 1984; Fernandez-Lopez *et al.*, 1993). Diversas **relações nutritivas**, baseadas na concentração foliar de cada um dos nutrientes, têm sido utilizadas como sejam: P/Fe (Mengel *et al.*, 1984; Köseoglu, 1995b; Wei *et al.*, 1995), K/Ca (Mengel *et al.*, 1984; Abadía *et al.*, 1985; 1989; Montañés *et al.*, 1990; Garcia *et al.*, 1999) e Fe/Mn (Lucena *et al.*, 1990; Monge *et al.*, 1993). As espécies vegetais mais sensíveis à clorose férrica tendem a acumular mais Fe e mais P na parte aérea (Wei *et al.*, 1995). Estes aumentos de P podem dever-se à absorção preferencial e ao aumento da translocação do P para a parte aérea (Wei *et al.*, 1995). Por outro lado, quando maior for a quantidade de Fe fisiologicamente inactivo maiores serão as necessidades em Fe pelas zonas em crescimento, originando desequilíbrios nutritivos como sejam os observados pelas razões P/Fe, Mn/Fe, Zn/Fe (Nenova e Stoyanov, 1999). Alternativamente, Mohammad *et al.* (1998) sugerem a determinação do **Fe activo**, extraído com O-fenantrolina, ou da razão entre o Fe activo e o Fe total, como métodos de diagnóstico da clorose férrica em limoeiros.

Devido à grande complexidade dos efeitos da clorose férrica no equilíbrio nutritivo, diversos autores (Guzmán e Romero, 1988; Guzmán *et al.*, 1991; López-Cantarero *et al.*, 1992; Valenzuela *et al.*, 1992; Köseoglu, 1995b) sugerem ainda o uso de diversos índices nutritivos como o índice do Fe, o DOP (“Desviación del Optimo Percentual”) e o DRIS (“Diagnosis and Recommendation Integrated System”).

O **índice do Fe** (“Fe-index”) calcula-se com base na concentração foliar de Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco), K (% de peso seco) e P (% de peso seco) mediante a aplicação da seguinte fórmula: $[(10P + K) 50]/\text{Fe}$. Os valores mais elevados deste índice ocorrem nas folhas cloróticas e decrescem destas para as folhas verdes (Guzmán e Romero, 1988; Valenzuela *et al.*, 1995). Para condições agronómicas e climáticas conhecidas, Guzmán *et al.* (1991) propõem a utilização deste índice de forma a efectuar as correcções nutritivas, atempadamente e quando necessárias, visando a obtenção da máxima produção associada a uma boa qualidade das culturas hortícolas. Estes autores estabeleceram ainda os intervalos de valores óptimos deste índice para diversas espécies hortícolas.

O **DOP** resulta de uma simplificação do DRIS adaptada e proposta por Montañés e Heras (1991) uma vez que os resultados obtidos pela utilização destes índices relacionaram-se entre si. O DOP define-se como o desvio percentual da concentração foliar (C) de determinado elemento em relação à concentração óptima ou de referência (C ref). Calcula-se de acordo com a seguinte fórmula: $100 - [C \cdot 100 / C \text{ ref}]$, permitindo avaliar a situação nutritiva de uma forma integrada, efectuando o balanço nutricional, traduzido quer pelos excessos como pelas deficiências nutritivas, de forma a ordenar os nutrientes mais limitantes à obtenção da produção máxima (Sanz, 1999).

A análise foliar, apesar de apresentar a vantagem de indicar os níveis de nutrientes absorvidos, não permite distinguir as formas de Fe metabolicamente activas das não activas (Bar-Akiva, 1964). Deste modo, este autor sugere a utilização de métodos enzimáticos, nomeadamente em citrinos, uma vez que através da magnitude da actividade enzimática é possível avaliar o estado nutricional das plantas. As enzimas peroxidase (Garcia *et al.*, 1980; Hellín *et al.*, 1983) e catalase (Alvarado *et al.*, 1995) podem vir a ser utilizadas como um possível método de diagnóstico da clorose férrica, enquanto que a clorofilase (Fernandez-Lopez *et al.*, 1991; 1992; Garcia e Galindo, 1991; Valenzuela *et al.*, 1995) e a superóxido dismutase (Almansa *et al.*, 1994) apenas permitem identificar a deficiência de Fe. De acordo com os resultados obtidos, o desenvolvimento e uso desta metodologia tem boas perspectivas futuras (Lavon e Goldshmidt, 1999).

Ultimamente têm sido efectuados diversos trabalhos com o objectivo de utilizar a **composição mineral das flores** como método de prognóstico da clorose férrica, nomeadamente em pessegueiro, kiwi, macieira e pereira (Sanz *et al.*, 1993; 1994; Sanz e Montañés, 1995a; 1995b; Igartua *et al.*, 2000; Tagliavini *et al.*, 2000). O **prognóstico** da clorose férrica, conceito introduzido por Sanz e Montañés (1995a), define o diagnóstico efectuado antes do aparecimento dos sintomas de forma a permitir uma correcção antecipada da clorose férrica, meses antes da colheita, evitando os decréscimos na produção e na qualidade do fruto (Sanz *et al.*, 1997b; Belkhodja *et al.*, 1998b; Sanz *et al.*, 1998).

A utilização da análise floral como método de diagnóstico baseia-se na melhor relação encontrada entre a clorofila total (grau de clorose) e a concentração de Fe nas flores relativamente à concentração de Fe nas folhas de pessegueiro, nectarinas, macieira e pereira (Sanz e Montañés, 1995a; 1995b; Sanz *et al.* 1997a; 1997b; 1998; Igartua *et al.*, 2000; Toselli *et al.*, 2000). Para além disso, o intervalo de variação do Fe nas flores foi superior ao das folhas, traduzindo uma maior sensibilidade às alterações do meio. Adicionalmente, os desequilíbrios nutricionais verificados ao nível das folhas, como o aumento do K e da razão K/Ca, também foram observados nas flores (Belkhodja *et al.*, 1998b).

Recentemente, Igartua *et al.* (2000) propõem a utilização da razão **K/Zn nas flores** como método de prognóstico da clorose férrica nas árvores de pessegueiro. O aumento desta razão nas flores das árvores cloróticas deveu-se sempre a aumentos da concentração de K enquanto que a concentração de Zn diminuiu ou permaneceu constante (Belkhdja *et al.*, 1998b). Os aumentos de K estiveram, possivelmente, associados aos mecanismos desencadeados pela deficiência de Fe como sejam, o aumento da actividade da enzima ATPase envolvida na libertação de hidrogeniões a nível radicular (Marschner *et al.*, 1986) e a acumulação de ácidos orgânicos em toda a planta (Welkie e Miller, 1993). Por outro lado, o Zn e o Fe partilham os mesmos processos tanto ao nível da absorção radicular como da translocação na planta (Grusak *et al.*, 1999).

1.3.5. Correção da clorose férrica

A correcção da clorose férrica induzida em solos calcários constitui um problema de várias décadas e de difícil resolução (Démétriadrès *et al.*, 1964; Chandra, 1966). Apesar de estar estabelecido que a clorose férrica diminui a produção e a qualidade do fruto, existem ainda poucos trabalhos que abordem esta questão. Tagliavini *et al.* (2000) constataram que a redução da produção total, observada em pomares de kiwi, pereira e pessegueiros estabelecidos em solos calcários, em Espanha e em Itália, está relacionada com o agravamento dos sintomas de clorose férrica. Para além disso foi ainda observado que o calibre dos pêssegos obtidos diminuiu e que parte dos frutos de kiwi não reuniam as características necessárias à sua comercialização. Sanz *et al.* (1997b) verificaram que a presença de clorose férrica motivou um atraso de cerca de duas semanas na maturação de pêssegos, retardando a colheita para uma época de comercialização menos favorável.

O impacto económico deste problema nutricional acentua a necessidade de correcção da clorose férrica nos pomares estabelecidos em solos calcários, prática que pode ascender aos 60% do total de custos da fertilização e que tem que ser repetida anualmente (Rombolà *et al.*, 1999; Tagliavini *et al.*, 2000).

Actualmente, a correcção da clorose férrica nas árvores de fruto é correntemente efectuada pela aplicação de **quelatos ao solo**, como o Fe-EDDHA. A eficácia destes tratamentos está relacionada com a estabilidade destes quelatos mesmo para valores de pH acima de 9 (Andréu *et al.*, 1991; Wallace, 1991; Lucena *et al.*, 1992a; 1992b; Hernandez-Apaolaza *et al.*, 1995). Pelo contrário, a estabilidade do Fe-EDTA decresce a acima de pH 6,5 e o Fe é substituído por outros

catiões como sejam o Ca, o Zn ou o Cu, não sendo efectivo na correcção da clorose férrica em solos com reacção alcalina (Alva, 1992). As aplicações de quelatos ao solo são habitualmente efectuadas na Primavera, entre o início e a plena floração, de forma localizada (Rombolà *et al.*, 1999). A aplicação preventiva de quelatos sintéticos a diversas fruteiras (pessegueiro, kiwi, macieira, pereira) durante o Outono, atrasou o aparecimento dos sintomas de clorose na Primavera (Papastylianou, 1993; Tagliavini *et al.*, 2000). Contudo, devido à chuva frequente durante o Outono, as aplicações nesta época apresentam encargos económicos e riscos ambientais elevados devido à lixiviação do quelato férrico e/ou dos ligandos não absorvidos pelas raízes (Tagliavini *et al.*, 2000). Para além dos custos associados a esta prática, os impactos ambientais da aplicação de quelatos ao solo são pouco conhecidos nomeadamente através da sua complexação com outros metais como sejam, o Mn, o Cu e o Ni (Wallace e Wallace, 1992).

Existem diversos métodos em estudo, alternativos à correcção da clorose férrica pela aplicação de quelatos de Fe(III) ao solo. Estes tratamentos quando efectuados ao solo podem fornecer Fe, aumentar a disponibilidade de Fe existente na rizosfera ou apresentar simultaneamente os dois efeitos.

A aplicação ao solo de sais inorgânicos de ferro solúveis, como seja o **sulfato de Fe(II)**, raramente é efectivo em solos calcários uma vez que o Fe precipita na forma de óxidos ou hidróxidos férricos e torna-se indisponível para as plantas (Ruiz *et al.*, 1984; Loeppert, 1986). Para que este tratamento tenha algum efeito no controlo da clorose férrica deve ser efectuado em aplicações localizadas conjuntamente com produtos acidificantes (Horesh *et al.*, 1986; 1991) ou com matéria orgânica humificada que complexam o Fe e evitam a sua precipitação (Tagliavini *et al.*, 2000). Do mesmo modo, estes autores propõem conjuntamente com a adição de sulfato de Fe(II) ao solo, a implantação de uma consociação entre as fruteiras e algumas gramíneas que em situação de deficiência de Fe libertam fitosideróferos que complexam o Fe.

A quantidade de ácido necessária para baixar o pH de 8 para menos de 7 depende da percentagem de CaCO₃ existente no solo (Wallace, 1991; Tagliavini *et al.*, 2000). O controlo da clorose férrica através da **diminuição do pH** na rizosfera torna-se assim difícil devido ao efeito tampão do ião bicarbonato nos solos calcários pelo que seriam necessárias elevadas quantidades de ácido tornando esta prática economicamente inviável (Wallace, 1991). No entanto, após a adição localizada de ácido sulfúrico num cubo de turfa colocado junto ao colo de plantas de citrinos cloróticas e estabelecidas em vaso (Horesh *et al.*, 1986; 1991) ou nos dois lados de árvores de marmeleiro estabelecidas num solo calcário foi possível corrigir, momentaneamente, a clorose férrica (Wallace, 1991). Graziano (1995) verificou que a adição localizada de enxofre elementar

(S) foi temporariamente eficiente no controlo da clorose férrica em árvores de pessegueiro uma vez que, no solo, o S é microbiologicamente oxidado a ião sulfato (SO_4^{2-}), permitindo a acidificação pontual do meio. Em termos práticos, a distribuição de ácidos fortes no solo tem vários riscos, nomeadamente de fitotoxicidade e de aumento da salinidade do terreno (Khorsandi, 1994). Tagliavini *et al.* (1995a) constataram que a neutralização completa dos solos calcários pela aplicação de adubos azotados na forma amoniacal fornecia quantidades de N excessivas, sendo necessário complementar o tratamento com inibidores da nitrificação.

Para a correcção da clorose férrica induzida em solos calcários, as pulverizações foliares podem ser potencialmente mais eficientes do que as aplicações ao solo, uma vez que deste modo os efeitos do ião bicarbonato na imobilização do Fe no solo e na absorção e transporte do Fe para a parte aérea poderão ser evitados (Mengel, 1995). Os produtos aplicados foliarmente para o tratamento da clorose férrica podem actuar directamente, através do fornecimento de Fe e/ou indirectamente ao nível do pH apoplástico e da membrana plasmática; no entanto, a eficácia destes tratamentos está limitada às situações de clorose férrica ligeira e pela curta duração dos efeitos obtidos na recuperação dos sintomas (Rombolà *et al.*, 1999). Por sua vez, a eficácia das pulverizações foliares com compostos químicos que forneçam Fe está dependente da capacidade que têm em atravessar a cutícula e deslocarem-se através do apoplasto em direcção à membrana plasmática, local onde ocorre a redução do Fe, necessária à entrada deste elemento no mesófilo das células foliares (Rombolà *et al.*, 2000).

Vários autores constataram que a aplicação foliar de **sulfato de Fe(II)** conduziu ao reverdecimento das folhas cloróticas de várias culturas destacando-se o pimenteiro (Varenes *et al.*, 1997), o kiwi (Rombolà *et al.*, 1999) e os citrinos (Horesh e Levy, 1981; Hamzé *et al.*, 1985; Miller *et al.*, 1994). Todavia, os efeitos deste tratamento na clorofila total podem, por vezes, não ser suficientes para melhorarem a produção devido à pouca mobilidade do Fe na planta.

A aplicação de sulfato de Fe directamente nos vasos lenhosos de árvores de pessegueiro é uma técnica que têm vindo a ser utilizada em Espanha e nos EUA apesar de onerosa e de apresentar riscos de infecção parasitária (Ruiz *et al.*, 1984; Wallace, 1991; Toselli *et al.*, 1995). Apesar de salientar que a utilização deste método de correcção deve restringir-se a situações de emergência, Wallace (1991) referiu que a aplicação de 10 cm^3 de uma solução de citrato férrico (8% de Fe) com ião amónio conduziu ao aumento da concentração foliar de Fe e ao reverdecimento de árvores cloróticas no espaço de uma semana. Mas segundo Toselli *et al.* (1995) as soluções utilizadas devem apresentar concentrações de Fe baixas (0,5-1%) e em cada aplicação

devem ser injectados pequenos volumes de solução (250-500 cm³) de forma a evitar fitotoxicidade.

Com o objectivo de corrigir a clorose férrica, diversos autores testaram a aplicação de **quelatos férricos** por pulverização foliar em várias culturas, tais como, morangueiro (Hernando e Casado, 1972), ervilheira (Sahu *et al.*, 1987), laranjeira (El-Kassa *et al.*, 1984; Legaz *et al.*, 1992), videira (Cuesta *et al.*, 1993), amendoim (Potdar e Anders, 1995) e kiwi (Rombolà *et al.*, 1999; Tagliavini *et al.*, 2000). Este método têm sido menos eficaz que a sua adição ao solo, possivelmente devido ao baixo nível de translocação do Fe aplicado para as folhas novas (Legaz *et al.*, 1992).

A aplicação foliar de diversos produtos que promovem a actividade da QF-R existente nas células do mesófilo foi testada por vários investigadores. De entre esses produtos salientam-se soluções diluídas de ácidos minerais ou orgânicos, de hormonas, de álcoois e de ureia. O reverdecimento, mesmo que parcial, resultante da aplicação destes produtos permitiu evidenciar a imobilização foliar do Fe em folhas cloróticas (Kosegarten e Englisch, 1994; Mengel *et al.*, 1994; Tagliavini *et al.*, 1995c; 1996).

A utilização do **ácido sulfúrico** foi testada em plantas cloróticas de ervilha (Sahu *et al.*, 1987), pimenteiro (Varennes *et al.*, 1997), girassol (Mengel, 1995) e em diversas fruteiras nomeadamente em kiwi (Tagliavini *et al.*, 1995c) e pereira (Garcia *et al.*, 1998) tendo resultado no reverdecimento parcial das folhas cloróticas. Do mesmo modo, as aplicações foliares de ácidos orgânicos, como o **ácido cítrico** e o **ácido ascórbico**, com um forte efeito anti-oxidante, permitiram apenas a recuperação parcial da clorose em árvores de kiwi (Tagliavini *et al.*, 1995c; Rombolà *et al.*, 1998b) e de pereira (Garcia *et al.*, 1998) instaladas em solos calcários. Resultados idênticos foram obtidos por Rombolà *et al.* (1999) com a aplicação de malato e citrato de Fe(III). A recuperação incompleta da clorose férrica esteve, provavelmente, associada à simultânea absorção radicular deficiente em Fe (Sahu *et al.*, 1987; Tagliavini *et al.*, 1995c). A eficácia destes produtos quando aplicados conjuntamente com sulfato de Fe foi testada por diversos autores (Varennes *et al.*, 1997; Rombolà *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 1998) e podem vir a constituir um método alternativo à aplicação de quelatos ao solo, uma vez que podem aumentar a concentração de Fe na folhas não só pela adição do Fe como também pela mobilização do Fe já existente nas folhas.

De entre as aplicações foliares com **hormonas** testadas destacam-se, o ácido giberélico (**GA₃**) e ácido naftalo-acético (**NAA**) aplicados por Sahu *et al.* (1987) em plantas de ervilha. Segundo Mengel (1995) as auxinas, como o ácido indolacético (**IAA**), ao estimularem a actividade

da bomba protónica do plasmalema permitem uma maior entrada de Fe nas células. Mengel e Geurtzen (1986) verificaram que folhas de milho cloróticas reverdeciam após pulverização com IAA comprovado por Tagliavini *et al.* (2000) em árvores de kiwi. No entanto, as pulverizações com IAA não conduziram a aumentos do teor de clorofila total em plantas de pimenteiro cloróticas (Varenes *et al.*, 1997).

Sahu *et al.* (1987) constataram a recuperação parcial da clorose férrica através da aplicação de álcoois como o Mixtafol (mistura de **álcoois** alifáticos de cadeia longa) em plantas cloróticas de soja. Varenes *et al.* (1997) obteve resultados idênticos pela aplicação de metanol em plantas de pimenteiro com clorose férrica. A aplicação de uma solução com diversos nutrientes dissolvidos em metanol, nas folhas e nos ramos de plantas de citrinos deficientes em Fe, teve alguns efeitos positivos no crescimento e na maturação dos frutos (Nonomura *et al.*, 1995).

Mengel e Geurtzen (1986) observaram o reverdecimento das folhas de milho após pulverização com **fusicocina**, composto que ao estimular a actividade da bomba protónica conduz a uma diminuição do pH apoplástico (Hoffmann *et al.*, 1992). Os resultados obtidos pela aplicação de Fe complexado por **poliflavonóides** variaram com as espécies estudadas, tendo sido promissores quando aplicados em árvores cloróticas de limoeiro, macieira e ameixeira (Hellín *et al.*, 1983; 1984; Fernandez-Lopez, 1993). As diferenças obtidas pela aplicação foliar do mesmo produto em diferentes espécies vegetais devem-se à variabilidade genotípica e fenotípica de cada uma das espécies como sejam, os mecanismos de resposta e de adaptação à clorose férrica e a permeabilidade das folhas, característica dependente da composição e espessura da cutícula (Rombolà *et al.*, 1999).

A necessidade de utilizar um **sistema integrado de produção** acentua-se nos solos calcários com baixo teor em calcário activo onde o uso de práticas culturais adequadas, incluindo as mobilizações do solo, o sistema de rega e o planeamento da fertilização, pode prevenir e por vezes atenuar os efeitos da clorose férrica.

Uma menor **mobilização** ou não mobilização do solo, especialmente nos meses mais chuvosos, poderá ter um efeito benéfico no controlo da clorose férrica porque a presença de infestantes, na sua maioria gramíneas, para além de melhorar o sistema de percolação do solo, aumenta a biodisponibilidade de Fe no solo devido aos fitosideróferos libertados (Toselli *et al.*, 1995). As mobilizações só devem ser efectuadas quando as infestantes competem, nutritiva e hidricamente, com as árvores constituintes do pomar. Toselli *et al.* (1995) sugerem ainda a utilização de um prado misto composto por espécies como, o *Lolium perenne* L., *Poa pratensis* L.,

Festuca rubra L. e *Festuca ovina* L. estabelecido em consociação com pomares de árvores de fruto.

O planeamento da **fertilização** em solos calcários deve passar em primeiro lugar pela selecção de adubos que apresentem uma reacção fisiológica acidificante de forma a diminuir o efeito do ião bicarbonato (Wallace, 1991; Mengel, 1995). A aplicação do sulfato de potássio (K_2SO_4) em solos calcários é caracterizada por uma reacção fisiológica acidificante, pois a absorção do ião K^+ é acompanhada pela libertação de hidrogeniões para a rizosfera que conduz ao aumento da actividade do Fe na solução do solo (Chen e Barak, 1982). A aplicação de sulfato de amónio ($(NH_4)_2SO_4$), apesar de ser um adubo fisiologicamente mais acidificante do que o sulfato de potássio, pode ser menos eficiente na prevenção da clorose férrica uma vez que o ião amónio (NH_4^+) pode ser oxidado a ião nitrato (NO_3^-) pela actividade microbiana (Toselli *et al.*, 1995). De forma a evitar o agravamento da clorose férrica induzida nos solos calcários, Wallace (1991) propõe a utilização de adubos na forma amoniacal (ou ureia) conjuntamente com inibidores da nitrificação e Toselli *et al.* (1995) sugerem o fraccionamento da adubação azotada em várias aplicações.

Quanto aos correctivos orgânicos, a **matéria orgânica** pode prevenir ou corrigir a clorose férrica devido ao seu papel na complexação e solubilização do Fe (Hoesch *et al.*, 1986; Wallace, 1991). A diferente capacidade de correcção da clorose férrica obtida pela aplicação de resíduos orgânicos de diferentes espécies vegetais ao solo está relacionada com a sua composição, a sua capacidade de complexar o Fe e a estabilidade dos complexos formados (Hagstrom, 1984). Segundo Alva (1992) estes compostos orgânicos podem permitir que a solubilização do Fe ocorra lentamente para diversos valores de pH da rizosfera. A adição de elevados níveis de resíduos sólidos urbanos pode corrigir a clorose férrica da cultura do sorgo (Wallace, 1991) e do trigo (Awad *et al.*, 1995a). Por sua vez, a aplicação de complexos húmicos com Fe(II) permitiu aumentar a disponibilidade e a absorção do Fe em solos calcários (Garcia-Mina *et al.*, 1995).

A eficácia da aplicação do Fe por **fertirrega** depende dos níveis de bicarbonato na água de rega e da forma em que o Fe é aplicado. Lucena *et al.* (1991) referem que a aplicação conjunta dos dois quelatos (Fe-EDTA e Fe-EDDHA), num sistema de rega de gota a gota, permite manter maior quantidade de Fe em solução. Zekri e Koo (1992) verificaram que o fornecimento de Fe por fertirrega apenas resultou em maiores concentrações de Fe nas folhas de citrinos quando adicionado na forma de quelato tal como posteriormente comprovado por outros autores (Rombolà *et al.*, 1999). Tagliavini *et al.* (2000) sugerem que a acidificação da água de rega, que tenha níveis elevados de bicarbonato, pode evitar a adição do Fe na forma de quelato.

A utilização de métodos biológicos com o objectivo de corrigir a clorose através do aumento da eficiência de utilização do Fe tem sido testada em diversas espécies vegetais. Bavaresco *et al.* (1995a) através da **inoculação** radicular, com uma suspensão celular de *Pseudomonas fluorescens* e com um inoculo de *Glomus mosseae* (Nicol. e Gerd.), conseguiram controlar o aparecimento da clorose férrica em plantas de videira (*Vitis vinifera* L. cv. ‘Chardonnay’) enxertadas num porta-enxerto susceptível. No final do ensaio, a clorofila total foi proporcional à percentagem de colonização conseguida. Jurkevitch *et al.* (1986; 1992) obtiveram resultados idênticos na recuperação dos sintomas de plantas de amendoim e de algodão artificialmente inoculadas. Apesar de ser necessário efectuar ensaios mais pormenorizados sobre este tipo de tratamento da clorose, os resultados preliminares são prometedores e devem-se à acumulação de sideróferos na rizosfera e conseqüentemente ao aumento da disponibilidade e absorção do Fe (Powel *et al.*, 1982; Walter *et al.*, 1994).

1.4. OS CITRINOS

1.4.1. A citricultura no Algarve

O Algarve é a principal região produtora de citrinos em Portugal apresentando em 1997 uma superfície instalada de 17000 ha, correspondente a 70% da área total nacional de citrinos. Esta tendência mantém-se para todas as espécies cítricas uma vez que nesta região está representada cerca de 60% da área nacional de pomares de laranjeiras, 85% de tangerineiras e 40% de limoeiros (Freitas *et al.*, 1998). Por sua vez, as cultivares de laranjeira com maior expressão cultural nesta região são no grupo das baías, ‘Newhall’, ‘Navelina’ e ‘Lanelate’ e no grupo das comuns, o clone Frost da ‘Valencia Late’ (Calabrese, 1994; Duarte *et al.*, 1999). Relativamente ao grupo das clementinas, as cultivares mais representativas são a ‘Fina’ e a ‘Nules’ e nos híbridos de tangerineira, a ‘Encore’ e a ‘Ortanique’ (Duarte *et al.*, 1999).

Apesar do Algarve apresentar condições climáticas favoráveis à produção de citrinos com uma qualidade diferenciada (Calabrese, 1994; Freitas *et al.*, 1998) a maioria dos pomares encontra-se instalada em solos de origem calcária e apresentam, frequentemente, clorose férrica. Actualmente, os porta-enxertos, citranjeira ‘Troyer’ e citranjeira ‘Carrizo’, apesar de serem susceptíveis à clorose férrica, ocupam cerca de 50 a 60% da superfície de citrinos instalada no

Algarve (Freitas *et al.*, 1998; Duarte *et al.*, 1999) por serem tolerantes ao vírus da tristeza (Byrne *et al.*, 1995).

1.4.2. Ciclo produtivo

A classificação taxonómica dos citrinos é complicada devido à existência de numerosas espécies, pela facilidade de hibridações e pela ocorrência frequente de mutações de gomo. Os três géneros de citrinos verdadeiros, *Fortunella*, *Poncirus* e *Citrus* tal como os seus híbridos estão incluídos na subfamília das Aurancióideas, família da Rutaceas (Ortiz, 1985).

De um modo geral, o habitat dos citrinos é determinado pelos climas com temperaturas médias que oscilam entre os 10 e os 35°C, onde se inclui a região do Algarve. Ao longo do ciclo vegetativo das laranjeiras verificam-se três épocas de rebentação (Bain, 1958): a primeira e a mais intensa ocorre na Primavera (Fevereiro - Março), a segunda ao início do Verão (Junho - Julho) e a última ao princípio do Outono (Setembro - Outubro). O ciclo produtivo das árvores de laranjeira da cultivar 'Valencia late' inicia-se no mês de Dezembro com a indução e diferenciação floral (Guardiola, 1981). De Fevereiro a Março verifica-se o desenvolvimento floral e dos rebentos vegetativos. Em Abril ocorre a plena floração e no início de Maio o vingamento e crescimento dos frutos, o qual se processa em três fases (Bain, 1958): uma primeira fase que decorre até Junho, caracterizada por um crescimento lento dos frutos tanto em peso fresco como em diâmetro; uma segunda fase desde meados de Junho até Janeiro, definida pelo rápido desenvolvimento do fruto e uma terceira fase que ocorre desde meados de Janeiro até à maturação do fruto e em que o ritmo de crescimento dos frutos volta a decair. A colheita decorre de Março a Julho (Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996).

A diferenciação de gomos florais nos citrinos está associada com a formação de três tipos de ramos, com comprimentos sucessivamente menores: i) ramos vegetativos; ii) ramos florais com folhas e ii) ramos florais sem folhas. A abertura das flores, agrupadas em inflorescências, coincide com os valores mínimos de N, P e K nas folhas velhas (Guardiola e Lazaro, 1987). Desde a emergência dos botões até à floração, a fotossíntese é superior ao consumo de hidratos de carbono, o que resulta na acumulação de hidratos de carbono não estruturais nas folhas, não sendo um factor limitante à floração. No entanto, durante este período, a absorção de nutrientes pelas raízes é muito baixa e o crescimento dos órgãos reprodutivos está dependente da retranslocação dos nutrientes acumulados nas folhas velhas. Cerca de 70 % de P e K e 40% de N da quantidade total usada na formação das flores é proveniente das folhas velhas (Guardiola e Lazaro, 1987). Para uma mesma

cultivar, as datas e a duração da plena floração dependem muito das condições climáticas, podendo haver diferenças entre ramos com diferente exposição (Spiegel-Roy e Goldshmidt, 1996).

Os frutos cítricos são hesperídeos constituídos por duas regiões morfológicamente distintas: o pericarpo ou casca e o endocarpo ou parte comestível. O pericarpo por sua vez divide-se em epicarpo ou flavedo, porção da casca colorida e em mesocarpo ou albedo, camada branca da casca. A polpa está dividida em segmentos, lóculos ovarianos, fechados em membranas locais e cheios com os sacos de sumo, muitas vezes designados por vesículas de sumo.

O desenvolvimento dos frutos de ‘Valencia late’ pode ser dividido em três estádios (Bain, 1958): i) divisão celular, ii) alargamento celular e iii) maturação do fruto. Nos primeiros estádios de desenvolvimento dos frutos, o albedo pode ocupar entre 60 a 90% do volume do fruto e o flavedo é verde escuro, fotossinteticamente activo. Próximo da maturação dos frutos, ocorre a transformação dos cloroplastos, existentes no flavedo, em cromoplastos pois aumenta a concentração em carotenóides e xantofilas específicas e a clorofila degrada-se, processo regulado pelo etileno (Purvis e Barmore, 1981). Por sua vez, a polpa do fruto aumenta e o albedo torna-se numa camada muito estreita.

A maturação da laranja caracteriza-se, sobretudo, por uma variação na constituição e na concentração de alguns componentes do seu sumo. Existem dois parâmetros frequentemente utilizados para avaliar o grau de maturação da laranja: a acidez, expressa em percentagem de ácido cítrico anidro, principal ácido orgânico constituinte do sumo de laranja (Widodo *et al.*, 1995) e o teor em açúcares, geralmente expresso como o total de sólidos solúveis ou graus (°) Brix. Durante o período de maturação do fruto a percentagem de ácido cítrico decresce de 2,2% para 0,5% (v/v de sumo) e aumenta o total de sólidos solúveis de 9 para 12° Brix (Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996). A data de colheita dos citrinos é determinada pelo índice de maturação definido pela razão entre os ° Brix e a acidez, sendo recomendado valores entre 10 e 16, admitindo-se no entanto um mínimo de 8 para consumo em fresco e de 10 para a indústria (Ledo *et al.*, 1999).

A acidez dos frutos varia entre espécies cítricas e entre cultivares, e para um mesmo genótipo está principalmente dependente da nutrição mineral e do clima (El-Kassa, 1984; Spiegel-Roy and Goldschmidt, 1996). O ácido cítrico existente nos frutos cítricos não é translocado das folhas para os frutos uma vez que a sua síntese ocorre nas mitocôndrias das células dos sacos de sumo (**Figura 1.2.**), via ciclo dos ácidos tricarbóxicos. Este processo, descrito por Sadka *et al.* (2000), consiste na condensação da acetil-CoA com o ácido oxaloacético na presença da citrato sintetase e com a formação de ácido cítrico que, por acção da enzima aconitase, é reversivelmente isomerado a ácido isocítrico. Posteriormente, o ácido isocítrico atravessa a membrana do

tonoplasto, por um sistema de co-transporte dependente de ATP e acumula-se nos vacúolos destas células em concentrações elevadas onde reage com os hidrogeniões libertados pela ATPase, actuando como um tampão às variações de pH. O Fe tem um papel crucial na acumulação do ácido cítrico, uma vez que a aconitase é uma sulfoproteína que contém um grupo Fe-S, onde o Fe actua na orientação do substracto (Imsande, 1998). A expressão desta enzima foi detectada durante todo o processo de desenvolvimento do fruto e, em menor extensão, nos botões florais e nas flores abertas (Sadka *et al.*, 2000). Estes autores detectaram ainda uma actividade mínima desta enzima no flavedo e albedo dos frutos. O decréscimo na concentração de ácido cítrico, que ocorre durante a maturação dos frutos, está associado à sua saída para o citosol onde é convertido em ácido α -cetoglutárico, processo regulado por uma aconitase citosólica e portanto dependente de Fe (Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996).

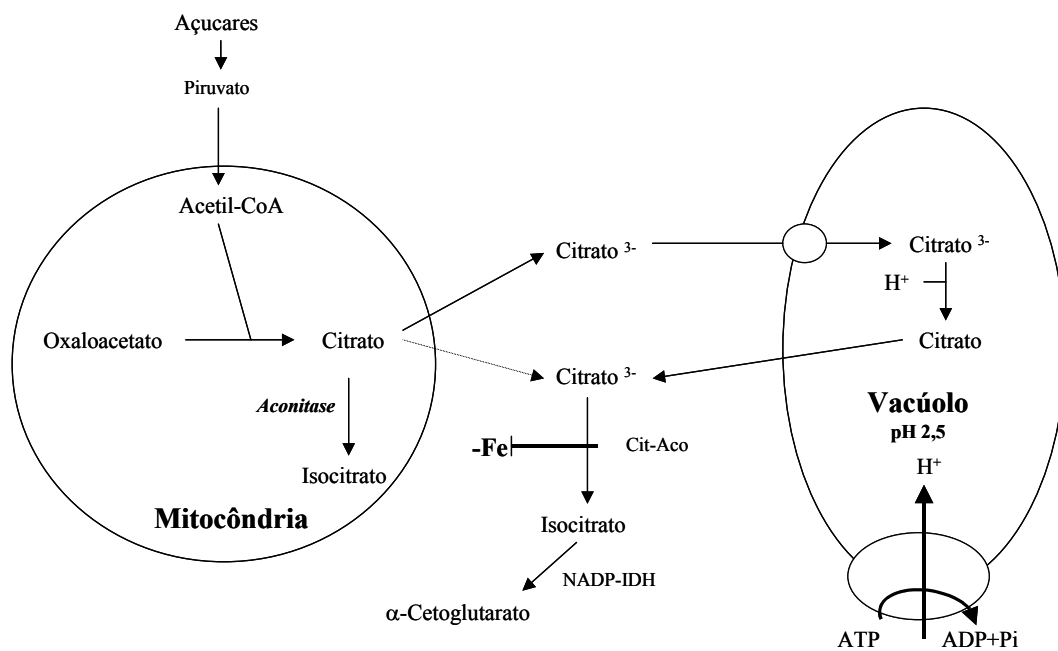


Figura 1.2 – Modelo que mostra as reacções envolvidas na acumulação e no decréscimo do ácido cítrico durante o processo de desenvolvimento e de maturação dos frutos cítricos. Cit-Aco – aconitase citosólica; IDH – isocitrato desidrogenase; PEPC – fosfoenolpiruvato carboxilase; Pi – fósforo inorgânico. Adaptado de Sadka *et al.* (2000).

O valor nutritivo dos citrinos deve-se ao elevado teor de ácido ascórbico (Vitamina C), habitualmente presente no sumo destes frutos que, apesar de variar ao longo da maturação do fruto e entre cultivares, permanece pouco alterado mesmo depois da colheita já que estes frutos são climatéricos (Spiegel-Roy e Goldshmidt, 1996). Miguel *et al.* (1999) registaram os teores de ácido ascórbico no sumo dos frutos de duas cultivares de laranja ('Newhall' e 'Valencia late')

colhidos durante a fase de maturação dos frutos em dois pomares da região do Algarve. Os valores obtidos variaram entre um mínimo de 45 e um máximo de 75 mg por 100 g de sumo para as duas cultivares.

Dentro dos limites impostos pelas características genéticas da variedade, o tamanho do fruto é determinado pela força de demanda do fruto (“sink”) e pela disponibilidade de metabolitos na árvore, que por sua vez depende da competição entre os órgãos em desenvolvimento (Guardiola, 1992). Recentemente, Ledo *et al.* (1999) referem o papel de diferentes porta-enxertos de citrinos no calibre e em diversos parâmetros de qualidade do fruto de cultivares de laranjeira. Constataram que os porta-enxertos como a citranjeira ‘Carrizo’ e as tangerineiras ‘Sunki’ e ‘Cleópatra’ promoveram a produção de frutos com maior teor de sólidos solúveis e maior acidez total comparativamente aos valores obtidos nos frutos das árvores enxertadas em limoeiro ‘Cravo’.

O calibre do fruto é dos parâmetros mais determinantes na comercialização dos citrinos e é afectado, entre outros factores, pela clorose férrica. El-Kassa (1984) verificou que os frutos provenientes de árvores com clorose férrica eram menores e apresentavam uma coloração menos intensa. Por sua vez, o sumo destes frutos apresentou um grau Brix inferior e uma maior acidez titulável.

1.4.3. Composição mineral dos citrinos

Na **Tabela 1.2.** está apresentada a composição mineral “standard” de folhas de citrinos com 4-6 meses de idade, colhidas em ramos não frutíferos (Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996).

Tabela 1.2 – Composição mineral “standard” de folhas de citrinos, com 4-6 meses de idade, colhidas em ramos não frutíferos – Florida (Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996).

Elemento	Deficiente	Baixo	Ótimo	Alto	Excesso
N (%)	< 2,2	2,2-2,4	2,5-2,7	2,8-3,0	>3,0
P (%)	<0,09	0,09-0,11	0,12-0,16	0,17-0,29	>0,3
K (%)	<0,7	0,7-1,1	1,2-1,7	1,8-2,3	>2,4
Ca (%)	<1,5	1,5-2,9	3,0-4,9	5,0-6,9	>5,0
Mg (%)	<0,20	0,20-0,29	0,30-0,49	0,5-0,70	>0,80
Mn (mg kg ⁻¹)	<17	18-24	25-100	101-300	>500
Zn (mg kg ⁻¹)	<17	18-24	25-100	101-300	>300
Cu (mg kg ⁻¹)	<3	3-4	5-16	17-20	>20
Fe (mg kg ⁻¹)	<35	36-59	60-120	121-200	>200
B (mg kg ⁻¹)	<20	21-35	36-100	100-200	>250
Mo (mg kg ⁻¹)	<0,05	0,06-0,09	0,1-1,0	2,0-5,0	>5,0

Existem diversos trabalhos que referem o efeito da clorose férrica na composição mineral das folhas de cultivares (El-Kassa, 1984; Alva, 1992; Fernandez-Lopez *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 1996) e de porta-enxertos de citrinos (Hamzé e Nimah, 1982; Obreza *et al.*, 1993; Treeby e Uren, 1993; Byrne *et al.*, 1995; Maksoud e Khalil, 1995).

Segundo Taylor e Dimsey (1993) a composição mineral dos citrinos varia consoante o porta-enxerto e o garfo utilizado. Para as mesmas condições, estes investigadores constataram que a utilização de porta-enxertos trifoliados (*Poncirus trifoliata* e as citranjeiras) conduziram a concentrações foliares de N, P e K elevadas, ao contrário dos valores obtidos nas árvores enxertadas em laranjeira azeda, que foram mais baixos. Em relação ao Fe, não verificaram alterações motivadas pelos porta-enxertos, provavelmente porque em todos os ensaios realizados os níveis deste elemento eram suficientes.

1.4.4. Tolerância dos porta-enxertos de citrinos

De um modo geral, a selecção e utilização de porta-enxertos tolerantes pode evitar o aparecimento dos sintomas porque a intensidade da clorose férrica observada nos citrinos relaciona-se com o binário porta-enxerto/garfo (Taylor e Dimsey, 1993). Actualmente, os porta-enxertos de citrinos que são tolerantes à clorose férrica induzida em solos calcários têm outras características que não são favoráveis do ponto de vista agronómico como a baixa qualidade dos frutos e a pouca resistência a doenças, nomeadamente ao vírus da tristeza (Byrne *et al.*, 1995).

Os porta-enxertos não-trifoliados, como sejam, o limoeiro rugoso, a laranjeira doce e tangerineira são geralmente classificados entre medianamente tolerantes a tolerantes à clorose férrica (Hamzé e Nimah, 1982; Hamzé *et al.*, 1986; Sagee *et al.*, 1992; Sudahomo *et al.*, 1994; Byrne *et al.*, 1995). De qualquer modo, há algumas tangerineiras ('Parson's Special' e 'Sanguine') e alguns híbridos de tangerineira (tangerineira 'Sunki' x trifoliata 'Benecke, tangerineira 'Cleopatra' x híbridos trifoliata) que são susceptíveis à clorose férrica (Byrne *et al.*, 1995). Os três híbridos puros de trifoliata são muito susceptíveis aos solos calcários (Hamzé e Nimah, 1982; Hamzé *et al.*, 1986; Sudahomo *et al.*, 1994).

Baseados nos resultados obtidos, Hamzé *et al.* (1986) classificaram o limoeiro rugoso (*Citrus jambhiri* Lush.) como o porta-enxerto mais tolerante à clorose férrica em solos calcários e a laranjeira trifoliata (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) como o mais susceptível. Entre estes dois extremos de tolerância situaram-se os seguintes porta-enxertos, por ordem decrescente de

tolerância: tangerineira Cleoptara (*Citrus reticulata* Blanco), limeira Rangpur (*Citrus reticulata* Auster), laranja azeda (*Citrus aurantium* L.), laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e as citranjeiras (híbridos de *Poncirus trifoliata* L.).

Na sequência de ensaios conduzidos em solos calcários, Byrne *et al.* (1995) indicam os seguintes porta-enxertos como os mais tolerantes à clorose férrica: *Citrus obovoidea*, *C. canaliculata*, laranja doce cv. ‘Texas’ e ‘Tosu’, tangerineira ‘Cleopatara’, limoeiro rugoso, limoeiro ‘Vangasy e os híbridos, tangerineira ‘Sunki’ x trifoliata ‘Swingle’ e Shaddock x trifoliata ‘Rubidoux’. Contudo, a classificação da tolerância à clorose férrica não elimina a necessidade de testar a resistência ao vírus da tristeza e de alargar os ensaios a outras classes de solos de forma a avaliar a adaptabilidade e produtividade destes porta-enxertos.

Actualmente, a base fisiológica que permite justificar os diferentes graus de tolerância aos solos calcários, observados nos vários porta-enxertos de citrinos, ainda não é totalmente conhecida (Treeby e Uren, 1993). No entanto, já em 1968, Wallihan e Garber tinham proposto que a distribuição dos fotossintetizados, expressos em peso seco, entre a raiz e a parte aérea era o parâmetro fisiológico mais indicado para distinguir o grau de tolerância obtido entre dois porta-enxertos de citrinos.

Hamzé *et al.* (1986) estabeleceram que valores da razão K/Ca diferentes de 1:2 na parte aérea e de 1:1 na seiva xilémica estão associados a porta-enxertos de citrinos susceptíveis à clorose férrica. Shijinag *et al.* (1995) verificaram que o grau de tolerância dos porta-enxertos de citrinos à clorose férrica se correlacionou com a diminuição da actividade das enzimas, catalase e peroxidase. Por outro lado, Manthey *et al.* (1994) referem que a tolerância é determinada pelo nível de estímulo radicular conseguido, abarcando o processo de redução e de absorção do Fe. Verificaram ainda que a taxa de redução do Fe(III) pelas raízes do porta-enxerto *C. macrophylla* e citranjeira ‘Troyer’ foi cerca de 4 a 6 vezes superior nas plantas deficientes enquanto que no citrumeleiro ‘Swingle’ apenas observaram acréscimos de 1,9 vezes e no *P. trifoliata* não registaram alterações. Por outro lado, a taxa de absorção do Fe verificada no porta-enxerto *C. macrophylla* foi muito superior nas plantas cloróticas, contrariamente ao observado na citranjeira ‘Troyer’. A avaliação simultânea das taxas de redução e de absorção ou translocação do Fe para a parte aérea permitiu diferenciar com mais pormenor o grau de tolerância anteriormente proposto por Hamzé *et al.* (1986) para estes porta-enxertos.

1.5. PROGRAMAS DE MELHORAMENTO

A clorose férrica afecta numerosas culturas estabelecidas em solos calcários (Chen e Barak, 1982). Nas árvores de fruto a clorose férrica induz a decréscimos na produção, quantitativa e qualitativamente e aumenta o custo das práticas culturais necessárias à manutenção destes pomares (Sanz *et al.*, 1997b). De entre as espécies frutícolas mais afectadas pela clorose férrica destacam-se, o pessegueiro, a pereira, o marmeleiro, o kiwi e os citrinos (Sanz *et al.*, 1992; Cinelli *et al.*, 1995; Bassi *et al.*, 1998; Tagliavini *et al.*, 2000).

As árvores de fruto são, geralmente, um sistema genético composto por porta-enxerto e garfo em que cada uma das partes tem uma contribuição específica na produção obtida (Ruiz *et al.*, 1997). A incidência da clorose férrica nas fruteiras mais susceptíveis está associada ao porta-enxerto mais comercializado e portanto mais utilizado. Por exemplo, na videira, a clorose férrica foi pela primeira vez detectada quando se substituiu os porta-enxertos tradicionais por outros resistentes à ‘*Phylloxera*’ (Socias i Company *et al.*, 1995)

Têm sido desenvolvidos diversos programas de melhoramento com o objectivo de obter material vegetal mais tolerante à clorose férrica (Chaney *et al.*, 1989; Cianzio, 1991; Cianzio e Voss, 1994; Socias i Company *et al.*, 1995) que quando aplicados a árvores de fruto, como se baseiam na avaliação de campo, são geralmente muito onerosos e morosos devido a uma longa fase juvenil das árvores.

De forma a encurtar a duração dos programas de melhoramento tradicionais, Jolley *et al.* (1995) propõem métodos alternativos de selecção de génotipos tolerantes, baseados em algumas respostas fisiológicas das plantas à clorose férrica e podendo ser realizados numa fase precoce do ciclo de vida da planta. O delineamento deste tipo de programa pressupõe no entanto, o prévio conhecimento das alterações morfológicas e fisiológicas, assim como dos mecanismos moleculares envolvidos nas diferentes respostas obtidas à clorose férrica.

Para além dos métodos convencionais, incluindo cruzamento ou enxertia, Mori (1999) propõe a produção de plantas transgénicas tolerantes à clorose férrica. Por fim, os programas de melhoramento estabelecidos com o objectivo de melhorar os mecanismos de tolerância à clorose férrica devem contemplar, simultaneamente, a selecção de génotipos tolerantes com produções adequadas de forma a possibilitar a sua utilização pelos agricultores (Cianzio, 1995).

1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadía, J.**; Nishio, J.N.; Monge, E.; Montañés, L.; Heras, L. 1985. Mineral composition of peach leaves affected by iron chlorosis. *Journal of Plant Nutrition*, 8(8): 697-707.
- Abadía, A.**; Lemoine, Y.; Trémolières, A.; Ambard-Bretteville, F.; Rémy, R. 1989. Iron deficiency in pea: effects on pigment, lipid and pigment-protein complex composition of thylacoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 27:679-687.
- Abadía, J.** 1992. Leaf responses to iron deficiency: A review. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1699-1713.
- Abadía, J.** e **Abadía, A.** 1993. Iron and plant pigments, pp. 327-344, In: L.L. Barton e B. Hemming (eds.), *Iron chelation in plants and soil microorganisms*. Academic Press, San Diego, EUA.
- Abadía, J.** 1998. Absorción y transporte de hierro en plantas. *Actas do VII Simposio Nacional-III Iberico sobre Nutrición Mineral de las Plantas*, pp. 13-23.
- Abadía, J.**; Morales, F.; Abadía, A. 1999. Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-deficient leaves. *Plant and Soil*, 215:183-192.
- Aktas, M.** e van Egmond, F. 1979. Effect of nitrate nutrition on iron utilization by on Fe-efficient and a Fe-inefficient soybean cultivar. *Plant and Soil*, 51:257-274.
- Alcántara, E.**; Romera, F.J.; de la Guardia, M.D. 1988. Genotypic differences in bicarbonate-induced iron chlorosis in sunflower. *Journal of Plant Nutrition*, 11(1):65-75.
- Alcántara, E.** e **Romera, J.R.** 1990. Caracterización de patrones de melocotonero por su tolerancia a clorosis ferrica mediante cultivo en solución nutritiva con bicarbonato. *Fruticultura Profesional*, 28:2-6.
- Alcántara, E.**; Romera, F.J.; Canete, M.; de la Guardia, M. 1994. Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe(III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *Journal of Experimental Botany*, 45(281):1893-1898.
- Alcaraz, C.F.**; Hellín, F.; Martínez-Sánchez, F. 1985. Influence of the leaf iron contents of the ferredoxin levels in citrus plants. *Journal of Plant Nutrition*, 8:603-611.
- Alhendawi, R.A.**; Römheld, V.; Kirkby, E.A.; Marschner, H. 1997. Influence of increasing bicarbonate concentrations on plant growth, organic acid accumulation in roots and iron uptake by barley, sorghum, and maize. *Journal of Plant Nutrition*, 20:1731-1753.
- Almansa, M.S.**; del Rio, L.A.; Sevilla, F. 1994. Characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a higher plant, *Citrus limonum*. *Physiologia Plantarum*, 90:339-347.
- Alva, A.K.** 1992. Solubility and iron release characteristics of iron chelates and sludge products. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1939-1954.
- Alva, A.K.** e **Chen, E.Q.** 1995. Effects of external copper concentrations on uptake of trace elements by citrus seedlings. *Soil Science*, 159(1):59-64.
- Alvarado, J.J.**; Valenzuela, J.L.; Sánchez, A.; Romero, L. 1995. Iron nutrition in wild plants growing in two different soils, pp. 141-145, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Andaluz, S.**; López-Millán, A. F.; Peleato, M. L.; Abadía, J.; Abadía, A. (2000) Phosphoenol pyruvate carboxylase: A key enzyme in iron-deficient sugar beet roots. *Livro de Resumos do 10th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants*. Houston, EUA, p. 90.
- Andréu, J.S.**; Jordé, J.; Juárez, M. 1991. Reactions of Fe-EDTA and Fe-EDDHA applied to calcareous soils, pp. 57-62, In: Y. Chen e Y. Hadar (eds.), *Iron nutrition and interactions in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Ao, T.Y.**; Fan, F.; Korcak, R.F.; Faust, M. 1985. Iron reduction by apple roots. *Journal of Plant Nutrition*, 8(7):629-644.
- Ayed, D.I.** 1970. A study of iron in tomato roots by chelate treatments. *Plant and Soil*, 32:18-26.
- Awad, F.**; Kahl, L.; Kluge, R. 1995a. Environmental aspects of sewage sludge and evaluation of super absorbent hydrogel under Egyptian conditions, pp. 91-97, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.

- Awad, F.;** Römheld, V.; Marschner, H. 1995b. Effect of root exudates on mobilization in the rhizosphere and uptake of iron by wheat plants, pp. 99-104, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Bagnaresi, P. e Pupillo P.** 1995. Characterization of NADH-dependent Fe^{3+} -chelate reductases of maize roots. *Journal of Experimental Botany*, 46(291):1497-1503.
- Bain, J.M.** 1958. Morphological, anatomical and physiological changes in developing fruit of the Valencia orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Australian Journal of Botany*, 6:1-24.
- Bakker, M.R. e Nys, C.** 1999. Effect of liming on fine root cation exchange sites of oak. *Journal of Plant Nutrition*, 22(10):1567-1575.
- Bañuls, J.;** Ratajczak, R.; Lüttge, U. 1993. Characterization of a proton-translocation ATPase in a tonoplast-vesicle fraction from citrus. *Plant Physiology*, 142:319-324.
- Bar-Akiva, A.** 1964. Visual symptoms and chemical analysers vs. biochemical indicators as means of diagnosing iron and manganese deficiencies in citrus plants. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 4:9-25.
- Bar, Y. e Kafkafi, U.** 1992. Nitrate-induced iron-deficiency chlorosis in avocado (*Persea americana* Mill.) rootstocks and its prevention by chloride. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1739-1746.
- Bar-Ness, E.;** Chen, Y.; Hadar, Y.; Marschner, H.; Römheld, V. 1991. Siderophores of *Pseudomonas putida* as an iron source for dicot and monocot plants. *Plant and Soil*, 130:231-241.
- Bassi, R.;** Rigoni, F.; Giacometti, G.M. 1990. Chlorophyll binding proteins with antenna function in higher plants and green algae. *Photochemistry*, 6:1187-1206.
- Bassi, D.;** Tagliavini, M.; Rombolà, A.; Marangoni, B. 1998. Il programma di selezione di portinnesti per il pero serie "Fox". *Frutticoltura*, 4:17-19.
- Bavaresco, L.;** Fregoni, M.; Frascini, P. 1991. Investigations on iron uptake and reduction by excised roots of different rootstocks and a *V. vinifera* cultivar, pp. 139-143, In: Y. Chen e Y. Hadar (eds.), Iron nutrition and interactions in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Bavaresco, L.;** Frascini, P.; Perino, A. 1993. Effect of the rootstock on the occurrence of lime-induced chlorosis of potted *Vitis vinifera* L. cv. Pinot blanc. *Plant and Soil*, 157:305-311.
- Bavaresco, L.;** Fregoni, M.; Perino, A. 1994. Physiological aspects of lime-induced chlorosis in some *Vitis* species. I. Pot trial on calcareous soil. *Vitis*, 33:123-126.
- Bavaresco, L.;** Fregoni, M.; Fogher, C. 1995a. Effect of some biological methods to improve Fe-efficiency in grafted grapevine, pp. 83-89, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Bavaresco, L.;** Fregoni, M.; Perino, A. 1995b. Physiological aspects of lime-induced chlorosis in some *Vitis* species. II. Genotype response to stress conditions. *Vitis*, 34:233-234.
- Bavaresco, L.** 1997. Relationship between chlorosis occurrence and mineral composition of grapevine leaves and berries. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 28:13-21.
- Bavaresco, L.;** Giachino, E.; Colla, R. 1999. Iron chlorosis paradox in grapevine. *Journal of Plant Nutrition*, 22(10):1589-1597.
- Belkhdja, R.;** Morales, F.; Quílez, R.; López-Millán, A.F.; Abadía, A.; Abadía, J. 1998a. Iron deficiency causes changes in chlorophyll fluorescence due to the reduction in the dark of the photosystem II acceptor side. *Photosynthesis Research*, 56:265-276.
- Belkhdja, R.;** Morales, F.; Sanz, M.; Abadía, A.; Abadía, J. 1998b. Iron deficiency in peach trees: effects on leaf chlorophyll and nutrient concentrations in flowers and leaves. *Plant and Soil*, 203:257-268.
- Bialczyk, J. e Lechowski, Z.** 1992. Absorption of HCO_3^- by roots and its effect on carbon metabolism of tomato. *Journal of Plant Nutrition*, 15(3):293-312.
- Bienfait, H.F.;** Bino, R.J.; Bliiek, A.M.; Duivenvoorden, J.F.; Fontain, J.M. 1983. Characterization of ferric reducing activity in roots of Fe deficient *Phaseolus vulgaris* L.. *Physiologia Plantarum*, 59:196-202.
- Bienfait, H.F.;** van der Briel, W.; Mesland-Mul, N.T. 1985. Free space iron pools in roots, generation and mobilization. *Plant Physiology*, 78:596-600.
- Brancadoro, L.;** Rabotti, G.; Scienza, A.; Zocchi, G. 1995. Mechanisms of Fe-efficiency in roots of *Vitis* spp. in response to iron deficiency stress. *Plant and Soil*, 171:229-234.

- Briat**, J.F.; Ma, L.A.; Laulhére, J.P.; Lescure, A.; Lobréaux, S.; Pesey, H.; Proudhon, D.; Wuytswinkel, O. 1995. Molecular and cellular biology of plant ferritins, pp. 265-276, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Brown**, J.C. 1978. Mechanism of iron uptake by plants. *Plant Cell and Environment*, 1:249-257.
- Brown**, J.C. e Jolley, V.D. 1989. Plant metabolic responses to iron-deficiency stress. A variety of mechanisms grouped into two major strategies make iron available from the soil. *Bioscience*, 39(8): 546-551.
- Brüggemann**, W.; Moog, P.R.; Nakagawa, H.; Janiesch, P.; Kuiper, P.J.C. 1990. Plasma membrane-bound NADH: Fe³⁺EDTA reductase and iron deficiency in tomato (*Lycopersicum esculentum* L.). Is there a turbo reductase? *Physiologia Plantarum*, 79:339-346.
- Brüggemann**, W.; Mass-Kantel, K.; Moog, P.R. 1993. Iron uptake by leaf mesophyll cells: The role of the plasma membrane-bound ferric chelate reductase. *Planta*, 190:151-155.
- Buckhout**, T.J.; Bell, P.F.; Luster, D.G.; Chaney, R.L. 1989. Iron-stress induced redox activity in tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) is localized on the plasma membrane. *Plant Physiology*, 90:151-156.
- Byrne**, D.H.; Rouse, R.E.; Sudahomo, M. 1995. Tolerance to citrus rootstocks to lime-induced iron chlorosis. *Subtropical Plant Science*, 47:7-11.
- Calabrese**, F. 1994. Agrumicoltura in Portogallo. *Revista di Fruticoltura e Ortofloricoltura*, LVI(3):45-49.
- Campbell**, S.A. e Nishio, J.N. 2000. Iron deficiency studies of sugar beet using an improved sodium bicarbonate-buffered hydroponics growth system. *Journal of Plant Nutrition*, 23:741-757.
- Chandra**, L. 1966. Responses of rough lemon and trifoliolate orange crown in calcareous and non-calcareous soils. *Advancing Frontiers of Plant Sciences*, 13:187-193.
- Chaney**, R.L.; Brown, J.C.; Tiffin, L.O. 1972. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiology*, 50:208-213.
- Chaney**, R.L. 1984. Diagnostic practices to identify iron deficiency in higher plants. *Journal of Plant Nutrition*, 7(1-5): 47-67.
- Chaney**, R.L.; Bell, P.F.; Coulombe, B.A. 1989. Screening strategies for improved nutrient uptake and use by plants. *HortScience*, 24:4-5.
- Chaney**, R.L.; Chen, Y.; Green, C.E.; Holden, M.J.; Bell, P.F.; Luster, D.G.; Angle, J.S. 1992. Root hairs on chlorotic tomatoes are an effect of chlorosis rather than part of adaptative Fe-stress-response. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1857-1875.
- Chang**, Y.; Ma, J.F.; Matsumoto, H. 1998. Mechanisms of Al-induced iron chlorosis in wheat (*Triticum aestivum*). Al-inhibited biosynthesis and secretion of phytosiderophore. *Physiologia Plantarum*, 102:9-15.
- Chapman**, H.D. 1968. The mineral nutrition in citrus, pp. 127-274, In: W. Reuther, L.D. Batchelor, H.J. Webber (eds.), Citrus industry. Vol. II. University of Califórnia, EUA.
- Chen**, Y. e Barak P. 1982. Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Advances in Agronomy*, 35:217-240.
- Cianzio**, S.R. 1991. Recent advances in breeding for improving iron utilization by plants, pp. 83-88, In: Y. Chen e Y. Hadar (eds.), Iron nutrition and interactions in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Cianzio**, S.R. e Voss, B.K. 1994. Three strategies for population development in breeding high-yielding soybean cultivars with improved iron efficiency. *Crop Science*, 34:355-359.
- Cianzio**, S.R. 1995. Strategies for the genetic improvement of Fe efficiency in plants, pp. 119-125, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Cinelli**, F. 1995. Physiological responses of clonal quince rootstocks to iron-deficiency induced by addition of bicarbonate to nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition*, 18(1):77-89.
- Cinelli**, F.; Viti, R.; Byrne, D.H.; Reed, D.W. 1995. Physiological characterization of two peach seedling rootstocks in bicarbonate nutrient solution. I. Root iron reduction and iron uptake, pp. 323-328, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Clark**, R.B. e Gross, R.D. 1986. Plant genotype differences to iron. *Journal of Plant Nutrition*, 9(3-7):471-491.
- Cordeiro**, A.M. 1997. Clorosis ferrica en olivo (*Olea europea* L.): Seleccin de cultivares tolerantes. Tese de Doutoramento, Córdoba, Espanha, 260p.

- Cress**, W.A.; Johnson, G.V.; Barton, L.L. 1986. The role of endomycorrhizal fungi in iron uptake by *Hilaria jamesii*. *Journal of Plant Nutrition*, 9(3-7):547-556.
- Cuesta**, A.; Sanchez-Andreu, A.; Juarez, M. 1993. Aplicación foliar de quelatos de Fe en vid (*Vitis vinifera*) cv. Aledo. Efecto residual sobre los micronutrientes Fe, Zn y Mn. *Agrochimica*, XXXVII:4-5.
- Davis**, T.; Jolley, V.; Walser, R.; Brown, J.; Blaylock, A. 1986. Net photosynthesis of Fe-efficient soybean cultivars grown under varying iron levels. *Journal of Plant Nutrition*, 9(3-7):671-681.
- de la Guardia**, M.D.; Felipe, A.; Alcántara, E.; Fournier, J.M.; Romera, F.J. 1995. Evaluation of experimental peach rootstocks grown in nutrient solutions for tolerance to iron stress, pp. 201-205, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- de la Guardia**, M. e Alcántara, E. 1996. Ferric chelates reduction by sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves: influence of light, oxygen, iron-deficiency and leaf age. *Journal of Experimental Botany*, 47:669-675.
- Deckock**, P.C.; Hall, A.; Inkson, R.H.E. 1979. Active iron in plant leaves. *Annals of Botany*, 43:737-740.
- Démétriadès**, S.D.; Gavalas, N.A.; Papadopoulos, S.E. 1964. Trials for the control of the lime-induced chlorosis in fruit trees in Greece. I. Preliminary observations on peach and lemon trees. *Annual Institute of Phytopathologie*, 7:28-36.
- Drossopoulos**, J.B.; Bouranis, D.L.; Bairaktari, B.D. 1994. Patterns of mineral nutrient fluctuations in soybean leaves in relation to their position. *Journal of Plant Nutrition*, 17(6):1017-1035.
- Duarte**, A.; Guerreiro, A.; Oliveira, S. 1999. La citricultura del Algarve. *Citrus*, 6:15-23.
- Egilla**, J.N.; Byrne, D.H.; Reed, D.W. 1994. Iron stress response of three peach rootstock cultivars: ferric-iron reduction capacity. *Journal of Plant Nutrition*, 17(12):2079-2103.
- El-Kassa**, S.E. 1984. Effect of iron nutrition on the growth, yield, fruit quality, and leaf composition of seeds balady lime trees grown on sandy calcareous soils. *Journal of Plant Nutrition*, 7(1-5):301-311.
- Fernandez-Lopez**, J.A.; Almela, J.; Lopez-Roca, J.M.; Alcaraz, C. 1991. Iron deficiency in citrus lemon: effects on photochlorophyllase synthetic pigments and chlorophyllase activity. *Journal of Plant Nutrition*, 14(11):1133-1144.
- Fernandez-Lopez**, J.A.; Almela, L.; Almansa, M.S.; Lopez-Roca, M. 1992. Partial purification and properties of chlorophyllase from chlorotic citrus lemon leaves. *Phytochemistry*, 31(2):447-449.
- Fernandez-Lopez**, J.A.; Lopez-Roca, J.M.; Almela, L. 1993. Mineral composition of iron chlorotic *Citrus lemon* L. leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 16(8):1395-1407.
- Freitas**, M.; Duarte, A.; Guerreiro, A.; Mouzinho, D.; Oliveira, S. 1998. Estratégias de organização e marketing para a citricultura Algarvia. *Direcção Regional de Agricultura do Algarve, Faro*, 35p.
- Fournier**, J.M.; Alcántara, E.; de la Guardia, M.D. 1992. Organic acid accumulation in roots of two sunflower lines with a different response to iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1747-1755.
- García**, A.L.; Galindo, L.; Navarro, S. 1980. Chlorophyllase in citrus leaves. Kinetic aspects of the reaction. *Biologia Plantarum*, 22(4):255-264.
- García**, A.L. e Galindo, L. 1991. Chlorophyllase activity as biochemical indicator of Mn and Fe deficiencies in citrus. *Photosynthetica*, 25(3):351-357.
- García**, M.; Daverede, C.; Gallego, P.; Toumi, M. 1999. Effect of various potassium-calcium ratios on cation nutrition of grape grown hydroponically. *Journal of Plant Nutrition*, 22(3):417-425.
- García**, P.; Abadía, J.; Abadía, A. 1998. Tratamientos foliares para la corrección de la clorosis férrica. *Geórgia*, 6:27-31.
- García-Mina**, J.M.; Sanchez-Diaz, M.; Iñiguez, J. 1995. The ability of several iron (II) - Humic complexes to provide available iron to plants under adverse soil conditions, pp. 235-239, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Gerke**, J.; Romera, W.; Jungk, A. 1994. The excretion of citric and malic acid by proteoid roots of *Lupinus albus* L.; effects on soil solution concentrations of phosphate, iron, and aluminium in the proteoid rhizosphere in samples of an oxisol and a luvisol. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie Und Bodenkunde*, 157:289-294.
- Gogorcena**, Y.; Abadía, J.; Abadía, A. 1998. Inducción in vivo de la reductasa de patrones frutales de *Prunus persica* L. *Actas do VII Simposio Nacional-III Iberico sobre Nutrición Mineral de las Plantas*, pp. 27-32.

- Gogorcena**, Y.; Abadía, J.; Abadía, A. 2000. Induction of in vivo root ferric chelate reductase activity in the fruit tree rootstock. *Journal of Plant Nutrition*, 23(1):9-21.
- González-Vallejo**, E.B.; Abadía, A.; Herbik, A.; Stephan, U.W.; Remy, R.; Abadía, J. 1998a. Determinación de patrones polipeptídicos de raíz de remolacha (*Beta vulgaris* L.) en condiciones de deficiencia de Fe. Actas do VII Simposio Nacional-III Iberico sobre Nutrición Mineral de las Plantas, pp. 119-124.
- González-Vallejo**, E.B.; Susín, S.; Abadía, A.; Abadía, J. 1998b. Changes in sugar beet leaf plasma membrane Fe(III)-chelate reductase activities mediated by Fe-deficiency, assay buffer composition, anaerobiosis and the presence of flavins. *Protoplasma*, 205:163-168.
- González-Vallejo**, E.B.; González-Reyes, J.A.; Abadía, A.; López-Millán, A.F.; Yunta, F.; Lucena, J.J.; Abadía, J. 1999. Reduction of ferric chelates by leaf plasma membrane preparations from Fe-deficient and Fe-sufficient sugar beet. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26:601-611.
- González-Vallejo**, E.B.; Morales, F.; Cistué, L.; Abadía, A.; Abadía, J. 2000. Iron deficiency decreases the Fe(III)-chelate reducing activity of leaf protoplasts. *Plant Physiology*, 122:337-344.
- Graziano**, P.L. 1995. Preventing iron chlorosis in fruit trees using elemental sulphur. *Sulphur in Agriculture*, 19:63-69.
- Grusak**, M.A.; Welch, R.M.; Kochian, L.V. 1990. Physiological characterization of a single-gene mutant of *Pisum sativum* exhibiting excess iron accumulation. I. Root iron reduction and iron uptake. *Plant Physiology*, 93:976-981.
- Grusak**, M.A.; Kochian, L.V.; Welch, R.M. 1993. Spatial and temporal development of iron(III) reductase activity in root systems of *Pisum sativum* (Fabaceae) challenged with iron-deficiency stress. *American Journal of Botany*, 80(3):300-308.
- Grusak**, M.A. e Pezeshgi, S. 1996. Shoot-to-root signal transmission regulates root Fe(III) reductase activity in the dgl mutant of pea. *Plant Physiology*, 110:329-334.
- Grusak**, M.A.; Pearson, J.N.; Marentes, E. 1999. The physiology of micronutrient homeostasis in field crops. *Field Crops Research*, 60:41-56.
- Guardiola**, J.L. 1981. Flower initiation and development in Citrus. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 1:242-248.
- Guardiola**, J.L. e Lazaro, E. 1987. The effect of synthetic auxins on fruit growth and anatomical development in Satsuma mandarin. *Scientia Horticulturae*, 31:119-130.
- Guardiola**, J.L. 1992. Frutificação e crescimento. Anais do segundo seminário internacional de citros, Bebedouro, Brasil. pp. 1-25.
- Guller**, L. e Krucká, M. 1993. Ultrastructure of grape-vine (*Vitis vinifera* L.) chloroplasts under Mg- and Fe- deficiencies. *Photosynthetica*, 29:417-425.
- Guzmán**, M. e Romero, L. 1988. Iron index horticultural crops. I. *Capsicum annuum* L. cv. Lamyo. *Journal of Plant Nutrition* 11(6-11):983-994.
- Guzmán**, M.; Urrestarazu, M.; Romero, L. 1991. Iron index horticultural, pp. 357-361, In: Y. Chen e Y. Hadar (eds.), Iron nutrition and interactions in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Hagstrom**, G.R. 1984. Current management practices for correcting iron deficiency in plants with emphasis on soil management. *Journal of Plant Nutrition*, 7(1-5):23-46.
- Haleem**, A.A.; Loeppert, R.H.; Anderson, W.B. 1995. Role of soil carbonate and iron oxide in iron nutrition of soybean in calcareous soils of Egypt and the United States, pp. 307-314, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Hamzé**, M.; Salsac, L.; Wacquant, J.P. 1980. Recherche de tests pour déceler précocement l'aptitude des agrumes résister à la chlorose calcaire: I. Capacité d'échange cationique et degré d'estérification des racines. *Agrochimica*, XXIV:432-442.
- Hamzé**, M. e Nimah, N. 1982. Iron content during lime-induced chlorosis with two citrus rootstocks. *Journal of Plant Nutrition*, 5(4-7):797-804.
- Hamzé**, M.; Ryan, J.; Shwayri, R.; Zaabout, M. 1985. Iron treatment of lime-induced chlorosis: implications for chlorophyll, Fe³⁺, Fe²⁺ and K⁺ in leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 8(3):437-448.
- Hamzé**, M.; Ryan, J.; Zaabout, M. 1986. Screening of citrus rootstocks for lime-induced chlorosis tolerance. *Journal of Plant Nutrition*, 9(3-7):459-469.

- Han, Z.H.;** Shen, T.; Korcak, R.F.; Baligar, V.C. 1998. Iron absorption by iron-efficient and -inefficient species of apples. *Journal of Plant Nutrition*, 21(1):181-190.
- Hellín, E.;** Llorente, S.; Piquer, V.; Sevilla, E. 1983. Actividad peroxidasa inducida como indicador de la efectividad de compuestos orgánicos de hierro en la corrección de la deficiencia de Fe en el limonero. *Agrochimica*, XXVIII:432-441.
- Hellín, E.;** Urena, R.; Sevilla, F.; Llorente, S. 1984. Efectividad de complejos orgánicos de hierro en la corrección de la clorosis ferrica del limonero. *Anales de Edafología e Agrobiología*, XLIII(7-8):1195-1203.
- Hellín, E.;** Hernández-Cortés, J.A.; Piqueras, A.; Olmos, E.; Sevilla, F. 1995. The influence of the iron content on the superoxide dismutase activity and chloroplast ultrastructure of *Citrus lemon*, pp. 247-254, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Hernandez-Apaolaza, L.;** Gárate, A.; Lucena, J.J. 1995. Efficacy of commercial Fe(III)-EDDHA and Fe(III)-EDDHMA chelates to supply iron to sunflower and corn seedlings. *Journal of Plant Nutrition*, 18(6):1209-1223.
- Hernando, V. e Casado, M.** 1972. Clorosis ferrica inducida por manganeso en plantas de freson. *Anales de Edafología e Agrobiología*, 13-24.
- Higuchi, K.;** Kanazawa, K.; Nishizawa, N.; Chino, M.; Mori, S. 1995. Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots, pp. 29-35, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Hoffmann, B.;** Planker, R.; Mengel, K. 1992. Measurements of pH in the apoplast of sunflower leaves by means of fluorescence. *Physiologia Plantarum*, 84:537-544.
- Holden, M.J.;** Luster, D.G.; Chaney, R.L.; Buckhout, T.J.; Robinson, C. 1991. Fe-chelate reductase activity of plasma membranes isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) roots. *Plant Physiology*, 97:537-544.
- Holden, M.J.;** Luster, D.G.; Chaney, R.L.; Buckhout, T.J. 1992. Enzymology of ferric chelate reduction at the root plasma membrane. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1667-1678.
- Holden, M.J.;** Luster, D.G.; Chaney, R.L. 1994. Enzymatic iron reduction at the root plasma membrane: partial purification of the NADH-Fe chelate reductase, pp. 285-294, In: J.A. Manthey (ed.), *Biochemistry of metal micronutrients in the rhizosphere*. Lewis Publishers, Londres, Reino Unido.
- Horesh, I. e Levy, Y.** 1981. Response of iron-deficient citrus trees to foliar iron sprays with a low-surface-tension surfactant. *Scientia Horticulturae*, 15(10):227-233.
- Horesh, I.;** Levy, Y.; Goldschmidt, E.E. 1986. Prevention of lime-induced chlorosis in citrus trees by peat and iron treatments to small soil volumes. *HortScience*, 21(6):1363-1364.
- Horesh, I.;** Levy, Y.; Goldschmidt, E.E. 1991. Correction of lime-induced chlorosis in container-grown citrus trees by peat and iron sulphate application to small soil volumes, pp. 345-349, In: Y. Chen e Y. Hadar (eds.), *Iron nutrition and interactions in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Huang, I.;** Welkie, G.W.; Miller, G.W. 1992. Ferredoxin and flavodoxin analysis in tobacco in response to iron stress. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1765-1782.
- Hughes, D.F.;** Jolley, V.D.; Brown, J.C. 1990. Differential response of dicotyledonous plants potassium-deficiency stress: iron-stress response mechanism. *Journal of Plant Nutrition*, 13(11):1405-1417.
- Hughes, D.F.;** Jolley, V.D.; Brown, J.C. 1992. Roles for potassium in the iron-stress response mechanisms of strategy I and strategy II plants. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1821-1839.
- Igartua, E.;** Grasa, R.; Sanz, M.; Abadía, A.; Abadía, J. 2000. Prognosis of iron chlorosis from the mineral composition of flowers in peach. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 75:111-118.
- Imsande, J.** 1998. Iron, sulfur, and chlorophyll deficiencies: A need for an integrative approach in plant physiology. *Physiologia Plantarum*, 103:139-144.
- Ji, Z.H.;** Korcak, R.F.; Wergin, W.P.; Fan, F.; Faust, M. 1984. Cellular ultrastructure and net photosynthesis of apple seedlings under iron stress. *Journal of Plant Nutrition*, 7(6):911-928.
- Jolley, V.D.;** Brown, J.C.; Blaylock, M.J.; Camp, S.D. 1988. A role of potassium in the use of iron by plants. *Journal of Plant Nutrition*, 11(6-11):1159-1175.
- Jolley, V.D.;** Fairbanks, D.J.; Stevens, W.B.; Terry, R.E.; Orf, J.H. 1992. Root iron-reduction capacity for genotypic evaluation of iron efficiency in soybean. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1679-1690.

- Jolley, V.D.** e Brown, J.C. 1994. Genetically controlled uptake and use of iron by plants, pp. 251-266, In: J.A. Manthey, D.E. Crowley, D. Luster (eds.), Biochemistry of metal micronutrients in the rhizosphere. Lewis Publishers, Londres, Reino Unido.
- Jolley, V.D.**; Brown, J.C.; Terry, R.E. 1995. Reduction of ferric iron by tumorous crown gall tissue is associated with cells modified by agrobacterium tumefaciens. Journal of Plant Nutrition, 18(12):2681-2689.
- Jurkevitch, E.**; Hadar, Y.; Chen, Y. 1986. The remedy of lime-induced chlorosis in peanuts by *Pseudomonas sp.* siderophores. Journal of Plant Nutrition, 9 (10):533-545.
- Jurkevitch, E.**; Hadar, Y.; Chen, Y. 1992. Utilization of the siderophores FOB and pseudobactin by rhizosphere microorganisms of cotton plants. Journal of Plant Nutrition, 15(10):2183-2192.
- Kanazawa, K.**; Higuchi, K.; Fushiya, S.; Nishizawa, N.; Chino, M.; Mori, S. 1995. Inductions of two enzyme activities involved in the biosynthesis of mugineic acid in Fe-deficient barley roots, pp. 37-41, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Kawai, S.**; Sasaki, O.; Hayasaka, Y.; Takagi, S. 1995. Biosynthesis of avenic acid A in oat cv Onward: studies with ¹⁴C or ¹⁵N labeled compounds, pp. 295-299, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Khorsandi, F.** 1994. Sulfuric acid effects on iron and phosphorus availability in two calcareous soils. Journal of Plant Nutrition, 17(9):1611-1623.
- Kolsh, H.**; Hofner, W.; Schaller, K. 1987. Effect of bicarbonate and phosphate on iron-chlorosis of grape vines with special regard to the susceptibility of the rootstocks. I. Field experiments. Journal of Plant Nutrition, 10(2):207-230.
- Kosegarten, H.** e Englisch, G. 1994. Effect of various nitrogen forms on the pH in leaf apoplast and on iron chlorosis of *Glycine max* L. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie und Bodenkunde, 157:401-405.
- Kosegarten, H.**; Schwed, U.; Wilson, G.; Mengel, K. 1998a. Comparative investigation on susceptibility of faba bean (*Vicia faba* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) to iron chlorosis. Journal of Plant Nutrition, 21(7):1511-1528.
- Kosegarten, H.**; Wilson, G.H.; Esch, A. 1998b. The effect of nitrate nutrition on iron chlorosis and leaf growth in sunflower (*Helianthus annuus* L.). European Journal of Agronomy, 8:283-292.
- Kosegarten, H.**; Hoffmann, B.; Mengel, K. 1999. Apoplastic pH and Fe³⁺ reduction in intact sunflower leaves. Plant Physiology, 121:1069-1079.
- Köseoglu, A.T.** 1995a. Effect of iron chlorosis on mineral composition of peach leaves. Journal of Plant Nutrition, 18(4):765-776.
- Köseoglu, A.T.** 1995b. Investigation of relationships between iron status of peach leaves and soil properties. Journal of Plant Nutrition, 18(9):1845-1859.
- Kramer, D.**; Römheld, V.; Landsberg, E.; Marschner, H. 1980. Induction of transfer-cell formation by iron deficiency in the root epidermis of *Helianthus annuus* L.. Planta, 147:335-339.
- Krauskopf, K.B.** 1983. Geoquímica de los micronutrientes, pp. 7-36, In: J.J. Mortvedt, P.M. Giodano, W.L. Lindsay (eds.), Micronutrientes en agricultura. 3ª ed., AGT Editor SA, México.
- Landsberg, E.C.** 1981a. Energy-driven H⁺ efflux in sunflower roots - activated by Fe-deficiency stress. Plant Physiology, 67:702.
- Landsberg, E.C.** 1981b. Fe-stress-induced transfer cell formation - regulated by auxin? Plant Physiology, 67:563.
- Landsberg, E.C.** 1981c. Organic acid synthesis and release of to Fe deficiency stress of mono and dicotyledonous plant species. Journal of Plant Nutrition, 3:579-591.
- Landsberg, E.C.** 1982. Transfer cell formation in the root epidermis: a prerequisite for Fe efficiency. Journal of Plant Nutrition, 5(4-7):415-432.
- Landsberg, E.C.** 1984. Regulation of iron-stress-response by whole-plant activity. Journal of Plant Nutrition, 7(1-5):609-621.
- Landsberg, E.** 1995. Transfer cell formation in sugar beet roots induced by latent Fe deficiency, pp. 67-75, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Lavon, R.** e Goldschmidt, E. 1999. Enzymatic methods for detection of mineral deficiencies in citrus leaves: A mini-review. Journal of Plant Nutrition, 22(1):139-150.

- Ledo**, A.S.; Ledo, F.J.S.; Ritzinger, R.; Sobrinho, A.P.C. 1999. Porta-enxertos para laranjeiras-doces (*Citrus sinensis* L. Osbeck) em Rio Grande, Acre. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 34:1211-1216.
- Legaz**, F.; Serna, M.D.; Primo-Millo, E.; Martin, B. 1992. Leaf spray and soil application of Fe-chelates to Navelina orange trees. Proceedings of the International Society of Citriculture, 2:613-617.
- Lindsay**, W.L. e Schwab, A.P. 1982. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. Journal of Plant Nutrition, 5(4-7):821-840.
- Lindsay**, W.L. 1991. Iron oxide solubilization by organic matter and its effect on iron availability, pp. 29-36, In: Y. Chen e Y. Hadar (eds.), Iron nutrition and interactions in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Lindsay**, W.L. 1995. Chemical reactions in soils that affect availability to plants. A quantitative approach, pp. 7-14, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Loeppert**, R.H. e Hallmark, C.T. 1985. Indigenous soil properties influencing the availability of iron in calcareous soils. Soil Science of Society American Journal, 49:597-603.
- Loeppert**, R.H. 1986. Reactions of iron and carbonates in calcareous soils. Journal of Plant Nutrition, 9(3-7):195-214.
- Loeppert**, R.H.; Geiger, S.C.; Hartwig, R.C.; Morris, D.R. 1988. A comparison of indigenous soil factors influencing the Fe-deficiency chlorosis of sorghum and soybean in calcareous soils. Journal of Plant Nutrition, 11(6-11):1481-1492.
- Longnecker**, N. e Welch, R.M. 1990. Accumulation of apoplastic iron in plant roots. Plant Physiology, 92:17-22.
- López-Cantarero**, I.; Sanchez, A.; del Rio, A.; Valenzuela, J.L.; Romero, L. 1992. What constitutes a good iron indicator with brackish water and gypsum. Journal of Plant Nutrition, 15(10):1567-1578.
- López-Millán**, A.F.; Morales, F.; Abadía, A.; Abadía, J. 1998. Implicaciones metabólicas en la resposta bioquímica a la deficiencia de hierro en remolacha (*Beta vulgaris* L.). Actas do VII Simposio Nacional-III Iberico sobre Nutrición Mineral de las Plantas, pp. 143-148.
- Lucena**, J.J.; Gárate, A.; Ramon, A.M.; Manzanares, M. 1990. Iron nutrition of a hydroponic strawberry culture (*Fragaria vesca* L.) supplied with different Fe chelates. Plant and Soil, 123:9-15.
- Lucena**, J.J.; Aberasturi, J.; Gárate, A. 1991. Stability of chelates in nutrient solutions for drip irrigation, pp. 63-67, In: Y. Chen e Y. Hadar (eds.), Iron nutrition and interactions in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Lucena**, J.J.; Manzanares, M.; Gárate, A. 1992a. A test to evaluate the efficacy of commercial Fe-chelates. Journal of Plant Nutrition, 15(10):1553-1566.
- Lucena**, J.J.; Manzanares, M.; Gárate, A. 1992b. Comparative study of the efficacy of commercial Fe-chelates using a new test. Journal of Plant Nutrition, 15(10):1995-2006.
- Macur**, R.E.; Olsen, R.A.; Inskeep, W.P. 1991. Photochemical mobilization of ferritin iron, pp. 89-94, In: Y. Chen e Y. Hadar (eds.), Iron nutrition and interaction in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Maksoud**, M.A. e Khalil, K.W. 1995. Effect of fertigation of Fe, Zn and Mn on Washington Navel orange trees. Annals of Agricultural Science, 40(2):765-769.
- Manthey**, J.A. e McCoy, D.L. 1993. Chelation effects on the iron reduction and uptake by low-iron stress tolerant and non-tolerant citrus rootstocks. Journal of Plant Nutrition, 16(5):881-893.
- Manthey**, J.A.; McCoy, D.L.; Crowley, D.E. 1994. Stimulation of rhizosphere iron reduction and uptake in response to iron deficiency in citrus rootstocks. Plant Physiology and Biochemistry, 32(2):211-215.
- Manthey**, J.A.; Tisserat, B.; Crowley, D.E. 1996. Root responses to sterile-grown onion plants to iron deficiency. Journal of Plant Nutrition, 19(1):145-161.
- Marschner**, H.; Römheld, V.; Ossenberg-Neuhaus, H. 1982. Rapid method for measuring changes in pH and reducing processes along roots of intact plants. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie und Bodenkunde, 105:407-416.
- Marschner**, H.; Römheld, V.; Kissel, M. 1986. Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. Journal of Plant Nutrition, 9(3-7):695-713.
- Marschner**, H.; Römheld, V.; Cakmak, I. 1987. Root-induced changes of nutrient availability in the rhizosphere. Journal of Plant Nutrition, 10(9-16):1175-1184.

- Marschner**, H. 1991. Symposium summary and future research areas, pp. 365-372, In: Y. Chen e Y. Hadar (eds.), Iron nutrition and interactions in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Marschner**, H. e Römheld, V. 1994. Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and Soil*, 165:261-274.
- Marschner**, H. e Römheld, V. 1995. Strategies of plants for acquisition of iron, pp. 375-388, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Marschner**, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 3ª ed., Academic Press, Londres, Reino Unido, 674 pp.
- Marschner**, P.; Crowley, D.E.; Higashi, R.M. 1997. Root exudation and physiological status of a root-colonizing fluorescent pseudomonad in mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant and Soil*, 189:11-20.
- Masalha**, J.; Kosegarten, H.; Elmaci, O.; Mengel, K. 2000. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biological Fertility of Soils*, 30:433-439.
- McCray**, J.M. e Matocha, J.E. 1992. Effects of soil water levels on solution bicarbonate, chlorosis and growth of sorghum. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1877-1890.
- McKenzie**, D.B.; Hossner, L.R.; Newton, R.J. 1984. Sorghum cultivar evaluation for iron chlorosis resistance by visual scores. *Journal of Plant Nutrition*, 7(1-5):677-685.
- Mengel**, K.; Breiningner, M.; Bubl, W. 1984. Bicarbonate, the most important factor inducing iron chlorosis in vine grapes on calcareous soils. *Plant and Soil*, 92:17-22.
- Mengel**, K. e Geurtzen, G. 1986. Iron chlorosis on calcareous soils. Alkaline nutritional condition as the cause for the chlorosis. *Journal of Plant Nutrition*, 9(3-7):161-173.
- Mengel**, K. e Geurtzen, G. 1988. Relationships between iron chlorosis and alkalinity in *Zea mays*. *Physiologia Plantarum*, 72:460-465.
- Mengel**, K.; Planker, R.; Hoffmann, B. 1994. Relationship between leaf apoplast pH and iron chlorosis of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Plant Nutrition*, 17(6):1053-1065.
- Mengel**, K. 1995. Iron availability in plant tissues - iron chlorosis on calcareous soils, pp. 389-397, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Miguel**, G.; Ferreira, A.S.; Monteiro, J.G.; Duarte, A. 1999. Teor de vitamina C em citrinos cultivados no Algarve. *Actas do 4º Encontro de Química dos Alimentos*, pp. 221-223.
- Mishashi**, S.; Mori, S.; Nishizawa, N. 1991. Enhancement of ferric mugenic acid uptake by iron deficient barley roots in the presence of excess free mugenic acid in the medium, pp. 167-173, In: Y. Chen e Y. Hadar (eds.), Iron nutrition and interactions in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Miller**, G.W.; Pushnik, J.C.; Welkie, G.W. 1984. Iron chlorosis, a world wide problem, the relation of chlorophyll biosynthesis to iron. *Journal of Plant Nutrition*, 7(1-5):1-22.
- Miller**, G.W.; Pushnik, J.C.; Brown, J.C.; Emery, T.E.; Jolley, V.D.; Warnik, K.Y. 1985. Uptake and translocation of iron from ferrated rhodotorulic acid in tomato. *Journal of Plant Nutrition*, 8(3):249-264.
- Miller**, J.E.; Swanepoel, J.; Miller, D.; Plessis, S.F. 1994. Correction of lime-induced chlorosis of citrus in the sundays river valley. *Subtropica*, 15(8):18-20.
- Miller**, G.W.; Huang, I.J.; Welkie, G.W.; Pushnik, J.C. 1995. Function of iron in plants with special emphasis on chloroplasts and photosynthetic activity, pp. 19-28, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Mohammad**, M.J.; Najim, H.; Khresat, S. 1998. Nitric acid- and O-phenanatroline-extractable iron for diagnosis of iron chlorosis in citrus lemon trees. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 29(7-8):1035-1043.
- Monge**, E.; Pérez, C.; Pequerul, A.; Madero, P.; Val, J. 1993. Effect of iron chlorosis on mineral nutrition and lipid composition of thylacoid biomembrane in *Prunus persica* L. Batsch. *Plant and Soil*, 154:97-102.
- Montañés**, L.; Sanz, M.; Gomez, V.; Heras, L. 1990. Evolución de nutrientes en hoja de melocotonero (*Prunus Persica*, L. Batsch) y producción. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei*, 20:15-26.
- Montañés**, L. e Heras, L. 1991. Desviación de óptimo porcentual (DOP): Nuevo índice para la interpretación del análisis vegetal. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei*, 20:93-107.
- Moog**, P.R. e Brüggemann, W. 1994. Iron reductase systems on the plant plasma membrane - a review. *Plant and Soil*, 165:241-260.

- Morales**, F.; Abadía, A.; Abadía, J. 1990. Characterization of the xanthophyll cycle and other photosynthetic pigment changes induced by iron deficiency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiology*, 94:607-613.
- Morales**, F.; Susin, S.; Abadía, A.; Carrera, M.; Abadía, J. 1992. Photosynthetic characteristics of iron chlorotic pear (*Pyrus communis* L.). *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1783-1790.
- Morales**, F.; Abadía, A.; Belkhodja, R.; Abadía, J. 1994. Iron deficiency-induced changes in the photosynthetic pigment composition on field-grown pear (*Pyrus communis* L.) leaves. *Plant, Cell and Environment*, 17:1153-1160.
- Morales**, F.; Abadía, A.; Abadía, J. 1998a. Mecanismos de protección frente al exceso de luz en hojas deficientes en hierro. *Actas do VII Simposio Nacional - III Iberico sobre Nutrición Mineral de las Plantas*, pp. 101-106.
- Morales**, F.; Grasa, R.; Abadía, A.; Abadía, J. 1998b. Iron chlorosis paradox in fruit trees. *Journal of Plant Nutrition*, 21(4):815-825.
- Morales**, F.; Belkhodja, R.; Abadía, A.; Abadía, J. 2000. Photosystem II efficiency and mechanisms of energy dissipation in iron-deficient, field-grown pear trees (*Pyrus communis* L.). *Photosynthesis Research*, 63:9-21.
- Moreno**, J.J.; Lucena, J.J.; Carpena, O. 1996. Effect of the iron supply on the nutrition of different citrus variety/rootstock combination using DRIS. *Journal of Plant Nutrition*, 19(5):689-704.
- Moreno**, D.A.; Pulgar, G.; Villora, G.; Romero, L. 1998. Nutritional diagnosis of fig tree leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 21(12):2579-2588.
- Mori**, S. 1999. Iron acquisition by plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2:250-253.
- Natt**, C. 1992. Effect of slow release iron fertilizers on chlorosis in grape. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1891-1912.
- Nedunchezian**, N.; Morales, F.; Abadía, A.; Abadía, J. 1997. Decline in photosynthetic electron transport activity and changes in thylakoid protein pattern in field grown iron deficient Peach (*Prunus persica* L.). *Plant Science*, 129:29-38.
- Nenova**, V. e Stoyanov, I. 1993. Physiological and biochemical changes in young maize plants under deficiency: 1. Growth and photosynthesis. *Journal of Plant Nutrition*, 16(5):835-849.
- Nenova**, V. e Stoyanov, I. 1995. Physiological and biochemical changes in young maize plants under iron deficiency: 2. Catalase, peroxidase, and nitrate reductase activities in leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 18(10):2081-2091.
- Nenova**, V. e Stoyanov, I. 1999. Physiological and biochemical changes in young maize plants under iron deficiency: 3. Concentration and distribution of some nutrient elements. *Journal of Plant Nutrition*, 22(3):565-578.
- Nikolic**, M. e Römheld, V. 1999. Mechanism of Fe uptake by the leaf symplast: Is the Fe inactivation in leaf a cause of Fe deficiency chlorosis. *Plant and Soil*, 215:229-237.
- Nonomura**, A.M.; Nishio, J.N.; Benson, A.A. 1995. Stimulated growth and correction of Fe-deficiency with trunk- and foliar-applied methanol-soluble nutrient amendments, pp. 329-333, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Obreza**, T.A.; Alva, A.K.; Calvert, D.V. 1993. Citrus fertilizer management on calcareous soils. *Circular of Florida Cooperative Extension Service*, pp. 1127-1136.
- Ortiz**, J.M. 1985. Nomenclatura botánica de los cítricos. *Revista Levante Agrícola*, 71-75.
- Papastylianou**, I. 1993. Timing and rate of iron chelate application to correct chlorosis of peanut. *Journal of Plant Nutrition*, 16(7):1193-1203.
- Pérez**, C.; Val, J.; Monge, E. 1995. Effects of iron deficiency on photosynthetic structures in peach (*Prunus persica* L. Batsch) leaves, pp. 183-189, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Potdar**, M.V. e Anders, M.M. 1995. On-farm performance of groundnut genotypes under different land configurations and foliar iron sprays for the correction of iron chlorosis on calcareous soils in India, pp. 111-118, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Powell**, P.E.; Szaniszlo, P.J.; Cline, G.R.; Reid, C.P.P. 1982. Hydroxamate siderophores in the iron nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition*, 5(4-7):653-673.

- Purvis**, A.C. e **Barmore**, C.R. 1981. Involvement of ethylene in chlorophyll degradation in peel citrus fruits. *Plant Physiology*, 68:854-856.
- Pushnik**, J.C.; **Miller**, G.W.; **Manwaring**, J.H. 1984. The role of iron in higher plant chlorophyll biosynthesis, maintenance and chloroplast biogenesis. *Journal of Plant Nutrition*, 7(1-5):733-758.
- Pushnik**, J.C. e **Miller**, G.W. 1989. Iron regulation of chloroplast photosynthetic function: mediation of PSI development. *Journal of Plant Nutrition*, 12(4):407-421.
- Quilez**, R.; **Abadía**, A.; **Abadía**, J. 1992. Characteristics of thylacoids and photosystem II membrane preparations from iron deficient and iron sufficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1809-1819.
- Rabotti**, G. e **Zocchi**, G. 1994. Plasma membrane-bound H⁺-ATPase and reductase activities in Fe-deficient cucumber roots. *Physiologia Plantarum*, 90:779-785.
- Rashid**, A.; **Couvillon**, G.A.; **Jones**, J.B. 1990. Assessment of Fe Status of peach rootstocks by techniques used to distinguish chlorotic and non-chlorotic leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 13(2):285-307.
- Reichard**, P. 1993. From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science*, 260:1773-1777.
- Ricardo**, C.P. e **Teixeira**, A. 1983. *Enzimas*. 1ª ed., Didáctica Editora, Lisboa, 159p.
- Robinson**, N.J.; **Sadjuga**, M.R.; **Groom**, Q.J. 1997. The *froh* gene family from *Arabidopsis thaliana*: putative iron-chelate reductase. *Plant and Soil*, 196:245-248.
- Rombolà**, A.D.; **Brüggemann**, W.; **Tagliavini**, M.; **Moog**, P.R. 1998a. Meccanismi biochimici di tolleranza alla clorosi ferrica in actinidia (*A. deliciosa*). *Actas do Convegno Nazionale SOI - "La coltura dell'actinidea"*, pp. 395-396.
- Rombolà**, A.D.; **Tagliavini**, M.; **Quartieri**, M.; **Malaguti**, D.; **Marangoni**, B.; **Scudellari**, D. 1998b. La clorosi ferrica delle colture arboree da frutto: aspetti general e strategie di cura. *Notiziario Tecnico CRPV*, 54:35-50.
- Rombolà**, A.D.; **Quartieri**, M.; **Marangoni**, B.; **Tagliavini**, M.; **Scudellari**, D.; **Abadía**, J. 1999. Strategie di cura della clorosi ferrica nella frutticoltura integrata. *Frutticoltura*, 5:59-64.
- Rombolà**, A.D.; **Brüggemann**, W.; **Tagliavini**, M.; **Marangoni**, B.; **Mogg**, P.R. 2000. Iron source affects Fe reduction and re-greening of kiwifruit (*Actinidea deliciosa*) leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 23(11): in press.
- Romera**, F.J.; **Alcántara**, E.; **de la Guardia**, M.D. 1991a. Characterization of the tolerance to iron chlorosis in different peach rootstocks grown in nutrient solution. I. Effect of bicarbonate and phosphate, pp. 145-149, In: Y. Chen e Y. Hadar (eds.), *Iron nutrition and interactions in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Romera**, F.J.; **Alcántara**, E.; **de la Guardia**, M.D. 1991b. Characterization of the tolerance to iron chlorosis in different peach rootstocks grown in nutrient solution. II. Iron-stress response mechanisms, pp. 151-155, In: Y. Chen e Y. Hadar (eds.) *Iron nutrition and interactions in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Romera**, F.J.; **Alcántara**, E.; **de la Guardia**, M.D. 1992. Effects of bicarbonate, phosphate and high pH on the reducing capacity of Fe-deficient sunflower and cucumber plants. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1519-1530.
- Romera**, F.J. e **Alcántara**, E. 1994. Iron deficiency stress responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots. A possible role for ethylene? *Plant Physiology*, 105:1133-1138.
- Romera**, F.J.; **Welch**, R.M.; **Norvell**, W.A.; **Schaefer**, S.C. 1996. Iron requirement for and effects of promoters and inhibitors of ethylene action on stimulation of Fe(III)-chelate reductase in roots of strategy I species. *Biometals*, 9:45-50.
- Romera**, F.J.; **Alcántara**, E.; **de la Guardia**, M. 1999. Ethylene production by Fe-deficient roots and its involvement in regulation of Fe-deficiency stress responses by strategy I plants. *Annals of Botany*, 83:51-55.
- Römheld**, V. e **Marschner**, H. 1979. Fine regulation of iron uptake by the Fe-efficient plant *Helianthus annuus*, pp. 406-417, In: J. Harley e R.S. Russel (eds.), *The soil-root interface*. Academic Press, New York, EUA.
- Römheld**, V. e **Marschner**, H. 1981. Iron deficiency stress induced morphological and physiological changes in root tips of sunflower. *Physiologia Plantarum*, 53:354-360.

- Römheld, V.** e Marschner, H. 1983. Mechanism of iron uptake by peanut plants. I. Fe(III) reduction, splitting and release of phenolics. *Plant Physiology*, 71:949-954.
- Römheld, V.;** Muller, C.; Marschner, H. 1984. Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant Physiology*, 76:603-606.
- Römheld, V.** e Marschner, H. 1986a. Evidence for a specific system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiology*, 80:175-180.
- Römheld, V.** e Marschner, H. 1986b. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species, pp. 155-204, In: B. Tinker e A. Lauchli (eds.), *Advances in Plant Nutrition*, Vol. 2. Praeger Publishers.
- Römheld, V.** 1987a. Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 70:231-234.
- Römheld, V.** 1987b. Existence of two different strategies for the acquisition of iron in higher plants, pp. 353-374, In: G. Winkelmann, D. van der Helm, J.B. Neilands, V.C.H. Verlag (eds.), *Iron transport in microbe's plants and animals*. Weinheim, Alemanha.
- Römheld, V.** e Marschner, H. 1990. Genotypical differences among graminaceous species in release of phytosiderophores and uptake of iron phytosiderophores. *Plant and Soil*, 123:147-153.
- Römheld, V.** 1997. The chlorosis paradox: Fe inactivation as a secondary event in chlorotic leaves of grapevine. *Livro de Resumos do 9th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants*. Hohenheim, Stuttgart, Alemanha, p. 10.
- Rubinstein, B.** e Luster, D.G. 1993. Plasma membrane redox activity: components and role in plant processes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44:131-155.
- Ruiz, R.S.;** Stomayor, C.S.; Lemus, G.S. 1984. Corrección de la clorosis ferrica en nectarinos y efecto residual. *Agricultura Técnica (Chile)*, 44(4):305-309.
- Ruiz, J.M.;** Belakbir, A.; López-Cantarero, I.; Romero, L. 1997. Leaf-macronutrient content and yield in grafted melon plants. A model to evaluate the influence of rootstock genotype. *Scientia Horticulturae*, 71:227-234.
- Sadka, A.;** Dahan, E.; Cohen, L.; Marsh, K.B. 2000. Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit. *Physiologia Plantarum*, 108:255-262.
- Sagee, O.;** Hasdai, D.; Hamou, M.; Shaked, A. 1992. Greenhouse evaluation of new citrus rootstocks for tolerance to adverse soil conditions. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, p. 205.
- Sahu, M.P.;** Sharma, D.D.; Jain, G.L.; Singh, H.G. 1987. Effects of growth substances, sequestrene 138-Fe and sulphuric acid on iron chlorosis of garden peas (*Pisum sativum* L.). *Journal of Horticultural Science*, 62:391-394.
- Sanz, M.;** Heras, L.; Montañés, L. 1992. Relationships between yield and leaf nutrient contents in peach trees: early nutritional status diagnosis. *Journal of Plant Nutrition*, 15(9):1457-1466.
- Sanz, M.;** Carrera, M.; Montañés, L. 1993. El estado nutricional del peral. Posibilidad del diagnóstico floral. *Hortofruticultura*, 10:60-62.
- Sanz, M.;** Montañés, L.; Carrera, M. 1994. The possibility of using analysis to diagnose the nutritional status of pear trees. *Acta Horticulturae*, 367:290-295.
- Sanz, M.** e Montañés, L. 1995a. Floral analysis: A novel approach for the prognosis of iron deficiency in pear (*Pyrus communis* L.) and peach (*Prunus persica* L. Batsch), pp. 371-374, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Sanz, M.** e Montañés, L. 1995b. Flower analysis as a new approach to diagnosing the nutritional status of the peach tree. *Journal of Plant Nutrition*, 18:1667-1675.
- Sanz, M.** e Montañés, L. 1997. Diagnóstico visual de la clorosis férrica. *Información Técnica Económica Agrária*, 93:7-22.
- Sanz, M.;** Belkhodja, R.; Toselli, M.; Montañés, L.; Abadía, A.; Tagliavini, M.; Marangoni, B.; Abadía, J. 1997a. Floral analysis as a possible tool for prognosis of iron deficiency in peach. *Acta Horticulturae*, 448:241-245.
- Sanz, M.;** Pascual, J.; Machin, J. 1997b. Prognosis and correction of iron chlorosis in peach trees: Influence on fruit quality. *Journal of Plant Nutrition*, 20(11):1567-1572.
- Sanz, M.;** Pérez, J.; Pascual, J.; Machin, J. 1998. Prognosis of iron chlorosis in apple trees by floral analysis. *Journal of Plant Nutrition*, 21(8):1697-1703.

- Sanz, M.** 1999. Evaluation of interpretation of DRIS system during growing season of the peach tree: comparison with DOP method. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 30(7-8):1025-1036.
- Schmidt, W. e Janiesch, P.** 1991. Specificity of the electron donor for transmembrane redox systems in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) roots. *Journal of Plant Physiology*, 138:450-453.
- Schmidt, W.** 1994. Root-mediated ferric reduction-responses to iron deficiency, exogenously induced changes in hormonal balance and inhibition of protein synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 45:275.
- Schmidt, W.; Boomgaarden, B.; Ahrens, V.** 1996. Reduction of root iron in *Plantago lanceolata* during recovery from Fe deficiency. *Physiologia Plantarum*, 98:587-593.
- Schmidt, W. e Schuck, C.** 1996. Pyridine nucleotide pool size changes in iron-deficient *Plantago lanceolata* roots during reduction of external oxidants. *Physiologia Plantarum*, 98:215-221.
- Schmidt, W. e Bartels, M.** 1996. Formation of root epidermal transfer cells in *Plantago*. *Plant Physiology*, 110:217-225.
- Schmidt, W.; Bartels, M.; Tittel, J.; Fuhner, C.** 1997. Physiological effects of copper on iron acquisition processes in *Plantago*. *New Phytologist*, 135:659-666.
- Schmidt, W. e Bartels, M.** 1998. Orientation of NADH-linked ferric chelate (turbo) reductase in plasma membranes from roots of *Plantago lanceolata*. *Protoplasma*, 203:186-193.
- Schmidt, W.** 1999. Review. Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist*, 141:1-26.
- Scholz, G.; Becker, R.; Pich, A.; Stephan, U.W.** 1992. Nicotianamina - a common constituent of strategies I and II of iron acquisition by plants: a review. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1647-1665.
- Schwertmann, U.** 1991. Solubility and dissolution of iron oxides. *Plant and Soil*, 130:1-25.
- Serrano, R.** 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40:61-94.
- Shi, Y. e Byrne, D.H.** 1995. Tolerance of Prunus rootstocks to potassium carbonate-induced chlorosis. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 102(2):283-285.
- Shijinag, Z.; Daogao, L.; Xuewu, Z.** 1995. Physiological reaction of citrus tube-cultured seedlings of different genotypes to Fe(II) and HCO₃⁻. *Acta Horticulturae*, 403:301-305.
- Sijmons, P.C. e Bienfait, H.F.** 1984. Mechanism of iron reduction by roots of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Plant Nutrition*, 7:687-693.
- Sijmons, P.C.; van den Briel, W.; Bienfait, H.F.** 1984. Cytosolic NADPH is the electron donor for extracellular Fe(III) reduction in iron-deficient bean roots. *Plant Physiology*, 75:219-221.
- Sijmons, P.C.; KolattuKucly, P.E.; Bienfait, H.F.** 1985. Iron deficiency decreases suberization in bean roots through a decrease in suberin-specific peroxidase activity. *Plant Physiology*, 78:115-120.
- Smith, B.N.** 1984. Iron in higher plants: storage and metabolic role. *Journal of Plant Nutrition*, 7(1-5):759-766.
- Smolders, A.J.P.; Hendriks, R.J.J.; Campschreur, H.M.; Roelofs, J.G.M.** 1997. Nitrate induced iron deficiency chlorosis in *Juncus acutiflorus*. *Plant and Soil*, 196:37-45.
- Socias i Company, R.; Aparisi, G.; Felipe, A.J.** 1995. A genetical approach to iron chlorosis in deciduous fruit trees, pp. 167-174, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Spiegel-Roy, P. e Goldschmidt, E.** 1996. *Biology of Citrus*. 1ª ed., Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, 230p.
- Spiller, S. e Terry, N.** 1980. Limiting factors in photosynthesis. II. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units. *Plant Physiology*, 65:121-125.
- Stephan, U.D. e Scholz, G.** 1993 Nicotianamina: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem? *Physiologia Plantarum*, 88:522-529.
- Stephan, U.D.; Schmidke, I.; Pich, A.** 1995. Phloem translocation of Fe, Cu, Mn and Zn in Ricinus seedlings in relation to the concentrations of nicotianamine, an endogenous chelator of divalent metal ions, in different seedlings parts, pp. 43-50, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Sudahomo, M.; Byrne, D.H.; Rouse, R.E.** 1994. Greenhouse screening of citrus rootstocks for tolerance to bicarbonate-induced iron chlorosis. *HortScience*, 29(2):113-116.

- Sugiura**, Y. e **Nomoto**, K. 1984. Phytosiderophores: structures and properties for mugineic acids and their metal complexes. *Structure and Bonding*, 58:107-135.
- Susín**, S.; **Abián**, J.; **Sánchez-Baeza**, F.; **Peleato**, M.L.; **Abadía**, A.; **Gelpí**, E.; **Abadía**, J. 1993. Riboflavin 3'-and 5'sulfate, two novel flavins accumulating in the roots of iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *The Journal of Biological Chemistry*, 5:20958-20965.
- Susín**, S.; **Abián**, J.; **Peleato**, M.L.; **Sánchez-Baeza**, F.; **Abadía**, A.; **Gelpí**, E.; **Abadía**, J. 1994. Flavin excretion from roots of iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Planta*, 193:514-519.
- Susín**, S.; **Abadía**, A.; **González-Reyes**, J.A.; **Lucena**, J.J.; **Abadía**, J. 1996. The pH requirement of the iron-deficiency-induced iron reductase activities of intact plants and isolated plasma membrane fractions in sugar beet. *Plant Physiology*, 110:111-123.
- Suzuki**, K.; **Hirano**, H.; **Yamaguchi**, H.; **Irifune**, T.; **Nishizawa**, N.K.; **Chino**, M.; **Mori**, S. 1995. Partial amino acid sequences of a peptide induced by Fe deficiency in barley roots, pp. 363-369, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Tagliavini**, M.; **Scudellari**, D.; **Marangoni**, B.; **Bastianel**, A.; **Franzin**, F.; **Zamborlini**, M. 1992. Leaf mineral composition of apple tree: sampling date and effects of cultivar and rootstock. *Journal of Plant Nutrition*, 15(5):605-619.
- Tagliavini**, M.; **Bassi**, D.; **Marangoni**, B. 1993. Growth and mineral nutrition of pear rootstocks in lime soils. *Scientia Horticulturae*, 54:13-22.
- Tagliavini**, M.; **Masia**, A.; **Quartieri**, M. 1995a. Bulk soil pH and rhizosphere of peach trees in calcareous and alkaline soils as affected by the form of nitrogen fertilizers. *Plant and Soil*, 176:263-271.
- Tagliavini**, M.; **Rombolà**, A.D.; **Marangoni**, B. 1995b. Response to iron-deficiency stress of pear and quince genotypes. *Journal of Plant Nutrition*, 18(11):2465-2482.
- Tagliavini**, M.; **Scudellari**, D.; **Marangoni**, B.; **Toselli**, M. 1995c. Acid-spray regreening of kiwifruit leaves affected by lime-induced iron chlorosis, pp. 191-195, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Tagliavini**, M.; **Scudellari**, D.; **Marangoni**, B.; **Pelliconi**, F.; **Valli**, S. 1996. Valutazione di method alternativi ai chelati per superare la clorosi ferrica dell'actinidea. *Actas do Convegno Nazionale SOI - "La coltura dell'actinidea"*, pp. 197-202.
- Tagliavini**, M.; **Abadía**, J.; **Rombolà**, A.D.; **Abadía**, A.; **Tsipouridis**, C.; **Marangoni**, B. 2000. Agronomic means for the control of iron chlorosis in deciduous fruit plants. *Journal of Plant Nutrition*, 23(11): in press.
- Takagi**, S.; **Nomoto**, K.; **Takemoto**, T. 1984. Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *Journal of Plant Nutrition*, 7(6):469-477.
- Taylor**, B.K. e **Dimsey**, R.T. 1993. Rootstock and scion effects on the leaf nutrient composition of citrus trees. *Australian Journal of Soil Research*, 33:363-371.
- Teixeira**, A.R. e **Ricardo**, C.P.P. 1983. *Fotossíntese*. Didática editora, Lisboa, 333 p.
- Terry**, N. 1980. Limiting factors in photosynthesis. I - Use of iron stress to control photochemical capacity *in vivo*. *Plant Physiology*, 65:114-120.
- Terry**, N. e **Low**, G. 1982. Leaf chlorophyll content and its relation to the intracellular localization of iron. *Journal of Plant Nutrition*, 5:(4-7):301-310.
- Terry**, N. 1983. Limiting factors in photosynthesis. IV. Iron stress mediated changes in light-harvesting and electron transport capacity and its effects on photosynthesis *in vivo*. *Plant Physiology*, 71:855-860,
- Terry**, N. e **Abadía**, J. 1986. Function of iron in chloroplasts. *Journal of Plant Nutrition*, 9(3-7):609-646.
- Terry**, N. e **Zayed**, A.M. 1995. Physiology and biochemistry of leaves under iron deficiency, pp. 283-294, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Thomas**, F.N.; **Brandt**, T.; **Hartmann**, G. 1998. Leaf chlorosis in pedunculate oaks (*Quercus suber* L.) on calcareous soils. Resulting from lime-induced manganese/iron deficiency: Soil conditions and physiological reactions. *Angewandte Botany*, 72:28-36.
- Tipton**, C.L. e **Thowsen**, J. 1985. Fe(III) reduction in cells walls of soybean roots. *Plant Physiology*, 79:432-435.
- Toselli**, M.; **Tagliavini**, M.; **Marangoni**, B. 1995. La clorosi ferrica el pesco: conoscenza, prevenzione e terapia. *Actas do XXII Convegno Peschicollo*, 108-113.

- Toselli, M.;** Marangoni, B.; Tagliavini, M. 2000. Iron content in vegetative and reproductive organs of nectarine trees in calcareous soils during the development of chlorosis. *European Journal of Agronomy*, 13(4):279-286.
- Toulon, V.;** Sentenac, H.; Thibaud, J.B.; Davidian, C.; Moulineau, C.; Grignon, C. 1992. Role of apoplast acidification by the H⁺ pump. The effect on the sensitivity to pH and CO₂ of iron reduction. *Planta*, 186: 212-218.
- Treeby, M.T.** 1992. The role of mycorrhizal fungi and non-mycorrhizal micro-organisms in iron nutrition of citrus. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(9):857-864.
- Treeby, M. e Uren, N.** 1993. Iron deficiency stress responses amongst citrus rootstocks. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie und Bodenkunde*, 156:75-81.
- Ulrich, W.R.** 1991. Transport of nitrate and ammonium through plant membranes, pp.121-137, In: K. Mengel e D.J. Pilbeam (eds.) *Nitrogen metabolisms in plants*. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido.
- Uren, N.C.** 1993. Mucilage secretion and its interaction with soil, and contact reduction. *Plant and Soil*, 155:79-382.
- Valenzuela, J.L.;** Sánchez, A.; del Rio, A.; López-Cantarero, I.; Romero, L. 1992. Influence of plant age on mature leaf iron parameters. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):2035-2043.
- Valenzuela, J.L.;** Alvarado, J.J.; Sánchez, A.; Romero, L. 1995. Influence of N, P and K treatments of several physiological and biochemical iron indicators in melon plants irrigated with brackish water, pp. 135-140, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Varenes, A. de, Vicente, M.F.;** Faria, E.A. 1997. Tratamento da clorose férrica em pimenteiro. *Revista das Ciências Agrárias*, 20:49-55.
- Vempati, R.K.;** Kollipara, K.P.; Stucki, J.; Wilkinson, W. 1995. Reduction of structural iron in selected iron-bearing minerals by soybean root exudates grown in an in vitro geponic system. *Journal of Plant Nutrition*, 18(2):343-345.
- Viti, R. e Cinelli, F.** 1993. Lime-induced chlorosis in quince rootstocks: methodological and physiological aspects. *Journal of Plant Nutrition*, 16(4):631-641.
- Vizzotto, G.;** Matosevic, I.; Pinton, R.; Varanini, Z.; Costa G.; 1997. Iron deficiency responses in roots of kiwi. *Journal of Plant Nutrition*, 20(2-3):327-334.
- Vizzotto, G.;** Pinton, R.; Bomben, C.; Cesco, S.; Varanini, Z.; Costa, G. 1999. Iron reduction in iron-stressed plants of *Actinidea deliciosa* genotypes: Involvement of PM Fe(III)-chelate reductase and H⁺-Atpase activity. *Journal of Plant Nutrition*, 22(3):479-488.
- Vos, C.R.;** Lubberding, J.; Bienfait, H.F. 1986. Rhizosphere acidification as a response to iron deficiency in bean plants. *Plant Physiology*, 81:842-846.
- Vose, P.B.** 1982. Iron nutrition in plants: a world overview. *Journal of Plant Nutrition*, 5(4-7):233-249.
- Wallace, A.** 1990a. Interactions encountered when supplying iron, phosphorus and nitrogen fertilizer to two cultivars of soybeans. *Journal of Plant Nutrition*, 13(3-4):349-356.
- Wallace, A.** 1990b. Nitrogen, phosphorus, potassium interactions on Valencia orange yields. *Journal of Plant Nutrition*, 13(3-4):357-365.
- Wallace, A.** 1991. Rational approaches to control iron deficiency other than plant breeding and choice of resistant cultivars. *Plant and Soil*, 130:281-288.
- Wallace, A. e Wallace, G.A.** 1992. Some of the problems concerning iron nutrition of plants after four decades of synthetic chelating agents. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1487-1508.
- Wallace, A.;** Wallace, G.A.; Cha, J.W. 1992. Some modifications in trace metal toxicities and deficiencies in plants resulting from interactions with other elements and chelating agents. The special case of iron. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1589-1598.
- Walliham, E.F. e Garber, M.J.** 1968. Iron uptake by two citrus rootstocks species in relation to soil moisture and CaCO₃. *Agronomy Journal*, 60:50-52.
- Walter, A.;** Römheld, V.; Marschner, H.; Crowley, D.E. 1994. Iron nutrition of cucumber and maize: effect of pseudomonas putida YC 3 and its siderophore. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(8):1023-1031.
- Wang, T. e Peverly, J.H.** 1999. Investigation of ferric iron reduction on the root surfaces of common reeds using EDTA-BPDS method. *Journal of Plant Nutrition*, 22(6):1021-1032.

- Wei, L.C.;** Ocumpaugh, W.R.; Loeppert, R.H. 1994. Differential effect of soil temperature on iron-deficiency chlorosis in susceptible and resistant subclovers. *Crop Science*, 34(3):715-721.
- Wei, L.C.;** Ocumpaugh, W.R.; Loeppert, R.H. 1995. Plant growth and nutrient uptake characteristics of Fe-deficiency chlorosis susceptible and resistant subclovers, pp. 259-264, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Welch, R.M.** 1995. Micronutrient nutrition of plants. *Critical Reviews Plant Science*, 14:49-82.
- Welkie, G.W.;** Hekmat-shoar, H.; Miller, G.W. 1990. Responses of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants to iron deficiency: Solution pH and riboflavin, pp. 207-211, In: M.L. van Beusichem (ed.), *Plant nutrition - physiology and applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Welkie, G.W. e** Miller, G.W. 1993. Plant iron uptake physiology by nonsiderophore systems, pp. 345-369, In: L.L. Barton e B.C. Hemming (eds.), *Iron chelation in plants and soil microorganisms*. Academic Press, San Diego, EUA.
- Welkie, G.W.** 1995. Effect of root temperature on iron stress responses, pp. 229-234. In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Widodo, S.E.;** Shiraishi, M.; Shiraishi, S. 1995. Organic acids in the juice of acid lemon and japanese acid citrus by gas chromatography. *Journal of Faculty of Agriculture of Kyushu University*, 40(1-2):39-44.
- Winder, T.L. e** Nishio, J.N. 1995. Early iron deficiency stress response in leaves of sugar beet. *Plant Physiology*, 108:1487-1494.
- Zaharieva, T.** 1995. Iron-manganese interactions in peanut plants as influenced by the source of applied iron, pp. 277-282, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Zaiter, H.Z. e** Ghlayini, A. 1994. Iron deficiency in lentils in the Mediterranean region and its control through resistant genotypes and nutrient application. *Journal of Plant Nutrition*, 17(6):945-952.
- Zekri, M. e** Koo, R.C.J. 1992. Application of micronutrients to citrus trees through microirrigation systems. *Journal of Plant Nutrition*, 15(11):2517-2529.
- Zhang, X.,** Yi, C.; Zhang, F. 1999. Iron accumulation in root apoplasm of dicotyledonous and graminaceous species grown on calcareous soil. *New Phytologist*, 141:27-31.

Parte II

**Desenvolvimento
Experimental**

CAPÍTULO 2

EFEITO DA CLOROSE FÉRRICA EM ALGUNS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

RESUMO

Com o objectivo geral de estudar o efeito da clorose férrica em diversos parâmetros fisiológicos de plantas de citrinos efectuaram-se dois ensaios em soluço nutritiva. No **ensaio 1** utilizaram-se três porta-enxertos de citrinos (citraneira ‘Troyer’ - *Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., *Citrus taiwanica* Tan. e citrumeleiro ‘Swingle’ - *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus paradisi* Macf.) e no **ensaio 2** uma laranjeira (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck, cv. ‘Newhall’) enxertada em citraneira ‘Troyer’. A soluço nutritiva utilizada apresentava a seguinte composi  o química (em mM): 5,0 Ca(NO₃)₂, 1,4 KNO₃, 0,6 K₂SO₄, 1,0 MgSO₄, 0,9 NaCl, 0,6 (NH₄)₂HPO₄, 3,0 (NH₄)₂SO₄, 0,2 MgCl₂ e (em   M): 41,8 H₃BO₃, 3,8 ZnSO₄, 3,9 CuSO₄, 6,9 MnSO₄ e 1,0 (NH₄)₆Mo₇O₂₄. As solu  es nutritivas utilizadas no **ensaio 1** continham CaCO₃ (1 g L⁻¹) de modo a induzir clorose férrica e foram completadas com 5 concentra  es de ferro, na forma de Fe(III)-NaEDTA: 0, 5, 10, 15 e 20   M de Fe. No **ensaio 2** cada concentra  o de Fe (0, 5, 10 e 20   M de Fe) foi utilizada com e sem carbonato de cálcio, resultando num total de 8 modalidades. Ao longo dos dois ensaios a clorofila total foi estimada através do aparelho SPAD-502. No final do **ensaio 1** determinou-se a altura da parte aérea, biomassa total e parcial, alguns parâmetros de crescimento, eficiência fotoquímica (*C. taiwanica* e citraneira ‘Troyer’) baseada nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e o teor nutritivo da parte aérea e da raiz. Estabeleceram-se ainda diversas correla  es de forma a avaliar o efeito das concentra  es de Fe na parti  o dos nutrientes. No final do **ensaio 2**, mediu-se a altura da parte aérea, determinou-se o peso seco e a composi  o mineral das folhas, estudou-se a eficiência fotoquímica, a capacidade fotossintética a partir da evolu  o do O₂ e a actividade da quelato de Fe(III)-redutase medida em ápices radiculares.

Os sintomas de clorose férrica, associados a decréscimos na clorofila total, manifestaram-se no ‘Swingle’ nas concentra  es de 0, 5, 10 e 15   M de Fe, enquanto que nos porta-enxertos ‘Troyer’ e *C. taiwanica* apenas ocorreram nas concentra  es mais baixas de Fe (0 e 5   M de Fe) e estiveram associados a decréscimos na eficiência fotoquímica (F_v / F_m) devidas a altera  es ao nível da cadeia de transporte de electrões para o ‘Troyer’ e *C. taiwanica*. Neste último porta-enxerto os pigmentos do fotossistema II também foram afectados. A clorose férrica afectou ainda os parâmetros de crescimento e de biomassa medidos. Os resultados são discutidos com base na tolerância    clorose férrica dos diferentes porta-enxertos. As plantas de laranjeira das modalidades com as concentra  es mais baixas de Fe (0 e 5   M de Fe) apresentaram decréscimos na clorofila total resultando no aparecimento dos sintomas de clorose férrica. As folhas das plantas que cresceram sem Fe apresentaram taxas de liberta  o de oxigénio mais baixas, tanto nas modalidades com como sem carbonato de cálcio, comparativamente com as plantas das modalidades com 10   M de Fe. Na ausência de carbonato de cálcio, a eficiência do fotossistema II foi idêntica em todas as modalidades, enquanto que se observou um pequeno decréscimo nas plantas que cresceram sem Fe e com carbonato de cálcio. Relativamente ao controlo, apenas as plantas que cresceram com baixos níveis de Fe (0 e 5   M de Fe) e com carbonato de cálcio    que apresentaram um acréscimo de 2,5 vezes da actividade da quelato de Fe(III)-redutase. A razão Fe/Mn na parte aérea foi a que se correlacionou melhor com a clorofila total em todos os porta-enxertos enquanto que nas plantas enxertadas foi a razão K/Ca.

Palavras chave: Análise nutritiva, Biomassa, Capacidade fotossintética, Citrinos, Clorose férrica, Fluorescência, Parâmetros de crescimento, Quelato de Fe(III)-redutase, SPAD.

ABSTRACT

To study the effects of iron chlorosis on physiological parameters of citrus two experiments were done in nutrient solutions. In the first experiment, three citrus rootstocks (Citrange Troyer - *Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., *Citrus taiwanica* Tan. and Citrumelo Swingle - *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus paradisi* Macf.) four-weeks old, were grown in a nutrient solution containing CaCO_3 (1 g L^{-1}) in order to induce iron chlorosis. Solutions were complemented with different iron amounts, added as Fe(III)-NaEDTA: 0, 5, 10, 15 and 20 μM of Fe. For each rootstock, shoot growth, shoot and root fresh and dry weights were analysed at the end of experiment. Chlorophyll *a* fluorescence parameters were also determined in the same date. Low iron concentrations in the nutrient solution triggered low F_v / F_m values, 0.5 to 0.6 for Citrange Troyer and 0.3 to 0.5 for *C. taiwanica*. However, for Citrange Troyer, F_v / F_m ratio increased in plants grown with iron concentrations greater than 10 μM of iron. Root/shoot ratio was higher for Citrange Troyer, compared with *C. taiwanica*, which may indicate significant differences in photosynthates partition. Apparently, in Citrumelo Swingle, the iron concentration did not affect that parameter. The different effects on growth parameters and fluorescence values are discussed in relation to differential tolerance to iron chlorosis.

In the second experiment, orange plants (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck, cv. 'Newhall') grafted on Citrange Troyer rootstock were grown in nutrient solutions with 0, 5, 10 and 20 μM Fe, with and without calcium carbonate. Leaf chlorophyll concentration was estimated every 3–4 days. Chlorophyll fluorescence parameters, photosynthetic capacity estimated from oxygen evolution, leaf Fe concentrations, and root tip ferric chelate reductase activity were measured at the end of the experiment. Plants from the 0 and 5 μM Fe treatments showed leaf chlorosis and had decreased leaf chlorophyll concentration. Leaves of plants grown in the absence of Fe in the solution had smaller rates of oxygen evolution both in the presence and absence of calcium carbonate, compared with plants grown in the presence of 10 μM Fe. In the absence of calcium carbonate the photosystem II efficiency, estimated from fluorescence parameters, was similar in all treatments. A slight decrease in photosystem II efficiency was observed in plants grown without Fe and in the presence of calcium carbonate. A 2.5-fold increase in root tip ferric chelate reductase activity over the control values was found only when plants were grown with low levels of Fe and in the presence of calcium carbonate. The ratio Fe/Mn in the shoots was correlated with chlorophyll concentration in all rootstocks, while in orange grafted on Citrange Troyer the ratio of K/Ca was the best related to the chlorophyll concentration.

Keywords: Biomass, Citrus, Ferric chelate reductase, Photosynthetic capacity, Fluorescence, Lime-induced chlorosis, Mineral composition, SPAD, Root/shoot ratio.

2.1. INTRODUÇÃO

Um dos principais factores indutores da clorose férrica em solos calcários é o ião bicarbonato (Boxma, 1972; Chen e Barak, 1982) cuja acção parece afectar processos metabólicos nas raízes e nas folhas, diminuindo a disponibilidade de Fe no interior da planta (Mengel, 1995). Nestas condições, quando a absorção de Fe é baixa, os genótipos Fe-eficientes desencadeiam mecanismos de resposta ao nível da parte aérea e/ou radicular que incluem alterações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas (Marschner e Römheld, 1995; Terry e Zayed, 1995; Schmidt, 1999).

A actividade da quelato de Fe(III) – redutase (QF-R) é essencial para a absorção do Fe e é inibida na presença do ião bicarbonato devido ao elevado pH da solução (Toulon *et al.*, 1992; Susín *et al.*, 1996). Algumas plantas podem aumentar o poder redutor das raízes pela activação de uma redutase específica localizada na membrana plasmática, conhecida como “turbo-redutase” e que pode ter um papel preponderante na prevenção da clorose férrica (Bienfait *et al.*, 1983; Römheld, 1987; Brüggemann *et al.*, 1990; Moog e Brüggemann, 1994; Mengel, 1995; Schmidt, 1999).

Ao nível da parte aérea, o ferro é um elemento essencial para a formação das membranas dos tilacóides e para a biossíntese clorofilina (Terry, 1980; Abadía *et al.*, 1991; Abadía, 1992; Abadía e Abadía, 1993). Consequentemente, a eficiência de conversão da energia fotossintética é afectada pela clorose férrica e pode ser avaliada pelos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (Lichtenthaler e Rinderle, 1988; Morales *et al.*, 1991).

Vários autores (Clakmak *et al.*, 1994; Marschner *et al.*, 1996; McDonald *et al.*, 1996; Viti e Cinelli, 1993) referem os efeitos da clorose férrica na variação de diversos parâmetros vegetativos nomeadamente, na taxa de crescimento e na distribuição dos fotossintetizados entre a parte aérea e a raíz.

Socias i Company *et al.* (1995) salientam a necessidade de clarificar e definir os métodos de selecção e melhoramento nas árvores de fruto caracterizados por um sistema genético composto por garfos e porta-enxertos. O comportamento de um porta-enxerto pode ser diferente daquele observado no garfo enxertado nesse mesmo porta-enxerto, uma vez que a zona de enxertia pode ter um papel importante na taxa de transporte dos fotossintetizados necessários ao crescimento radicular (Tagliavini *et al.*, 1993).

Em estudos preliminares, vários autores (Hamzé e Nimah, 1982; Hamzé *et al.*, 1986; Sudahomo *et al.*, 1994; Byrne *et al.*, 1995) classificaram alguns porta-enxertos de citrinos desde os mais tolerantes como sejam, algumas tangerineiras, (*Citrus reticulata* Blanco, *Citrus nobilis* Lour.,

Citrus depressa Hay), limeiras (*Citrus limonia* Osbeck), limoeiros (*Citrus jambhiri* Tan.), laranjeira doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), híbridos de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (citranjeiras ‘Troyer’ e ‘Carrizo’) ao mais susceptível, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf..

A adição de carbonato de cálcio à solução nutritiva é um método que tem sido utilizado com êxito por diversos investigadores (Coulombe *et al.*, 1984a; 1984b; Alcántara e Romera, 1990; Romera *et al.*, 1991a; 1991b) de forma a simular as condições existentes nos solos calcários e proceder à caracterização e selecção das espécies vegetais mais tolerantes à clorose férrica.

2.1.1. Objectivos

Nestes ensaios que decorreram em solução nutritiva utilizaram-se três porta-enxertos de citrinos (*Citrus taiwanica*, citranjeira ‘Troyer’ - *Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e citrumeleiro ‘Swingle’) e uma laranjeira - cultivar ‘Newhall’, enxertada em citranjeira ‘Troyer’, com o objectivo de estudar o efeito da clorose férrica em diversos componentes e processos fisiológicos da planta nomeadamente: i) clorofila total; ii) eficiência fotossintética estimada através de trocas gasosas e dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*; iii) biomassa total e parcial; iv) composição mineral e v) actividade da quelato de Fe(III)-redutase em ápices radiculares. Deste modo, pretendeu-se caracterizar a tolerância destas espécies citrícolas à clorose férrica.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Com o objectivo de estudar o efeito da clorose férrica em diversos parâmetros fisiológicos efectuaram-se dois ensaios em solução nutritiva. No **ensaio 1** utilizaram-se três porta-enxertos de citrinos e no **ensaio 2** uma cultivar de laranjeira enxertada.

Os ensaios realizaram-se de Março a Julho de anos consecutivos (1996 e 1997), num compartimento com 50 m² de área de uma estufa de vidro, com ambiente controlado, existente no Centro de Desenvolvimento de Ciências e Técnicas de Produção Vegetal da Universidade do Algarve. As condições de temperatura (< 25° C) e humidade (80%) foram controladas e permaneceram constantes durante todo o ensaio.

2.2.1. Material vegetal

O material vegetal foi seleccionado com base na sua representatividade na região do Algarve e nos diferentes níveis de tolerância apresentado em ensaios preliminares realizados por outros autores.

Os porta-enxertos de citrinos utilizados no **ensaio 1** foram, o *Citrus taiwanica* Tan., a citranjeira ‘Troyer’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) e o citrumeleiro ‘Swingle’ (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus paradisi* Macf.). As sementes do porta-enxerto ‘Troyer’ foram gentilmente cedidas pelo proprietário dos Viveiros do Foral (S. Bartolomeu de Messines, Algarve-Portugal), Sr. Andrew Welsh, enquanto que as sementes dos outros dois porta-enxertos foram adquiridas à empresa Willits e Newcomb (Arvin, EUA). O **ensaio 2** foi realizado com plantas de laranjeira (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cv. ‘Newhall’, enxertadas em citranjeira ‘Troyer’ que foram adquiridas aos Viveiros do Foral.

2.2.2. Sistema de cultura

Ambos os ensaios foram realizados em solução nutritiva. Utilizaram-se caixas de plástico, opacas, com 20 L de capacidade e com a tampa perfurada onde se colocaram as plantas utilizando como suporte uma “rolha” de esponja. Durante todo o período de ensaio, o arejamento da solução nutritiva foi garantido por um compressor acoplado a um sistema de tubagens de forma a garantir um fornecimento de oxigénio adequado. O fluxo de ar debitado por caixa foi regulado por uma torneira existente à entrada de cada caixa.

A solução nutritiva foi preparada com água desmineralizada e apresentava a seguinte composição química (em mM): 5,0 Ca(NO₃)₂, 1,4 KNO₃, 0,6 K₂SO₄, 1,0 MgSO₄, 0,9 NaCl, 0,6 (NH₄)₂HPO₄, 3,0 (NH₄)₂SO₄, 0,2 MgCl₂ e (em µM): 41,8 H₃BO₃, 3,8 ZnSO₄, 3,9 CuSO₄, 6,9 MnSO₄ e 1,0 (NH₄)₆Mo₇O₂₄ (Carpena-Artes, 1983).

As modalidades foram estabelecidas com base nas diferentes concentrações de ferro, na forma de Fe(III)-NaEDTA, adicionadas à solução nutritiva. Com a adição de carbonato de cálcio à solução nutritiva (1 g de CaCO₃ por litro de solução nutritiva) pretendeu-se simular condições semelhantes às dos solos calcários de forma a induzir a clorose férrica.

A solução nutritiva foi substituída sempre que a condutividade baixou para 1,0 ou 1,7 dS m⁻¹ conforme se tratasse da solução nutritiva a ½ força ou completa, respectivamente. O pH e a condutividade da solução nutritiva das diferentes modalidades do ensaio foi medido cada 3 dias, como controlo da concentração iónica na solução nutritiva, através da utilização de um potenciómetro (HI 9023C, Hanna Instruments, Alemanha) e um condutímetro (LF95/SET, WTW, Alemanha) portáteis.

Durante o período em que permaneceram em solução nutritiva, as plantas foram preventivamente tratadas contra os ácaros com uma periodicidade de 2 vezes por mês. Os produtos utilizados foram, fenepiroximato (AgrEvo) a uma concentração de 0,15% e fluxenoxurão (Bayer) a uma concentração de 0,10 %.

2.2.3. Delineamento experimental

- **Ensaio 1**

A desinfecção das sementes dos três porta-enxertos foi realizada através da sua imersão numa solução de hipoclorito de sódio comercial a 30% durante 15 minutos, seguida de uma passagem por água e nova imersão numa solução de hipoclorito de sódio comercial a 15% durante 10 minutos. Após uma última lavagem com água procedeu-se à sementeira, efectuada manualmente em tabuleiros de alvéolos. O substracto utilizado na fase de germinação foi a vermiculite. A germinação das sementes teve lugar numa câmara de crescimento (750 – EDTU, Aralab, Portugal) com um fotoperíodo de 12 horas de luz (lâmpadas fluorescentes e incandescentes)/12 horas de escuro. Durante o período de luz, a densidade de fluxo fotónico mínima foi de 113 µmol de quanta de PAR (radiação fotossinteticamente activa) m⁻² s⁻¹ ao nível das plantas. A humidade relativa da câmara manteve-se a 80% e a temperatura oscilou entre os 21°C e os 22°C.

Quatro semanas após a germinação as plântulas foram transferidas para a solução nutritiva. Estabeleceram-se 5 modalidades correspondentes a 5 concentrações de ferro na solução nutritiva (0, 5, 10, 15 e 20 µM de Fe) todas na presença de CaCO₃. Durante os primeiros 25 dias de ensaio as plantas cresceram na solução nutritiva completa mas diluída, a ½ força para todos os nutrientes

com exceção do Fe e carbonato de cálcio, após os quais foram mudadas para a concentração completa onde permaneceram até ao final do ensaio.

O pH inicial da solução nutritiva foi de $6,1 \pm 0,1$ e depois da adição do carbonato de cálcio subiu para $7,1 \pm 0,2$ para todas as modalidades. Para cada uma das 5 modalidades, colocaram-se 12 plantas, com cerca de 7 cm de altura, por caixa.

- **Ensaio 2**

Três meses após a enxertia, as plantas com aproximadamente 20 cm de altura da parte aérea (com cerca de 10 a 12 folhas) foram colocadas na solução nutritiva completa e anteriormente indicada.

O ferro foi adicionado à solução nutritiva em 4 concentrações diferentes: 0, 5, 10, e 20 μM de Fe. Cada concentração de Fe foi utilizada com e sem carbonato de cálcio (1 g L^{-1}), resultando num total de 8 modalidades. Para cada uma das 8 modalidades, utilizaram-se 10 plantas distribuídas por 2 caixas.

2.2.4. Métodos

O procedimento experimental utilizado em qualquer um dos parâmetros medidos foi idêntico para os dois ensaios.

2.2.4.1. Quantificação da clorofila total (SPAD)

O grau de clorose foi estimado através da utilização de um aparelho medidor de clorofila, SPAD-502 (Minolta Co., Osaka, Japão). O princípio de funcionamento deste aparelho consiste em medir a luz transmitida através de uma folha depois de submetida, sequencialmente, a dois tipos de luz; primeiro com uma radiação na zona do vermelho ($\approx 650 \text{ nm}$), e que corresponde a um pico de absorção das moléculas de clorofila e de seguida com uma luz na zona do infravermelho ($\approx 940 \text{ nm}$) e que funciona como referência. A intensidade luminosa transmitida pela folha é convertida, primeiro em sinais eléctricos e depois, através de um microprocessador, em unidades de SPAD conforme definido pela Minolta.

Este aparelho pode ser utilizado como um método não destrutivo de estimar a concentração clorofilina uma vez que os valores de SPAD são proporcionais à quantidade de clorofila total existente nas folhas. De forma a converter os valores de SPAD na correspondente concentração de clorofila total efectuou-se, previamente, uma curva de calibração para cada uma das espécies estudadas.

Para cada um dos porta-enxertos seleccionaram-se folhas com diferentes graus de clorose onde se efectuaram medições de SPAD em diversos discos foliares (diâmetro = 1 cm; área = 0,7854 cm²). De seguida, procedeu-se à extracção dos pigmentos com acetona a 100% na presença de ascorbato de sódio, de forma a evitar a rápida degradação da clorofila *a*. A absorvância das amostras foi determinada por leitura colorimétrica num espectrofotómetro UV-Visível (Shimadzu, Kyoto, Japão) a diferentes comprimentos de onda (661,6 nm – clorofila *a*; 644,8 nm – clorofila *b*). Todo o procedimento de extracção e leitura foi comum às diferentes espécies e foi efectuado conforme descrito por Abadía e Abadía (1993).

A conversão dos valores de absorvância (A), obtidos no comprimento de onda indicado, para concentração de clorofila total (mg L⁻¹) foi realizada com base nas equações propostas por Lichtenthaler (1987):

$$\text{Clorofila } a = 11,24 * A_{661,6} - 2,04 * A_{664,8}$$

$$\text{Clorofila } b = 20,13 * A_{644,8} - 4,19 * A_{661,6}$$

$$\text{Clorofila total} = \text{Clorofila } a + \text{Clorofila } b$$

Todos os valores de SPAD medidos ao longo dos dois ensaios foram convertidos em µmol de clorofila total m⁻² através da utilização das curvas de calibração.

Na **Figura 2.1**, estão apresentadas as curvas de calibração correspondentes aos três porta-enxertos utilizados no **ensaio 1**: citranjeira ‘Troyer’ (**a**), *Citrus taiwanica* (**b**) e citrumeleiro ‘Swingle’ (**c**).

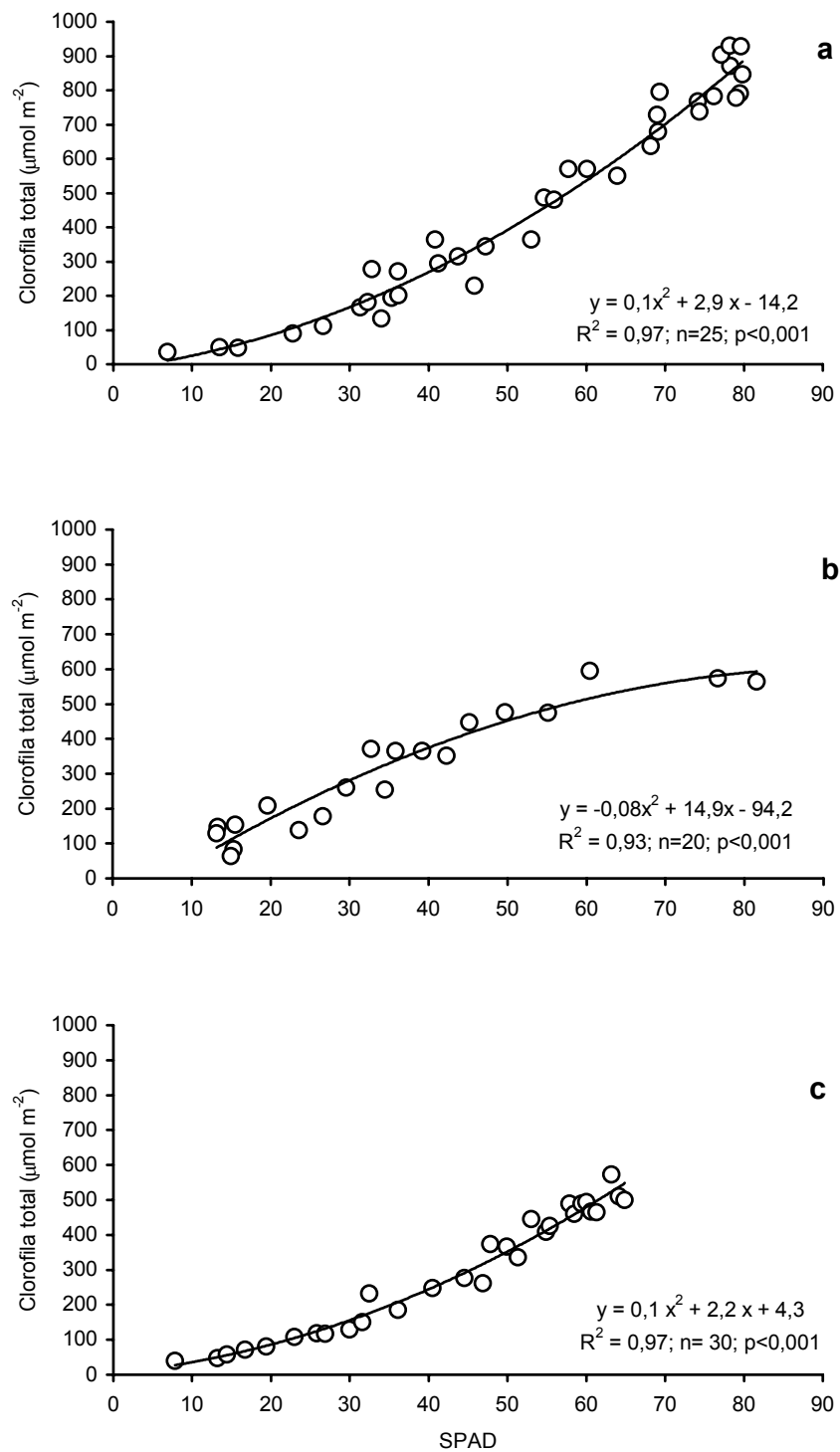


Figura 2.1 – Relação entre os valores de SPAD e a concentração foliar da clorofila total ($\mu\text{mol m}^{-2}$) para citranjeira 'Troyer' (a), *Citrus taiwanica* (b) e citrumeleiro 'Swingle' (c).

Na **Figura 2.2** está apresentada a curva de calibração dos valores de SPAD para as plantas de laranjeira, cv. ‘Newhall’, utilizado no **ensaio 2**.

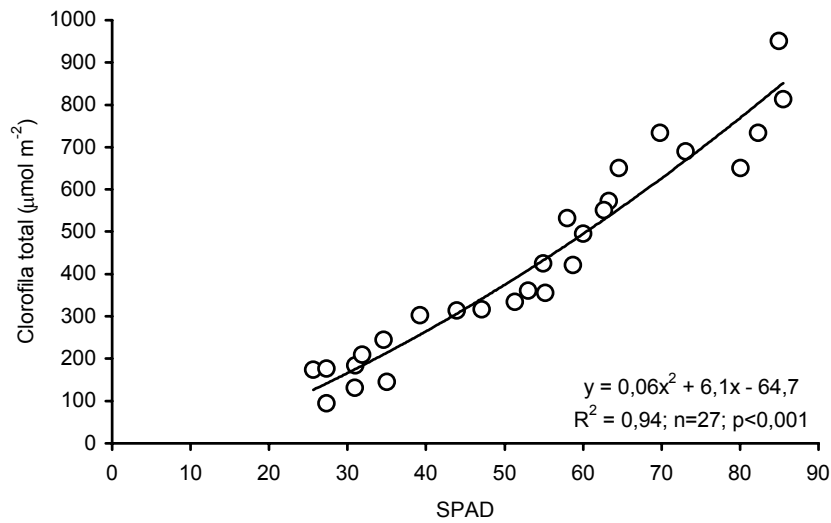


Figura 2.2 – Relação entre os valores de SPAD e a concentração foliar de clorofila total ($\mu\text{mol m}^{-2}$) das plantas de laranjeira, ‘Newhall’, enxertadas em citranjeira ‘Troyer’.

Em ambos os ensaios, as medições de SPAD iniciaram-se sempre 3 dias após as plantas terem sido colocadas na solução nutritiva. Em cada uma das 10 plantas amostradas por modalidade foram efectuadas duas leituras nas 2ª e 3ª folhas recentemente expandidas.

No **ensaio 1** realizaram-se 2 medições semanais de SPAD enquanto que no **ensaio 2** apenas se efectuou uma leitura semanal. Deste modo, em cada uma das datas de amostragem e para cada uma das modalidades foram considerados um total de 40 valores ($n = 10$ plantas \times 2 folhas \times 2 valores de SPAD) no **ensaio 1** e de 20 valores ($n = 10$ plantas \times 2 folhas \times 1 valor de SPAD) para o **ensaio 2**.

A percentagem (%) de variação da clorofila total, utilizada para comparar os 3 porta-enxertos utilizados no **ensaio 1**, foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de variação da clorofila total} = (C_f - C_i) / C_i * 100$$

em que C_i e C_f são respectivamente, a concentração de clorofila total ($\mu\text{mol m}^{-2}$) obtida no início e no final do ensaio.

2.2.4.3. Biomassa parcial e total

No final do **ensaio 1** registou-se a altura da parte aérea e determinou-se o peso fresco e seco quer da parte aérea, quer da parte radicular para as várias modalidades e para cada um dos porta-enxertos estudados. Utilizaram-se pelo menos 8 plantas por modalidade, separando-se a parte aérea (incluindo folhas, caules e pecíolos) da parte radicular.

No final do **ensaio 2** apenas se mediu a altura da parte aérea de todas as plantas utilizadas (10). Posteriormente as folhas de cada uma das plantas foram utilizadas para a determinação do seu peso fresco e seco e utilizadas para análise nutritiva.

Após a determinação do peso fresco procedeu-se à lavagem do material vegetal, efectuada com detergente não iónico (Teepol), ácido diluído (HCl - 0,01 mM), e com 3 passagens por água desionizada. De seguida, procedeu-se à sua secagem a 60°C durante 48 horas para determinação do respectivo peso seco. O arrefecimento do material vegetal seco foi realizado num excicador de vidro, com sílica gel. As pesagens foram efectuadas numa balança analítica (A 120 S, Sartorius GmbH, Alemanha). As amostras foram finamente moídas através de um moinho do tipo almofariz de ágata (RM 0, Retsch, Alemanha) e guardadas para posterior análise nutritiva.

2.2.4.4. Parâmetros de crescimento

No final do **ensaio 1** e posteriormente à determinação da biomassa total e parcial de cada um dos porta-enxertos foram calculados os seguintes parâmetros de crescimento:

Razão do peso da parte aérea - **RPA**

$$RPA = P_{pa} / P_t$$

em que P_{pa} é a biomassa da parte aérea e P_t é a biomassa total, expressos em termos de peso seco.

Razão do peso radicular - **RPR**

$$RPR = P_r / P_t$$

em que P_r é a biomassa radicular e P_t é a biomassa total, expressos em termos de peso seco.

Razão entre a parte radicular e a aérea - **RRPA**

$$RRPA = Pr / Ppa$$

em que Pr é a biomassa da parte radicular e Ppa é a biomassa da parte aérea, expressos em termos de peso seco.

Para cada porta-enxerto (**ensaio 1**), calculou-se ainda a percentagem de variação entre os parâmetros de crescimento para as diferentes concentrações de ferro:

Percentagem de variação - %

$$\% = (V_{\text{máx.}} - V_{\text{mín.}}) / V_{\text{máx.}} * 100$$

em que $V_{\text{máx.}}$ e $V_{\text{mín.}}$ são respectivamente o valor máximo e mínimo obtidos em cada um dos parâmetros de crescimento.

2.2.4.5. Análise nutritiva

A análise nutritiva foi efectuada com o material vegetal previamente seco. No **ensaio 1** analisou-se a parte aérea e a parte radicular de cada porta-enxerto e no **ensaio 2** determinou-se a composição mineral das folhas de cada uma das modalidades em ensaio.

A composição mineral foi determinada através dos métodos normalizados e descritos pela “Association of Official Analytical Chemists” (A.O.A.C., 1990). Após incineração a 450°C as amostras permaneceram em solução, por digestão ácida (HCl 1N), num volume final de 25 ml para a determinação dos restantes nutrientes, conforme indicado por Abadía *et al.* (1985) e por Belkhdja *et al.* (1998b). O fósforo foi determinado através da análise do complexo molibdovanadato fosfórico a 420 nm, no espectrofotómetro de UV-Visível (Shimadzu, Kyoto, Japão). O potássio foi determinado por fotometria de chama (Corning Ltd., Halstead, Inglaterra) e os restantes nutrientes (Mg, Ca, Fe, Mn, Cu e Zn) por espectrofotometria de absorção atómica (Shimadzu, Kyoto, Japão).

No **ensaio 1** a quantidade total de cada nutriente foi determinada a partir da respectiva concentração e do peso seco total da parte aérea e da raiz. Os macronutrientes foram expressos em mg de nutriente e os micronutrientes em µg. Com o objectivo de comparar o comportamento dos diferentes porta-enxertos face as diferentes concentrações de Fe na solução nutritiva testaram-se

diversas correlações, estando apresentadas apenas as que apresentaram o coeficiente de determinação mais significativo. Avaliou-se ainda o efeito das modalidades na distribuição dos nutrientes entre a parte aérea e a raiz que foi calculada através da razão entre o teor de um nutriente na parte aérea e o teor desse nutriente na raiz. Para estudar o efeito da clorose fêrrica no equilíbrio nutritivo da parte aérea realizaram-se correlações entre algumas razões nutritivas (P/Mg, K/Ca, K/Zn, P/Fe, Fe/Mn e Fe/Zn) e a clorofila total obtida na última data de observação.

No **ensaio 2** os resultados expressaram-se em concentração foliar, ou seja, em g de nutriente por kg de peso seco (ps) para os macronutrientes e em mg de nutriente por kg de ps para os micronutrientes.

2.2.4.6. Capacidade fotossintética

A taxa de evolução do O₂ foi determinada em discos foliares a concentrações de CO₂ e a irradiâncias saturantes pela utilização do eléctrodo de oxigénio (LD2, Hansatech, Kings Lynn, Reino Unido) e de acordo com o método descrito por Björkman e Demmig (1987).

Este sistema mede a libertação de oxigénio originada pela actividade fotossintética dos tecidos clorofilinos colocados numa câmara fechada, iluminada e com dióxido de carbono. O oxigénio libertado é detectado, polarograficamente, por um eléctrodo do tipo “Clark”, que consiste num cátodo de platina e num ânodo ligados entre si por um electrólito (95 % de etileno glicol com 5% de KCl). A aplicação de uma pequena voltagem (600 a 700 mV) entre os dois eléctrodos polariza a platina e reduz o oxigénio, que funciona como aceitador de electrões. A corrente gerada é proporcional à actividade do oxigénio presente (Walker, 1990).

Previamente, determinou-se a intensidade luminosa saturante em discos foliares provenientes de 10 plantas de laranjeira, ‘Newhall’ (**ensaio 2**). As taxas fotossintéticas foram obtidas para valores de densidade de fluxo quântico (PFD) crescentes entre 20 e 2002 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e numa concentração de CO₂ saturante (5%). Os valores de PFD foram obtidos através da combinação de filtros (“Neutral Density filters”, Hansatech) colocados no sistema de iluminação constituído por uma lâmpada de Björkman (LS2, Hansatech). A curva fotossintética de resposta à densidade de fluxo quântico assim obtida está apresentada na **Figura 2.3**.

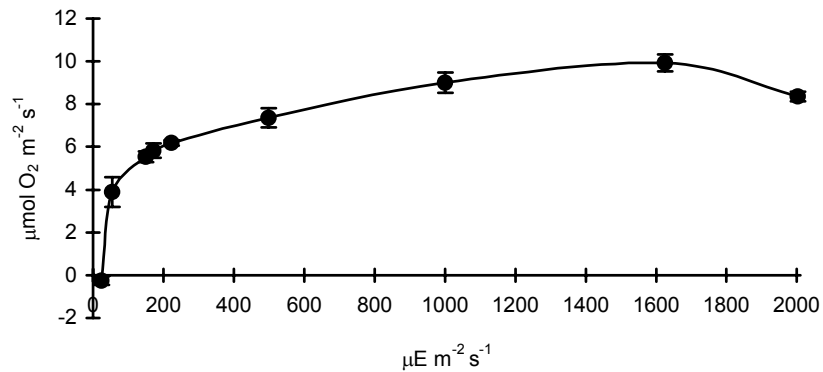


Figura 2.3 – Curva fotossintética de resposta à luz para as plantas de laranja, ‘Newhall’, enxertadas em citranjeira ‘Troyer’. Cada ponto da curva representa a média de duas leituras e o respectivo erro padrão.

No final do **ensaio 2** todas as determinações foram efectuadas a temperatura controlada (25°C), em condições de irradiância ($1625 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e de CO_2 (5%) saturantes, de forma a ultrapassar a limitação estomática e possibilitar a obtenção dos níveis máximos correspondentes à capacidade fotossintética. A concentração saturante de CO_2 (aproximadamente 5%) foi obtida através de uma solução saturada de NaHCO_3 (Walker, 1990).

Para cada uma das leituras, incluindo as da curva de resposta à luz, utilizaram-se 9 discos foliares com 0,5 cm de diâmetro retirados aleatoriamente, da 2ª e da 3ª folha completamente desenvolvidas (por contagem basípeta) em pelo menos 3 plantas de cada uma das modalidades. Em cada uma das folhas de onde se retiraram os discos foliares efectuaram-se duas leituras de SPAD, de forma a relacionar a clorofila total com a evolução do oxigénio. A capacidade fotossintética foi expressa em $\mu\text{mol de O}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2.4.7. Actividade da quelato de Fe(III)-redutase

A actividade da quelato de Fe(III)-redutase foi apenas determinada nos ápices radiculares das plantas de laranja, ‘Newhall’ enxertadas em citranjeira ‘Troyer’ (**ensaio 2**). O método utilizado foi modificado a partir do proposto Bienfait *et al.* (1983) e baseia-se na quantificação

colorimétrica do complexo Fe(II)-BPDS (“bathophenantrolinedisulfonate”) obtido a partir do quelato Fe(III)-EDTA adicionado.

No final do ensaio, seleccionaram-se aleatoriamente pelo menos 3 plantas de cada uma das modalidades. Cortaram-se 5 ápices radiculares de raízes secundárias aproximadamente com 2 cm de comprimento e 64 ± 23 mg de peso fresco, que foram colocados conjuntamente num tubo “ependorff” de 2000 μ l de capacidade. Cada “ependorff” continha 900 μ l de solução de Hoagland’s a $\frac{1}{2}$ força e sem micronutrientes, 300 μ l de BPDS (300 μ M), 30 μ l de Fe(III)-EDTA (500 μ M) e 300 μ l de solução tampão Tris (5mM, pH=6,5). A reacção processou-se durante 3 horas, no escuro, após as quais se procedeu à leitura da absorvância de 1 ml destas soluções a 535 nm num espectrofotómetro UV-Visível (UV-160 A, Shimadzu, Kyoto, Japão). Para os cálculos considerou-se um coeficiente de extinção de 22,14 mM cm^{-1} . Após as leituras procedeu-se à secagem dos ápices radiculares a 60°C durante 48 horas para determinação do respectivo peso seco (ps). Os resultados expressaram-se em nmol de Fe(II) $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de peso fresco (pf) e nmol de Fe(II) $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de ps. De forma a corrigir possíveis reduções não específicas de ferro efectuaram-se soluções de controlo sem raízes (Branco).

2.2.5. Procedimento estatístico

Em qualquer um dos dois ensaios realizados as plantas foram distribuídas num desenho experimental completamente casualizado. O número de repetições considerado em cada um dos parâmetros medidos foi anteriormente referenciado.

A comparação das médias obtidas entre modalidades, em cada data de observação e para cada parâmetro medido, foi efectuada através da análise de variância (ANOVA) e do teste de comparação múltiplo de médias de Duncan (DMRT) para um intervalo de confiança de 95%.

O valor do coeficiente de determinação (R^2) foi indicado como medida da inter-relação entre as variáveis.

A análise estatística dos dados foi processada através do programa SAS - Versão 6 (SAS Institute, 1989).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Ensaio 1

2.3.1.1 Parâmetros de crescimento

Na **Figura 2.4** apresenta-se a altura média registada por modalidade, para cada um dos porta-enxertos em estudo, no final do ensaio.

O crescimento das plantas da citranjeira ‘Troyer’ foi significativamente superior quando a concentração de ferro na solução nutritiva aumentou de 5 para 10 μM de Fe. Para o *C. taiwanica* este facto apenas se observou a partir da concentração de 10 μM de Fe e para o citrumeleiro ‘Swingle’ só para a concentração de 20 μM de Fe na solução nutritiva.

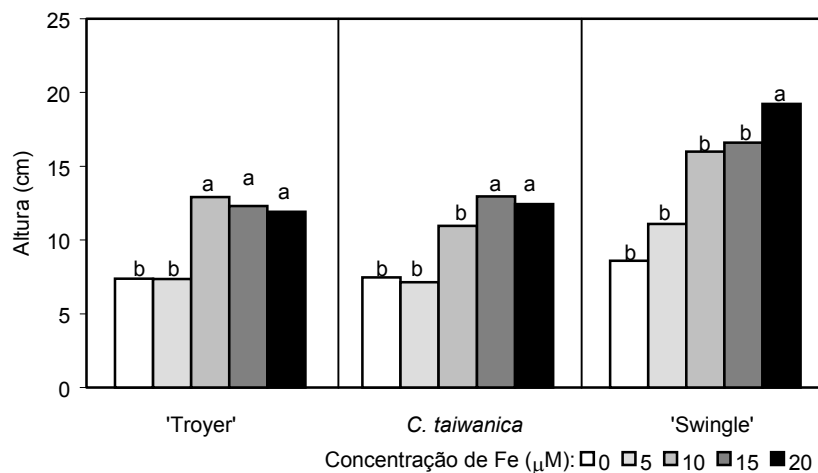


Figura 2.4 - Altura da parte aérea (cm) dos diferentes porta-enxertos. Considerando cada porta-enxerto, colunas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas a 95% (teste de Duncan).

Os resultados referentes à biomassa total e parcial obtida no final do ensaio, bem como aos diversos parâmetros de crescimento calculados para os três porta-enxertos, estão apresentados na **Tabela 2.1**. De um modo geral, a clorose férrica diminuiu a produção de biomassa total quer expressa em peso fresco quer em peso seco. Enquanto que nos porta-enxertos ‘Troyer’ e *C. taiwanica* a biomassa total apenas diminuiu nas plantas das modalidades sem ferro ou com a

concentração mais baixa deste elemento (5 μM de Fe), no citrumeleiro ‘Swingle’ diminuiu para todas as concentrações em relação à concentração mais alta de ferro (20 μM de Fe).

A percentagem (%) de variação da biomassa total e parcial (parte aérea e raiz) foi semelhante para os três porta-enxertos, abrangendo valores entre os 64 % e os 89 % (Tabela 2.1). Os valores de variação mais elevados registaram-se no porta-enxerto ‘Swingle’ e no *C. taiwanica*, quando expressos respectivamente em peso fresco e peso seco. Em qualquer um dos porta-enxertos estudados, o decréscimo da biomassa total deveu-se a diminuições tanto ao nível da parte aérea como da parte radicular. As maiores percentagens de variação relativas à distribuição do peso seco entre a parte aérea e a radicular registaram-se no porta-enxerto *C. taiwanica* (- 277%). Por outro lado, os valores mais baixos foram obtidos no citrumeleiro ‘Swingle’ (- 28%) enquanto que a citranjeira ‘Troyer’ teve um comportamento intermédio (-77%).

Tabela 2.1 – Valores médios de biomassa total e parcial (parte aérea e parte radicular) observados nos três porta-enxertos de citrinos submetidos a diferentes concentrações de Fe na solução nutritiva, com CaCO_3 .

Fe (μM)	Peso fresco (g)			Peso seco (g)			Razões		
	parte aérea	raiz	total	parte aérea	raízes	total	RPA	RPR	RRPA
<i>citranjeira ‘Troyer’</i>									
0	1,0 b	0,7 b	1,6 b	0,3 b	0,3 b	0,5 b	0,6 a	0,5 a	1,0 a
5	1,5 b	1,0 b	2,5 b	0,4 b	0,3 b	0,7 b	0,6 a	0,4 a	0,8 a
10	3,5 a	2,2 a	5,6 a	1,0 a	0,6 a	1,5 a	0,6 a	0,4 a	0,6 a
15	3,1 a	1,8 a	5,0 a	0,9 a	0,6 a	1,5 a	0,6 a	0,4 a	0,7 a
20	3,3 a	2,1 a	5,5 a	0,9 a	0,6 a	1,5 a	0,6 a	0,4 a	0,6 a
(%)	72	69	71	73	64	70	17	26	-77
<i>Citrus taiwanica</i>									
0	0,6 c	0,3 c	0,9 c	0,1 b	0,1 c	0,2 b	0,4 b	0,6 a	1,1 a
5	0,7 c	0,4 c	1,0 c	0,4 b	0,2 bc	0,6 b	0,7 a	0,3 b	0,5 b
10	2,0 ab	0,6 b	2,6 ab	0,9 a	0,3 b	1,2 a	0,8 a	0,3 b	0,3 b
15	2,3 a	1,0 a	3,3 a	1,2 a	0,4 a	1,6 a	0,8 a	0,3 b	0,4 b
20	1,5 b	0,8 a	2,2 b	1,0 a	0,3 b	1,2 a	0,8 a	0,2 b	0,3 b
(%)	72	75	73	89	74	84	40	-144	-277
<i>citrumeleiro ‘Swingle’</i>									
0	0,5 b	0,3 b	0,81 b	0,2 b	0,1 b	0,3 b	0,6 a	0,4 a	0,6 a
5	0,6 b	0,4 b	1,00 b	0,2 b	0,1 b	0,3 b	0,6 a	0,4 a	0,7 a
10	1,0 b	0,6 b	1,59 b	0,3 b	0,2 b	0,6 b	0,6 a	0,4 a	0,7 a
15	1,2 b	0,8 b	2,07 b	0,3 b	0,2 b	0,5 b	0,7 a	0,4 a	0,6 a
20	2,9 a	1,9 a	4,81 a	0,8 a	0,4 a	1,3 a	0,6 a	0,4 a	0,5 a
(%)	82	85	83	75	71	73	9	-17	-28

Valores médios da razão entre a biomassa, expressa em peso seco (RPA – razão do peso da parte aérea; RPR – razão do peso radicular; RRPA – razão entre a parte radicular e a aérea). Valores de percentagem de variação (%) calculado entre o valor máximo e o valor mínimo obtidos para cada um dos parâmetros de crescimento apresentados. Para cada porta-enxerto e para parâmetro, médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes a 95% (teste de Duncan).

Independentemente da concentração de ferro na solução nutritiva, a principal contribuição para o peso seco total do porta-enxerto ‘Troyer’ e do ‘Swingle’ foi dada pela parte aérea, cerca de 60% (**Tabela 2.1**). Em relação ao porta-enxerto *C. taiwanica* esta tendência (74 % de contribuição da parte aérea) apenas se manteve nas modalidades em que se adicionou ferro à solução nutritiva, uma vez que na ausência de ferro na solução nutritiva foi a parte radicular que contribuiu mais para a biomassa total (57%). Conseqüentemente, a razão entre a parte radicular e a aérea (RRPA), expressa em peso seco foi nitidamente mais afectada no *C. taiwanica* do que nos outros porta-enxertos. Saliente-se ainda, que a distribuição dos fotoassimilados entre a parte aérea e a parte radicular, no ‘Swingle’, parece não ter sido afectada pela clorose férrica, uma vez que os valores de RRPA obtidos são similares entre si e portanto independentes da concentração de ferro na solução nutritiva.

O investimento dos diferentes porta-enxertos na biomassa da parte aérea ou da parte radicular, expresso pela razão entre a parte radicular e a parte aérea (RRPA), foi diferente consoante a concentração de ferro na solução nutritiva (**Figura 2.5**).

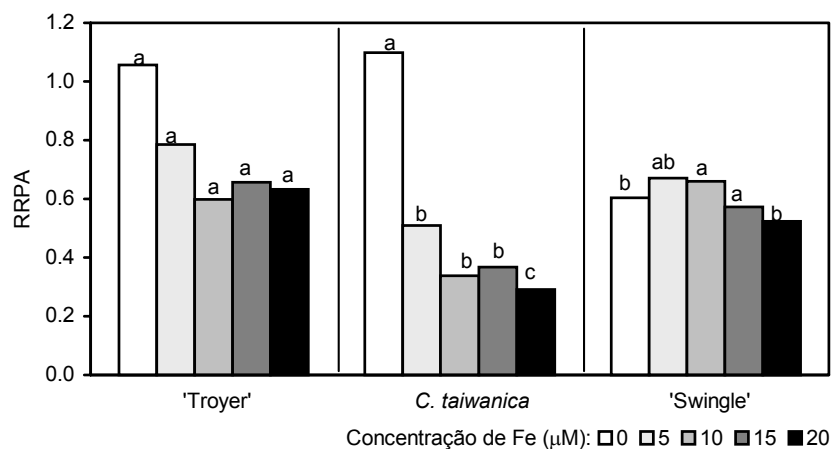


Figura 2.5 - Comparação entre cada um dos porta-enxertos estudados relativamente à razão entre a parte radicular e a aérea (RRPA), calculada com base no peso seco (g). Considerando cada uma das concentrações de ferro na solução nutritiva, colunas com a mesma letra não indicam diferenças significativas a 95% (teste Duncan).

As plantas de citranjeira ‘Troyer’ e de *C. taiwanica* que cresceram sem Fe apresentaram valores de RRPA significativamente superiores aos registados no citrumeleiro ‘Swingle’. Nas restantes modalidades, o *C. taiwanica* apresentou os valores mais baixos. Na modalidade correspondente a 20 µM de Fe os porta-enxertos tiveram um comportamento distinto, já que os

valores de RRPA obtidos foram decrescendo, significativamente, do ‘Troyer’ para o ‘Swingle’ e por fim para o *C. taiwanica*.

2.3.1.2. Clorofila total

No início do ensaio as plantas de citranjeira ‘Troyer’, de *Citrus taiwanica* e de citrumeleiro ‘Swingle’ apresentavam, respectivamente, uma concentração média de clorofila total de 409 ± 26 , 436 ± 5 e $243 \pm 26 \mu\text{mol m}^{-2}$.

A variação da clorofila total do porta-enxerto ‘Troyer’, ao longo do ensaio, está apresentada na **Figura 2.6**. Na primeira semana de ensaio registou-se um decréscimo na clorofila total das plantas sujeitas às concentrações mais baixas de ferro (0 e 5 μM de Fe), enquanto que nas plantas das outras modalidades se verificou um aumento da clorofila total até ao final do ensaio. A partir de 4ª data de leitura (25 de Março) a clorofila total apresentada pelas plantas das modalidades com 15 e 20 μM de Fe foi superior à das plantas com 10 μM de Fe. Os sintomas de clorose férrica surgiram primeiro nas plantas sem ferro e o decréscimo do teor de clorofila nestas plantas foi sempre mais acentuado, comparativamente às plantas com 5 μM de Fe na solução nutritiva.

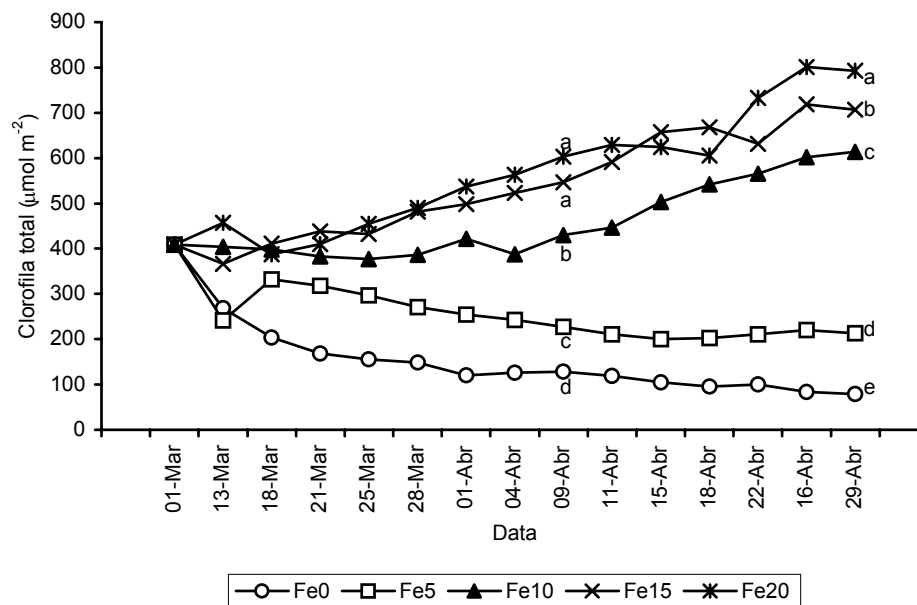


Figura 2.6 – Variação da clorofila total ($\mu\text{mol m}^{-2}$) do porta-enxerto citranjeira ‘Troyer’ ao longo do ensaio. A análise estatística apenas está apresentada em 2 datas. Médias com a mesma letra não apresentam diferenças significativas a 95% (teste de Duncan).

No final do ensaio, a clorofila total variou na razão directa com a concentração de ferro existente na solução nutritiva. Apenas se registaram cloroses intensas na ausência de ferro ou na concentração mais baixa de ferro na solução nutritiva.

A clorofila total das plantas de *Citrus taiwanica* das modalidades com 15 e 20 μM de Fe foi aumentando lentamente ao longo do ensaio (**Figura 2.7**), contrariamente às plantas das modalidades com 0 e 5 μM de Fe. O decréscimo mais acentuado verificou-se na ausência de ferro. Na modalidade com 10 μM de Fe, a clorofila diminuiu durante os primeiros 40 dias e depois aumentou até ao final do ensaio atingindo valores semelhantes aos das modalidades com 15 e 20 μM de Fe.

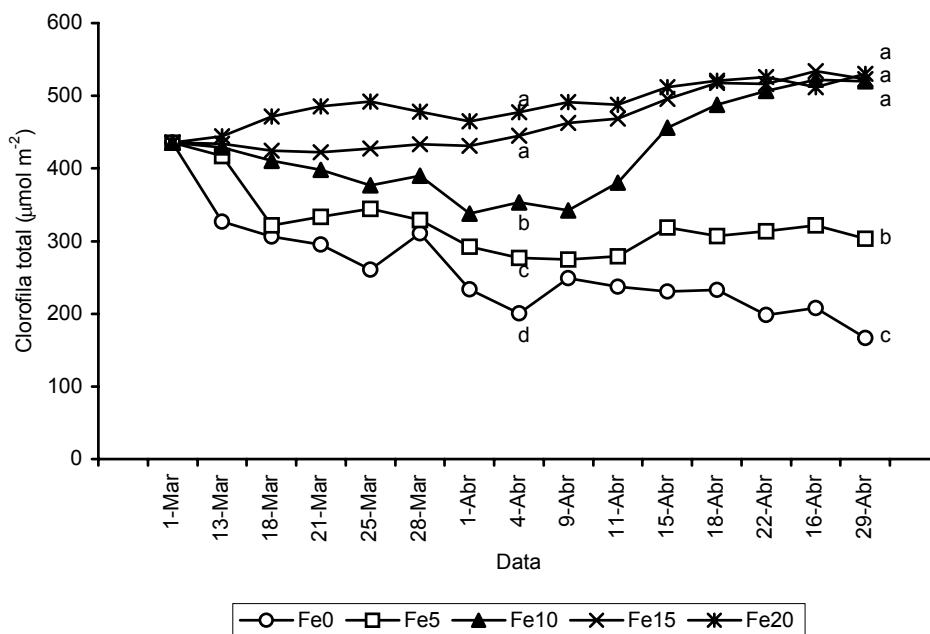


Figura 2.7 – Variação da clorofila total ($\mu\text{mol m}^{-2}$) do porta-enxerto *Citrus taiwanica* ao longo do ensaio. A análise estatística apenas está apresentada em 2 datas. Médias com a mesma letra não apresentam diferenças significativas a 95% (teste de Duncan).

No final do ensaio, os valores mais elevados de clorofila total foram registados para as plantas com 10, 15 e 20 μM de Fe na solução nutritiva e os mais baixos verificaram-se nas plantas sem ferro estando associados a cloroses intensas com algumas necroses. As plantas da modalidade com 5 μM de Fe apresentaram valores intermédios e expressavam sintomas de clorose fêrrica.

Na **Figura 2.8** está apresentada a variação da clorofila total do porta-enxerto ‘Swingle’, ao longo do ensaio. Nas primeiras semanas de ensaio, as plantas das três modalidades com maior

concentração de Fe apresentaram um acréscimo na clorofila total contrariamente ao decréscimo registado nas outras duas modalidades, o qual se manteve até ao final do ensaio. Entre a 5ª e a 7ª data de leitura, a clorofila total das plantas com 10, 15 e 20 μM de Fe decresceu acentuadamente, atingindo valores semelhantes aos verificados nas plantas das outras modalidades. A partir da 10ª data de medição apenas as plantas da modalidade com 20 μM de Fe recuperaram os valores iniciais e no final do ensaio eram as únicas que não apresentavam sintomas de clorose férrica. As plantas da modalidade com 15 μM de Fe na solução nutritiva apenas apresentavam sintomas moderados de clorose férrica.

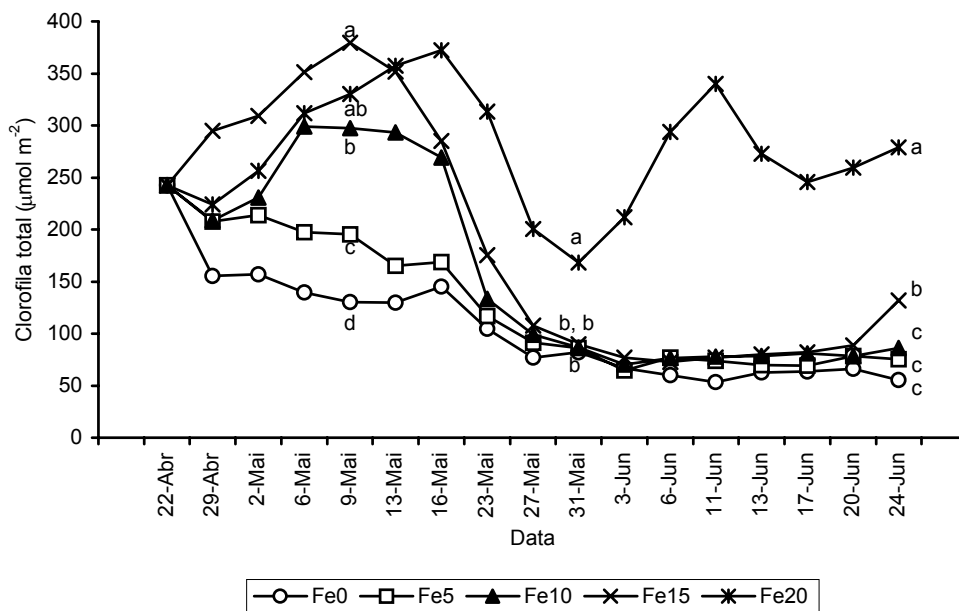


Figura 2.8 – Variação da clorofila total ($\mu\text{mol m}^{-2}$) do porta-enxerto citrumeleiro ‘Swingle’ ao longo do ensaio. A análise estatística apenas está apresentada em 3 datas. Médias com a mesma letra não apresentam diferenças significativas a 95% (teste de Duncan).

A percentagem (%) de variação da clorofila total ocorrida entre o princípio e o final do ensaio está apresentada na **Figura 2.9**, de forma a comparar os resultados obtidos com os três porta-enxertos.

Enquanto que os porta-enxertos ‘Troyer’ e *Citrus taiwanica* apresentaram um decréscimo de clorofila total em relação ao valor original apenas nas duas concentrações mais baixas de ferro (0 e 5 μM de Fe), o porta-enxerto ‘Swingle’ mostrou sempre variações negativas com exceção dos valores referentes à concentração mais alta de ferro (20 μM de Fe).

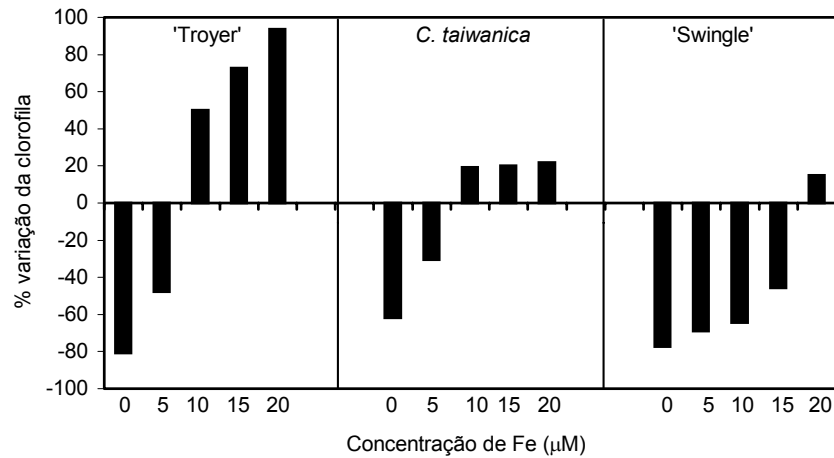


Figura 2.9 – Percentagem de variação da clorofila total entre o início (0 %) e o final do ensaio para cada um dos três porta-enxertos estudados (citraneira 'Troyer', *Citrus taiwanica* e citrumeleiro 'Swingle').

Nas restantes modalidades (10, 15 e 20 µM de Fe), os porta-enxertos 'Troyer' e *C. taiwanica*, apresentaram comportamentos diferentes. Enquanto que para o 'Troyer' a percentagem de variação da clorofila total relacionou-se directamente com a quantidade de ferro adicionada à solução nutritiva, no *C. taiwanica* a partir da modalidade com 10 µM de Fe os acréscimos de clorofila foram idênticos entre si e independentes da concentração de ferro na solução nutritiva. O 'Troyer' foi o porta-enxerto que apresentou, independentemente da modalidade, maiores percentagens de variação da clorofila total.

2.3.1.3. Fluorescência da clorofila *a*

O porta-enxerto 'Troyer' (**Figura 2.10a**) apresentou valores de fluorescência basal (F_0) iguais, independentemente da concentração de ferro na solução nutritiva. Relativamente ao *C. taiwanica* (**Figura 2.10b**) constatou-se que a F_0 decresceu progressivamente a partir da modalidade sem Fe, mantendo-se constante entre 10 e 20 µM de Fe.

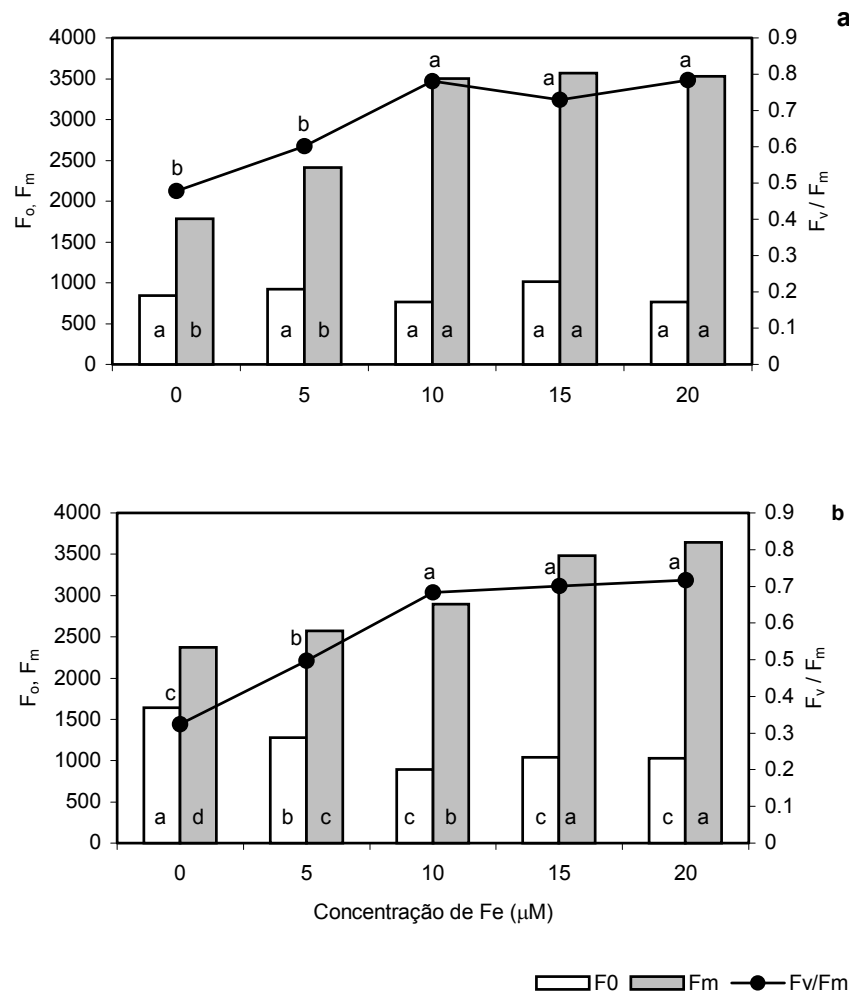


Figura 2.10 – Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* dos porta-enxertos citranjeira ‘Troyer’ (a) e *Citrus taiwanica* (b) para diferentes concentrações de ferro na solução nutritiva, obtidos no final do ensaio. F₀ – Fluorescência basal; F_m – Fluorescência máxima e F_v / F_m – Razão entre a fluorescência variável (F_v = F_m - F₀) e a fluorescência máxima. Considerando cada porta-enxerto e cada um dos parâmetros, colunas com a mesma letra não indicam diferenças significativas a 95% (teste de Duncan).

A fluorescência máxima (F_m) das plantas de citranjeira ‘Troyer’ que cresceram na ausência de Fe ou com 5 µM de Fe na solução nutritiva foi inferior à obtida nas restantes modalidades. Observou-se uma tendência semelhante para as plantas de *C. taiwanica* embora os valores de F_m para as concentrações mais baixas tenham sido ligeiramente superiores.

A razão F_v / F_m (fluorescência variável / fluorescência máxima) apresentou uma tendência similar nos dois porta-enxertos, os valores aumentaram das plantas sem Fe até às plantas com 10 µM de Fe, que apresentaram valores idênticos aos obtidos nas concentrações mais altas. No

entanto, os valores obtidos com o porta-enxerto ‘Troyer’ foram sempre superiores aos do *C. taiwanica*.

Na **Figura 2.11** estão apresentadas graficamente as correlações obtidas entre a razão F_v/F_m e a fluorescência máxima - F_m e entre a razão F_v/F_m e a fluorescência basal - F_o , para os dois porta-enxertos ‘Troyer’ e *Citrus taiwanica*.

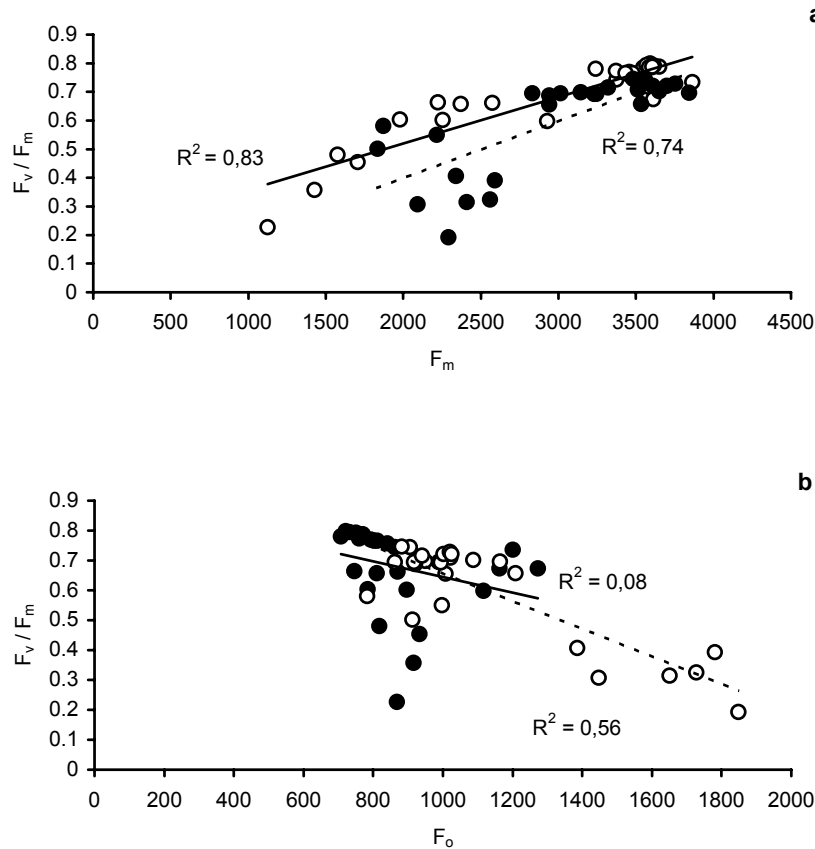


Figura 2.11 – Correlação entre a fluorescência máxima e a razão entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima **(a)** e correlação entre a fluorescência basal e a razão entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima **(b)**, para os porta-enxertos citranjeira ‘Troyer’ (●, —) e *Citrus taiwanica* (○, ---). F_o – Fluorescência basal; F_m – Fluorescência máxima e F_v / F_m – Razão entre a fluorescência variável ($F_v = F_m - F_o$) e a fluorescência máxima.

Para o porta-enxerto ‘Troyer’, cerca de 83% da variação dos valores da razão F_v / F_m foi explicada pela F_m . Por outro lado, a F_o não teve influência nessa variação, uma vez que o coeficiente de determinação obtido não foi significativo ($R^2=0,08$). A razão F_v/F_m obtida, para o porta enxerto *Citrus taiwanica*, dependeu da variação simultânea dos dois parâmetros, da

fluorescência basal (56 %) e da fluorescência máxima (74 %). Os valores de F_v/F_m foram directamente proporcionais à fluorescência máxima e inversamente proporcionais à fluorescência basal (**Figura 2.11, Tabela 2.2**).

Deste modo, os efeitos da clorose férrica na fluorescência da clorofila *a* diferiram face ao material vegetal em estudo. Enquanto que no porta-enxerto ‘Troyer’ estes efeitos se traduziram fundamentalmente por uma diminuição da F_m , no porta-enxerto *Citrus taiwanica* resultaram da diminuição da F_m e do aumento da F_o .

Na **Tabela 2.2** estão ainda apresentadas as equações de regressões lineares que permitem avaliar a influência da clorofila total na razão F_v / F_m , para cada um dos porta-enxertos, citranjeira ‘Troyer’ e *Citrus taiwanica*.

Tabela 2.2 – Equações de regressões lineares que permitem avaliar a influência dos parâmetros de fluorescência (máxima e basal) e da concentração da clorofila total na razão F_v / F_m para cada um dos porta-enxertos, citranjeira ‘Troyer’ (n=29) e *Citrus taiwanica* (n=25).

Equação	R ²	p
citranjeira ‘Troyer’		
$F_v / F_m = - 0,0003 * F_o + 0,91$	0,08	0,15
$F_v / F_m = 0,0002 * F_m + 0,20$	0,83	0,0001
$F_v / F_m = 0,0004 * Clf + 0,49$	0,59	0,0001
<i>Citrus taiwanica</i>		
$F_v / F_m = 0,0005 * F_o + 1,12$	0,56	0,0001
$F_v / F_m = 0,0002 * F_m + 0,003$	0,74	0,0001
$F_v / F_m = 0,0009 * Clf + 0,23$	0,76	0,0001

F_o – fluorescência basal; F_m – fluorescência máxima; F_v – fluorescência variável; Clf - concentração de clorofila total; R² - coeficiente de determinação; p – probabilidade.

A razão F_v / F_m correlacionou-se linear e positivamente com a clorofila total medida no final do ensaio. A percentagem de variação da razão F_v / F_m explicada pela clorofila total foi de aproximadamente 59 % para o porta-enxerto ‘Troyer’ e de 76 % para o *Citrus taiwanica*. Deste modo e para ambos os porta-enxertos, parte da variação da fluorescência pode ser também explicada pelo efeito da clorose férrica na clorofila total.

2.3.1.4. Teor nutritivo da parte aérea e da raiz

Os teores nutritivos, quer na parte aérea (pa) quer na raiz (r), de cada um dos porta-enxertos apresentam-se agrupados por macronutrientes (P, K, Ca e Mg) e micronutrientes (Fe, Mn, Zn e Cu).

• **Macronutrientes**

Na **Figura 2.12** estão apresentadas as relações entre os teores médios de P, K, Ca e Mg determinados na parte aérea de cada um dos porta-enxertos e a concentração de Fe (μM) na solução nutritiva.

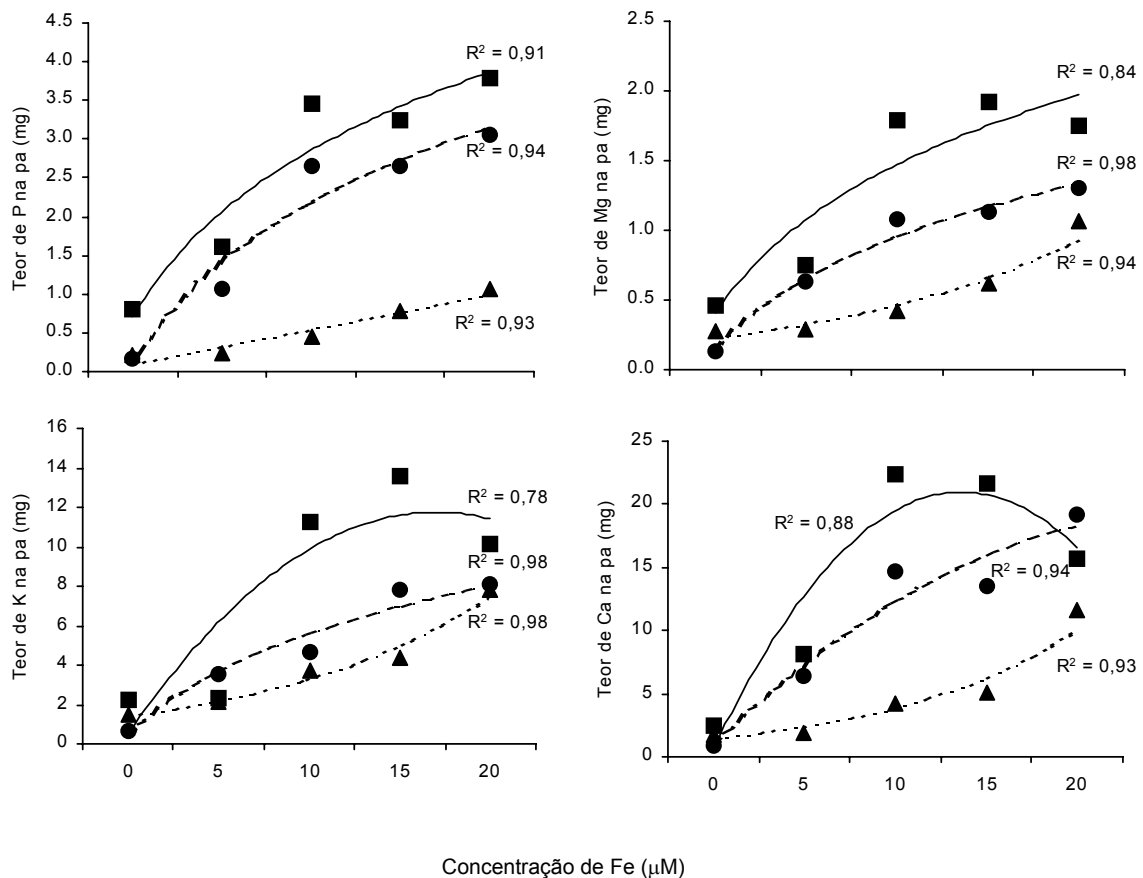


Figura 2.12 – Correlações entre os teores (mg) de P, K, Ca e Mg existentes na parte aérea e a concentração de ferro (μM) na solução nutritiva para cada um dos porta-enxertos: citranjeira ‘Troyer’ (■, —), *Citrus taiwanica* (●, ----) e citrumeleiro ‘Swingle’ (▲,).

Em relação às concentrações crescentes de Fe, os teores médios de P, K, Ca e Mg dos porta-enxertos ‘Troyer’ e *C. taiwanica* apresentaram uma tendência idêntica entre si mas diferente da registada para o ‘Swingle’.

Para qualquer um dos porta-enxertos, as plantas que cresceram na ausência de Fe apresentaram sempre teores nutritivos de K, Ca e Mg na parte aérea muito semelhantes entre si. Nas restantes modalidades, o porta-enxerto ‘Troyer’ apresentou os valores mais altos, o ‘Swingle’ os mais baixos e o *C. taiwanica*, valores intermédios.

De um modo geral, as relações obtidas entre as diferentes modalidades e o teor nutritivo radicular foram semelhantes às obtidas na parte aérea e estão apresentadas na **Figura 2.13**.

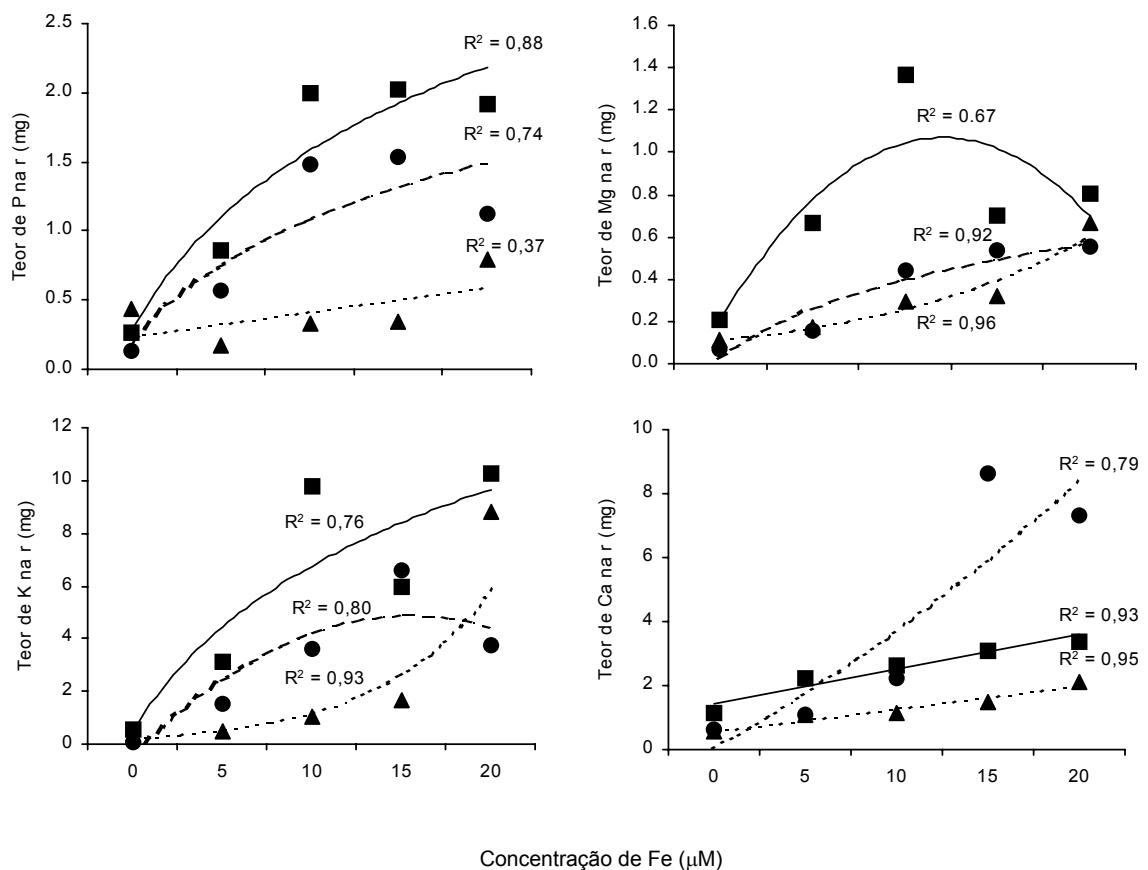


Figura 2.13 – Correlações entre os teores (mg) de P, K, Ca e Mg existentes na raiz e a concentração de ferro (µM) na solução nutritiva para cada um dos porta-enxertos: citranjeira ‘Troyer’ (■, —), *Citrus taiwanica* (●, ----) e citrumeleiro ‘Swingle’ (▲,).

Com exceção do Ca, em que todos os porta-enxertos apresentaram relações linearmente crescentes, observou-se que os teores nutritivos existentes na raiz do porta-enxerto ‘Troyer’ e do *C. taiwanica* apresentaram sempre relações quadráticas ou logarítmicas com a concentração de Fe na solução nutritiva, tendendo portanto para um patamar. Contrariamente e dentro dos valores amostrados, o ‘Swingle’ apresentou sempre relações lineares ou exponenciais. Nas plantas que cresceram sem Fe na solução nutritiva os teores dos macronutrientes P, K, Mg e Ca, foram iguais em qualquer dos porta enxertos estudados.

As plantas dos porta-enxertos *C. taiwanica* e citranjeira ‘Troyer’ apresentaram um aumento dos teores radiculares de P superior ao das plantas de citrumeleiro ‘Swingle’. Na modalidade com 20 μM de Fe na solução nutritiva, os teores radiculares de Mg das plantas de citranjeira ‘Troyer’ decresceram e igualaram os valores observados nas plantas de *C. taiwanica* e o ‘Swingle’. Nas restantes modalidades o teor de Mg foi equivalente para o *C. taiwanica* e o ‘Swingle’, tendo o ‘Troyer’ apresentado sempre valores mais altos. Os teores mais baixos de K observaram-se nas plantas de citrumeleiro ‘Swingle’, exceptuando-se a modalidade com 20 μM de Fe, onde o valor mais baixo foi obtido para as plantas de *C. taiwanica*. Os teores de Ca na raiz do porta-enxerto ‘Swingle’ foram mais baixos que os registados nos restantes porta-enxertos. Nas plantas das duas modalidades com mais ferro (15 e 20 μM de Fe) o *C. taiwanica* teve valores de Ca muito superiores aos dos outros porta-enxertos o que acentuou o declive desta relação.

- **Micronutrientes**

Na **Figura 2.14** estão apresentadas as correlações obtidas entre os teores médios de Fe, Mn, Cu e Zn existentes na parte aérea e a concentração de Fe (μM) na solução nutritiva, para cada um dos porta-enxertos.

Na ausência de Fe na solução nutritiva, e para qualquer um dos micronutrientes, o porta-enxerto citranjeira ‘Troyer’ apresentou sempre teores superiores aos outros dois porta-enxertos. Com o aumento de Fe na solução nutritiva, a tendência manteve-se, tendo as plantas de citranjeira ‘Troyer’ apresentado sempre valores superiores (dos teores de Fe, Zn e Mn) aos das plantas de citrumeleiro ‘Swingle’ e de *C. taiwanica* que por sua vez apresentaram um comportamento intermédio. A dependência entre o teor de Cu na parte aérea e a concentração de Fe na solução nutritiva foi pequena, comprovada pelos baixos coeficientes de determinação obtidos.

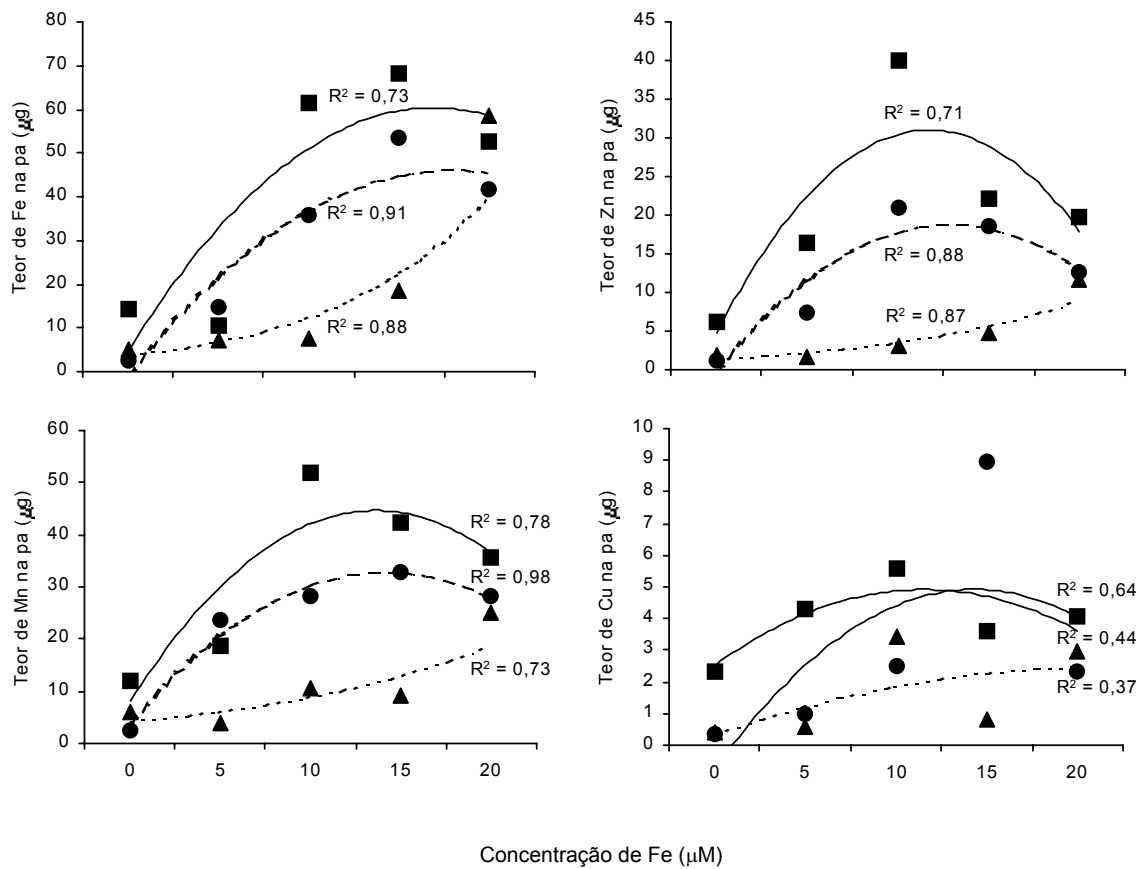


Figura 2.14 – Correlações entre os teores (μg) de Fe, Mn, Cu e Zn existentes na parte aérea e a concentração de ferro (μM) na solução nutritiva para cada um dos porta-enxertos: citranjeira ‘Troyer’ (■, —), *Citrus taiwanica* (●, ----) e citrumeleiro ‘Swingle’(▲,).

A quantidade de Fe existente na parte aérea das plantas de citrumeleiro ‘Swingle’ aumentou exponencialmente com o acréscimo de Fe na solução nutritiva, enquanto que as plantas dos outros porta-enxertos apresentaram um decréscimo na concentração mais alta.

Ao nível dos teores de micronutrientes existentes na raiz, as diferenças de comportamento dos três porta-enxertos acentuaram-se face à concentração de ferro na solução nutritiva (**Figura 2.15**). Comparativamente com a parte aérea, enquanto que os teores radiculares de Fe obtidos no *C. taiwanica* mantiveram a tendência logarítmica, no ‘Troyer’ estes valores foram directamente proporcionais às concentrações de Fe na solução nutritiva e de um modo geral, superiores aos dos outros porta-enxertos.

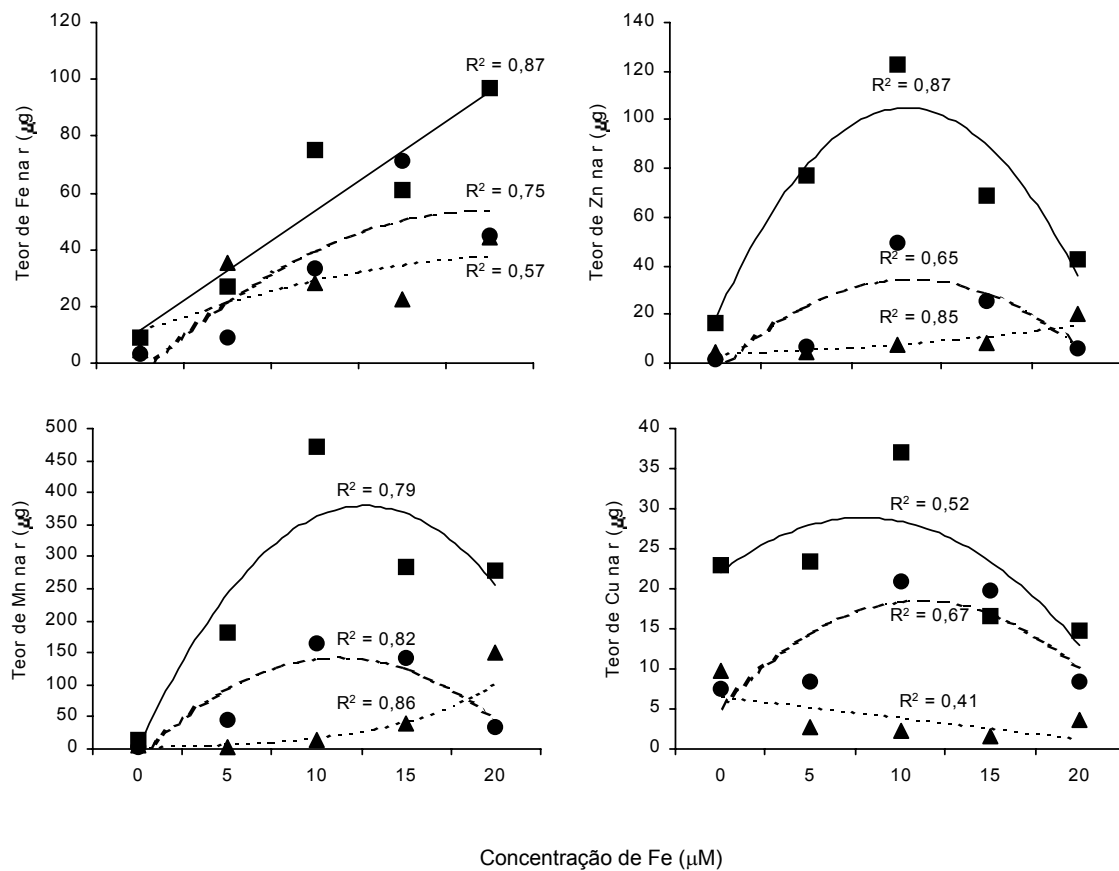


Figura 2.15 – Correlações entre os teores (µg) de Fe, Mn, Cu e Zn existentes na raiz e a concentração de ferro (µM) na solução nutritiva para cada um dos porta-enxertos: citranjeira ‘Troyer’ (■, —), *Citrus taiwanica* (●, ----) e citrumeleiro ‘Swingle’(▲,).

A relação obtida entre o teor radicular de Zn e o de Mn e a concentração de Fe na solução nutritiva foi semelhante para cada um dos porta-enxertos. O ‘Swingle’ apresentou teores crescentes com o aumento da concentração de Fe e inferiores aos obtidos nos restantes porta-enxertos. Por outro lado, o ‘Troyer’ e o *C. taiwanica* apresentaram uma relação que se traduziu por uma função quadrática positiva, com o valor máximo na concentração de 10 µM de Fe na solução nutritiva. O ‘Troyer’ apresentou os teores de Zn e Mn mais altos e o *C. taiwanica* intermédios aos dos outros dois porta-enxertos. A tendência destes dois porta-enxertos (‘Troyer’ e *C. taiwanica*) manteve-se para os teores de Cu mas o ‘Swingle’ apresentou uma relação linear e inversamente proporcional à concentração de Fe na solução nutritiva.

2.3.1.5. Distribuição dos teores nutritivos entre a parte aérea e a raíz

A análise do distribuição dos nutrientes entre a parte aérea e a parte radicular traduziu-se pela razão entre o teor existente na parte aérea e o teor existente na raíz, para o mesmo nutriente.

• **Macronutrientes**

Da análise da **Figura 2.16** salienta-se que todos os macronutrientes (P, K, Ca e Mg) se acumularam preferencialmente na parte aérea (razão entre parte aérea e raíz > 1).

A distribuição do P entre a parte aérea e a raíz para além de dependente da concentração de Fe na solução nutritiva foi diferente em cada um dos porta-enxertos. Ambos os porta-enxertos, ‘Swingle’ e ‘Troyer’, apresentaram relações quadráticas mas diferentes, respectivamente positiva e negativa, enquanto que o *C. taiwanica* teve uma relação linear e directamente proporcional.

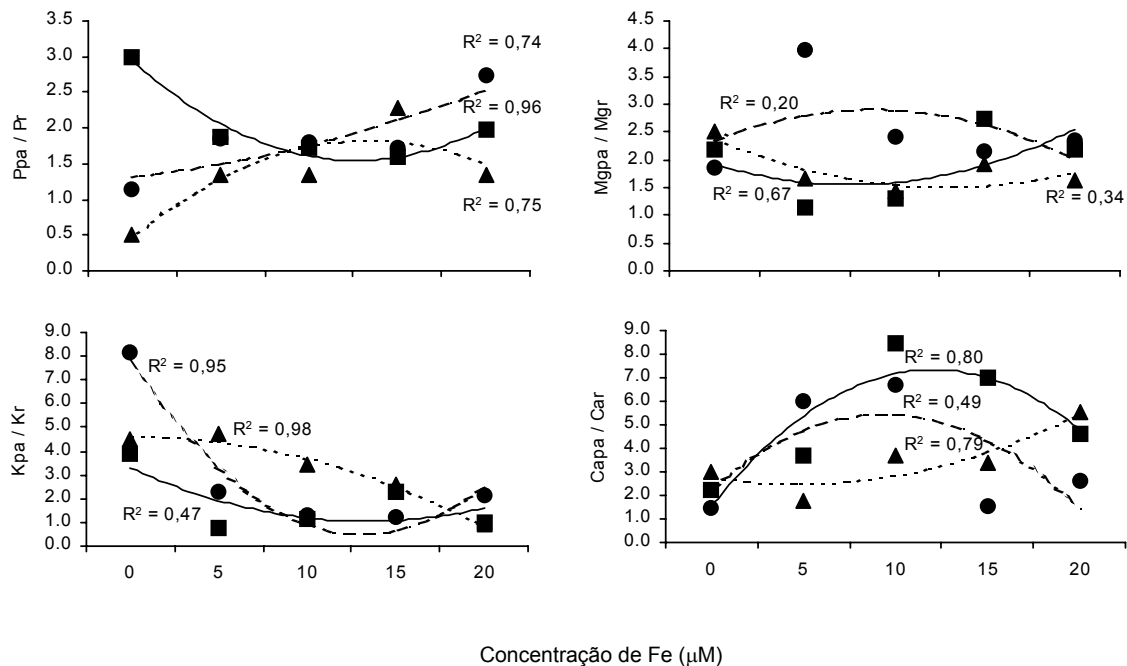


Figura 2.16 – Correlações entre as razões nutritivas (teores de P, K, Ca e Mg existentes na parte aérea -pa e o mesmo nutriente na raíz -r) e a concentração de ferro (µM) na solução nutritiva, para cada um dos porta-enxertos: citranjeira ‘Troyer’ (■, —), *Citrus taiwanica* (●, ----) e citrumeleiro ‘Swingle’ (▲,).

Independentemente do material vegetal, a partição do Mg entre a parte aérea e a raiz apresentou coeficientes de determinação baixos não estando portanto, dependente da concentração de Fe disponível na solução nutritiva. Por outro lado, os teores de K na parte aérea foram inversamente proporcionais à concentração de Fe na solução nutritiva e decresceram para valores próximos de 1 nas concentrações mais altas, tendendo para uma distribuição equilibrada entre a parte aérea e a raiz dos porta-enxertos citrumeleiro ‘Swingle’ e *C. taiwanica*. O teor de K do porta-enxerto ‘Troyer’ foi pouco afectado pelas modalidades testadas. O Ca apresentou uma distribuição oposta à do K, já que os valores mais baixos se registaram nas plantas cloróticas.

• **Micronutrientes**

Contrariamente aos macronutrientes, os teores dos micronutrientes (Fe, Mn, Zn e Cu) foram de um modo geral superiores na raiz (razão < 1), em qualquer um dos porta-enxertos estudados (Figura 2.17).

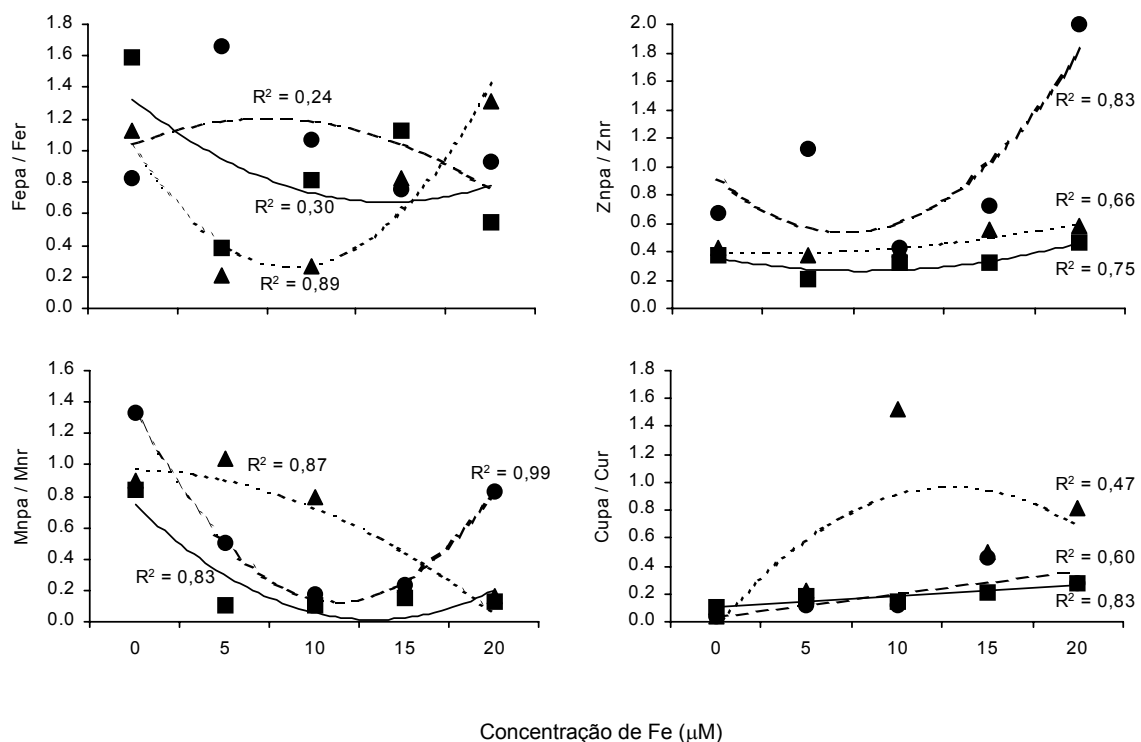


Figura 2.17 – Correlações entre as razões nutritivas (teores de Fe, Mn, Cu e Zn existentes na parte aérea – pa e o mesmo nutriente na raiz -r) e a concentração de ferro (µM) na solução nutritiva, para cada um dos porta-enxertos: citranjeira ‘Troyer’ (■, —), *Citrus taiwanica* (●, ----) e citrumeleiro ‘Swingle’ (▲,).

Tanto no porta-enxerto ‘Troyer’ como no *C. taiwanica* não se verificou qualquer tendência de distribuição do Fe entre a parte aérea e a raiz proporcionalmente à concentração de Fe na solução, já que os coeficientes de determinação obtidos entre estes parâmetros foram sempre inferiores a 0,30. Por outro lado, nas plantas de ‘Swingle’ e à medida que se adicionou Fe à solução nutritiva, este elemento acumulou-se preferencialmente na raiz atingindo o valor mais baixo para 10 µM de Fe, a partir do qual os valores aumentaram até à modalidade com mais Fe.

À medida que a concentração de Fe aumentou na solução nutritiva o Mn passou a acumular-se preferencialmente na raiz nas plantas de ‘Swingle’, passando a razão entre o teor de Mn na parte aérea e o teor de Mn na raiz (Mn_{pa} / Mn_r) de 0,9 para 0,1. Para os outros porta-enxertos a tendência é semelhante, mas mais acentuada. As plantas do porta-enxerto *C. taiwanica*, na concentração mais alta de Fe, apresentaram uma distribuição de Mn equitativa entre a parte aérea e a raiz e portanto com valores próximo da unidade.

A partição do Cu e do Zn entre a parte aérea e a raiz traduziu-se por razões directamente proporcionais à concentração de Fe na solução nutritiva. A curva de distribuição do Cu e do Zn permitiu diferenciar alguns dos porta-enxertos estudados. Assim, a partição do Zn entre a parte aérea e a raiz foi diferente no *C. taiwanica* enquanto que a do Cu foi diferente no ‘Swingle’.

2.3.1.6. Relação entre o equilíbrio nutritivo da parte aérea e a clorofila total

As relações obtidas entre o grau de clorose, expresso pela clorofila total, e o equilíbrio nutritivo da parte aérea traduzido por razões entre o teor de alguns nutrientes, estão apresentadas na **Figura 2.18** para cada um dos porta-enxertos.

Da análise da figura salienta-se que os valores de clorofila total obtidos para as diferentes concentrações de Fe na solução nutritiva correlacionaram-se de modo diferente com o equilíbrio nutritivo da parte aérea de cada um dos porta-enxertos.

A razão Fe/Mn foi a única que se relacionou significativamente com a clorofila total, em todos os porta-enxertos. De qualquer modo, o ‘Swingle’ apresentou uma curvatura inversa à dos outros porta-enxertos.

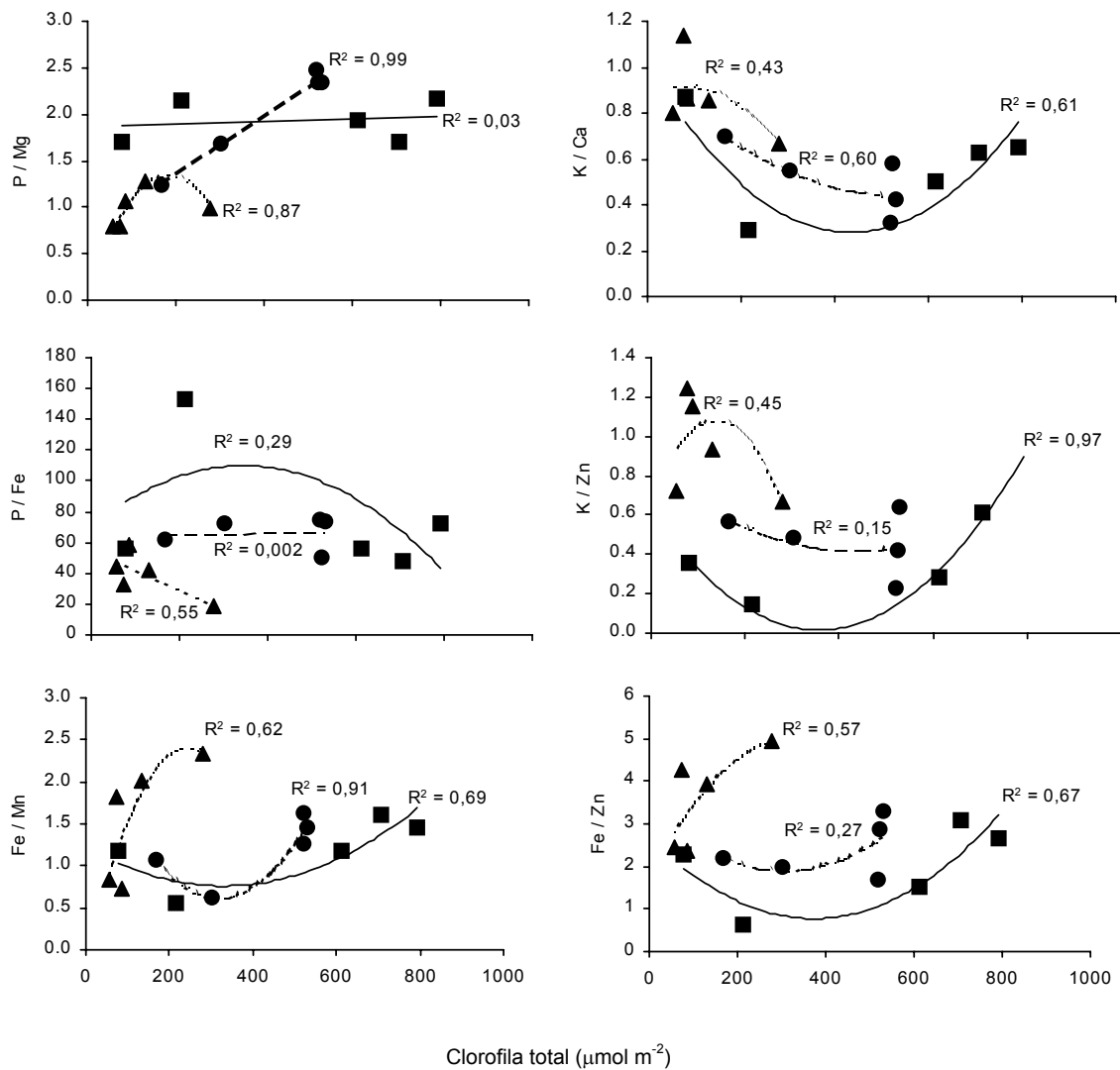


Figura 2.18 – Correlações entre as razões nutritivas (P/Mg, K/Ca, P/Fe, K/Zn, Fe/Mn e Fe/Zn) e a clorofila total (µmol m⁻²) em cada um dos porta-enxertos obtida, no final do ensaio: citranjeira ‘Troyer’ (■, —), *Citrus taiwanica* (●, ----) e citrumeleiro ‘Swingle’ (▲,).

Considerando cada um dos porta-enxertos, os melhores coeficientes de determinação foram obtidos com a razão P/Mg para o porta-enxerto *C. taiwanica*, K/Zn para o ‘Troyer’ e Fe/Mn seguida da razão P/Mg para o ‘Swingle’.

2.3.2. Ensaio 2

2.3.2.1. Altura e peso seco da parte aérea

Na **Figura 2.19** está apresentada a altura e o peso seco da parte aérea das plantas de laranjeira da cultivar ‘Newhall’, registados no final do ensaio, que permaneceram em diferentes concentrações de Fe na solução nutritiva, com e sem carbonato de cálcio.

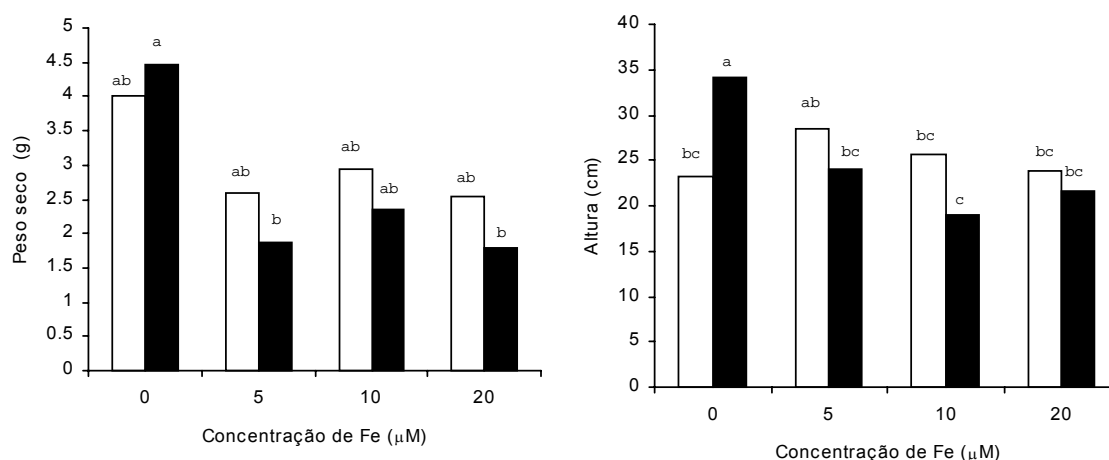


Figura 2.19 – Peso seco (g) das folhas e altura (cm) das plantas de laranjeira, cv. ‘Newhall’, no final do ensaio, sujeitas a diferentes concentrações de ferro com (colunas pretas) e sem carbonato de cálcio (colunas brancas). Comparando as diferentes modalidades, colunas com a mesma letra não indicam diferenças significativas a 95% (teste de Duncan).

As plantas que apresentaram maior altura da parte aérea e o maior peso seco foliar foram as que cresceram na solução nutritiva sem ferro e com carbonato de cálcio. Em relação às plantas das restantes modalidades não se registaram diferenças significativas.

2.3.2.2. Clorofila total

Nas primeiras três datas de observação a concentração de clorofila total das folhas recentemente desenvolvidas foi idêntica para todas as modalidades, com uma média de $747,5 \pm 8,1 \mu\text{mol m}^{-2}$. A partir desta data, observou-se um acentuado decréscimo na clorofila total das plantas colocadas em solução nutritiva sem Fe e com 5 μM de Fe (**Figura 2.20**), coincidente com o

aparecimento dos sintomas de clorose fêrrica que permaneceram até ao final do ensaio. Nas plantas cultivadas em solução nutritiva com 5 μM de Fe o decréscimo na clorofila total ocorreu entre a 5ª e a 6ª data de observação, tanto na presença como na ausência de CaCO_3 . O decréscimo na clorofila total foi mais rápido na presença de CaCO_3 , atingindo valores semelhantes aos registados na ausência de ferro logo a partir da 7ª data de observação.

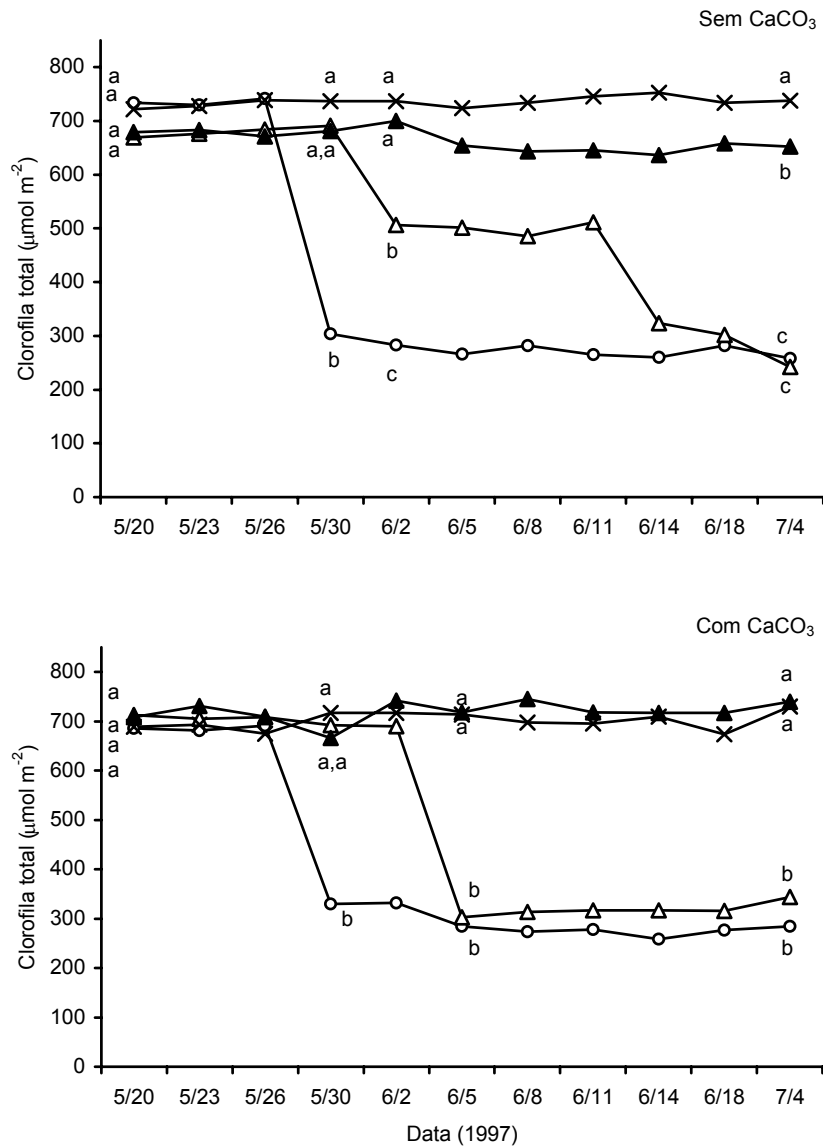


Figura 2.20 – Variação da clorofila total ($\mu\text{mol m}^{-2}$) ao longo do ensaio nas folhas recentemente desenvolvidas de plantas de laranja cv. ‘Newhall’ com diferentes concentrações de ferro na solução nutritiva: 0 μM Fe, (o); 5 μM Fe, (Δ); 10 μM Fe, (\blacktriangle); 20 μM Fe, (\times). Em ambos os gráficos, a análise estatística apenas está apresentada em quatro datas. Para cada data, médias com a mesma letra não são significativamente diferente para 95% (teste de Duncan).

No final do ensaio, a concentração foliar de clorofila total das plantas que cresceram nas modalidades sem Fe e com 5 μM de Fe foi idêntica (314 $\mu\text{mol m}^{-2}$). Não se registaram sintomas de clorose férrica nas plantas das restantes modalidades (10 ou 20 μM de Fe na solução nutritiva). Contudo, nas últimas semanas de ensaio, as plantas da modalidade com 10 μM de Fe na solução nutritiva (sem CaCO_3) apresentaram uma pequena, mas significativa, diminuição nos valores de clorofila total quando comparados com os registados nas plantas que cresceram nas concentrações 20 μM de Fe. Todavia, este decréscimo não se registou na presença do carbonato de cálcio.

2.3.2.3. Parâmetros de fluorescência da clorofila *a*

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* obtidos no final do ensaio estão apresentados na **Tabela 2.3**. Na ausência de CaCO_3 , a razão F_v / F_m foi similar em todas as modalidades. Contudo, nas plantas que cresceram com CaCO_3 na solução nutritiva, a razão F_v / F_m foi ligeiramente inferior nas plantas sem ferro quando comparadas com as plantas que cresceram com a concentração mais alta de ferro (20 μM de Fe) na solução nutritiva.

Tabela 2.3 – Eficiência fotossintética do PSII (razão F_v / F_m) em folhas recentemente desenvolvidas das plantas de ‘Newhall’ sujeitas a diferentes concentrações de ferro na solução nutritiva, com e sem carbonato de cálcio. As medições foram efectuadas no final do ensaio (7 semanas).

Fe (μM)	F_v/F_m	
	Sem CaCO_3	Com CaCO_3
0	0,78 a	0,78 b
5	0,78 a	0,79 ab
10	0,80 a	0,80 ab
20	0,79 a	0,82 a

Para cada coluna, médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes a 95% de probabilidade (teste de Duncan).

Relativamente à fluorescência máxima (F_m) e à fluorescência basal (F_o) não se verificaram diferenças significativas entre modalidades, tanto na presença como na ausência de CaCO_3 . Nas plantas que cresceram nas modalidades com CaCO_3 , os valores médios de F_m foram 2721 ± 181 e

os de F_o , 564 ± 7 . Por outro lado, na ausência de CaCO_3 os valores foram de 2768 ± 250 para a F_m e de 564 ± 20 para a F_o .

2.3.2.4. Capacidade fotossintética

A capacidade fotossintética no final do ensaio e referida a cada uma das diferentes modalidades, está apresentada na **Figura 2.21**.

As plantas que cresceram sem ferro apresentaram sempre uma menor capacidade fotossintética em relação à das plantas que cresceram nas soluções nutritivas com as concentrações mais elevadas de Fe (10 e 20 μM de Fe).

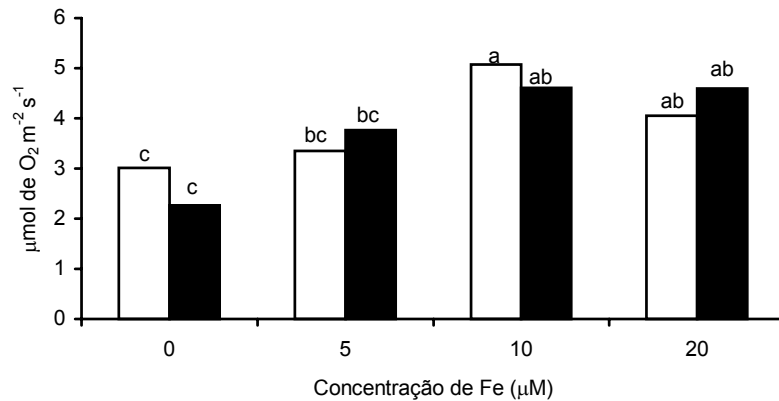


Figura 2.21 – Capacidade fotossintética ($\mu\text{mol de O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) das plantas de laranjeira cv. ‘Newhall’ enxertadas em citranjeira ‘Troyer’, para as diferentes modalidades no final do ensaio, na presença (colunas pretas) e na ausência (colunas brancas) de carbonato de cálcio na solução nutritiva. Colunas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas a 95% (teste de Duncan).

A existência de uma correlação significativa entre a capacidade fotossintética e a clorofila total foi constatada nas folhas recentemente desenvolvidas das plantas que cresceram com CaCO_3 na solução nutritiva (**Figura 2.22**). Contudo, para as plantas das modalidades sem CaCO_3 a correlação não foi significativa ($R^2 = 0,16$).

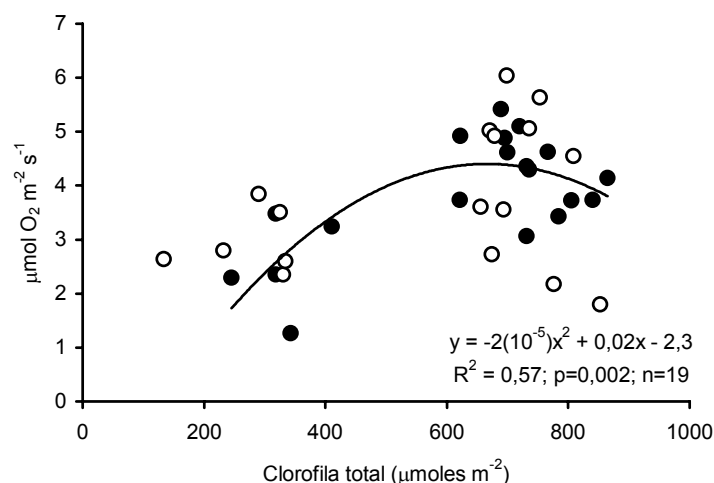


Figura 2.22 – Correlação entre a capacidade fotossintética ($\mu\text{mol de O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a concentração de clorofila total em folhas recentemente desenvolvidas das plantas de laranjeira cv. ‘Newhall’ sujeitas a diferentes concentrações de ferro, no final do ensaio. Na presença de CaCO_3 (círculos pretos) e na ausência de CaCO_3 (círculos brancos). A equação refere-se às plantas das modalidades com CaCO_3 (círculos pretos, -).

2.3.2.5. Actividade da quelato de Fe(III)-redutase

A morfologia externa das raízes das plantas de laranjeira da cultivar ‘Newhall’, enxertadas em citranjeira ‘Troyer’, que cresceram nas modalidades sem ferro ou com $5 \mu\text{M}$ de Fe na solução nutritiva foi bastante distinta da observada para as restantes modalidades.

As raízes eram menores, apresentavam-se menos ramificadas e portanto com uma densidade inferior. Por sua vez, os ápices laterais apresentavam uma zona subapical dilatada, com cerca de 2 a 4 mm de comprimento. Após a determinação da actividade da quelato de Fe(III)-redutase (QF-R) esta zona permanecia com uma coloração rosa forte, característica do complexo Fe(II)-BPDS, e identificando os possíveis locais de redução do ferro conforme ilustrado pela fotografia apresentada na **Figura 2.23**.

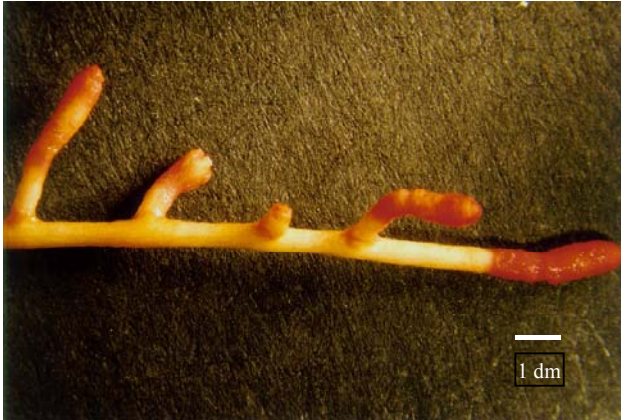


Figura 2.23 – Fotografia ilustrativa da alteração morfológica apresentada pelos ápices radiculares das plantas de laranjeira que cresceram sem Fe ou com 5 μM de Fe na solução nutritiva. Ampliação: 6x.

Os valores de actividade da QF-R na presença do substrato Fe(III)-EDTA, medida no final do ensaio em ápices radiculares de cada uma das modalidades está apresentada na **Figura 2.24**.

Para as duas concentrações mais baixas de ferro (0 e 5 μM de Fe) na solução nutritiva, a presença de carbonato de cálcio induziu aumentos significativos na actividade da QF-R (aproximadamente 2,5 vezes), comparativamente às plantas que cresceram nas concentrações mais altas de Fe (10 e 20 μM de Fe). Saliente-se que, nas condições de ensaio, este acréscimo da actividade apenas se verificou na presença de CaCO_3 .

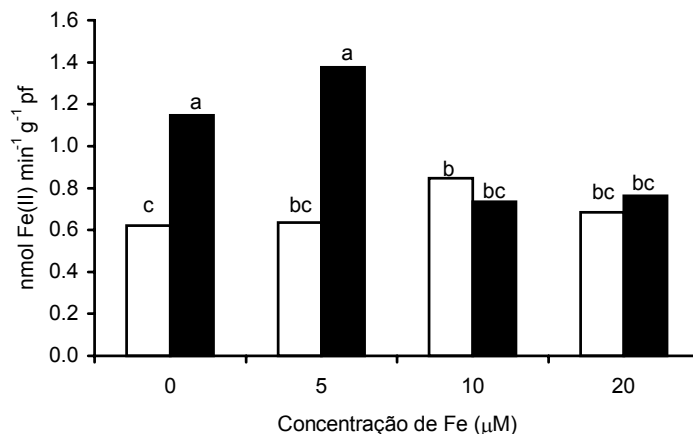


Figura 2.24 – Taxa de redução do ferro, expressa em $\text{nmol de Fe(II) min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de peso fresco (pf), das raízes de plantas de laranjeira cv. ‘Newhall’ enxertadas em citranjeira ‘Troyer’. Considerando a presença (colunas pretas) ou não (colunas brancas) de carbonato de cálcio na solução nutritiva, colunas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas a 95% (teste de Duncan).

2.3.2.6. Análise nutritiva

Na **Tabela 2.4** apresentam-se os valores médios dos elementos nutritivos analisados nas folhas, para cada uma das modalidades estudadas.

Independentemente da presença ou não do CaCO_3 na solução nutritiva, as diferentes concentrações de Fe na solução nutritiva tiveram um efeito significativo na concentração foliar de P, K, Ca e Mn, assim como na razão K/Ca. Verificou-se ainda, um efeito significativo na concentração foliar de Zn, para as modalidades sem CaCO_3 e na concentração de Mg e na razão Fe/Zn, nas modalidades com CaCO_3 . Nestes nutrientes, as concentrações mais baixas registaram-se sempre nas modalidades sem ferro. A concentração dos restantes elementos nutritivos nas folhas não foi afectada pela concentração de Fe na solução nutritiva. Refira-se que a concentração foliar de ferro foi independente das modalidades testadas neste ensaio.

Tabela 2.4 – Composição mineral das folhas de laranjeira, no final do ensaio.

Fe (μM)	P ----- g kg ⁻¹ ps	K ----- g kg ⁻¹ ps	Ca ----- ps	Mg -----	Zn ----- mg kg ⁻¹ ps	Fe ----- mg kg ⁻¹ ps	Cu ----- ps	Mn -----	P/Fe	K/Ca	Fe/Mn	Fe/Zn
Sem CaCO_3												
0	1,5 b	17 b	14 b	1,9 a	171 b	149 a	17 a	43 b	1,1 a	1,3 a	3,5 a	0,9 a
5	2,5 a	23 a	17 b	2,2 a	316 a	156 a	27 a	65 a	1,6 a	1,4 a	2,4 a	0,5 a
10	3,2 a	23 a	29 a	2,3 a	238 ab	181 a	11 a	54 a	1,7 a	0,8 b	3,4 a	0,8 a
20	3,2 a	20 a	17 b	2,3 a	249 ab	170 a	18 a	50 a	1,5 a	1,2 a	3,4 a	0,7 a
Com CaCO_3												
0	1,7 b	18 b	12 b	2,0 b	150 a	152 a	12 a	41 b	1,2 a	1,4 a	3,7 a	1,0 a
5	2,2 b	20 a	18 ab	2,2 ab	255 a	187 a	25 a	57 ab	1,3 a	1,1 bc	3,3 a	0,7 ab
10	2,3 ab	22 a	17 ab	2,4 a	243 a	148 a	13 a	54 ab	1,6 a	1,3 ab	2,7 a	0,6 b
20	3,0 a	23 a	25 a	2,3 ab	305 a	249 a	16 a	80 a	1,2 a	0,9 c	3,1 a	0,8 ab

ps – peso seco. Comparando as concentrações de Fe, na presença ou na ausência de carbonato de cálcio, médias seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes a 95% (teste de Duncan).

Nas modalidades sem CaCO_3 , a concentração foliar de P, K, Zn e de Mn apenas foi significativamente inferior nas plantas sem Fe. O Ca apresentou sempre valores mais baixos com excepção da modalidade com 10 μM de Fe, onde se registou o valor mais elevado. Consequentemente a razão K/Ca foi inferior para esta concentração de Fe.

A presença de CaCO_3 acentuou o efeito da concentração de ferro da solução nutritiva na composição mineral das folhas. De um modo geral, os valores nutritivos máximos apenas foram alcançados na concentração mais alta de ferro (20 μM de Fe), excepção feita ao potássio, que só

foi afectado na ausência de ferro. Em relação às razões entre nutrientes, a razão K/Ca teve uma tendência geralmente inversa à das concentrações de ferro na solução nutritiva. A razão Fe/Zn, apresentou diferenças entre as plantas com 10 μM de Fe e as sem Fe, sendo estes últimos valores superiores.

2.4. DISCUSSÃO

A análise dos dados experimentais recolhidos no presente capítulo sugere que as diferentes respostas do material vegetal estão associadas com o nível de tolerância à clorose férrica induzida. Constatou-se que a clorose férrica afecta diversos parâmetros fisiológicos tanto ao nível da parte aérea como da raiz das espécies cítricas estudadas.

2.4.1. Parâmetros de crescimento

No **ensaio 1**, os três porta-enxertos de citrinos (citraneira ‘Troyer’, *Citrus taiwanica* e citrumeleiro ‘Swingle’) responderam à clorose férrica induzida através da diminuição da altura e da produção de biomassa total à semelhança do observado para outras espécies (Abadía *et al.*, 1989; Nenova e Stoyanov, 1993; Marschner *et al.*, 1996).

Os resultados obtidos em relação à altura da parte aérea evidenciaram comportamentos distintos entre os três porta-enxertos, particularmente para as concentrações de 10, 15 e 20 μM de Fe, já que as diferenças observadas indicaram um crescimento significativo do ‘Troyer’ comparativamente ao dos outros porta-enxertos, contrariando os efeitos do ião bicarbonato existente na solução nutritiva. Por outro lado, este “nível crítico” foi para *Citrus taiwanica* de 15 μM de Fe e para o citrumeleiro ‘Swingle’ de 20 μM de Fe. Ou seja, a resposta ao aumento da disponibilidade de ferro, foi sucessivamente mais lenta, pela seguinte ordem: citraneira ‘Troyer’, *Citrus taiwanica* e citrumeleiro ‘Swingle’.

A razão entre o peso seco da raiz e o peso seco da parte aérea (RRPA) tem sido, entre outros parâmetros, utilizada de forma a avaliar a distribuição dos fotossintetizados entre a parte aérea e a parte radicular (Clakmak *et al.*, 1994; McDonald *et al.*, 1996).

As plantas dos porta-enxertos citranjeira ‘Troyer’ e *C. taiwanica* que cresceram sem Fe e na presença de carbonato de cálcio apresentaram valores de RRPA mais elevadas que as plantas verdes, demonstrando o efeito da clorose férrica no aumento da biomassa radicular, preferencialmente à da parte aérea, tal como obtido por diversos autores (Viti e Cinelli, 1993; Marschner *et al.*, 1996) em outras espécies vegetais. Segundo Bavaresco *et al.* (1994), este facto pode ser motivado pela activação de mecanismos de resposta, como o aumento do número de raízes secundárias e a diferenciação de células de transferência nos ápices radiculares, os quais são genotipicamente determinados e estão associados a espécies mais tolerantes à clorose férrica (Socias i Company *et al.*, 1995). Deste modo, o porta-enxerto ‘Swingle’ não evidenciou este mecanismo de resposta traduzido por valores de RRPA constantes e independentes da concentração de ferro na solução nutritiva e poderá ser considerado como susceptível à clorose férrica.

Ao utilizar o porta-enxerto ‘Troyer’ com o enxerto de laranjeira, cv. ‘Newhall’, (**ensaio 2**) constatou-se que houve uma resposta diferente da parte aérea. Assim, os valores mais elevados da altura da parte aérea e do peso seco das folhas de ‘Newhall’ foram registados nas plantas que cresceram na ausência de Fe e com carbonato de cálcio na solução nutritiva.

2.4.2. Clorofila total

Segundo diversos autores (Abadía *et al.*, 1991; Sudahomo *et al.*, 1994) a clorofila total é um parâmetro que, para além de permitir medir o grau de clorose, pode ser utilizado como método de selecção de génotipos tolerantes à clorose férrica.

O acréscimo de ferro à solução nutritiva, na presença de carbonato de cálcio, permitiu evidenciar a resposta diferenciada dos três porta-enxertos utilizados no **ensaio 1**, expressa em clorofila total. Enquanto que as plantas dos porta-enxertos citranjeira ‘Troyer’ e *C. taiwanica* apenas apresentaram sintomas característicos desta deficiência nas concentrações mais baixas (0 e 5 μM de Fe), as plantas de citrumeleiro ‘Swingle’ apresentaram sintomas de clorose férrica nas plantas das modalidades com 0, 5, 10 e 15 μM de Fe na solução nutritiva. Estes resultados reflectem a diferente capacidade de resposta, de cada um dos porta-enxertos, ao efeito inibitório do ião bicarbonato na absorção e translocação do ferro nas plantas superiores (Bialczyk e Lechowski, 1992; Mengel, 1995).

Em relação à clorofila total, o porta-enxerto e a cultivar enxertada nesse porta-enxerto apresentaram um comportamento semelhante. Tal como o porta-enxerto ‘Troyer’ (**ensaio 1**), as plantas de laranjeira cv. ‘Newhall’ (**ensaio 2**) apenas apresentaram sintomas de clorose férrica quando cresceram nas concentrações mais baixas (0 e 5 μM de Fe) de ferro na solução nutritiva. Para estas concentrações, o decréscimo do teor de clorofila total das plantas de ‘Newhall’ (**ensaio 2**) foi mais acentuado na presença do que na ausência de carbonato de cálcio, provavelmente, porque o ião bicarbonato ao elevar o pH intracelular diminuiu a mobilidade do ferro, existente já em deficiência nessas plantas, afectando mais rapidamente a biossíntese clorofilina (Mengel, 1995).

2.4.3. Eficiência fotossintética

Nas diferentes abordagens aos mecanismos de susceptibilidade à clorose férrica o aumento ou a redução da biomassa parece estar relacionada com a eficiência de conversão da energia captada pelo aparelho fotossintético (Lichtenthaler e Rinderle, 1988).

Os baixos valores da razão F_v/F_m verificados nos porta-enxertos ‘Troyer’ e *C. taiwanica*, nas plantas cloróticas significam que a eficiência de conversão da energia fotossintética foi significativamente afectada pela clorose férrica (Morales *et al.*, 1991; 1998a). Na citranjeira ‘Troyer’ esta redução foi devida apenas a alterações ao nível do transporte de electrões, expressa pela diminuição da F_m , enquanto que no *C. taiwanica* se deveu também a alterações estruturais ao nível dos pigmentos do PSII uma vez que a F_o também variou. Os acréscimos verificados na F_o podem ser originados pela redução da plastoquinona ocorrida no escuro, como verificado por Belkhdja *et al.* (1998a) em beterraba sacarina.

Contrariamente aos resultados obtidos com o porta-enxerto ‘Troyer’ (**ensaio 1**), os valores de fluorescência das folhas de laranjeira, ‘Newhall’, quando enxertada nesse porta-enxerto (**ensaio 2**) foram apenas ligeiramente afectados pela clorose férrica e estiveram associados a variações no PSII, tal como referido por Abadía *et al.* (1999) para a beterraba sacarina e a pereira. Adicionalmente, o facto de a variação da capacidade fotossintética se correlacionar com a clorofila total denota que apesar do número de unidades fotossinteticamente activas ter decrescido, a eficiência de conversão da energia luminosa não foi muito afectada pela clorose férrica (Morales *et al.*, 1998a).

2.4.4. Composição mineral

O teor nutritivo, quer da parte aérea quer da raiz, dos três porta-enxertos utilizados no **ensaio 1** foi afectado pela clorose férrica e apresentou tendências crescentes com o aumento de Fe na solução nutritiva. A diminuição de crescimento e da biomassa devida à ausência de Fe, agravada pela presença de carbonato de cálcio, pode justificar os baixos teores nutritivos dessas plantas (Abadía *et al.*, 1989). De um modo geral, os teores médios de Fe existentes na parte aérea foram em todos os porta-enxertos inferiores aos obtidos na raiz tal como verificado por Viti e Cinelli (1993).

As razões obtidas entre o teor de um nutriente na raiz e o teor desse nutriente na parte aérea permitiu avaliar a partição mineral entre esses órgãos. Nas plantas cloróticas de citranjeira ‘Troyer’ verificou-se uma acumulação preferencial de P na parte aérea, decrescendo nas plantas verdes. Esta tendência foi inversa à verificada nos outros porta-enxertos. Mengel *et al.* (1984) referem valores mais elevados de P em folhas cloróticas.

Comparativamente com os outros porta-enxertos, a translocação do Fe no citrumeleiro ‘Swingle’ foi mais afectada pelo ião bicarbonato uma vez que o Fe se acumulou preferencialmente na raiz (razão Fepa / Fer < 1), tal como obtido por Cinelli (1995) no porta-enxerto de marmeleiro mais susceptível à clorose férrica.

Em trabalhos anteriores, diversos autores propõem a utilização das razões nutritivas como forma de caracterização e selecção de diferentes espécies vegetais quanto à sua tolerância à clorose férrica; nomeadamente Hernando e Casado (1972) sugerem a razão Fe/Mn como a mais indicada para a cultura de morangueiro, Abadía *et al.* (1985) indicam a razão K/Ca anteriormente citada por Hamzé *et al.* (1980) para citrinos e Köseoglu (1995) refere a razão P/Fe para pessegueiro. Num trabalho mais recente, Igartua *et al.* (2000) apresentam a razão K/Zn nas flores como método de diagnóstico em pessegueiros. Existe assim uma grande discrepância de resultados face ao material vegetal em estudo e às condições de cultura, o que se comprova nos dados obtidos no **ensaio 1**, onde a razão P/Mg foi a que se correlacionou melhor com a clorofila total para o porta-enxerto *C. taiwanica*, enquanto que para o ‘Troyer’ foi a razão K/Zn e para o ‘Swingle’ a razão Fe/Mn. A razão Fe/Mn foi a que apresentou relações mais significativas com a clorofila total, nos três porta-enxertos indicando ser um bom parâmetro para avaliar a tolerância à clorose férrica. A concentração do Fe por si só, não é suficiente para explicar a clorose férrica induzida pelo ião

bicarbonato (Fernandez-Lopez *et al.*, 1993) e deste modo os resultados obtidos não podem ser explicados apenas pela deficiência deste elemento mas sim pela interacção nutritiva observada.

De um modo geral, a ausência de Fe motivou um decréscimo da concentração de P, K, Ca, Zn e de Mn nas folhas cloróticas de laranjeira cv. ‘Newhall’ (**ensaio 2**), nutrientes que são referenciados por diversos autores em condições de clorose fêrrica (Tagliavini *et al.*, 1993; Terry e Zayed, 1995; Belkhadja *et al.*, 1998b). A concentração foliar de Fe foi independente das modalidades, o que está de acordo com os resultados obtidos por outros autores sugerindo que houve imobilização fisiológica do Fe dentro da folha (Rashid *et al.*, 1990, Abadía, 1992; Carpena-Artes *et al.*, 1995; Morales *et al.*, 1998b).

Na presença de carbonato de cálcio, a razão nutritiva K/Ca diminuiu com a adição de Fe à solução nutritiva tal como verificado por Hamzé *et al.* (1980; 1986), que associam este resultado ao equilíbrio existente entre catiões monovalentes e divalentes, característico das espécies calcícolas.

A diferença entre a melhor razão identificada para os porta-enxertos (**ensaio 1**; Fe/Mn) e para a laranjeira cv. ‘Newhall’ (**ensaio 2**; K/Ca) deve-se provavelmente às características genótípicas e portanto às necessidades nutritivas intrínsecas de cada espécie.

2.4.5. Actividade da quelato de Fe(III)-redutase

Na presença de carbonato de cálcio e nas concentrações 0 e 5 µM de Fe, o sistema radicular das plantas de laranjeira (**ensaio 2**), ou seja do porta-enxerto ‘Troyer’, apresentou raízes menores e menos ramificadas, que por sua vez apresentavam cerca de 2 a 4 mm de comprimento da zona subapical dilatada. Algumas destas alterações morfológicas foram idênticas às observadas por Bavaresco *et al.* (1991) em raízes de videira e por Landsberg (1995) em beterraba sacarina.

A actividade da QF-R em ápices radiculares foi detectada, pela primeira vez, em citrinos por Manthey e McCoy (1993) e por Treeby e Uren (1993) oscilando os valores entre 4,1-6,3 e 2,0-56,1 nmol Fe reduzido min⁻¹ g⁻¹ de peso fresco, respectivamente para o controlo e para as plantas deficientes em Fe. O aumento da actividade da quelato de Fe(III)-redutase (cerca de 2,5 vezes) registado nos ápices radiculares das plantas que cresceram com 0 ou 5 µM de Fe, na presença de carbonato de cálcio está de acordo com Manthey *et al.* (1994) que evidencia que os acréscimos de actividade desta enzima ocorrem entre menos de 1 até 10 vezes. Tem sido assumido que resulta da

activação de uma quelato de Fe(III)-redutase, enzima ligada à membrana plasmática (Bienfait *et al.*, 1983; 1985; Moog e Brüggemann, 1994; Schmidt, 1999) e geralmente denominada por “turbo-redutase”.

A associação do aumento da actividade enzimática com a localização da coloração rosa intenso, característica da intensa redução do Fe, permite-nos propor que a indução deste mecanismo de resposta em plantas de laranjeira desenvolvidas em solução nutritiva, ocorre preferencialmente nas zonas subapicais e mais dilatadas dos ápices radiculares, tal como observado por outros investigadores (Marschner *et al.*, 1982; 1988; Römheld, 1987).

Nas condições de ensaio, o aumento da actividade radicular da quelato de Fe(III)-redutase apenas se verificou na presença de carbonato de cálcio o que indica que a deficiência de Fe por si só não foi suficiente para desencadear este mecanismo de resposta a nível radicular. Estes resultados são concordantes com os obtidos por diversos investigadores em outras fruteiras (Romera *et al.*, 1991a; 1991b; Cinelli, 1995; Tagliavini *et al.*, 1995; Gogorcena *et al.*, 2000).

Saliente-se que, apesar de ter aumentado a redução e presumivelmente a absorção do Fe para a parte aérea, a activação da QF-R a nível radicular não foi suficiente para contrariar os efeitos do ião bicarbonato na translocação do Fe (Mengel, 1995), uma vez que a nível foliar parece continuar a haver deficiência de Fe. Consequentemente as plantas destas modalidades apesar do acréscimo de actividade da QF-R apresentaram sintomas de clorose férrica.

2.4.6. Tolerância do material vegetal

Pode assim admitir-se que os parâmetros fisiológicos medidos no **ensaio 1** permitiram caracterizar e avaliar a eficiência de utilização do ferro. É possível concluir que, relativamente aos porta-enxertos estudados, a citranjeira ‘Troyer’ é o mais tolerante, seguido do *Citrus taiwanica* e apresentando-se o citrumeleiro ‘Swingle’ como o mais sensível à clorose férrica. Esta classificação está de um modo geral de acordo com a apresentada por diversos autores (Hamzé e Nimah, 1982; Hamzé *et al.*, 1986; Sudahomo *et al.*, 1994; Byrne *et al.*, 1995), baseada em parâmetros medidos na parte aérea. Segundo estes autores, a citranjeira ‘Troyer’ e o *Citrus taiwanica* situam-se no mesmo grupo, o dos porta-enxertos medianamente tolerantes. Os resultados suplementares obtidos em outros parâmetros, nomeadamente a nível radicular, permitiram distinguir o comportamento dos dois porta-enxertos salientando-se a maior tolerância do ‘Troyer’ relativamente ao *C. taiwanica*.

A utilização de diferentes concentrações de ferro na solução nutritiva permitiu identificar o nível crítico de Fe de cada um dos porta-enxertos estudados, isto é o valor a partir do qual a disponibilidade de Fe na rizosfera é suficiente para contrariar os efeitos do ião bicarbonato, evitando o aparecimento de sintomas de clorose férrica. Esses valores são de 10, 15 e 20 μM de Fe respectivamente para a citranjeira ‘Troyer’, o *C. taiwanica* e o citrumeleiro ‘Swingle’, o que fundamenta a ordem de tolerância anteriormente proposta. A citranjeira ‘Troyer’, considerada como o porta-enxerto mais tolerante dos estudados, apresentou maior crescimento da parte aérea, maior acumulação de biomassa, valores de clorofila total mais elevados, uma eficiência fotoquímica superior e um equilíbrio nutritivo menos afectado pela clorose férrica. Pelo contrário, a susceptibilidade do citrumeleiro ‘Swingle’ está essencialmente associada à necessidade de mais Fe na solução nutritiva, para conseguir contrariar os efeitos do ião bicarbonato tal como constatado.

As diferenças encontradas entre o comportamento do porta-enxerto ‘Troyer’ (**ensaio 1**) e da sua combinação com a laranjeira ‘Newhall’ (**ensaio 2**) estão de acordo com o referido por Socias i Company *et al.* (1995) e por Tagliavini *et al.* (1993).

2.5. CONCLUSÕES

A clorose férrica induzida pelo ião bicarbonato está associada, não só à deficiência de ferro como também às interações entre diversos nutrientes, quer na parte aérea quer na parte radicular.

Dos porta-enxertos estudados, a citranjeira ‘Troyer’ é o mais tolerante à clorose férrica. No entanto, apesar de ser um dos mais utilizados na região Sul do país, em situações de baixa disponibilidade de Fe no meio e na presença de carbonato de cálcio, continua a apresentar sintomas de clorose férrica.

Face às respostas obtidas, a selecção de porta-enxertos tolerantes à clorose férrica não elimina o estudo das combinações entre o porta-enxerto e o garfo uma vez que os aumentos significativos da actividade da QF-R ao nível do porta-enxerto, ocorridos na presença de carbonato de cálcio, estiveram associados a decréscimos significativos da clorofila total e da eficiência fotossintética do garfo o que explica os sintomas de clorose férrica.

2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadía, J.**; Nishio, J.; Monge, N.E.; Montañés, L.; Heras, L. 1985. Mineral composition of peach affected by iron chlorosis. *Journal of Plant Nutrition*, 8(8):697-707.
- Abadía, A.**; Lemoine, Y.; Trémolières, A.; Ambard-Bretteville, F.; Rémy, R. 1989. Iron deficiency in pea: effects on pigment, lipid and pigment-protein complex composition of thylacoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 27:679-687.
- Abadía, A.**; Poc, A.; Abadía, J. 1991. Could iron nutrition status be evaluated through photosynthetic pigment changes. *Journal of Plant Nutrition*, 14(9):987-999.
- Abadía, J.** 1992. Leaf responses to iron deficiency: A review. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1699-1713.
- Abadía, J.** e **Abadía, A.** 1993. Iron and plant pigments, pp. 327-344, In: L.L. Barton e B. Hemming (eds.), *Iron chelation in plants and soil microorganisms*. Academic Press, San Diego, EUA.
- Abadía, J.**; Morales, F.; Abadía, A. 1999. Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-deficient leaves. *Plant and Soil*, 215:183-192.
- Alcántara, E.** e **Romera, J.R.** 1990. Caracterización de patrones de melocotonero por su tolerancia a clorosis ferrica mediante cultivo en solución nutritiva con bicarbonato. *Fruticultura Profesional* 28, 2-6.
- A.O.A.C.** 1990. Association of Official Agricultural Chemists. *Official Methods of Analysis*. 12th. Ed. Washington, EUA.
- Bavaresco, L.**; Fregoni, M.; Fraschini, P. 1991. Investigations on iron uptake and reduction by excised roots of different rootstocks and a *V. vinifera* cultivar, pp. 139-143, In: Y. Chen e Y. Hadar (eds.), *Iron nutrition and interactions in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Bavaresco, L.**; Fregoni, M.; Perino, A. 1994. Physiological aspects of lime-induced chlorosis in some *Vitis* species. I. Pot trial on calcareous soil. *Vitis*, 33:123-126.
- Belkhdja, R.**; Morales, F.; Quílez, R.; López-Millán, A.F.; Abadía, A.; Abadía, J. 1998a. Iron deficiency causes changes in chlorophyll fluorescence due to the reduction in the dark of the photosystem II acceptor side. *Photosynthesis Research*, 56:265-276.
- Belkhdja, R.**; Morales, F.; Sanz, M.; Abadía, A.; Abadía, J. 1998b. Iron deficiency in peach trees: effects on leaf chlorophyll and nutrient concentrations in flowers and leaves. *Plant and Soil*, 203:257-268.
- Bialczyk, J.** e **Lechowski, Z.** 1992. Absorption of HCO_3^- by roots and its effect on carbon metabolism of tomato. *Journal of Plant Nutrition*, 15(3):293-312.
- Bienfait, H.F.**; Bino, R.J.; Bliet, A.M.; Duivenvoorden, J.F.; Fontain, J.M. 1983. Characterization of ferric reducing activity in roots of Fe deficient *Phaseolus vulgaris* L.. *Physiologia Plantarum*, 59:196-202.
- Bienfait, H.F.**; van der Briel, W.; Mesland-Mul, N.T. 1985. Free space iron pools in roots, generation and mobilization. *Plant Physiology*, 78:596-600.
- Björkman, O.** e **Demmig, B.** 1987. Photon yield of O_2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170:489-504.
- Boxma, R.** 1972. Bicarbonate as the most important soil factor in lime-induced chlorosis in the Netherlands. *Plant and Soil*, 37:233-243.
- Brüggemann, W.**; Moog, P.R.; Nakagawa, H.; Janiesch, P.; Kuiper, P.J.C. 1990. Plasma membrane-bound NADH: Fe^{3+} - EDTA reductase and iron deficiency in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Is there a turbo reductase? *Physiologia Plantarum*, 79:339-346.
- Byrne, D.H.**; Rouse, R.E.; Sudahomo, M. 1995. Tolerance to citrus rootstocks to lime-induced iron chlorosis. *Subtropical Plant Science*, 47:7-11.
- Carpna-Artes, O.** 1983. Dinâmica de nutrientes em porta-injertos de citrus. *Actas do Congresso Mundial de la Asociación de Viveiristas de Agrios, Valencia, Espanha*.
- Carpna-Artes, O.**; Moreno, J.J.; Lucena, J.J.; Carpena-Ruiz, R.O. 1995. Response to iron chlorosis of different hydroponically grown Citrus varieties, pp. 147-151, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Chen, Y.** e **Barak P.** 1982. Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Advances in Agronomy*, 35:217-240.
- Cinelli, F.** 1995. Physiological responses of clonal quince rootstocks to iron-deficiency induced by addition of bicarbonate to nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition*, 18(1):77-89.

- Clakmak**, I.; Hengeler, C.; Marschner, H. 1994. Partitioning of shoot and root dry matter and carbohydrates in bean plants suffering from phosphorus, potassium and magnesium deficiency. *Journal of Experimental Botany*, 45: 1245-1250.
- Coulombe**, B.A.; Chaney, R.F.; Wiebold, W.J. 1984a. Bicarbonate directly induces iron chlorosis in susceptible soybean cultivars. *Soil Science Society American Journal*, 48:1297-1301.
- Coulombe**, B.A.; Chaney, R.F.; Wiebold, W.J. 1984b. Use bicarbonate in screening soybeans for resistance to iron chlorosis. *Journal of Plant Nutrition*, 7(1-5):411-425.
- Fernandez-Lopez**, J.A.; Lopez-Roca, J.M.; Almela, L. 1993. Mineral composition of iron chlorotic *Citrus lemon* L. leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 16(8):1395-1407.
- Gogorcena**, Y.; Abadía, J.; Abadía, A. 2000. Induction of in vivo root ferric chelate reductase activity in the fruit tree rootstock. *Journal of Plant Nutrition*, 23:9-21.
- Hamzé**, M.; Salsac, L.; Wacquant, J.P. 1980. Recherche de tests pour déceler précocement l'aptitude des agrumes résister à la chlorose calcaire: I. Capacité d'échange cationique et degré d'estérification des racines. *Agrochimica*, XXIV:432-442.
- Hamzé**, M. e Nimah, N. 1982. Iron content during lime-induced chlorosis with two citrus rootstocks. *Journal of Plant Nutrition*, 5(4-7):797-804.
- Hamzé**, M.; Ryan, J.; Zaabout, M. 1986. Screening of citrus rootstocks for lime-induced chlorosis tolerance. *Journal of Plant Nutrition*, 9(3-7):459-469.
- Hernando**, V. e Casado, M. 1972. Clorosis ferrica inducida por manganeso en plantas de freson. *Anales de Edafologia e Agrobiologia*, 13-24.
- Igartua**, E.; Grasa, R.; Sanz, M.; Abadía, A.; Abadía, J. 2000. Prognosis of iron chlorosis from the mineral composition of flowers in peach. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 75:111-118.
- Köseoglu**, A.T. 1995. Investigation of relationships between iron status of peach leaves and soil properties. *Journal of Plant Nutrition*, 18(9):1845-1859.
- Landsberg**, E. 1995. Transfer cell formation in sugar beet roots induced by latent Fe deficiency, pp. 67-75, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Lichtenthaler**, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148:350-382.
- Lichtenthaler**, H.K. e Rinderle, U. 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 19:529-585.
- Manthey**, J.A. e McCoy, D.L. 1993. Chelation effects on the iron reduction and uptake by low-iron stress tolerant and non-tolerant citrus rootstocks. *Journal of Plant Nutrition*, 16(5):881-893.
- Manthey**, J.A.; McCoy, D.L.; Crowley, D.E. 1994. Stimulation of rhizosphere iron reduction and uptake in response to iron deficiency in citrus rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry*, 32(2):211-215.
- Marschner**, H.; Römheld, V.; Ossenbreg-Neuhaus, H. 1982. Rapid method for measuring changes in pH and reducing processes along roots of intact plants. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie und Bodenkunde*, 105:407-416.
- Marschner**, H.; Treeby, M.; Römheld, V. 1988. Role of root-induced changes in the rhizosphere for iron acquisition in higher plants. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie und Bodenkunde*, 152: 197-204.
- Marschner**, H. e Römheld, V. 1995. Strategies of plants for acquisition of iron, pp. 375-388, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Marschner**, H.; Kirkby, E.A.; Cakmak, I. 1996. Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *Journal of Experimental Botany*, 47: 1255-1265.
- McDonald**, A.J.S.; Ericsson, T.; Larsson, C.M. 1996 Plant nutrition, dry matter gain and partitioning at the whole-plant level. *Journal of Experimental Botany*, 47: 1245-1255.
- Mengel**, K.; Breiningner, M.; Bubl, W. 1984. Bicarbonate, the most important factor inducing iron chlorosis in vine grapes on calcareous soils. *Plant and Soil*, 92:17-22.
- Mengel**, K. 1995. Iron availability in plant tissues - iron chlorosis on calcareous soils, pp. 389-397, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Moog**, P.R. e Brüggemann, W. 1994. Iron reductase systems on the plant plasma membrane - A review. *Plant and Soil*, 165:241-260.

- Morales**, F.; Abadía, A.; Abadía, J. 1991. Chlorophyll fluorescence and photon yield of oxygen evolution in iron deficient sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Plant Physiology*, 97:886-893.
- Morales**, F.; Abadía, A.; Abadía, J. 1998a. Mecanismos de protección frente al exceso de luz en hojas deficientes en hierro. *Actas do VII Simposio Nacional-III Iberico sobre Nutrición Mineral de las Plantas*:101-106.
- Morales**, F.; Grasa, R.; Abadía, A.; Abadía, J. 1998b. Iron chlorosis paradox in fruit trees. *Journal of Plant Nutrition*, 21(4):815-825.
- Nenova**, V. e Stoyanov, I. 1993. Physiological and biochemical changes in young maize plants under deficiency I. Growth and photosynthesis. *Journal of Plant Nutrition*, 16(5):835-849.
- Rashid**, A.; Couvillon, G.A.; Jooness, J.B. 1990. Assessment of Fe Status of peach rootstocks by techniques used to distinguish chlorotic and non-chlorotic leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 13(2):285-307.
- Romera**, F.J.; Alcántara, E.; de la Guardia, M.D. 1991a. Characterization of the tolerance to iron chlorosis in different peach rootstocks grown in nutrient solution. I. Effect of bicarbonate and phosphate, pp. 145-149, In: Y. Chen e Y. Hadar (eds.), *Iron nutrition and interactions in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Romera**, F.J.; Alcántara, E.; de la Guardia, M.D. 1991b. Characterization of the tolerance to iron chlorosis in different peach rootstocks grown in nutrient solution. II. Iron-stress response mechanisms, pp. 151-155, In: Y. Chen e Y. Hadar (eds.), *Iron nutrition and interactions in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Römheld**, V. 1987. Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 70:231-234.
- SAS Institute**. 1989. SAS/STAT User's Guide. 6ª Versão. Vol. 1 e 2, SAS Institute Inc., Cary, EUA
- Schmidt**, W. 1999. Review. Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist*, 141:1-26.
- Schreiber**, U. e Bilger, W. 1985. Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements, pp. 22-53, In: D.L. Lange (ed.), *Plant response to stress*. Verlag, Berlim, Alemanha.
- Socias i Company**, R.; Aparisi, G.; Felipe, A.J. 1995. A genetical approach to iron chlorosis in deciduous fruit trees, pp. 167-174, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Sudahomo**, M.; Byrne, D.H.; Rouse, R.E. 1994. Greenhouse screening of citrus rootstocks for tolerance to bicarbonate-induced iron chlorosis. *HortScience*, 29(2):113-116.
- Susín**, S.; Abadía, A.; González-Reyes, J.A.; Lucena, J.J.; Abadía, J. 1996. The pH requirement of the iron-deficiency-induced iron reductase activities of intact plants and isolated plasma membrane fractions in sugar beet. *Plant Physiology*, 110:111-123.
- Tagliavini**, M.; Bassi, D.; Marangoni, B. 1993. Growth and mineral nutrition of pear rootstocks in lime soils. *Scientia Horticulturae*, 54:13-22.
- Tagliavini**, M.; Rombolà, A.D.; Marangoni, B. 1995. Response to iron-deficiency stress of pear and quince genotypes. *Journal of Plant Nutrition*, 18(11):2465-2482.
- Terry**, N. 1980. Limiting factors in photosynthesis. I-Use of iron stress to control photochemical capacity *in vivo*. *Plant Physiology*, 65:114-120.
- Terry**, N. e Zayed, A.M. 1995. Physiology and biochemistry of leaves under iron deficiency, pp. 283-294, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Toulon**, V.; Sentenac, H.; Thibaud, J.B.; Davidian, C.; Moulineau, C.; Grignon, C. 1992. Role of apoplast acidification by the H⁺ pump. The effect on the sensitivity to pH and CO₂ of iron reduction. *Planta*, 186: 212-218.
- Treeby**, M. e Uren, N. 1993. Iron deficiency stress responses amongst citrus rootstocks. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie und Bodenkunde*, 156:75-81.
- Viti**, R. e Cinelli, F. 1993. Lime-induced chlorosis in quince rootstocks: methodological and physiological aspects. *Journal of Plant Nutrition*, 16(4):631-641.
- Walker**, D. 1990. The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. 2ª ed. Hansatech Instruments Limited, Kyngs Lynn, Reino Unido, 196p.

CAPÍTULO 3

DIAGNÓSTICO DA CLOROSE FÉRRICA EM CITRINOS

RESUMO

Com o objectivo geral de avaliar se a análise floral pode ser usada para diagnosticar o estado nutritivo dos citrinos e para estimar alguns parâmetros da produção foram seleccionadas 20 árvores de laranjeiras (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. 'Valencia late'), enxertadas em citranjeira 'Troyer' e instaladas num solo calcário. Em Abril de 1996, durante a plena floração, foi efectuada uma colheita de 30 flores e 30 folhas de cada uma das árvores. Nos restantes meses do ano foram efectuadas colheitas foliares. Em finais de Março do ano seguinte (1997) efectuou-se uma amostragem de frutos nas mesmas árvores, determinando-se o seu peso fresco e calibre, assim como o total de sólidos solúveis e a percentagem de ácido cítrico existente no sumo desses frutos. A clorofila total foi estimada através do aparelho SPAD-502 em todas as folhas utilizadas para a análise foliar. Este procedimento experimental repetiu-se nos dois anos seguintes nas mesmas árvores. Foi utilizada a análise em componentes para avaliar a variação sazonal da composição mineral das folhas e da clorofila e os modelos foram estabelecidos com base no método de eliminação por passos. Na validação dos modelos foi considerada a diferença entre o coeficiente de determinação do modelo original e o coeficiente de determinação determinado para o conjunto de dados externos de forma a estimar a perda de poder preditivo de cada um dos modelos.

O padrão de variação encontrado na composição mineral das folhas contrasta o aumento dos macronutrientes (N, P, K, Ca e Mg) enquanto que nas flores é evidenciado o aumento de N, P e K com o de Ca, Fe e Zn. As relações encontradas entre a composição mineral das folhas, das flores e a clorofila permite concluir que é possível efectuar o diagnóstico da clorose férrica através da composição mineral das flores de laranjeira na plena floração (Abril). Flores com valores médios de Mg/Zn inferiores a 100 correspondem a árvores que terão tendência a manifestar sintomas de clorose férrica 90 dias após a plena floração (Julho). Pelo contrário, flores com uma razão Mg/Zn nas flores superior a 200 tendem a permanecer verdes em Julho. Valores intermédios, correspondem provavelmente a árvores com clorose férrica latente, isto é, num estado incipiente sem sintomas. A concentração nutritiva das flores durante a plena floração de um determinado ano permite estimar alguns parâmetros de qualidade da produção do ano seguinte, nomeadamente o peso fresco do fruto e o índice de maturação. Enquanto que para a estimativa do peso fresco do fruto foram considerados os nutrientes, N, Mg, Ca e Zn nas flores para o índice de maturação foram incluídos o N, P, Mg e Fe. Determinaram-se valores de referência para a concentração de alguns nutrientes nas flores associados com a produção de frutos com um calibre comercialmente favorável (> 76 mm). Através da análise floral é possível antecipar a data de colheita foliar recomendada para citrinos, de Outubro para Abril. O diagnóstico precoce ou prognóstico da clorose férrica possibilita uma correcção atempada, previne o aparecimento dos sintomas nos meses seguintes e melhora a qualidade da produção.

Palavras chave: Análise foliar, Análise floral, Citrinos, Clorose férrica, Métodos de diagnóstico, Qualidade da produção, SPAD.

ABSTRACT

A field experiment was conducted in a commercial orange orchard (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. 'Valencia late') grafted on Citrange Troyer and established on a calcareous soil in the south of Portugal, to investigate if flower analysis could be used to diagnose the nutritional status of the trees, and predict fruit quality. In April 1996, during full bloom, flowers and leaves were collected from 20 trees. Leaf samples were again collected in June and August from the same trees. In March 1997 the fruits were harvested and their quality evaluated. Total chlorophyll was estimated in all the leaves sampled for foliar analysis, using the SPAD-502 apparatus. This procedure was repeated every year. Principal Component Analysis was used to evaluate the variation of chlorophyll and leaf mineral content throughout the season and mathematic models were established based on stepwise regression procedure. In models validation, the difference between the correlation coefficient of the original model and the same coefficient obtained in external data was used in order to estimate the loss of the predictive power of the models.

The variation pattern in leaf mineral composition contrasts the increase in macronutrients (N, P, K, Ca and Mg), while in flowers the increase in N, P and K is put in contrast to Ca, Fe and Zn. Based on the relationship between leaf and flower mineral composition and leaf chlorophyll concentration, it is possible to diagnose iron chlorosis in Citrus (cv. 'Valencia Late') by using flowers mineral concentration at full bloom (April). A Mg/Zn ratio in flowers smaller than 100 indicates that the trees will develop iron chlorosis 90 days after full bloom (July). When the ratio is greater than 200, the trees remained green in the same date (July). Intermediary values indicate a latent chlorosis with no apparent symptoms. The mineral concentration of flowers at full bloom allows estimations of quality parameters in the fruit the following year, namely fruit fresh weight and maturation index. N, Mg, Ca and Zn registered in flowers were related to fruit fresh weight estimations and N, P, Mg and Fe were related to fruit maturation index. Reference values were determined for the mineral composition of flowers corresponding to trees where fruits had a diameter > 76 mm. An earlier diagnosis can benefit commercial fruit growers since it allows them to detect potential deficiencies earlier in time and implement treatments to prevent loss of fruit quality.

Keywords: Floral analysis, Foliar analysis, Citrus, Iron chlorosis, Diagnostic, Fruit quality, Lime-induced chlorosis, SPAD.

3.1. INTRODUÇÃO

A clorose férrica é um problema nutricional muito frequente nos pomares estabelecidos em solos calcários (Chen e Barak, 1982). Nestes solos, a deficiência de Fe resulta do efeito do ião bicarbonato na absorção, translocação e biodisponibilidade deste elemento na parte aérea. Na folha, o aumento do pH apoplástico conduz à imobilização fisiológica do Fe (Terry e Zayed, 1995), que resulta num decréscimo dos pigmentos fotossintéticos e no aparecimento dos sintomas característicos de clorose férrica (Terry e Abadía, 1986; Abadía, 1992; Abadía e Abadía, 1993).

A interpretação dos resultados obtidos pela análise foliar constitui o meio mais correntemente utilizado para avaliar o estado nutricional das árvores de fruto (Moreno *et al.*, 1998), nomeadamente dos pomares citrícolas. No entanto, no caso das árvores de fruto com clorose férrica, o uso de métodos de diagnóstico baseados na análise foliar, quer do Fe total (Heras *et al.*, 1990) quer de fracções activas do Fe (Abadía *et al.*, 1985; 1989), apresenta diversas limitações.

As folhas deficientes em Fe apresentam muitas vezes concentrações de Fe superiores às existentes nas folhas verdes (Venkatraju e Marschner, 1981; Chen e Barak, 1982; Hamzé e Nimah, 1982; Mengel *et al.*, 1984; Abadía *et al.*, 1985; Abadía *et al.*, 1989; Morales *et al.*, 1998). Em muitos casos, não existe qualquer correlação entre a concentração de Fe nos tecidos vegetais e a clorofila total, que expressa o grau de incidência desta deficiência (Hamzé e Nimah, 1982; Mengel *et al.*, 1984; Abadía, 1992). Este fenómeno foi denominado por Römheld (1997) como o “paradoxo da clorose férrica”.

Diversos autores (Sanz e Montañés, 1995; Sanz *et al.*, 1997; Igartua *et al.*, 2000) propuseram o uso da composição química das flores como método de diagnóstico do estado nutricional de árvores de fruto como o pessegueiro, a macieira e a pereira. Como fundamento, referem que nestas árvores de fruto as flores surgem primeiro do que as folhas e antes do aparecimento dos sintomas de clorose férrica que ocorrem habitualmente no final de Abril ou no princípio de Maio.

O diagnóstico nutricional efectuado pela composição mineral das flores, para além de poder ser efectuado mais cedo, apresenta ainda a vantagem de basear-se em órgãos de curta duração e fotossinteticamente não activos, que não estão sujeitos aos processos de imobilização do Fe presentes nas folhas (Sanz *et al.*, 1994).

Em árvores de pessegueiro com deficiência de Fe a concentração de Fe nas flores (Abril) correlaciona-se com a clorofila total existente nas folhas cloróticas, permitindo estimar o grau de

incidência e o aparecimento da clorose férrica nas folhas, meses mais tarde, durante o desenvolvimento do fruto (Sanz *et al.*, 1997). Resultados semelhantes foram observados em outras árvores de fruto como pereiras (Sanz *et al.*, 1994), macieiras (Sanz *et al.*, 1998) e nectarinas (Toselli *et al.*, 2000).

Nas flores de macieira com clorose férrica verificaram-se também relações entre outros nutrientes como o Ca e o Mn e a clorofila total das folhas colhidas 60 e 120 dias após a plena floração (Sanz *et al.*, 1998). Baseados no padrão consistente encontrado ao longo de 5 anos, Igartua *et al.* (2000) propuseram o uso da razão K/Zn nas flores como um bom indicador do aparecimento de clorose férrica em pessegueiros.

O uso da composição mineral das flores como método de diagnóstico pode assim evitar, através do tratamento antecipado, o aparecimento dos sintomas de clorose férrica e melhorar não só a quantidade como a qualidade da produção (Sanz *et al.*, 1997; Igartua *et al.*, 2000).

3.1.1. Objectivos

Neste capítulo pretendeu-se avaliar a possibilidade da análise floral poder vir a ser utilizada como método de diagnóstico precoce do estado nutritivo e da qualidade da produção de laranjeiras instaladas em solos calcários.

Para tal, determinou-se a composição mineral das flores e das folhas e estimou-se a clorofila através do aparelho SPAD-502, durante 3 anos. Foram estudados os padrões de variação sazonal destes parâmetros e identificadas as relações mais consistentes entre eles.

Mediram-se diversos parâmetros de qualidade da produção que se relacionaram com a composição nutritiva das flores.

Estabeleceram-se modelos entre a composição mineral das flores, a clorofila nas folhas e a produção do ano seguinte. Procedeu-se, ainda, à validação dos modelos originais com dados externos.

Por fim, foram estabelecidos valores de referência para a composição mineral das flores, com base nos valores obtidos nas árvores que produziram frutos com um calibre comercialmente mais favorável.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Caracterização do pomar

3.2.1.1. Localização

O ensaio foi realizado num pomar de citrinos estabelecido em solo calcário, situado na província do Algarve, a uma latitude de 37° 03' N e a uma longitude de 8° 23' W, com uma altitude inferior a 50 m. O pomar está localizado a cerca de 3 km de Faro, no Sítio do Mar e Guerra, local pertencente ao Concelho de Faro, constituindo uma parcela de uma propriedade particular.

Na **Figura 3.1** está representada a parcela do pomar utilizada para o ensaio, composta por laranjeiras, cv. 'Valencia late' com 12 anos de idade em Abril de 1996, data de início do ensaio. O compasso de plantação é de 3 por 4 m, o que equivale a 833 árvores por hectare.

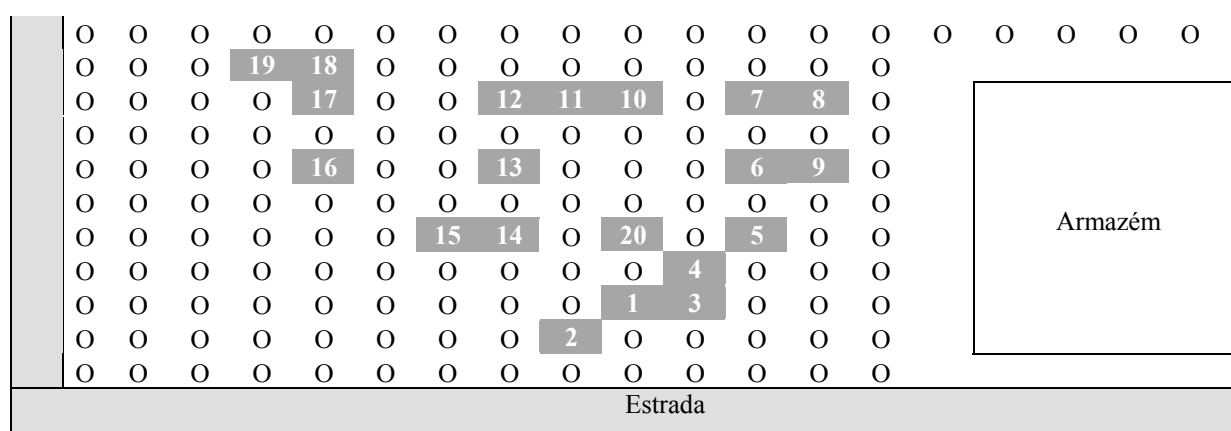


Figura 3.1 – Representação esquemática do pomar com identificação da parcela de experimentação, assinalando as 20 árvores (1 a 20) de laranjeiras da cultivar 'Valencia late'. O - árvores de 'Valencia late' não utilizadas no ensaio.

3.2.1.2. Caracterização climática

Segundo Köppen, o clima do Algarve é Mediterrâneo, encontrando-se o pomar utilizado no ensaio numa área que abrange a variação Csa que representa um clima mesotérmico em que a

temperatura média diária do ar do mês mais frio se situa entre -3°C e 18°C , havendo pelo menos um mês em que a temperatura média diária do ar é superior a 10°C . A estação seca coincide com o Verão (insolação elevada), sendo a temperatura do ar do mês mais quente do ano superior a 22°C . Num estudo do Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica, Rocha Faria *et al.* (1981) associam o Litoral Sul do Algarve a um clima semi-árido com base no intervalo de precipitação frequentemente obtidos (entre 250 e os 500 mm).

Num estudo do Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica, Rocha Faria *et al.* (1981) associam o Litoral Sul do Algarve a um clima semi-árido com base no intervalo de precipitação frequentemente obtido (entre 250 e 500 mm).

Com o objectivo de caracterizar o período em que decorreu o ensaio reuniu-se informação referente às temperaturas mínima, máxima e média do ar e à precipitação registadas na estação meteorológica da Direcção Regional de Agricultura do Algarve, que está localizada no Patacão, a cerca de 1 km a Sul do pomar (**Figura 3.2**). A temperatura média do ar resultou da média aritmética entre as temperaturas mínima e máxima registadas num termohigrógrafo colocado em abrigo de madeira a cerca de 1,5 m do solo. A precipitação foi medida a partir de um udómetro situado no mesmo local, também à mesma altura.

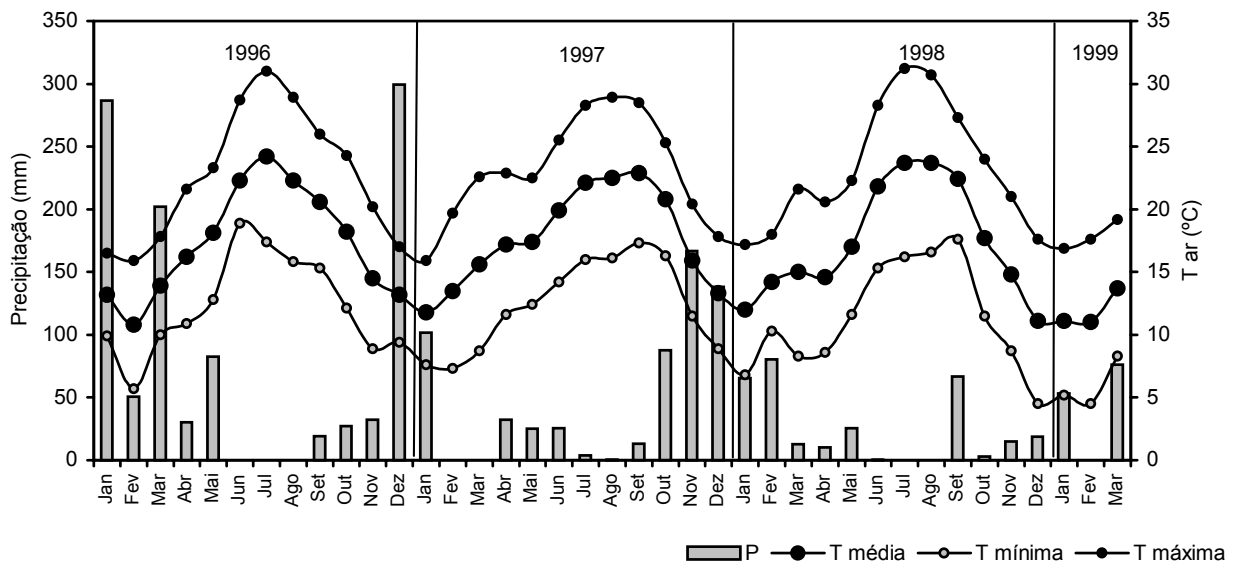


Figura 3.2 – Variação das temperaturas (T, °C) mínima, máxima e média mensal do ar e da precipitação (P, mm) mensal de Janeiro de 1996 a Março de 1999.

Contrariamente à precipitação, o padrão sazonal e anual das temperaturas média, mínima e máxima diárias do ar foi muito semelhante ao longo dos três anos de ensaio (**Figura 3.2**). No ano de 1996 o valor total de precipitação foi de 1030 mm, enquanto que nos anos de 1997 e 1998 apenas se registaram 594 e 298 mm, respectivamente. Em 1997, verificaram-se valores de precipitação anual 50% inferiores aos registados em 1996. Por sua vez, de 1997 para 1998 foi observado o mesmo decréscimo. Tanto em 1996 como em 1998, 60 % da precipitação anual ocorreu no primeiro semestre do ano e sucedeu o contrário em 1997. Comparando com o valor médio da precipitação anual, calculado para o período de 1964 a 1980 (I.N.M.G., 1991), 1996 é um ano que se afasta do padrão pois apresenta o dobro da média (514 mm), tendo sido especialmente chuvosos os meses de Janeiro, Março e Dezembro.

3.2.1.3. Caracterização física e química do solo

De acordo com a classificação de solos do Serviço de Reconhecimento e Ordenamento Agrários (S.R.O.A.) o solo da parcela utilizada para os ensaios pertence à família dos aluviosolos antigos calcários de textura pesada (Atac), a que corresponde um Fluvissole calcário nas categorias taxonómicas da FAO (FAO-Unesco, 1985).

De um modo geral, estes solos resultam de um processo de sedimentação fluvial, e por apresentarem o lençol freático muito próximo da superfície apresentam propensão ao alagamento. Apresentam teores em carbonato de cálcio que podem oscilar entre 2 – 70% ao longo do perfil, podendo surgir horizontes ao nível do subsolo, enriquecidos em calcário (Kopp *et al.*, 1989). Estes solos apresentam baixa capacidade de troca catiónica (CTC), uma saturação em bases sempre elevada e uma reacção ligeira alcalina. Nestes solos reúnem-se diversas características (como sejam, a reacção, a presença de carbonato de cálcio e as condições de asfixia radicular) que podem não só induzir como agravar a clorose férrica, salientando a importância da selecção de um porta-enxerto tolerante, quando da instalação de pomares nestas unidades pedológicas.

No início do ensaio foi efectuada uma amostragem aleatória na camada superficial (0-30 cm) da parcela seleccionada da qual resultou uma amostra composta, uma mistura de várias porções de solo retiradas de diferentes pontos e entre as linhas das árvores da parcela seleccionada do pomar, com o objectivo de especificar a caracterização física e química do solo do pomar em estudo.

Os resultados obtidos nas análises químicas e físicas realizadas ao solo, de acordo com os métodos descritos por A.O.A.C. (1990), estão apresentados na **Tabela 3.1**. O fósforo foi extraído com bicarbonato de sódio (Olsen), o potássio com acetato de amónio e foi utilizado o diagrama de Pereira Gomes e Antunes da Silva (1962) *in* Costa (1995) para se proceder à classificação da textura do solo.

Tabela 3.1 – Análise química e física da amostra de solo composta obtida a 30 cm de profundidade, na parcela experimental.

Parâmetros	Valores
K (mg kg ⁻¹)	398
P (mg kg ⁻¹)	166
Matéria orgânica (%)	2,1
Calcário total (%)	17
Calcário activo (%)	9
pH (H ₂ O)	7,7
Condutividade eléctrica (mS cm ⁻¹)	0,17
Areia (%)	60
Limo (%)	11
Argila (%)	29
Textura	Franco-argilo-arenosa

De um modo geral, os valores obtidos enquadram-se nas características apresentadas por Kopp *et al.* (1989) para os solos da família Atac. No entanto, os valores de fósforo e potássio estão muito acima dos teores esperados, provavelmente por este solo ser cultivado, e portanto fertilizado, há vários anos. Nas características físicas salientam-se os elevados teores em argila, factor que pode afectar tanto a porosidade como a permeabilidade do solo.

3.2.1.4. Sistema de rega

A rega do pomar, a cargo do agricultor, foi efectuada através de um sistema de micro-aspersão, com 2 micro-aspersores, colocados junto ao tronco de cada árvore. Cada aspersor tem uma dispersão de 180° e debita, segundo o fabricante, 10 L de água por hora.

3.2.2. Delineamento experimental

Numa parcela do pomar (**Figura 3.1**) seleccionaram-se aleatoriamente 20 árvores de laranjeira (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), cultivar ‘Valencia late’, enxertadas em citranjeira ‘Troyer’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.).

Em cada uma das árvores seleccionadas realizaram-se colheitas mensais de folhas e estimou-se a clorofila total dessas folhas, através da utilização do aparelho de SPAD-502, durante três anos consecutivos (de Abril de 1996 a Março de 1998). Efectuou-se ainda uma colheita de flores durante a plena floração (mais de 75% de flores abertas) que foi coincidente com o mês de Abril nos três anos considerados. No final de Março de cada um dos anos seguintes à primeira colheita de flores (1997, 1998 e 1999) efectuou-se uma amostragem aleatória de frutos de cada uma das árvores. Independentemente do tipo de amostragem (folhas, flores ou frutos) as colheitas abrangeram sempre os quatro quadrantes da copa.

3.2.3. Parâmetros estudados

Neste ponto descreve-se a metodologia utilizada para cada um dos parâmetros estudados, clorofila total, composição mineral das folhas e flores, e qualidade da produção.

3.2.3.1. Análise da composição mineral das folhas e flores

Em toda a exposição da copa de cada uma das árvores seleccionadas, colheram-se mensalmente 30 folhas sãs e recentemente expandidas (2ª e 3ª folha). Em Abril de cada ano, colheram-se também 30 flores completas (incluindo as sépalas). As folhas foram colhidas dos ramos não frutíferos enquanto que as flores foram colhidas independentemente do tipo de ramo. As amostras (foliares ou florais) colhidas por árvore foram analisadas separadamente de forma a constituírem uma repetição por tratamento.

A lavagem das folhas foi efectuada com detergente não iónico (Teepol), ácido diluído (HCl - 0,01 mM), e seguidamente com 3 passagens por água desionizada e no final da lavagem retirou-se a nervura principal de cada folha. As flores foram lavadas apenas com água destilada. De seguida, procedeu-se à secagem das amostras foliares e florais em estufa a 60° C, durante 48 horas.

Posteriormente, as amostras foram finamente moídas através de um moinho do tipo almofariz de ágata (RM 0, Retsch, Alemanha).

A composição mineral, de qualquer uma das amostras analisadas, foi determinada através dos métodos normalizados descritos pela “Association of Official Analytical Chemists” (A.O.A.C., 1990). O azoto foi determinado pelo método de Kjeldhal, utilizando como catalisador uma mistura de sulfato de cobre, sulfato de sódio e selénio. Após incineração a 450°C as amostras permaneceram em solução, por digestão ácida (HCl 1N), num volume final de 25 ml para a determinação dos restantes nutrientes, conforme indicado por Abadía *et al.* (1985) e por Belkhodja *et al.* (1998). O fósforo foi determinado através da análise do complexo molibdovanadato fosfórico a 420 nm, no espectrofotómetro de UV-Visível (Shimadzu, Kyoto, Japão). O potássio foi determinado por fotometria de chama (Corning Ltd., Halstead, Inglaterra) e os restantes nutrientes (Mg, Ca, Fe, Mn, Cu e Zn) por espectrofotometria de absorção atómica (Shimadzu, Kyoto, Japão).

3.2.3.2. Quantificação da clorofila total (SPAD)

A clorofila total foi estimada pelo aparelho SPAD-502 (Minolta Co., Osaka, Japão), que pode ser utilizado como um método não destrutivo de estimar a concentração clorofilina uma vez que os valores de SPAD são proporcionais à quantidade relativa de clorofila total existente nas folhas.

De forma a converter os valores de SPAD na correspondente concentração de clorofila total efectuou-se, previamente, uma curva de calibração. Antes de iniciar o ensaio colheram-se folhas, com diferentes graus de clorose, das árvores seleccionadas, de imediato transportadas numa arca térmica para o laboratório, onde se efectuaram medições de SPAD em diversos discos foliares (diâmetro = 1 cm; área = 0,7854 cm²). De seguida, procedeu-se à extracção dos pigmentos com acetona a 100% na presença de ascorbato de sódio, de forma a evitar a rápida degradação da clorofila *a*. A absorvância das amostras foi determinada por leitura colorimétrica num espectrofotómetro UV-Visível (Shimadzu, Kyoto, Japão) a dois comprimentos de onda (661,6 nm e 644,8 nm). Todo o procedimento de extracção e leitura foi efectuado conforme descrito por Abadía e Abadía (1993). A conversão dos valores de absorvância (A), obtidos no comprimento de onda indicado, para concentração de clorofila (mg L⁻¹) foi realizada com base nas equações propostas por Lichtenthaler (1987):

$$\text{Clorofila } a = 11,24 * A_{661,6} - 2,04 * A_{664,8}$$

$$\text{Clorofila } b = 20,13 * A_{644,8} - 4,19 * A_{661,6}$$

$$\text{Clorofila total} = \text{Clorofila } a + \text{Clorofila } b$$

Todos os valores de SPAD medidos ao longo do ensaio foram convertidos em μmol de clorofila total por unidade de área (m^2) através da utilização da curva de calibração apresentada na **Figura 3.3**, para as árvores de laranjeira utilizadas. Segundo diversos autores (Abadía *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1994) este parâmetro é adequado para medir o grau de clorose.

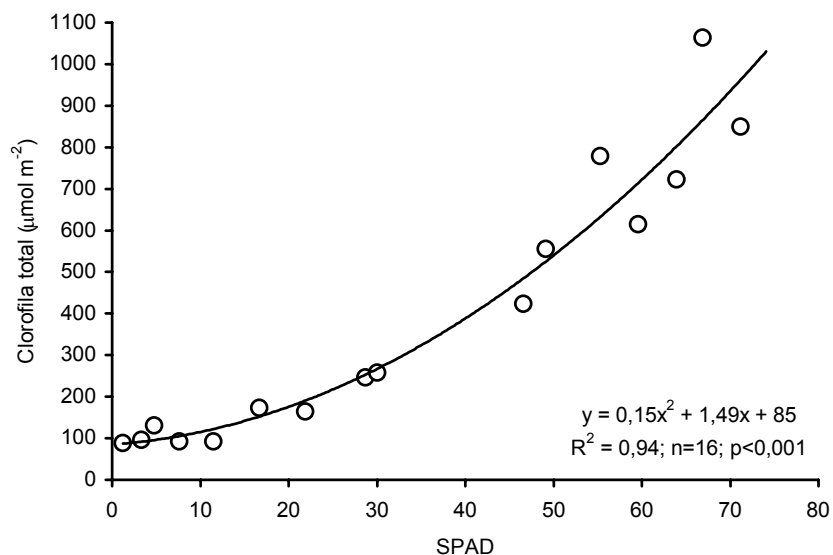


Figura 3.3 – Relação entre a clorofila total ($\mu\text{mol m}^{-2}$) e os valores de SPAD medidos em árvores de laranjeira, cv. ‘Valencia late’.

As medições de SPAD foram efectuadas em cada uma das folhas amostradas mensalmente, para análise foliar. Para cada uma das datas de amostragem foram considerados no mínimo um total de 30 valores por árvore.

3.2.3.3. Parâmetros de qualidade dos frutos

No final de Março de 1997, 1998 e 1999 realizou-se uma amostragem de frutos de, pelo menos, 60 frutos por cada uma das árvores seleccionadas. Os frutos foram rapidamente

transportados numa arca frigorífica para o laboratório e mantidos no frigorífico (4°C) até se completarem todas as análises.

Em cada fruto determinou-se o seu peso fresco (g) e o calibre (mm). No sumo de cada fruto, determinou-se o total de sólidos solúveis, expresso em ° Brix, através do índice de refração do sumo medido pela utilização de um refractómetro de bancada (Atago Co. Ltd., Tóquio, Japão) e a acidez através da titulação de 10 ml de sumo com NaOH 0,1 M, na presença do indicador fenolftaleína ($pK_i = 8,1$). A acidez do sumo foi convertida em percentagem de ácido cítrico anidro (m/v de sumo). Estas análises foram realizadas de acordo com os métodos descritos por A.O.A.C. (A.O.A.C., 1990). O índice de maturação dos frutos foi avaliado pela razão entre o total de sólidos solúveis e a concentração de ácido cítrico (%) conforme proposto por Spiegel-Roy e Goldschmidt (1996).

3.2.4. Procedimento estatístico

O ensaio realizado teve um desenho experimental totalmente casualizado. Os valores obtidos por árvore para cada um dos parâmetros foram considerados como uma repetição independente. O número de árvores variou entre 20 e 18, porque no decorrer do ensaio foram cortadas duas árvores pelo agricultor.

A comparação das médias obtidas para determinado parâmetro medido foi efectuada através da análise de variância (ANOVA) e do teste de comparação múltiplo de médias de Duncan (DMRT) para um intervalo de confiança de 95%.

A consistência interanual na variabilidade da composição mineral e da clorofila das folhas ao longo dos anos foi testada através do coeficiente de concordância de Kendall (W) (Siegel e Castellan, 1988).

A identificação dos principais padrões de variação sazonal e o estudo da variação do conjunto de resultados obtidos em cada um dos parâmetros medidos foi efectuada através da análise em componentes principais. A análise em componentes principais é um método multivariado que permite transformar um conjunto de variáveis iniciais correlacionadas entre si, num outro conjunto de variáveis ortogonais e portanto, não correlacionadas, denominadas por componentes principais, que resultam de combinações lineares do conjunto inicial. Cada componente ou eixo representa uma proporção da variação existente na matriz inicial de resultados (Legendre e Legendre, 1998). Foram considerados como relevantes os eixos com valor-próprio

superior a 1, de acordo com o critério de Kaiser (Legendre e Legendre, 1998). Este procedimento estatístico é muito aplicado na área da nutrição vegetal devido às correlações frequentemente encontradas entre os nutrientes vegetais (Carranca *et al.*, 1993; Igartua *et al.*, 2000).

Após a extracção das componentes principais é possível calcular novos valores (“scores”) para cada uma das observações (árvores) ou casos (médias, meses). Estes valores transformados, resultam da substituição dos valores originais de cada variável no vector calculado para cada uma das componentes principais. Através dos “scores” é possível especificar quais as observações ou casos que têm mais influência na formação das componentes principais e como é que essas observações ou casos se apresentam distribuídos ao longo de cada componente extraída (Legendre e Legendre, 1998).

Foram testadas diferentes regressões múltiplas da forma: $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_nX_n$ (Glantz e Slinker, 1990; Ott, 1997) frequentemente utilizadas para estimar produções em função do estado nutricional das árvores de fruto (Carranca *et al.*, 1993; Correia *et al.*, 2000). Para o estabelecimento dos modelos, os resultados dos três anos de ensaio foram considerados como observações independentes de modo a dispor de um conjunto de dados mais representativos do estado nutricional das árvores. A inclusão das variáveis ($X_1 \dots X_n$) foi efectuada através do método de eliminação de variáveis por passos (“stepwise backward”) de forma a obter modelos optimizados que concretizem os seguintes objectivos:

i) prever o aparecimento dos sintomas de clorose férrica nos meses seguintes à plena floração (Abril) através da composição mineral das flores.

ii) estimar diversos parâmetros de qualidade da produção com base na composição mineral das flores do ano anterior.

De modo a avaliar a capacidade de previsão dos modelos seleccionados, foi efectuada uma validação para um novo conjunto de dados, baseada na comparação entre os valores observados e os estimados pelo modelo seleccionado.

Para a validação do modelo referente à clorofila total utilizaram-se 16 árvores de laranja cv. ‘Valencia late’ instaladas no mesmo pomar do ensaio. No ano de 1999, efectuou-se uma nova colheita de flores em Abril e mediu-se o SPAD 90 dias após a plena floração em 30 folhas das mesmas árvores. A clorofila total apresentou uma média de $517 \pm 26 \mu\text{mol m}^{-2}$, correspondente a um intervalo entre 414 e 734 μmol de clorofila por m^2 .

Em relação ao modelo que permite estimar os parâmetros de qualidade da produção através da composição mineral das flores do ano anterior, utilizaram-se os resultados provenientes de outro pomar instalado num Cambissolo cálcico segundo a classificação da FAO (FAO-Unesco, 1985) e localizado em Almancil, a cerca de 5 Km a Oeste do pomar onde decorreu o ensaio. Em Abril de 1997, procedeu-se à colheita de flores em 10 árvores de laranjeira, ‘Valencia late’. Em Março do ano seguinte, recolheram-se, pelo menos, 40 frutos de cada uma das 10 árvores. Determinou-se o peso fresco e o calibre dos frutos e registou-se o total de sólidos solúveis e percentagem de ácido cítrico existente no sumo desses frutos. O peso fresco dos frutos observados esteve entre 151 e 203 g, a que correspondeu um valor médio de 166 ± 5 . O índice de maturação observado apresentou uma média de $7,8 \pm 0,3$, sendo o valor máximo e mínimo de respectivamente de 6,8 e 9,0.

Na validação de cada um dos modelos foi calculado o coeficiente de determinação (R^2) que se obtém no conjunto de dados novos, externos ao modelo original. O R^2 foi calculado através da equação:

$$R^2 = [\sum(\hat{y} - y_{med})^2] / [\sum(y - y_{med})^2],$$

onde o y é o valor de cada observação, y_{med} é o valor médio das observações \hat{y} é o valor estimado pelo modelo original.

A diferença entre o coeficiente de determinação do modelo original e o R^2 do novo conjunto de dados traduz a perda de poder preditivo, quando se utiliza o modelo em dados diferentes daqueles para os quais foi construído (Glantz e Slinker, 1990).

Por fim, foram determinados os valores referência, ou níveis adequados, relativos à concentração nutritiva nas flores com base nos valores médios obtidos para as árvores que produziram frutos com um calibre superior a 76 mm.

A análise estatística dos dados obtidos foi efectuada no programa de estatística STATISTICA - Versão 5 (Statsoft, 1995).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Composição mineral das folhas

Na **Figura 3.4** está apresentada a variação mensal da concentração nutritiva de folhas de laranjeira, cv. 'Valencia late', entre Abril de 1996 e Março de 1999.

Entre Maio e Agosto, nos anos de 1997 e 1998, a concentração foliar de **N** permaneceu constante entre 19,9 e 22,4 g kg⁻¹ de peso seco (ps), tendência que se manteve nos restantes meses do ano de 1997. Por outro lado, a partir de Agosto de 1998 os valores aumentaram até Novembro, mês em que se registaram os valores mais altos. Desde Novembro de 1998 até Março de 1999 os valores decresceram. Esta variação foi idêntica nos anos de 1996/97 e de 1997/98. Independentemente do ano, a concentração foliar de **N** foi sempre mais baixa nos meses de Abril ou de Maio e variou entre um mínimo de 19,9 g de **N** kg⁻¹ de peso seco (ps) e um máximo 30,9 g kg⁻¹ ps. A variação anual deste elemento foi diferente nos três anos ($W=0,23$; $\chi^2=7,4$; $gl=11$; $p=0,763$).

De um modo geral, a concentração média mensal de **P** aumentou sucessivamente de Maio até Novembro. A partir de Novembro os valores decresceram até Maio do ano seguinte, mês em que se encontraram os valores mínimos de **P** nas folhas. A concentração foliar de **P** apresentou valores médios entre 1,1 e 2,5 g kg⁻¹ ps, considerando os três anos estudados. O **P** não apresentou um padrão de variação anual semelhante nos três anos ($W=0,53$; $\chi^2=17,4$; $gl=11$; $p=0,096$).

Tal como observado para o **P**, o padrão mais evidente na variação do **K** nas folhas de 'Valencia late' foi o decréscimo observado nos dois meses posteriores à floração (Maio e Junho), que se manteve nos três anos de ensaio. No ano de 1997/98 a concentração média de **K** decresceu ao longo do período de tempo considerado. Nos outros anos, os valores aumentaram a partir de Junho e permaneceram constantes durante os meses de Verão (Julho, Agosto e Setembro). Nos meses seguintes a concentração média de **K** decresceu até Março. No período de tempo considerado, a concentração de **K** nas folhas esteve compreendida entre um mínimo de 4 e um máximo de 12 g kg⁻¹ ps e apresentou uma variação não concordante entre anos ($W=0,46$; $\chi^2=15,3$; $gl=11$; $p=0,171$).

Nos três anos amostrados e tal como para o **Ca** ($W=0,37$; $\chi^2=12,3$; $gl=11$; $p=0,34$), não foi possível identificar um padrão de variação sazonal para o **Mg** ($W=0,29$; $\chi^2=9,6$; $gl=11$; $p=0,563$).

Em comum, as concentrações destes nutrientes apresentaram um decréscimo entre Março e Maio, facto que variou com o ano. Considerando os 3 anos, a concentração foliar de Mg oscilou entre 1,6 e 3,2 g kg⁻¹ ps enquanto que a de Ca variou entre 21 e 62 g kg⁻¹ ps.

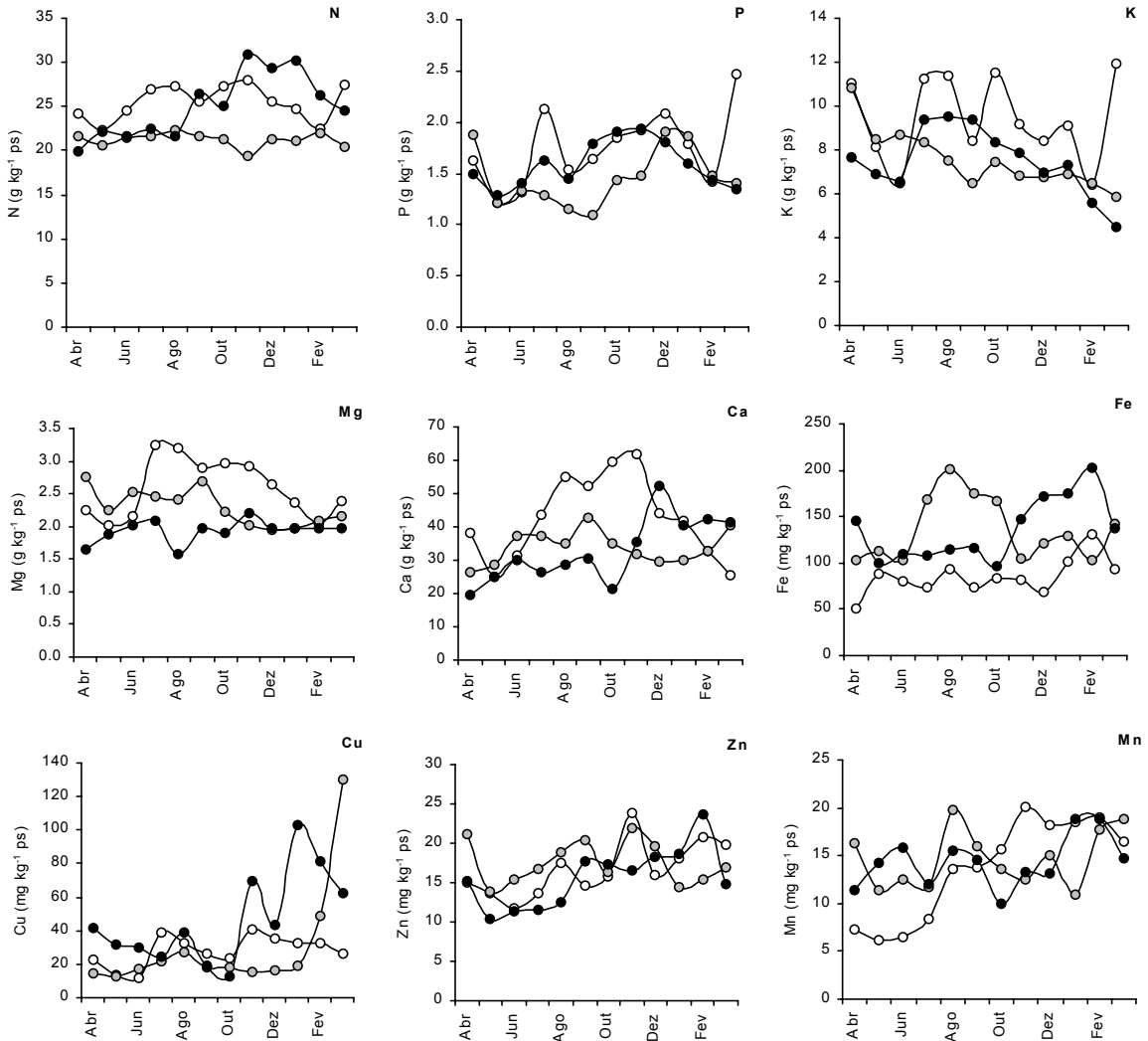


Figura 3.4 – Variação anual da concentração média mensal dos nutrientes em folhas de laranjeira da cv. ‘Valencia late’ registada durante três anos consecutivos. Cada valor corresponde à média mensal de pelo menos 18 árvores. Círculos brancos, cinzentos e pretos representam respectivamente, os valores obtidos no período de Abril de 1996 a Março de 1997, de Abril de 1997 a Março de 1998 e de Abril de 1998 a Março de 1999.

A concentração foliar de Fe para os três anos considerados variou entre 51 e 203 mg kg⁻¹ ps. Por outro lado, a variação anual da concentração foliar de Fe não foi concordante entre os anos considerados ($W=0,31$; $\chi^2=10,1$; $gl=11$; $p=0,518$). Em 1996 e 1998, os valores mais altos foram observados nos meses de Outono - Inverno enquanto que em 1997 foram registados nos meses de Verão (Julho, Agosto e Setembro). Considerando cada um dos anos, verificou-se que os valores de

Fe mais baixos foram observados sempre no mês de Abril ou de Maio, tal como observado para o Zn e o Mn. O **Mn** não apresentou um padrão de variação evidente durante o período em que decorreu o ensaio ($W=0,43$; $\chi^2=14,3$; $gl=11$; $p=0,22$). No período entre Abril de 1996 e Março de 1999 os valores de Mn estiveram compreendidos entre 6 e 20 mg kg⁻¹ ps.

Contrariamente aos restantes nutrientes, o **Zn** apresentou um padrão de variação anual concordante nos três anos considerados ($W=0,59$; $\chi^2=19,4$; $gl=11$; $p=0,05$) e os valores estiveram entre 10 e 24 mg kg⁻¹ ps

A concentração foliar de **Cu** não apresentou uma variação anual concordante ($W=0,54$; $\chi^2=17,8$; $gl=11$; $p=0,086$). Os valores correspondentes aos meses entre Outubro e Março foram superiores aos registados nas outras datas de amostragem. Nos restantes meses os valores de Cu nas folhas permaneceram pouco alterados. A concentração de Cu nas folhas apresentou variações entre 11 e 130 mg kg⁻¹ ps.

As elevadas variações relativas ao Cu são motivadas pelos tratamentos efectuados com fungicidas com sulfato de cobre, não sendo este nutriente considerado na restante análise estatística dos resultados.

3.3.2. Variação sazonal da concentração nutritiva das folhas

Com o objectivo de identificar um padrão de variação nutritiva comum aos 3 anos de ensaio aplicou-se a análise em componentes principais ao conjunto de dados obtidos da análise foliar efectuada mensalmente.

Verificou-se que cerca de 58% da variação global está condensada nas duas primeiras componentes, explicando o primeiro eixo 35% e o segundo eixo 23% desta variação. Da análise em componentes principais (**Figura 3.5**), salienta-se que o primeiro eixo (CP1) reflecte um gradiente nutricional que contrasta o aumento de N, P, K, Ca e Mg, com o aumento de Fe, tendo o Zn e o Mn um peso negligenciável na formação do eixo. Neste gradiente, Abril de 1998 aparece no extremo com maiores concentrações de Fe e os meses de Julho, Agosto, Outubro e Novembro de 1996 aparecem no extremo oposto.

O segundo eixo (CP2) reflecte um gradiente nutricional que corresponde basicamente a um aumento coordenado da concentração de K, Zn, Mn, Fe e Ca nas folhas. O K, embora com um

peso relativamente baixo na formação do eixo, é o único nutriente cujo comportamento contrasta com o gradiente dominante.

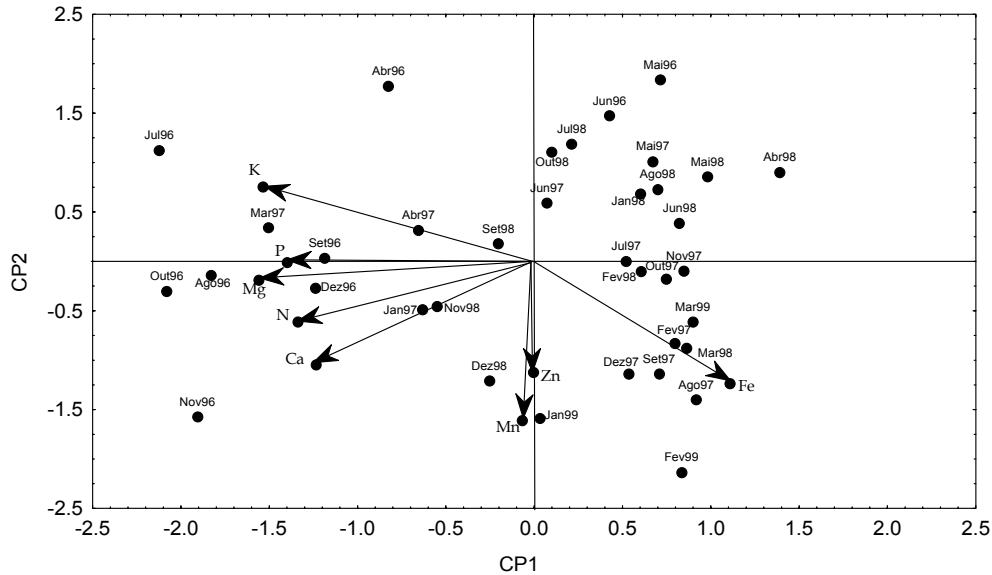


Figura 3.5 – Diagrama da análise de componentes principais referente à concentração foliar de diversos nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn e Mn) durante 3 anos. Os vectores representam os pesos factoriais (“loadings”) das variáveis (nutrientes) nas duas componentes e os círculos representam os valores das componentes (“scores”) para cada caso (meses). CP1 – primeiro eixo; CP2 – segundo eixo.

Analisando cada um dos anos separadamente, verificou-se que Fevereiro, Maio e Junho são os meses que se tendem a localizar no extremo do gradiente definido pelo CP1 que corresponde às maiores concentrações foliares de Fe, e menores concentrações dos restantes nutrientes (N, P, K, Ca e Mg) (**Figura 3.5**).

No gradiente definido por CP2, os meses de Novembro, Dezembro e Fevereiro tendem a localizar-se no extremo do gradiente definido por menor concentração foliar de Fe, Ca, Mn e Zn. Pelo contrário, os meses imediatamente após a plena floração (Abril a Julho) tendem a concentrar-se no extremo oposto deste gradiente (**Figura 3.5**).

Na **Figura 3.6**, destaca-se o comportamento singular do ano de 1996 relativamente aos outros dois anos, onde as variações ao longo do ano segundo o CP1 são mais acentuadas ($W=0,31$; $\chi^2=10$; $gl=11$; $p=0,52$). O gradiente de variação nutricional expresso no segundo eixo apresentou uma tendência similar nos três anos, salientando-se o decréscimo verificado a seguir a Abril ou Maio ($W=0,57$; $\chi^2=19$; $gl=11$; $p=0,05$).

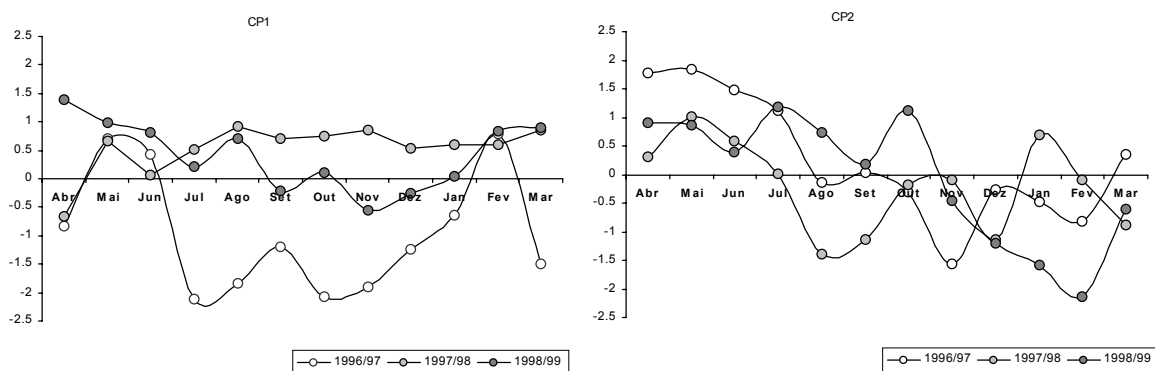


Figura 3.6 – “Scores” calculados segundo os vectores dos dois primeiros eixos referentes ao gradiente da concentração foliar de N, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn e Mn). Cada ponto representa o valor médio mensal. CP1 – primeiro eixo; CP2 – segundo eixo.

A variação do Fe e do Ca está distribuída segundo os dois eixos principais salientando a influência destes dois elementos nutritivos no padrão de variação anual encontrado pela análise em componentes principais. No entanto, no CP1 estes elementos têm comportamentos opostos enquanto que no CP2 têm comportamentos concordantes.

3.3.3. Composição mineral das flores

Na **Tabela 3.3** está apresentada a composição mineral de flores de laranjeira colhidas durante a plena floração (Abril) durante três anos consecutivos (1996, 1997 e 1998).

Considerando os anos amostrados, a concentração (expressa em g de nutriente por kg⁻¹ de ps) média, de N variou entre 20,5 e 29,7, a de K entre 14,8 e 24,0, a de P entre 2,5 e 2,8, a de Ca entre 3,0 e 7,2 e a de Mg entre 1,7 e 2,3. Relativamente aos micronutrientes (mg de nutriente por kg⁻¹ ps), os valores médios mínimos e máximos registados no conjunto dos três anos foram respectivamente, de 22,0 e 62,0 para o Fe, de 6,6 e 49,3 para o Cu, de 11,3 e 20,2 para o Zn e de 11,4 e 12,8 para o Mn. As razões obtidas entre a concentração nutritiva de alguns nutrientes nas flores de laranjeira colhidas em 1996 são muito superiores às obtidas nos outros dois anos realçando um equilíbrio nutritivo diferente no primeiro ano de ensaio.

Tabela 3.3 – Média e desvio padrão da concentração de diversos nutrientes e de algumas razões nutritivas obtidas em **flores** de laranjeira colhidas durante a plena floração (Abril) durante três anos consecutivos (1996 a 1998).

	1996 (n=20)		1997 (n=20)		1998 (n=18)	
	média	desvio padrão	média	desvio padrão	média	desvio padrão
<i>g kg⁻¹ peso seco</i>						
N	29,7	2,4	21,6	2,7	20,5	2,1
P	2,8	0,3	2,5	0,4	2,6	0,8
K	24,0	2,1	18,5	2,1	14,8	4,2
Mg	2,2	0,3	2,3	0,2	1,7	0,2
Ca	3,0	0,9	7,2	1,1	4,9	1,7
<i>mg kg⁻¹ peso seco</i>						
Fe	21,6	3,4	61,8	9,2	41,5	7,6
Cu	6,6	1,0	19,8	4,1	49,3	12,9
Zn	11,3	1,1	20,2	2,7	18,7	6,4
Mn	12,3	1,5	12,8	1,6	11,4	2,0
<i>razões nutritivas</i>						
P/Fe	134,2	35,8	40,2	10,5	65,1	14,3
K/Ca	8,7	2,7	2,6	0,4	3,3	1,1
K/Zn	2131,8	251,5	931,2	166,5	834,8	180,5
K/Mg	1149,1	232,8	304,8	68,9	370,5	91,1
K/P	11,3	1,3	8,1	0,5	8,8	1,0
Mg/Zn	191,8	31,8	115,6	18,9	95,3	18,0
Fe/Mn	8,8	1,3	7,7	1,5	5,7	0,9

3.3.4. Variação da concentração nutritiva das flores

A variação da composição mineral das flores está condensada nos dois primeiros eixos extraídos pela análise em componentes principais. No primeiro e segundo eixos estão respectivamente representados 44% e 23% da variação global. O CP1 evidencia o gradiente nutricional que contrasta o aumento de N, P e K com o aumento de Ca, Fe, Cu e Zn (**Figura 3.7**), embora o P tenha uma contribuição relativamente baixa. A concentração de Mg e Mn tem uma contribuição muito baixa na formação deste eixo. O CP2 reflecte o gradiente nutricional associado ao aumento coordenado do Mg, Ca e Mn.

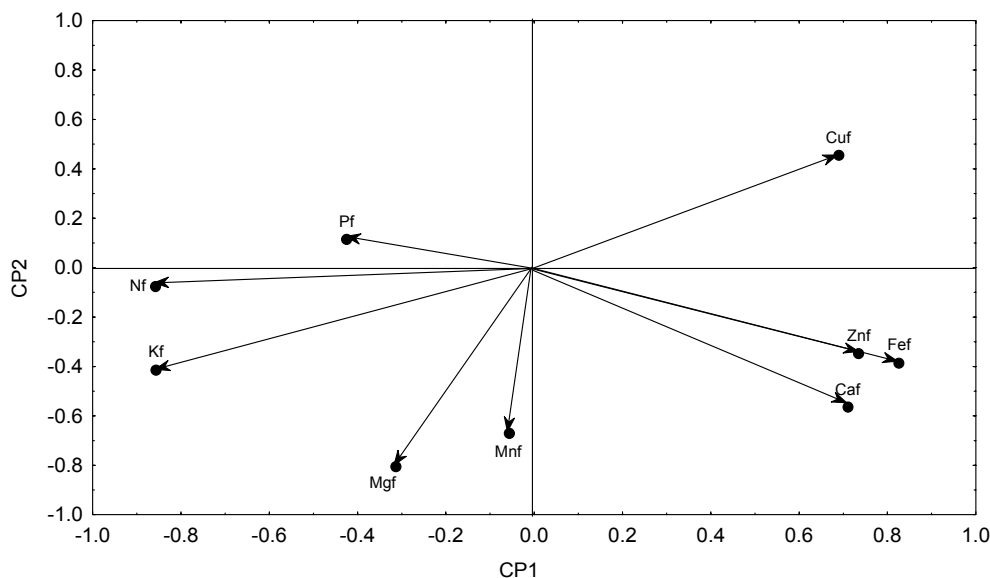


Figura 3.7 – Diagrama da análise de componentes principais referente à concentração floral (f) dos nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn e Mn) durante 3 anos. Os vectores representam os pesos factoriais (“loadings”) das variáveis (nutrientes) nas duas componentes principais. CP1 – primeiro eixo; CP2 – segundo eixo.

Os “scores” de cada uma das árvores (1 a 20) segundo o CP1 e o CP2 estão representados na **Figura 3.8**.

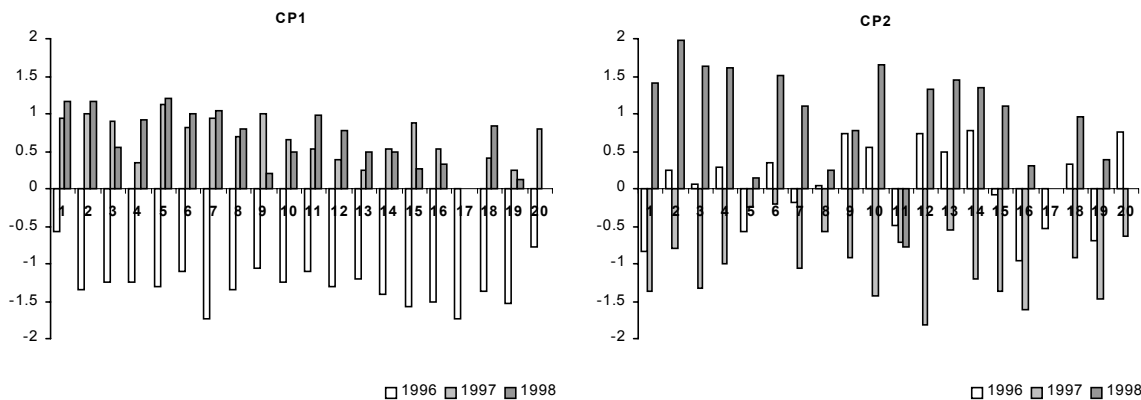


Figura 3.8 – “Scores” resultantes da análise em componentes principais referente à concentração floral (f) dos nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn e Mn) no mês de Abril (plena floração) durante 3 anos (1996 a 1998). Cada barra representa o valor obtido em cada uma das árvores. CP1 – primeiro eixo; CP2 – segundo eixo.

No gradiente expresso pelo CP1, os valores obtidos para todas as árvores no ano de 1996 são contrários aos calculados para os anos de 1997 e de 1998. Consequentemente, é no ano de 1996 que as árvores apresentaram as concentrações mais altas de N, P e K e as mais baixas de Ca, Fe, Cu e Mn nas flores. Em relação ao CP2, parece haver um contraste marcado entre os anos de 1997 e 1998, tendo os valores de 1996 pouca influência na formação deste eixo. O ano de 1997

corresponde a concentrações mais elevadas de Mg, Ca e Mn, enquanto que em 1998 se verificaram concentrações mais baixas deste nutrientes e mais elevadas de Cu. Em resumo, os gradientes definidos pelos dois primeiros eixos da análise em componentes principais sugerem que os principais contrastes podem ser mais definidos por diferenças na concentração de nutrientes em diferentes anos, do que por diferenças sistemáticas entre grupos de árvores.

3.3.5. Comparação entre a composição mineral das folhas e das flores

Na **Figura 3.9** estão apresentadas as concentrações nutritivas nas flores e nas folhas colhidas em Abril de cada um dos anos considerados.

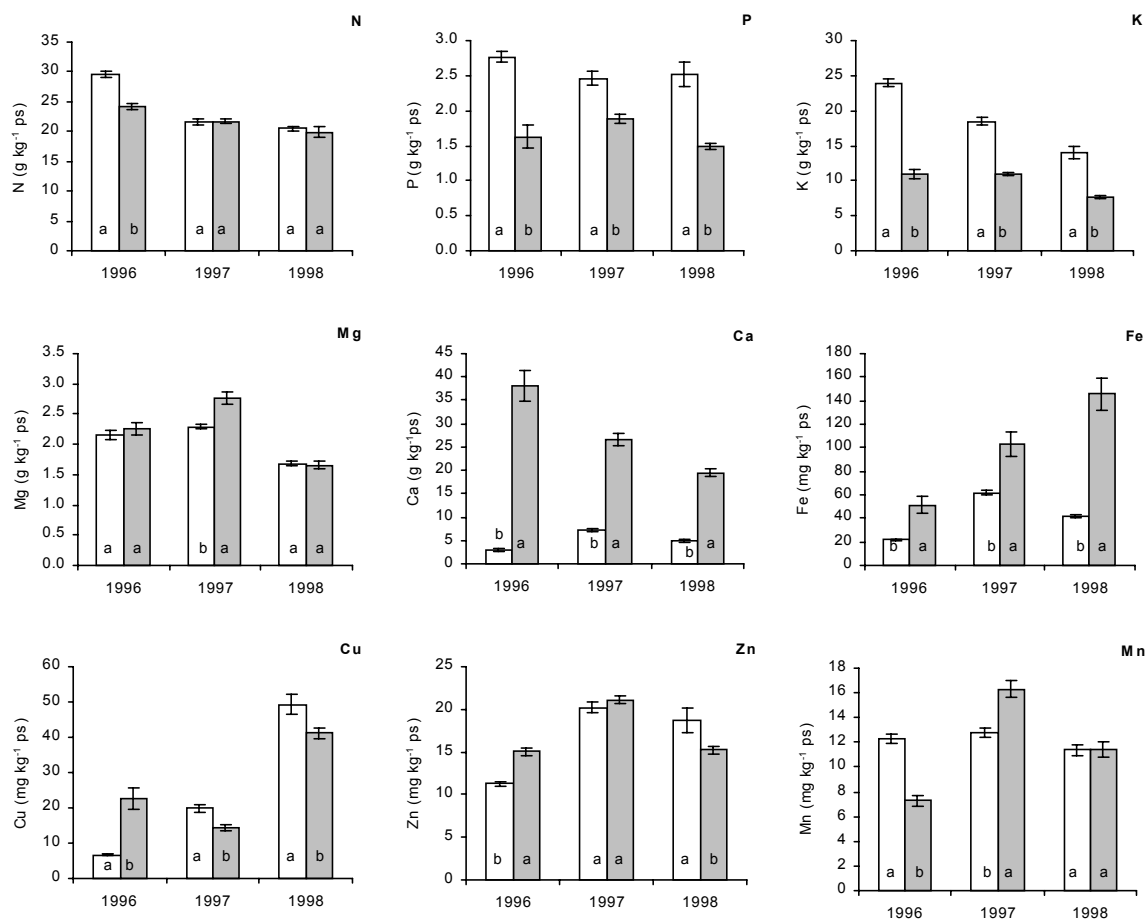


Figura 3.9 – Concentrações nutritivas obtidas em flores (barras brancas) e folhas (barras cinzentas) de laranjeira colhidas em Abril de 1996, 1997 e 1998. Para cada média está representado o respectivo erro padrão. Comparando folhas com flores, médias com a mesma letra não são significativamente diferentes a 95%.

Da comparação entre as concentrações médias dos nutrientes nas flores e nas folhas de laranjeira ‘Valencia late’ verificadas no mês de Abril dos três anos de ensaio é evidente que, por

um lado, os valores de K e de P nas flores são sempre superiores aos das folhas e que pelo contrário, a concentração de Ca e de Fe nas flores é sempre inferior à registrada nas folhas. Assim, enquanto que a concentração média de K oscilou entre 19 e 24 g kg⁻¹ ps nas flores, nas folhas os valores em Abril variaram entre 4 e 12 g kg⁻¹ ps. Em relação ao P, a concentração variou entre 2,5 e 2,8 g kg⁻¹ ps nas flores e de 1,0 e 2,5 g kg⁻¹ ps nas folhas. A concentração de Ca situou-se entre 3 e 7 g kg⁻¹ ps nas flores e entre 25 e 62 g kg⁻¹ ps nas folhas. O Fe nas flores apresentou valores compreendidos entre 22 e 62 mg kg⁻¹ ps, valores muito inferiores aos registrados nas folhas (51 e 203 mg kg⁻¹ ps) e com um intervalo de variação menor.

A concentração de N e de Mg nas flores foi muito idêntica à das folhas, com exceção de 1996 para o N e de 1997 para o Mg. Quanto aos restantes micronutrientes (Cu, Zn e Mn), os valores registrados nas folhas e nas flores apresentaram uma ordem de grandeza muito semelhante. Por outro lado, não se reconhece qualquer tipo de padrão de variação semelhante destes nutrientes nos três anos de amostragem.

Devido ao elevado intervalo de variação dos valores de Cu nas flores, motivado pelas frequentes pulverizações com fungicidas cúpricos, este nutriente não foi incluído em qualquer um dos modelos posteriormente testados.

3.3.6. Variação sazonal da clorofila total

Na **Figura 3.10** está representada a variação mensal da clorofila total nas folhas de laranjeira ‘Valencia late’ entre Abril de 1996 e Março de 1999. De um modo geral, os valores de clorofila total foram inferiores aos registrados para a mesma cultivar, quando instalada em solos não calcários, onde pode atingir valores da ordem das 800 µmol m⁻². Verificaram-se sintomas de clorose férrica sempre que os valores decresceram abaixo das 400 µmol m⁻².

Da análise do gráfico salienta-se que o padrão de variação anual da clorofila total nas folhas de laranjeira é muito semelhante nos anos de 1996/97 e de 1997/98 enquanto que no ano seguinte a partir de Agosto de 1998 as tendências são contrárias ($W=0,22$; $\chi^2=5,2$; $gl=2$; $p=0,8$). Nos dois primeiros anos verificou-se que a clorofila total aumentou desde Abril até Agosto, mês a partir do qual os valores decresceram novamente até Dezembro. Em Agosto e Setembro de 1998 registaram-se os valores mais baixos de clorofila total que aumentaram nos meses seguintes

enquanto que, pelo contrário, em Agosto de 1996 e de 1997 obtiveram-se os valores altos que decresceram nos meses seguintes.

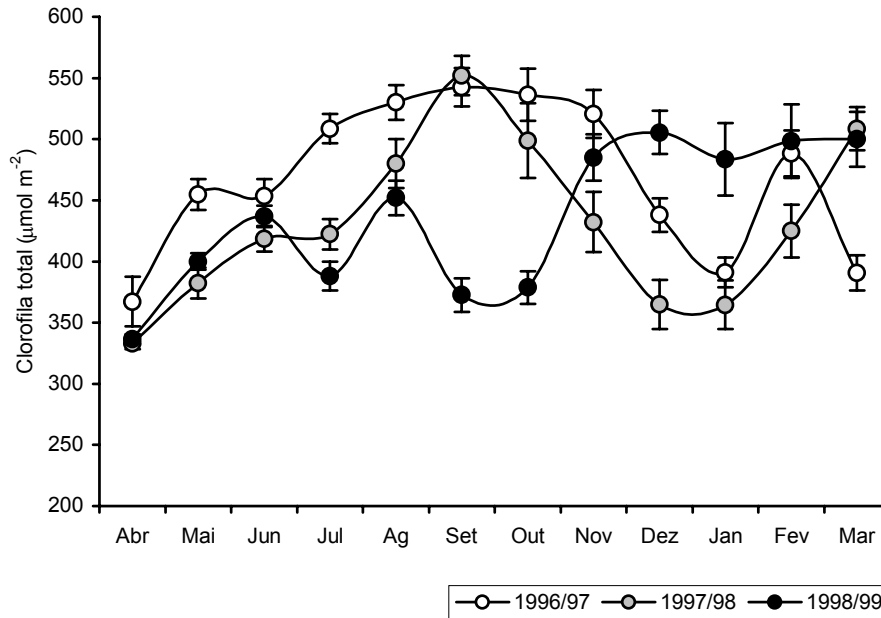


Figura 3.10 – Variação anual (Abril de 1996 a Março de 1999) da clorofila total média de folhas de ‘Valencia late’. Cada ponto representa a média mensal e o respectivo erro padrão de pelo menos 18 árvores .

O valor mais baixo de clorofila total foi registado em Abril de cada um dos três anos enquanto que o valor mais alto foi observado em Setembro dos dois primeiros anos (1996 e 1997) e em Dezembro de 1998. Considerando os três anos, os valores médios mensais de clorofila total oscilaram entre 333 e 552 $\mu\text{mol m}^{-2}$.

3.3.7. Relação entre a clorofila total e a composição mineral das folhas e flores

Aplicou-se o método da análise em componentes principais aos valores referentes à clorofila total e à composição mineral das folhas e das flores no mês de Abril considerando o conjunto dos três anos de ensaio. Verificou-se que os dois primeiros eixos factoriais representam cerca de 53% da variação total dos dados.

Na **Figura 3.11** são representados os pesos das variáveis nos dois primeiros eixos extraídos pela análise em componentes principais, ilustrando-se assim as relações dominantes entre a clorofila total e os nutrientes nas folhas e nas flores. Para a clorofila total foram considerados os

valores medidos nos meses de Abril, Maio, Junho, Julho e Agosto, enquanto que para a composição mineral das folhas e das flores foram incluídos os valores referentes ao mês de Abril (plena floração).

A clorofila acompanha o padrão de variação associado ao CP1, independentemente do mês considerado, e com igual tendência entre meses. A clorofila, medida nos meses de Maio e Julho, é a que apresenta maior contribuição para a formação deste eixo. O peso das clorofilas na formação do segundo eixo factorial é negligenciável.

Enquanto que o K, N e P nas flores, assim como o N e o Ca nas folhas acompanham o gradiente de variação da clorofila segundo o CP1, pelo contrário, o Fe, o Zn e o Ca nas flores bem como o Mn nas folhas têm uma tendência contrária. Para a formação do segundo eixo factorial (CP2) os nutrientes Mg, K e P nas folhas assim como o Mg nas flores têm uma contribuição contrária à do Fe nas folhas.

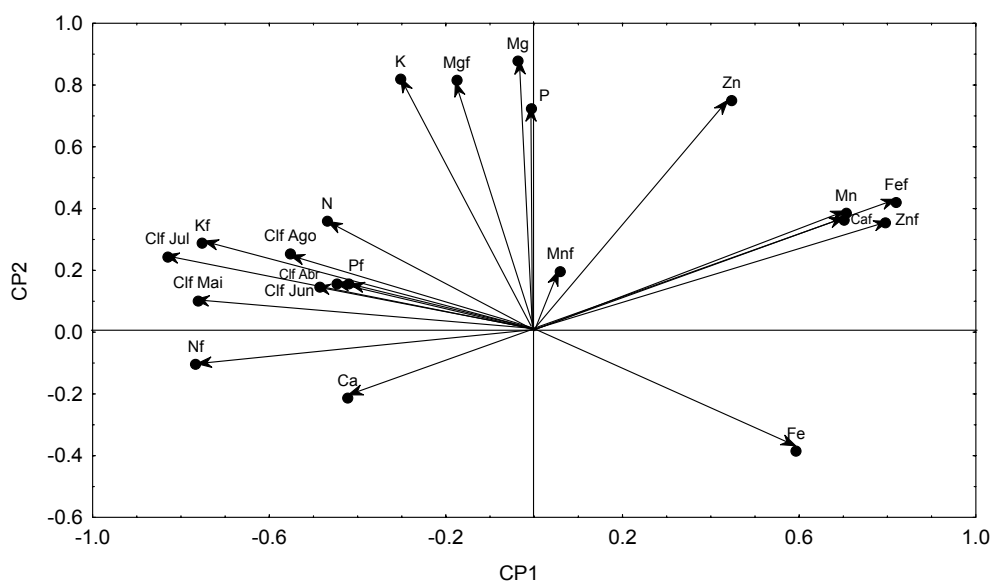


Figura 3.11 – Diagrama da análise de componentes principais referente à clorofila total (Clf), concentração floral (f) e concentração foliar dos nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn e Mn) na plena floração (Abril) durante 3 anos (1996 a 1998). Apresentam-se os valores de clorofila total nos meses de Abril (Clf Abr), Maio (Clf Mai), Junho (Clf Jun), Julho (Clf Jul) e Agosto (Clf Ago). Os vectores representam os pesos factoriais (“loadings”) das variáveis (nutrientes) nas duas componentes principais. CP1 – primeiro eixo; CP2 – segundo eixo.

Tal como tinha sido evidenciado pela análise foliar (**Figuras 3.5 e 3.6**), os valores obtidos segundo o CP1 para todas as árvores no ano de 1996 são mais altos e contrários aos obtidos no ano

de 1997 e de 1998 (**Figura 3.12**). Em relação ao CP2, 1998 foi o ano que apresentou uma influência mais acentuada e de um modo geral, contrária à dos outros anos.

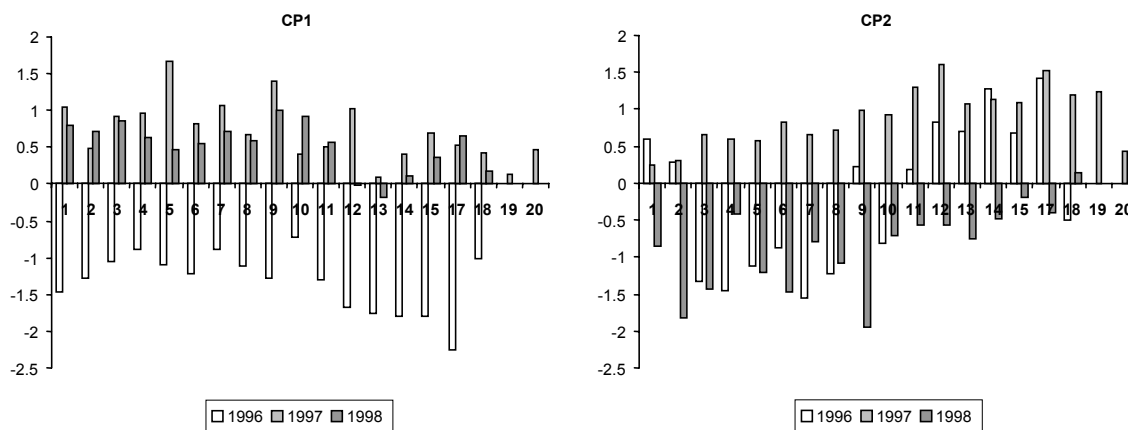


Figura 3.12 – “Scores” resultantes da análise em componentes principais referente à clorofila total (Clf), concentração floral (f) e concentração foliar dos nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn e Mn) na plena floração (Abril), durante 3 anos (1996 a 1998). Cada barra representa o valor obtido em cada uma das árvores (1 a 20). CP1 – primeiro eixo; CP2 – segundo eixo.

Verificou-se uma grande homogeneidade no conjunto das árvores amostradas em cada um dos anos. Isto é, em termos de caracterização nutritiva e de clorose férrica as árvores apresentaram valores similares dentro de cada ano e diferentes de 1996 para os outros anos segundo o CP1 e diferente de 1998 em relação a 1996 e 1997, segundo o CP2. O efeito do ano nos parâmetros considerados foi, assim, evidenciado na análise dos “scores”.

3.3.8. Modelação das relações entre os nutrientes na flor e a clorofila total nas folhas

Na sequência dos resultados da análise em componentes principais, foram testados diversos modelos de regressão múltipla com o objectivo de estimar a clorofila total verificada nas folhas de laranjeira 90 dias após a plena floração (DAPF, Julho) a partir da composição mineral das flores colhidas durante a plena floração (PF, Abril).

O modelo, construído através do método de selecção progressiva por passos, reteve como únicas variáveis significativas o Mg e o Zn (**Tabela 3.4**). Este modelo é globalmente significativo ($p < 0,0001$; $F_{(2,51)} = 20$), embora apresente um coeficiente de determinação relativamente baixo

($R^2=0,44$). Por outro lado, a introdução do termo de interação definido por estas variáveis (Mg*Zn) não melhorou o modelo.

Tabela 3.4 – Valor e respectivo erro padrão do declive (b) e da ordenada na origem para cada um dos nutrientes incluídos no modelo de regressão múltipla obtido pelo método de selecção progressiva por passos entre a clorofila total 90 DAPF (Julho) e diversos nutrientes nas flores.

	b	erro padrão	p
Ordenada na origem	442,3	53,3	0,000
Mg (flores)	79,2	22,9	0,001
Zn (flores)	-10,2	1,8	0,000

Para tentar obter uma maior capacidade de previsão da clorofila a partir das concentrações de nutrientes nas flores, desenvolveram-se novos modelos baseados nas razões nutritivas habitualmente utilizadas para avaliar o estado nutritivo das árvores de fruto. O melhor modelo construído com base numa eliminação progressiva por passos apenas reteve como variável significativa a razão entre a concentração floral de Mg e de Zn ($R^2=0,49$; $F_{(1,52)}=50$; $p<0,00001$). A inclusão desta razão nutritiva está de acordo com o modelo obtido quando se consideraram apenas as concentrações individuais de cada nutriente (**Tabela 3.4**). Os valores que permitem estimar a clorofila 90 DAPF (Julho) em função da razão nutritiva Mg/Zn nas flores estão apresentados na **Tabela 3.5**.

Tabela 3.5– Valor e respectivo erro padrão do declive (b) e da ordenada na origem para a razão nutritiva incluída no modelo de regressão múltipla obtido pelo método de selecção progressiva por passos entre a clorofila total 90 DAPF (Julho) e diversas razões nutritivas nas flores (f).

	b	erro padrão	p
Ordenada na origem	283,6	23,1	0,000
Mg/Zn (flores)	1,2	0,2	0,000

Para cada acréscimo de uma unidade na razão Mg/Zn, determinada nas flores em Abril (PF), a clorofila total nas folhas no mês de Julho aumenta de $1,2 \pm 0,2$ e menor será a probabilidade de ocorrerem sintomas de clorose férrica no mês de Julho. A diminuição desta razão nutritiva nas

flores ao longo dos três anos esteve associada a acréscimos mais acentuados do Zn em relação aos de Mg.

A função linear resultante deste modelo está graficamente apresentada na **Figura 3.13**.

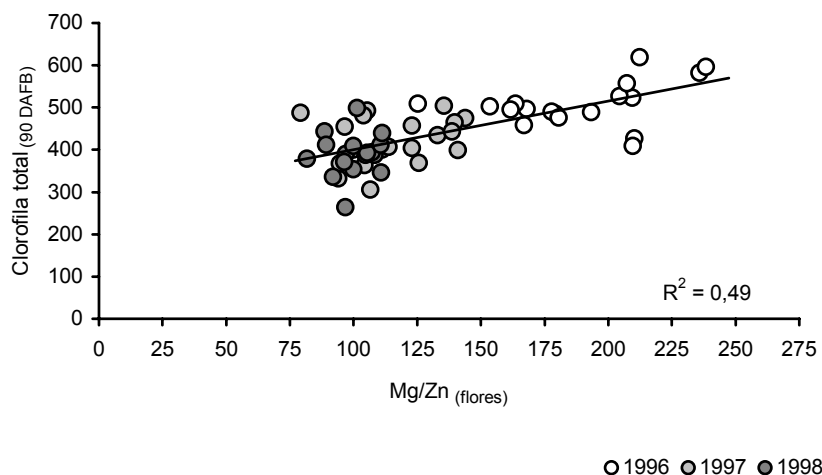


Figura 3.13 – Regressão linear entre a razão Mg/Zn nas flores durante a plena floração e a clorofila total ($\mu\text{mol m}^{-2}$) nas folhas 90 dias após a plena floração (DAPF).

Através da análise da **Figura 3.13** é evidente o decréscimo anual da clorofila a partir de 1996.

3.3.8.1. Validação do modelo

A validação dos modelos de regressão entre a clorofila e a razão nutritiva Mg/Zn foi efectuada com base em dados não utilizados na sua construção, uma vez que a avaliação interna da capacidade preditiva tende a produzir sobre-estimativas.

O primeiro modelo considerado, que resulta da concentração nutritiva de cada um dos nutrientes, Mg e Zn, apresentou uma reduzida capacidade de previsão para outro conjunto de dados independentes pois a validação deste modelo apresentou diferenças entre os valores observados e os estimados superiores a 50%. Os resultados obtidos da validação do modelo onde é considerada a razão nutritiva Mg/Zn nas flores como parâmetro que permite estimar a clorofila 90 DAPF estão apresentados na **Figura 3.14**.

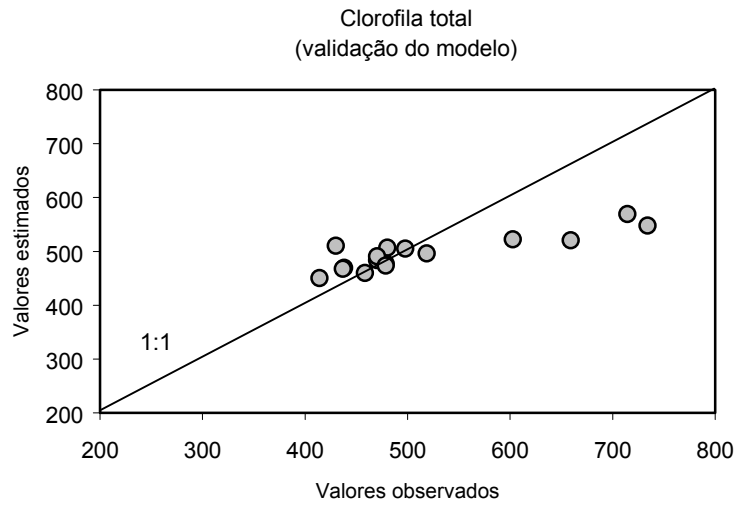


Figura 3.14 – Validação do modelo seleccionado para a clorofila total 90 dias após a plena floração. Cada ponto representa o valor médio estimado por árvore.

A clorofila observada 90 DAPF apresentou uma média de $517 \pm 25 \mu\text{mol m}^{-2}$ enquanto que os valores de clorofila estimados pelo modelo apresentaram valores médios de $497 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2}$. O coeficiente de determinação calculado para o conjunto de dados utilizados na validação do modelo decresceu para 0,22, o que significa que quando se utiliza a equação para estimar valores externos ao modelo há uma perda de 27% do poder preditivo.

Partindo do pressuposto que folhas de laranja ‘Valencia late’ com uma concentração clorofilina inferior a $400 \mu\text{mol m}^{-2}$ apresentam sintomas de clorose férrica foi possível determinar a razão Mg/Zn associada a estas condições através do modelo estabelecido. Deste modo, flores de ‘Valencia late’ com valores de Mg/Zn inferiores a 100 durante a PF (Abril) terão tendência a manifestar sintomas de clorose férrica 90 DAPF (Julho).

Pelo contrário, árvores que apresentem flores com uma razão Mg/Zn superior a 200 não deverão apresentar sintomas de clorose férrica 90 DAPF e apresentarão valores de clorofila superiores a $500 \mu\text{mol m}^{-2}$. Flores com valores intermédios, entre 100 e 200, encontram-se provavelmente numa situação de clorose férrica latente.

3.3.9. Qualidade da produção

Na **Tabela 3.6** mostram-se as médias e os respectivos erro padrão obtidos em alguns dos parâmetros de qualidade da produção (peso fresco, calibre, total de sólidos solúveis, percentagem de ácido cítrico) durante os anos de 1997 a 1999.

Tabela 3.6 – Média e respectivo erro padrão de alguns parâmetros de qualidade da produção colhida em Abril de 1997, 1998 e 1999.

	1997 (n=60)	1998 (n=190)	1999 (n=126)
	média ± erro padrão	média ± erro padrão	média ± erro padrão
Peso fresco do fruto (g)	208,7 ± 11,6 a	176,2 ± 6,5 b	194,1 ± 10,0 ab
Calibre (mm)	73,2 ± 1,5 a	71,7 ± 1,3 a	72,5 ± 1,2 a
Total de sólidos solúveis (° Brix)	10,0 ± 0,2 b	11,5 ± 0,1 a	10,0 ± 0,2 b
Ácido cítrico (%)	1,1 ± 0,04 b	1,0 ± 0,03 c	1,4 ± 0,02 a

Na linha, médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes a 95% (teste de Duncan).

Considerando cada um dos anos, não houve diferenças acentuadas entre o peso fresco dos frutos que, contudo, foi ligeiramente superior em 1997. Por sua vez, o calibre das laranjas foi independente do ano. Em 1998, os frutos apresentaram os valores mais altos de total de sólidos solúveis e mais baixos de ácido cítrico. No ano de 1999 registou-se uma acidez média dos frutos superior à dos outros dois anos.

Aplicou-se a análise em componentes principais aos parâmetros de qualidade obtidos num determinado ano e às respectivas concentrações florais obtidas no ano anterior. A projecção destas variáveis segundo os dois eixos principais, representam 54% da variação total do conjunto de dados (**Figura 3.15**).

No primeiro eixo estão expressos os parâmetros que definem o tamanho dos frutos, o calibre e o peso fresco, que variam em concordância entre si, e os que caracterizam o estado de maturação dos frutos, total de sólidos solúveis e percentagem de ácido cítrico, que apresentam entre si um padrão de variação contrário. Por sua vez, enquanto que o ácido cítrico acompanha a variação do tamanho do fruto, o índice de maturação e o total de sólidos solúveis apresentam uma tendência contrária. A variação dos parâmetros de qualidade da produção representados neste eixo está

associada a um gradiente nutricional que contrasta o aumento de P, K e N com o aumento de Ca, Fe e Zn nas flores.

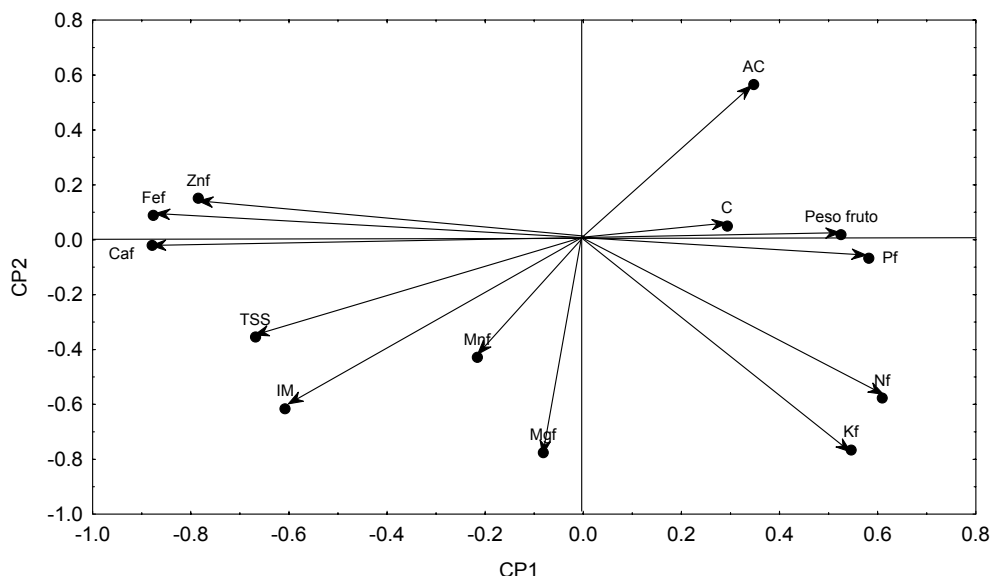


Figura 3.15– Diagrama da análise de componentes principais referente à concentração floral (f) durante 3 anos (1996 a 1998) e aos parâmetros de qualidade dos frutos colhidos nos anos seguintes (1997 a 1999). Apresentam-se os parâmetros de qualidade: C - calibre; TSS - total sólidos solúveis; IM - índice de maturação; AC – percentagem ácido cítrico. Os vectores representam os pesos factoriais (“loadings”) das variáveis nos dois eixos principais. CP1 – primeiro eixo; CP2 – segundo eixo.

O segundo eixo representa a variação do índice de maturação que ocorre independentemente do tamanho dos frutos onde o total de sólidos solúveis e a percentagem de ácido cítrico apresentam um padrão de variação contrário. Nas flores, o gradiente nutricional que acompanha a variação da maturação dos frutos é definido pelo aumento coordenado do Mg, K, N e em menor extensão, do Mn.

3.3.10. Modelação das relações entre a composição mineral das flores e a qualidade da produção

Com base nas relações encontradas entre a composição mineral das flores (N, K, P, Ca, Mg, Fe, Zn e Mn) colhidas num determinado ano e a qualidade da produção obtida no ano seguinte a partir dessas flores foram estabelecidos dois modelos de regressão múltipla, pelo método de selecção progressiva por passos, formados a partir de diferentes variáveis dependentes: i) Modelo

1, que considera o tamanho do fruto (peso fresco do fruto) e ii) Modelo 2, referente ao estado de maturação dos frutos (índice de maturação).

- **Modelo 1 (peso fresco do fruto)**

A concentração de N, Mg, Ca e Zn existente nas flores de um determinado ano permitiu estimar o peso fresco do fruto no ano seguinte através de uma equação de regressão linear múltipla apresentada na **Tabela 3.7**.

Tabela 3.7 – Valor e respectivo erro padrão do declive (b) e da ordenada na origem para cada um dos nutrientes incluídos no modelo de regressão múltipla obtido pelo método de eliminação progressiva por passos entre o peso fresco do fruto e diversos nutrientes nas flores.

	b	erro padrão	p
Ordenada na origem	193,1	43,7	0,000
N _(flores)	-2,2	1,3	0,080
Mg _(flores)	41,0	14,4	0,006
Ca _(flores)	-20,1	3,0	0,000
Zn _(flores)	4,2	1,2	0,001

A alteração do efeito singular do N no peso fresco do fruto foi devida ao efeito conjunto dos nutrientes incluídos no modelo que como variáveis muito correlacionadas apenas tem valor preditivo ($R^2 = 0,50$; $F_{(4,50)} = 12,3$; $p < 0,0001$).

- **Modelo 2 (índice de maturação)**

O índice de maturação, expresso pela razão entre o total de sólidos solúveis e a percentagem do ácido cítrico existente no sumo de laranja, é o parâmetro mais indicado para avaliar o estado de maturação e determinar a data de colheita dos frutos citrícolas. A composição mineral das flores, colhidas durante a plena floração, pode ser utilizada para estimar o índice de maturação dos frutos

no ano seguinte. O melhor modelo de regressão múltipla ($R^2 = 0,55$; $F_{(4,50)}=15,1$; $p<0,00001$) foi obtido pela inclusão da concentração floral de N, P, Mg e Fe (**Tabela 3.8**).

Tabela 3.8 – Valor e respectivo erro padrão do declive (b) e da ordenada na origem para cada um dos nutrientes incluídos no modelo de regressão múltipla obtido pelo método de selecção progressiva por passos entre o índice de maturação das laranjas e a composição mineral das flores.

	b	erro padrão	p
Ordenada na origem	1,82	2,11	0,400
N (flores)	0,16	0,05	0,005
P (flores)	-1,03	0,43	0,020
Mg (flores)	1,78	0,58	0,003
Fe (flores)	0,07	0,01	0,000

3.3.10.1. Validação dos modelos 1 e 2

Para a validação dos dois modelos estabelecidos entre a composição mineral das flores e o peso fresco das laranjas (Modelo 1) e o índice de maturação (Modelo 2) utilizou-se um conjunto de observações externas às utilizadas na construção destes modelos.

Na **Figura 3.16** estão apresentados os resultados resultantes da aplicação do modelo determinado entre o peso fresco das laranjas e a composição mineral das flores.

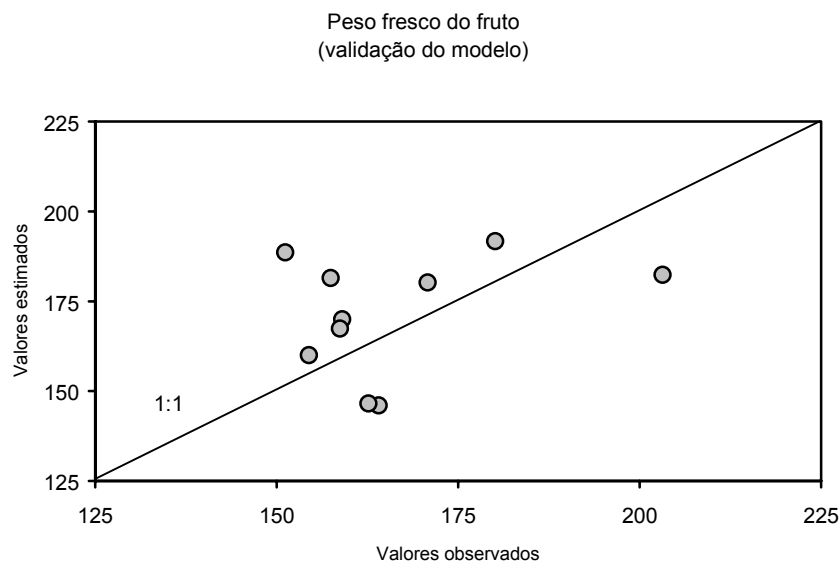


Figura 3.16 – Validação do modelo seleccionado para o peso fresco do fruto (g). Cada ponto representa o valor médio estimado por árvore.

Enquanto que o peso fresco do fruto observado apresenta uma média de 166 ± 5 g, o peso fresco do fruto estimado apresenta valores médios de 174 ± 5 g. Comparando o coeficiente de determinação do modelo (0,50) com o obtido para os dados externos (0,42) verifica-se que a equação perde cerca de 8% de poder preditivo quando é utilizada para estimar casos externos ao modelo.

Os resultados obtidos da validação do modelo seleccionado para o índice de maturação estão apresentados na **Figura 3.17**.

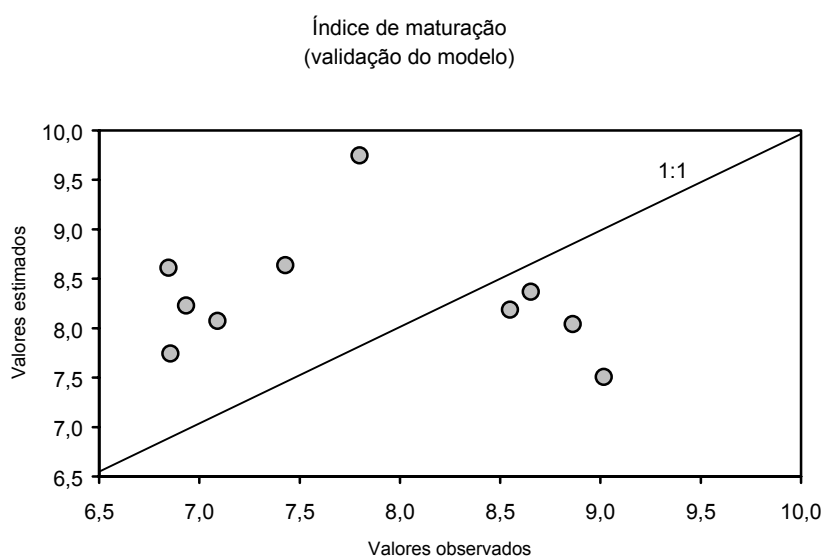


Figura 3.17 – Validação do modelo seleccionado para o índice de maturação. Cada ponto representa o valor médio estimado por árvore.

Os valores do índice de maturação observados apresentam uma média de $7,8 \pm 0,3$ enquanto que os estimados têm uma média de $8,3 \pm 0,2$. O modelo explica 55% da variabilidade dos dados originais mas só explica 36% da variabilidade dos dados externos utilizados na sua validação, o que representa uma redução de poder preditivo da ordem dos 19%.

3.3.11. Valores de referência para a composição mineral das flores

De forma a obter valores de referência, ou os níveis adequados, para a concentração nutritiva das flores de laranjeira, cv. ‘Valencia late’, seleccionaram-se todas as árvores que independentemente do ano, produziram frutos com um calibre médio superior a 76 mm. Estes

calibres da laranja ‘Valencia late’, correspondem às classes com maior valorização económica na região do Algarve. Deste modo, do conjunto de árvores utilizadas, nos três anos de ensaio, seleccionaram-se 12 árvores caracterizadas por produzirem frutos com um calibre médio de $80,4 \pm 3,6$ mm. Na **Tabela 3.9** apresentam-se identificadas as árvores seleccionadas em cada um dos anos, o calibre médio dos frutos obtido por árvore e os correspondentes valores da concentração nutritiva obtidos nas flores, colhidas de cada uma das árvores durante a plena floração do ano anterior ao da produção.

Tabela 3.9 – Valores de calibre e da concentração nutritiva das flores para cálculo de valores referência para a composição mineral das flores.

Árvore	Frutos	Flores							
	C	N	P	K	Mg	Ca	Fe	Zn	Mn
	(mm)	g kg ⁻¹ ps							
	1997	1996							
1	83,7	30,0	2,3	25,4	2,1	3,1	29,8	26,2	13,2
3	80,2	25,5	2,4	26,3	2,1	1,7	22,7	11,9	12,5
7	77,7	32,7	3,0	25,5	2,3	2,0	19,7	10,8	13,6
15	80,7	27,7	3,0	25,4	2,5	2,5	17,6	10,1	11,8
16	78,6	26,7	3,2	26,4	3,0	3,7	17,3	12,6	12,0
	1998	1997							
7	90,5	22,8	2,5	18,1	2,2	6,4	79,5	23,5	12,5
11	78,2	26,4	2,6	17,6	2,1	6,3	52,0	26,5	12,0
	1999	1998							
13	76,9	21,3	2,8	14,7	1,6	3,4	42,0	17,5	10,5
14	78,8	20,4	3,4	16,0	1,8	4,0	41,5	17,5	10,5
15	79,8	25,3	3,4	15,8	1,7	3,4	43,0	18,5	12,5
18	80,9	21,4	3,2	14,1	1,7	3,8	56,0	18,5	13,0
19	78,8	22,3	3,4	22,7	2,0	4,4	38,5	21,0	11,5
Média	80,4	25,2	2,9	20,7	2,1	3,7	38,3	17,9	12,1
Desvio padrão	3,6	3,8	0,4	5,0	0,4	1,5	18,5	5,7	1,0

C – calibre do fruto; ps – peso seco.

A obtenção de laranjas com um calibre comercial favorável (acima de 76 mm) está associada ao intervalo de valores médios calculados para cada um dos nutrientes analisados nas flores durante a PF do ano anterior e indicados na **Tabela 3.9**.

Dos macronutrientes, expressos em g kg⁻¹ ps, o N apresenta um valor médio de $25,2 \pm 3,8$, o P de $2,9 \pm 0,4$, o K de $20,7 \pm 5,0$, o Mg de $2,1 \pm 0,4$ e o Ca de $3,7 \pm 1,5$. Em relação aos micronutrientes, expressos em g kg⁻¹ ps, a concentração média de Fe é de $38,3 \pm 18,5$, a de Zn de $17,9 \pm 5,7$ e a de Mn de $12,1 \pm 1,0$.

3.4. DISCUSSÃO

3.4.1. Composição mineral das folhas e das flores

A avaliação do estado nutritivo das árvores foi efectuada pela comparação dos valores obtidos por análise foliar, com os propostos por Spiegel-Roy e Goldschmidt (1996) como valores referência para as folhas de laranjeira, ‘Valencia late’. De um modo geral, as concentrações de N, P e Ca nas **folhas** situaram-se no intervalo de valores recomendados para esta cultivar. Pelo contrário, na maioria dos meses, os valores de K, Mg, Zn e Mn foram inferiores encontrando-se as árvores carenciadas destes elementos. Estes níveis deficitários parecem ser motivados pela interacção nutritiva característica dos solos calcários, onde os elevados teores do ião bicarbonato na solução do solo afectam não só a biodisponibilidade como a subsequente absorção e metabolização do Zn e do Mn na planta (Grusak *et al.*, 1999; Lavon e Goldschmidt, 1999; Schmidt, 1999). O antagonismo iónico existente entre o Ca que existe em elevadas quantidades nos solos calcários, e outros nutrientes (K e Mg) é referido em diversos trabalhos (Wallace, 1990; Garcia *et al.*, 1999), inclusivamente para citrinos (Hamzé *et al.*, 1980).

A concentração média mensal de Fe nas folhas situou-se no limite superior do intervalo de valores óptimos e não decresceu com o aparecimento de sintomas de clorose férrica. Contrariamente ao registado para os outros nutrientes, a concentração média mensal de Fe nas folhas apresentou um desvio padrão elevado. Estes resultados comprovam que a concentração foliar de Fe não é o parâmetro mais indicado para diagnosticar a clorose férrica (Abadía, 1992; Römheld, 1997; Sanz *et al.*, 1998). Por outro lado, as concentrações elevadas de Fe nas folhas cloróticas, podem ser de extrema importância para o estabelecimento de novos métodos de controlo da clorose férrica baseados na remobilização do Fe existente em formas fisiologicamente inactivas, tal como referido por Morales *et al.* (1998) em árvores de pessegueiro e de pereira.

Pelo facto de não existirem valores de referência para a composição mineral das **flores** de laranjeira, os valores obtidos foram comparados com os valores geralmente referenciados para outras fruteiras como, pessegueiro (Sanz *et al.*, 1997; Belkhodja *et al.*, 1998; Igartua *et al.*, 2000; Toselli *et al.*, 2000), macieira (Sanz *et al.*, 1998) e pereira (Sanz *et al.*, 1994; Sanz e Montañés, 1995). Deste modo, verificou-se que só a concentração de N foi similar à obtida nas outras fruteiras, uma vez que a de Ca foi sempre superior e a dos restantes nutrientes (P, K, Mg, Fe, Mn e Zn) foi sempre inferior. A concentração média de Fe das flores de laranjeira esteve associada a

intervalos de variação inferiores aos registados nas outras fruteiras. Os valores excessivos de Cu registados nas folhas e nas flores estiveram associados aos tratamentos foliares com fungicidas cúpricos (Igartua *et al.*, 2000).

As diferenças entre os níveis nutritivos das flores de laranjeira e os das flores das outras espécies devem-se ao diferente ciclo anual destas árvores de fruto que condiciona a estratégia de utilização nutritiva destas espécies. Nas árvores de laranjeira ‘Valencia late’, a floração ocorre simultaneamente com a rebentação vegetativa da Primavera e com a maturação dos frutos formados no ano anterior, o que implica uma elevada demanda nutricional (Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996). Pelo contrário, nas outras fruteiras por serem árvores de folha caduca, para além de haver retranslocação nutritiva imediatamente antes da queda da folha, a floração ocorre antes do aparecimento das folhas, sendo reduzida a competição nutritiva pelos diferentes órgãos em crescimento.

A comparação entre a composição mineral das **folhas** e das **flores** foi efectuada no mês de Abril, já que é neste mês que ocorre a plena floração. As flores de laranjeira apresentaram sempre valores de P e de K superiores e valores de Ca e de Fe inferiores aos obtidos nas folhas. Estes resultados parecem reflectir as diferenças entre as necessidades nutritivas e as funções metabólicas destes nutrientes em cada um dos órgãos considerados. Enquanto que o P e o K existente na árvore são preferencialmente distribuídos para as flores, o Ca e o Fe parecem ser mais necessários nas folhas, ou aí permaneceram, devido à sua baixa mobilidade na planta. Com excepção do Fe, esta tendência na distribuição dos elementos pelos diferentes órgãos da planta foi também verificada por Sanz *et al.* (1993) quando compararam a concentração nutritiva das flores na plena floração com a das folhas de pereira colhidas 60 dias após a plena floração. Por outro lado, em situação de “stress”, a árvore apresenta uma redistribuição nutritiva favorável aos órgãos reprodutivos (Bavaresco, 1997).

3.4.2. Variação sazonal da clorofila e da composição mineral das folhas e flores

Para a identificação dos padrões sazonais de variação, as 20 árvores amostradas em cada um dos anos foram consideradas como uma observação independente de forma a reunir o número de repetições necessárias à utilização da análise em componentes, procedimento mais adequado a variáveis que se relacionam entre si.

O principal padrão de variação sazonal identificado na composição mineral das **folhas** evidencia o aumento de Fe com a diminuição dos macronutrientes principais e secundários (N, P, K, Mg e Ca) que ocorre do mesmo modo nos meses de Fevereiro, Maio e Junho dos três anos amostrados. No ciclo das árvores de laranjeira ‘Valencia late’, estes meses correspondem ao período que antecede (Fevereiro ou Março) e que sucede (Maio e Junho) a plena floração (Abril). Este padrão de variação está nitidamente associado ao aparecimento das flores e portanto à partição destes nutrientes entre os órgãos reprodutivos e os vegetativos (Goldschmidt e Koch, 1996).

Nas **flores**, o gradiente nutricional mais consistente nos três anos é o que expressa a variação inversa do N, P e K relativamente ao Ca, Fe e Zn. Sempre que as concentrações nutritivas de N, P e K aumentaram nas flores, as concentrações de Ca, Fe e Zn, decresceram. Estes resultados são parcialmente idênticos aos obtidos por Igartua *et al.* (2000) em flores de pessegueiro onde o Fe, Ca, P e o Zn apresentaram uma variação contrária à de K, Mg e Mn.

O padrão de variação encontrado nas folhas e que contrasta o aumento do N, P e K com o aumento de Fe foi verificado de igual modo nos meses imediatamente anteriores e posteriores à plena floração. Durante a plena floração, são as flores que passam a traduzir esse gradiente nutricional. Além disso, as flores também expressam a interação nutritiva, em que a concentração de alguns nutrientes na flor depende em alguma extensão do nível de outros nutrientes.

Os resultados obtidos sugerem que as flores, tal como as folhas, podem ser utilizadas como órgãos que expressam o equilíbrio nutritivo de toda a árvore tal como observado nas fruteiras caducifólias acima referidas. Contudo, para que as flores possam ser utilizadas como método de diagnóstico da clorose férrica é necessário que a composição nutritiva das flores se relacione com a clorofila total, um dos parâmetros mais utilizados na caracterização e identificação desta deficiência.

O gradiente nutricional existente nas flores durante a plena floração condicionou os valores de clorofila observados nos meses seguintes, sendo Julho (90 dias após a plena floração) o mês mais determinante nestas relações. Para outras árvores de fruto como, pessegueiro (Sanz e Montañés, 1995; Belkhodja *et al.*, 1998; Toselli *et al.*, 2000), pereira (Sanz *et al.*, 1994) e macieira (Sanz *et al.*, 1998) o mês seleccionado foi Agosto (120 dias após a plena floração) A maior competição nutritiva presente nas árvores de laranjeira induz a um aparecimento antecipado dos sintomas e do mês indicado para o diagnóstico da clorose férrica.

A concentração foliar de Fe não acompanhou o padrão de variação da clorofila total nos meses seguintes à plena floração, tal como referido por diversos autores (Mengel, 1995; Morales *et*

al., 1998; Bavaresco *et al.*, 1999) e denominado por Römheld (1997) como o paradoxo da clorose férrica. O Fe pode existir nas folhas em elevadas concentrações mas estar metabolicamente inactivo, confinado ao apoplasto foliar devido a valores de pH intracelular limitantes (Kosegarten e English, 1994; Mengel, 1995; Kosegarten *et al.*, 1999). Contudo, a clorofila relacionou-se negativamente com a concentração floral de Fe ao contrário do verificado em outras árvores de fruto de folha caduca (Sanz *et al.*, 1994) em que esta relação é positiva.

Dos resultados evidencia-se que quanto mais Fe se acumular nas flores em Abril, menor será a concentração da clorofila total nos meses seguintes e maior será a probabilidade de ocorrerem sintomas de clorose férrica. A maioria do Fe, se não todo, presente nas flores corresponde ao Fe acumulado durante o período de dormência, Outono-Inverno, porque devido à mobilidade do Fe no floema, os crescimentos vegetativos e reprodutivos da Primavera, ocorrem principalmente à custa das reservas armazenadas nas folhas do ano anterior e na raiz (Goldschmidt e Koch, 1996; Toselli *et al.*, 2000). Quanto mais Fe houver imobilizado nas folhas, maior será a concentração floral de Fe em Abril e menor será a clorofila em Julho. Consequentemente, as reservas necessárias ao crescimento do ano seguinte poderão ser mais afectadas, ocorrendo o agravamento da clorose férrica de um ano para o outro.

O efeito do ano é um dos resultados mais evidente e consistente em todos os parâmetros amostrados (concentração nutritiva das flores e das folhas, clorofila total e parâmetros de qualidade da produção). O efeito do ano no tamanho e na maturação de laranjas 'Valencia late' foi também observado por Carranca *et al.* (1993). Dentro de cada ano, as árvores amostradas apresentaram um intervalo de variação muito baixo, denotando a homogeneidade nutritiva em que se encontravam no início do ensaio.

Em relação à composição mineral das folhas e das flores, foi no ano de 1996 que se verificaram variações sazonais mais acentuadas, provavelmente devidas aos elevados valores de precipitação que ocorreram no primeiro semestre deste ano. Esta precipitação anormal, associada aos elevados teores de argila do solo, pode ter originado condições favoráveis à acumulação do Fe nas folhas do ano o que, poderá ter favorecido a distribuição do Fe para as flores do ano seguinte. Consequentemente, em 1997 as árvores apresentaram o equilíbrio nutritivo mais debilitado associado a sintomas de clorose férrica 90 dias após a plena floração (DAPF). Por outro lado, em 1997 houve precipitação até final de Junho, facto que segundo Toselli *et al.* (2000) pode agravar o aparecimento dos sintomas de clorose férrica, que estão associados não só aos elevados níveis de carbonato de cálcio como também à humidade do solo motivada pelas chuvas da Primavera.

Nestas condições o nível do ião bicarbonato na solução do solo aumenta, prejudicando a nutrição de Fe (Boxma, 1972; Chaney, 1984; Köseoglu, 1995b).

3.4.3. A utilização das flores como método de diagnóstico da clorose férrica

Para que as flores de laranjeira possam ser utilizadas como parâmetro de diagnóstico da clorose férrica é necessário identificar e testar o seu poder preditivo.

A composição mineral das flores pode ser utilizada para estimar a concentração clorofilina nas folhas 90 dias após a plena floração (Julho). O modelo que melhor se ajustou ao conjunto de dados obtidos nos três anos do ensaio, foi estabelecido entre a razão nutritiva **Mg/Zn** nas flores e a clorofila total. Recentemente, a utilização das razões nutritivas nas flores de pessegueiro (K/Ca, K/P, P/Fe e K/Zn) para estimar a clorofila nos meses seguintes foi sugerida por diversos autores (Belkhodja *et al.*, 1998; Nenova e Stoyanov, 1999; Igartua *et al.*, 2000). Em árvores de laranjeira, a clorofila total 90 dias após a plena floração relacionou-se directamente com a razão Mg/Zn, nas flores, nutrientes associados com a clorose férrica (Köseoglu, 1995b). Uma vez que o Mg é constituinte da molécula de clorofila e existe relação directamente proporcional entre a concentração deste elemento nas flores e nas folhas, será de esperar que quanto menor for a concentração de Mg nas flores menor será a sua concentração nas folhas e menor será a síntese clorofilina. O Zn partilha diversos mecanismos com o Fe, nomeadamente ao nível da absorção e translocação para a parte aérea (Köseoglu, 1995a; 1995b; Grusak *et al.*, 1999), onde o Fe é necessário à formação do anel pirrólico da molécula de clorofila (Marshner, 1995). As árvores cloróticas apresentam razões Mg/Zn mais baixas que estão associadas a aumentos na concentração de Zn.

A elevada correlação verificada entre a concentração média de Fe e de Zn nas flores, não permitiu que o Fe fosse incluído no modelo utilizado para estimar a clorofila total. Por outro lado, a concentração de Fe e de Zn nas flores relacionou-se inversamente com a clorofila total nos meses seguintes à plena floração. Segundo Köseoglu (1995b) o teor de Zn no solo pode ser determinante na intensidade ou gravidade dos sintomas de clorose férrica.

A homogeneidade dos resultados por ano impossibilitou a obtenção de modelos anuais uma vez que devido ao pequeno intervalo de variação amostrado não foi possível estabelecer relações. O decréscimo das variações encontradas de 1996 para 1998 reflecte a influência que o estado

nutritivo de uma árvore em determinado ano tem no ano seguinte. Em futuros ensaios, as árvores deverão ser marcadas com base nos valores de clorofila, de forma a abarcar um maior intervalo de variação e a permitir o estudo da consistência dos resultados ano a ano.

A utilização de dados externos permitiu estimar a perda de poder preditivo deste modelo. Enquanto que o modelo explica 49% da variabilidade dos dados originais apenas explica 22% da variabilidade dos dados externos, que pontualmente ultrapassaram o intervalo de valores utilizados no modelo original.

Estes resultados comprovam que a razão Mg/Zn nas flores é um parâmetro que pode ser utilizado para estimar a clorofila 90 dias após a plena produção. Com base no modelo original foi ainda possível determinar valores referência para as condições estabelecidas neste ensaio. Se a razão entre o Mg e o Zn for inferior a 100 as folhas de laranjeira apresentam sintomas de clorose férrica 90 dias após a plena produção (clorofila total < 400 $\mu\text{mol m}^{-2}$), enquanto que para valores acima de 200 as folhas permanecerão verdes (clorofila total > 500 $\mu\text{mol m}^{-2}$). Valores intermédios poderão estar associados a uma clorose férrica latente, isto é, num estado incipiente sem sintomas.

A importância de determinar um método de diagnóstico para a clorose férrica é acentuada pelo efeito da clorose férrica na produção (Sanz *et al.*, 1997; 1998). Através da composição mineral das flores foi possível estimar alguns dos **parâmetros de qualidade da produção** obtidos no ano seguinte, nomeadamente o peso fresco do fruto e o índice de maturação, dois parâmetros afectados pela clorose férrica (Hamzé *et al.*, 1980; Sanz *et al.*, 1997).

O peso fresco e o calibre do fruto estiveram directamente relacionados entre si. O peso do fruto é essencialmente determinado pela quantidade de sumo existente no fruto que por sua vez está limitado, entre outros factores, pelo calibre do fruto (Fernández, 1995). A variação destes parâmetros esteve associada a um gradiente nutricional que contrasta o aumento de N, P e K com o aumento de Ca, Fe e Zn nas flores.

O índice de maturação permite avaliar o estado de maturação do fruto que se caracteriza, sobretudo por uma variação na constituição e concentração de alguns componentes do seu sumo (Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996). A variação do índice de maturação dependeu do aumento coordenado do Mg, K e N nas flores e em menor extensão de Mn.

Através da concentração de N, Mg, Ca e de Zn nas flores foi possível estimar o peso fresco dos frutos do ano seguinte. Enquanto, que o Zn e o Mg nas flores têm um efeito positivo, o Ca nas flores apresentam uma tendência contrária. Quanto mais Mg e Zn houver e menos Ca nas flores em Abril maior será o peso fresco dos frutos formados a partir do vingamento dessas flores. Carranca *et al.* (1993) obtiveram também relações positivas entre o tamanho das laranjas ‘Valencia

late' e a concentração de Mg nas folhas de ramos frutíferos que eventualmente, expressam um comportamento idêntico ao das flores. O facto da concentração de Mg e de Zn nas flores estarem incluídos no modelo com a clorofila e com os parâmetros de produção salienta o efeito cumulativo destes dois elementos em estimar o aparecimento da clorose férrica e em quantificar o decréscimo de qualidade da produção.

Sabendo a concentração de N, P, Mg e Fe nas flores é possível prever o índice de maturação do sumo das laranjas. O acréscimo de N, Mg e Fe nas flores conduziu a frutos com um índice de maturação superior. O Fe afecta significativamente a percentagem de ácido cítrico existente no sumo de laranja devido ao seu papel na actividade da enzima aconitase (Sadka *et al.*, 2000). O P nas flores teve um efeito contrário ao dos restantes elementos. O aumento da concentração de Mg nas flores teve um efeito cumulativo no peso fresco e no índice de maturação das laranjas vingadas a partir dessas flores.

Com base nos modelos estabelecidos entre a composição mineral das flores e os parâmetros de qualidade da produção do ano seguinte torna-se possível corrigir o estado nutritivo da árvore antes de a produção ter sido afectada. Estes resultados foram comprovados através da interpolação de valores com base em dados externos, diferentes dos utilizados para estabelecer o modelo.

A utilização das flores como método de diagnóstico da clorose férrica, permite antecipar a avaliação nutricional das árvores de Outubro (data de colheita foliar recomendada para citrinos) para Abril.

Por fim, o uso da análise floral como método de diagnóstico necessita do estabelecimento de **valores de referência** para cada espécie e inclusivamente variedade, habitualmente determinados com base na produção total de cada árvore (Sanz e Montañés, 1995).

Como neste ensaio não foi possível determinar a produção total de cada árvore marcada, os valores apresentados como referência para as flores de laranjeira foram calculados com a média das concentrações nutritivas da flor que originaram frutos com um calibre superior a 76 mm, comercialmente mais favorável.

Apesar desta limitação metodológica, numa primeira aproximação estes valores podem ser utilizados para avaliar os resultados obtidos numa análise floral, pois expressam o balanço nutritivo mais adequado à produção de frutos com um valor económico acrescido, permitindo a correcção precoce dos desequilíbrios nutritivos mais evidentes.

3.5. CONCLUSÕES

A composição mineral das flores é um parâmetro que permite avaliar o estado nutricional das árvores de laranja, cv. 'Valencia late' e antecipar a avaliação do estado nutricional de Outubro (data de colheita foliar recomendada para citrinos) para Abril.

É possível efectuar o diagnóstico da clorose férrica através da composição mineral das flores de laranja, cv. 'Valencia late' na plena floração (Abril). Flores com valores médios de Mg/Zn inferiores a 100 correspondem a árvores terão tendência a manifestar sintomas de clorose férrica 90 dias após a plena floração (Julho). Pelo contrário, flores com uma razão Mg/Zn nas flores superior a 200 tendem a permanecer verdes em Julho. Valores intermédios, correspondem provavelmente a árvores com clorose férrica latente, isto é, num estado incipiente sem sintomas.

A concentração nutritiva das flores durante a plena floração de um determinado ano permite estimar alguns parâmetros de qualidade da produção do ano seguinte, nomeadamente o peso fresco do fruto e o índice de maturação.

Nas condições de ensaio, determinaram-se valores referência para a concentração de alguns nutrientes nas flores associados com a produção de frutos com um calibre comercialmente favorável (> 76 mm).

O diagnóstico precoce ou prognóstico da clorose férrica possibilita uma correcção atempada, prevenindo o aparecimento dos sintomas da rebentação seguinte (Verão) com a consequente melhoria da qualidade da produção a obter no final do ciclo produtivo.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadía, J.**; Nishio, J.; Monge, N.E.; Montañés, L.; Heras, L. 1985. Mineral composition of peach affected by iron chlorosis. *Journal of Plant Nutrition*, 8(8):697-707.
- Abadía, A.**; Lemoine, Y.; Trémolières, A.; Ambard-Bretteville, F.; Rémy, R. 1989. Iron deficiency in pea: effects on pigment, lipid and pigment-protein complex composition of thylacoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 27:679-687.
- Abadía, A.**; Poc, A.; Abadía, J. 1991. Could iron nutrition status be evaluated through photosynthetic pigment changes. *Journal of Plant Nutrition*, 14(9):987-999.
- Abadía, J.** 1992. Leaf responses to iron deficiency: A review. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1699-1713.
- Abadía, J.** e **Abadía, A.** 1993. Iron and plant pigments, pp. 327-344, In: Iron chelation in plants and soil microorganisms. L.L. Barton e B. Hemming (eds.), Academic Press, San Diego, EUA.
- A.O.A.C.** 1990. Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis. 12ª ed., Washington, EUA.
- Bavaresco, L.** 1997. Relationship between chlorosis occurrence and mineral composition of grapevine leaves and berries. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 28:13-21.
- Bavaresco, L.**; Giachino, E.; Colla, R. 1999. Iron chlorosis paradox in grapevine. *Journal of Plant Nutrition*, 22(10):1589-1597.
- Belkhdja, R.**; Morales, F.; Sanz, M.; Abadía, A.; Abadía, J. 1998. Iron deficiency in peach trees: effects on leaf chlorophyll and nutrient concentrations in flowers and leaves. *Plant and Soil*, 203:257-268.
- Boxma, R.** 1972. Bicarbonate as the most important soil factor in lime-induced chlorosis in the Netherlands. *Plant and Soil*, 37:233-243.
- Carranca, C.F.**; Baeta, J.; Fragoso, M.A.C. 1993. Effect of NK fertilization on leaf nutrient content and fruit quality of 'Valencia late' orange trees, pp. 445-448, In: M.A.C. Fragoso e M.L. van Beusichem (eds.), Optimization of Plant Nutrition. Kluwer Academic publishers, Dordrecht, Holanda.
- Chaney, R.L.** 1984. Diagnostic practices to identify iron deficiency in higher plants. *Journal of Plant Nutrition*, 7(1-5):47-67.
- Chen, Y.** e **Barak, P.** 1982. Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Advances in Agronomy*, 35:217-240.
- Correia, P.J.**; Anastácio, I.; Candeias, M.F.M.; Martins-Loução, M.A. 2000. Nutritional diagnosis in carob-tree (*Ceratonia siliqua* L.): relationships between yield and leaf mineral concentration. *European Journal of Agronomy*, in press.
- Costa, J.B.** 1995. Caracterização e constituição do solo. 5ª Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 527p.
- FAO-Unesco** 1985. Soil map of the world. Vol. 5 - Europe. Roma, Itália, 199p.
- Fernández, J.L.** 1995. La naranja, composición y cualidades de sus zumos y esencias. Generalitat Valenciana, Valencia, Espanha, 450p.
- García, M.**; Daverede, C.; Gallego, P.; Toumi, M. 1999. Effect of various potassium-calcium ratios on cation nutrition of grape grown hydroponically. *Journal of Plant Nutrition*, 22(3):417-425.
- Glantz, S.** e **Slinker, B.K.** 1990. Primer of applied regression and analysis of variance McGraw-Hill Inc., New York, EUA, 750p.
- Goldschmidt, E.E.** e **Koch, K.E.** 1996. Citrus, pp. 797-824, In: E. Zamski e A.A. Schaffer (eds.), In: Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-Sink relationships. Marcel Dekker, Inc., New York, EUA.
- Grusak, M.A.**; Pearson, J.N.; Marentes, E. 1999. The physiology of micronutrient homeostasis in field crops. *Field Crops Research*, 60:41-56.
- Hamzé, M.**; Salsac, L.; Wacquand, J.P. 1980. Recherche de tests pour déceler précocement l'aptitude des agrumes résister à la chlorose calcaire: I. Capacité d'échange cationique et degré d'estérification des racines. *Agrochimica*, XXIV:432-442.
- Hamzé, M.** e **Nimah, N.** 1982. Iron content during lime-induced chlorosis with two citrus rootstocks. *Journal of Plant Nutrition*, 5(4-7):797-804.
- Heras, L.**; Sanz, M.; Gómez, V.; Montañés, L. 1990. Diagnóstico precoz de la situación nutricional del melocotonero. Valores de referencia. *Surcos de Aragón*, 26:35-37.

- Igartua**, E.; Grasa, R.; Sanz, M.; Abadía, A.; Abadía, J. 2000. Prognosis of iron chlorosis from the mineral composition of flowers in peach. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 75:111-118.
- I.N.M.G.** (Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica) 1991. Normais climatológicas da região do “Alentejo e Algarve”, correspondentes a 1951-1980. *O Clima de Portugal*. 4ª ed., Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica, XLIX (4): 98 p.
- Kosegarten**, H. e Englisch, G. 1994. Effect of various nitrogen forms on pH in leaf apoplast and on iron chlorosis of *Glycine max* L.. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie und Bodenkunde*, 157:401-405.
- Kosegarten**, H.; Hoffmann, B.; Mengel, K. 1999. Apoplastic pH and Fe³⁺ reduction in intact sunflower leaves. *Plant Physiology*, 121:1069-1079.
- Köseoglu**, A.T. 1995a. Effect of iron chlorosis on mineral composition of peach leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 18(4):765-776.
- Köseoglu**, A.T. 1995b. Investigation of relationships between iron status of peach leaves and soil properties. *Journal of Plant Nutrition*, 18(9):1845-1859.
- Kopp**, E.; Sobral, M.; Soares, T.; Woerner, M. 1989. Os solos do Algarve e suas características. *Vista geral*. MAPA-GDHA-DRAAG-GTZ. Faro. 180 p.
- Lavon**, R. e Goldschmidt, E. 1999. Enzymatic methods for detection of mineral deficiencies in citrus leaves: A mini-review. *Journal of Plant Nutrition*, 22:139-150.
- Legendre**, P. e Legendre, L. 1998. *Numerical ecology*. 2ª ed. Elsevier, Amesterdam, Holanda, 853p.
- Lichtenthaler**, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148:350-382.
- Marschner**, H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. 3ª ed., Academic Press, Londres, Reino Unido, 674p.
- Mengel**, K.; Breiningen, M.T.; Buble, W. 1984. Bicarbonate, the most important factor inducing iron chlorosis in vine grapes on calcareous soil. *Plant and Soil*, 81:333-334.
- Mengel**, K. 1995. Iron availability in plant tissues - iron chlorosis on soil calcareous, pp. 389-397, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Miller**, J.E.; Swanepoel, J.; Miller, D.; Plessis, S.F. 1994. Correction of lime-induced chlorosis of citrus in the Sundays river valley. *Subtropica*, 15(8):18-20.
- Morales**, F.; Grasa, R.; Abadía, A.; Abadía, J. 1998. Iron chlorosis paradox in fruit trees. *Journal of Plant Nutrition*, 21(4):815-825.
- Moreno**, D.A.; Pulgar, G.; Villora, G.; Romero, L. 1998. Nutritional diagnosis of fig tree leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 21(12):2579-2588.
- Nenova**, V. e Stoyanov, I. 1999. Physiological and biochemical changes in young maize plants under iron deficiency. 3. Concentration and distribution of some nutrient elements. *Journal of Plant Nutrition*, 22(3):565-578.
- Ott**, R.L. 1997. *An introduction to statistical methods and data analysis*. 4ª ed., Duxbury Press, Belmont, EUA, 1051p.
- Reis Cunha**, F. 1957. *O Clima do Algarve. Relatório de estágio*. ISA, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 589p.
- Rocha Faria**, J.M.; Godinho, S.; Almeida, M.J.R.; Machado, M.S. 1981. *O clima de Portugal*. Vol. XXVII. INMG, Lisboa, 155p.
- Römhald**, V. 1997. The chlorosi paradox: Fe inactivation as a secondary event in chlorotic leaves of grapevine. *Livro de Resumos do 9th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants*. Hohenheim, Stuttgart, Alemanha, 10p.
- Sadka**, A.; Dahan, E.; Cohen, L.; Marsh, K.B. 2000. Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit. *Physiologia Plantarum*, 108:255-262.
- Sanz**, M., Carrera, M.; Montañés, L. 1993. El estado nutricional del peral. *Possibilidade del diagnóstico floral*. *Hortofruticultura*, 10:60-62.
- Sanz**, M.; Montañés, L.; Carrera, M. 1994. The possibility of using analysis to diagnose the nutritional status of pear trees. *Acta Horticulturae*, 367:290-295.
- Sanz**, M. e Montañés, L. 1995. Floral analysis: A novel approach for the prognosis of iron deficiency in pear (*Pyrus communis* L.) and peach (*Prunus persica* L. Batsch), pp. 371-374, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.

- Sanz, M.;** Pascual, J.; Machin, J. 1997. Prognosis and correction of iron chlorosis in peach trees: Influence on fruit quality. *Journal of Plant Nutrition*, 20(11):1567-1572.
- Sanz, M.;** Pérez, J.; Pascual, J.; Machín, J. 1998. Prognosis of iron chlorosis in apple trees by floral analysis. *Journal of Plant Nutrition*, 21(8):1697-1703.
- Schmidt, W.** 1999. Review. Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist*, 141:1-26.
- Siegel, S. e** Castellan, N.J. 1988. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. 2ª ed., McGraw-Hill International, New York, EUA.
- Spiegel-Roy, P. e** Goldschmidt, E. 1996. *Biology of Citrus*. 1ª ed., Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, 230p.
- Statsoft**, 1995. *Statistica for Windows*, 5ª Versão, Statsoft, Tulsa, EUA.
- Terry, N. e** Abadía, J. 1986. Function of iron in chloroplasts. *Journal of Plant Nutrition*, 9(3-7), 609-646.
- Terry, N. e** Zayed, A.M. 1995. Physiology and biochemistry of leaves under iron deficiency, pp. 283-294, In: J. Abadía (ed.), *Iron nutrition in soils and plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Toselli, M.;** Marangoni, B.; Tagliavini, M. 2000. Iron content in vegetative and reproductive organs of nectarine trees in calcareous soils during the development of chlorosis. *European Journal of Agronomy*, 13(4):279-286.
- Venkatraju, K. e** Marschner, H. 1981. Inhibition of iron-stress reactions in sunflower by bicarbonate. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie und Bodenkunde*, 144:339-355.
- Wallace, A.** 1990. The decade of the 1981s for iron nutrition and interactions in plants. *HortScience*, 25:8.

CAPÍTULO 4

PRÁTICAS ALTERNATIVAS PARA CONTROLAR A CLOROSE FÉRRICA EM CITRINOS

RESUMO

Foram realizados três ensaios em campo onde se efectuou a aplicação foliar de diversos compostos em árvores de tangerineira (híbrido ‘Encore’, *Citrus deliciosa* Tan. x *Citrus nobilis* Lour. – **ensaio 1**) e de laranjeira (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck, cv. ‘Valencia late’ – **ensaios 2 e 3**) enxertadas em laranjeira azeda (*Citrus aurantium* L.) e estabelecidas num solo calcário. Os tratamentos estudados foram: sulfato de Fe(II) (500 mg Fe L⁻¹), ácido sulfúrico (0,5 mM H₂SO₄), quelato de Fe(III) (Hampiron 654 GS, 120 mg Fe L⁻¹), ácido cítrico (C₆H₈O₇.H₂O, 10 mM), sulfato Fe(II) (500 mg Fe L⁻¹) mais ácido cítrico (10 mM), sulfato Fe(II) (500 mg Fe L⁻¹) mais ácido sulfúrico (0,5 mM H₂SO₄) e água destilada como testemunha. Adicionou-se um agente molhante não iónico a todos os tratamentos. Durante os ensaios, a capacidade de recuperação das árvores foi estimada pelo aparelho SPAD-502 através da variação da concentração foliar de clorofila total. No final dos **ensaios 2 e 3**, foi ainda analisado o efeito dos tratamentos na composição mineral das folhas e flores, nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, no tamanho e na qualidade dos frutos. Simultaneamente, avaliou-se a duração dos efeitos de algumas das pulverizações efectuadas.

O uso frequente de pulverizações foliares permitiu atenuar os sintomas de clorose fêrrica, em ambas as espécies estudadas, e traduziu-se pelo acréscimo da clorofila total. O tratamento com ácido sulfúrico apenas afectou a concentração da clorofila total. Comparativamente à testemunha, o maior calibre e peso fresco dos frutos de tangerineira (‘Encore’ - **ensaio 1**) foram obtidos com as aplicações de quelato fêrrico enquanto que nos frutos de laranjeira (**ensaio 2**) foi com a aplicação de sulfato ferroso que se obteve os melhores resultados, tendo-se verificado aumentos na concentração de ferro e de zinco nas folhas e flores. As aplicações foliares com quelato de ferro às árvores de ‘Valencia late’ apesar de originarem acréscimos na concentração foliar de ferro e de promoverem a qualidade do fruto, não promoveram o aumento do calibre do fruto. A adição de ácido cítrico às soluções com sulfato de ferro (**ensaio 3**) melhorou os resultados obtidos. Neste ensaio, os tratamentos aplicados afectaram principalmente a concentração de ferro nas folhas novas o que pode estar relacionado com as relações “source/sink” e/ou com a menor suberificação destas folhas.

A clorose fêrrica atrasou a maturação dos frutos das duas espécies de citrinos estudadas, expressa pela razão entre o ácido cítrico e o total de sólidos solúveis. Em todas as árvores tratadas a concentração de ácido cítrico nos frutos decresceu e o total de sólidos solúveis aumentou.

O decréscimo de eficiência fotoquímica das árvores de ‘Valencia late’ (**ensaio 3**) com sintomas de clorose fêrrica esteve associado com alterações ao nível da cadeia de transporte de electrões e do fotossistema II.

Os resultados obtidos sugerem que as aplicações foliares de ferro em pomares de citrinos permitem controlar os decréscimos de produção e de qualidade do fruto motivados pela clorose fêrrica induzida pelo calcário. Para além disso, estes tratamentos podem ser efectuados com produtos economicamente mais viáveis como sejam as soluções com sulfato de ferro (II).

Palavras chave: Citrinos, Clorose fêrrica, Composição mineral, Fluorescência, Qualidade da produção, SPAD, Tratamentos foliares.

ABSTRACT

The responses of tangerine ('Encore' hybrid, *Citrus deliciosa* Tan. x *Citrus nobilis* Lour. – **experiment 1**) and orange trees (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. 'Valencia late' – **experiment 2 and 3**) grown on a calcareous soil to different foliar sprays were studied. The treatments were Fe(II) sulphate (500 mg Fe L⁻¹), sulphuric acid (0.5 mM H₂SO₄), Fe(III)-chelate (Hampiron 654 GS, 120 mg Fe L⁻¹) citric acid (C₆H₈O₇.H₂O, 10 mM), Fe(II) sulphate (500 mg Fe L⁻¹) plus citric acid (10 mM), Fe(II) sulphate (500 mg Fe L⁻¹) plus sulphuric acid (0.5 mM H₂SO₄) and distilled water as a control. A non-ionic wetting agent was used in all treatments. In all the experiments, the recovery from iron chlorosis was evaluated with the SPAD-502 apparatus and the values converted to total chlorophyll concentration. The effects of treatments on the mineral composition of leaves and flowers were studied in experiment 2 and 3. Chlorophyll *a* fluorescence parameters were also measured. In all the experiments the size and quality of fruits were evaluated. The residual effect of some treatments was also evaluated one year later.

In tangerine trees, the chlorophyll concentration in the leaves, and the total sugar content of the fruits, were greater in all experimental treatments, compared with control, but with no significant differences between treatments. The concentration of citric acid decreased in the treated plants. The greatest diameter and fresh weight fruit were obtained in the treatment with iron chelate. Foliar applications of iron sulphate or sulphuric acid led to values of these parameters that were intermediate between those of the control and the iron chelate treatments. In orange trees, the use of frequent foliar sprays was able to alleviate Fe chlorosis. Sprays of Fe(II) sulphate increased the concentrations of chlorophyll, Fe and Zn in leaves and significantly improved fruit size and quality over those of fruits in control trees. Sprays of Fe(III)-chelate also increased leaf chlorophyll and Fe concentrations and improved fruit quality, but did not significantly increase fruit size. Iron chlorosis caused a delay in fruit ripening in both citrus species. In addition of citric acid to iron (II) sulphate further improved the results of the treatment. The decrease of photochemical efficiency in chlorotic orange trees was associated with changes in the electron transport chain. Sprays of sulphuric acid alone produced a small increase in leaf chlorophyll and Fe concentrations, without improving fruit size and quality. These results suggest that foliar sprays with Fe could help to avoid yield and quality losses caused by Fe chlorosis in citrus orchards. Furthermore, these treatments could be done with relatively cheap materials such as solutions containing Fe(II) sulphate.

Keywords: Citrus, Fluorescence, Foliar treatments, Fruit quality, Lime-induced chlorosis, Mineral composition, SPAD.

4.1. INTRODUÇÃO

A clorose férrica afecta não só a composição mineral das folhas e das flores (Sanz *et al.*, 1993; 1994; Sanz e Montañés, 1995) como é responsável por um significativo decréscimo na produção, no calibre e na qualidade dos frutos, facto que foi referenciado para algumas fruteiras como, limeiras (El-Kassa, 1984), pessegueiros (Sanz *et al.*, 1997) e kiwi (Tagliavini *et al.*, 1995c).

O aparecimento de sintomas de clorose férrica em fruteiras, para além de alterar o equilíbrio nutritivo da árvore nesse ano, afecta consequentemente o crescimento vegetativo e dos órgãos reprodutivos da árvore no ano seguinte, que está dependente das reservas reunidas no ano anterior (Tagliavini *et al.*, 2000). Assim, os efeitos negativos da clorose férrica em árvores de fruto permanecem nos anos subsequentes ao aparecimento dos sintomas e por vezes mesmo após a sua correcção.

A correcção da clorose férrica em fruteiras instaladas em solos calcários faz-se frequentemente recorrendo a aplicações massivas de quelatos férricos sintéticos, ao solo. O quelato mais eficaz na correcção desta deficiência nutritiva é o ácido etileno-diamina di-orto-hidroxi-fenil de ferro (Fe-EDDHA) devido à sua elevada estabilidade mesmo a pH superiores a 9,0 (Norvell, 1991; Wallace e Wallace, 1992). No entanto, a aquisição destes quelatos é muito dispendiosa e, nomeadamente devido ao regime de rega excessivo ou às chuvas frequentes no Outono-Inverno, o ferro aplicado num ano não previne o aparecimento da clorose no ano seguinte e estas aplicações repetem-se anualmente para o mesmo pomar (Legaz *et al.*, 1992). Os custos desta operação podem atingir os 60% do custo total da fertilização o que corresponde a cerca de 250 Euros por hectare (Tagliavini *et al.*, 2000). Em relação ao impacto ambiental desta aplicação apenas se sabe que estes agentes quelatantes sintéticos podem ser responsáveis por uma maior absorção de outros metais, tais como o Mn, Cu e o Ni (Wallace *et al.*, 1992).

Torna-se importante desenvolver práticas alternativas de controlo da clorose férrica que apresentem menores custos e reduzido impacto ambiental. As fertilizações efectuadas ao nível do solo quer através da adição de adubos com Fe quer através da correcção do pH da rizosfera não são totalmente eficientes em solos calcários devido ao elevado poder tampão destes solos (Papastylianou, 1990; Graziano, 1995; Tagliavini *et al.*, 2000). Os resultados mais promissores foram obtidos com a aplicação ao solo de resíduos provenientes de actividades industriais constituídos por ácidos húmicos e/ou fúlvicos (“Fe-humate”) tal como referido por Alva e Obreza (1998). Alternativamente, vários autores (Sahu *et al.*, 1987; Tagliavini *et al.*, 1995b; 1995c; 2000) propõem a aplicação de diversos compostos por pulverização foliar pois deste modo é possível

evitar os efeitos inibitórios do ião bicarbonato na absorção e no subsequente transporte do ferro para a parte aérea. Por outro lado, a aplicação foliar de ácidos minerais, ácidos orgânicos ou de auxinas permitiu ainda disponibilizar o Fe imobilizado no interior das folhas cloróticas.

4.1.1. Objectivos

Neste capítulo, procurou-se estudar a recuperação da clorose férrica através da aplicação foliar de diversos compostos em árvores do híbrido de tangerineira ('Encore' - **ensaio 1**) e de laranjeira ('Valencia late' – **ensaios 2 e 3**) estabelecidas em solo calcário.

No final dos ensaios, foi analisado o efeito dos tratamentos na composição mineral das folhas e flores e no tamanho e qualidade dos frutos. Avaliou-se ainda a duração dos efeitos de algumas das pulverizações efectuadas (**ensaio 2**), procurando identificar-se a existência ou não de correlações entre a composição mineral das folhas e das flores num ano e alguns parâmetros de qualidade da produção no ano seguinte.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Caracterização do pomar

4.2.1.1. Localização

Selecionou-se um pomar de citrinos estabelecido em solo calcário, situado na província do Algarve, a uma latitude de 37° 05' N e a uma longitude de 8° 28' W, com uma altitude inferior a 200 m. A sua área total é de 12000 m².

O pomar está localizado a cerca de 3 km de Almancil, vila pertencente ao Concelho de Loulé, constituindo uma parcela de uma propriedade particular.

Com o objectivo de caracterizar período em que decorreram os ensaios reuniu-se informação referente às temperaturas mínima, máxima e média diárias do ar e à precipitação registadas na estação meteorológica da Direcção Regional de Agricultura do Algarve, que está localizada no Patacão a cerca de 2 km a Oeste do pomar (**Figura 4.2**). A temperatura média do ar resultou da média aritmética entre as temperaturas máxima e a mínima registadas num termohigrógrafo colocado em abrigo de madeira a cerca de 1,5 m do solo. A precipitação foi medida a partir de um udómetro situado no mesmo local, também à mesma altura.

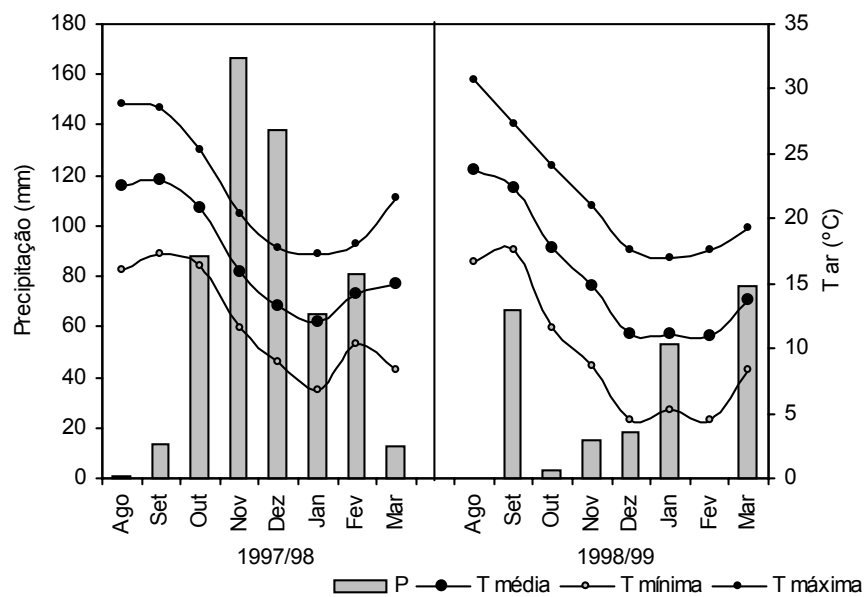


Figura 4.2 – Variação das temperaturas (T, °C) mínima, máxima e média mensal do ar e da precipitação (P, mm) mensal ao longo do período em que decorreram os ensaios.

As variações da temperatura média do ar foram muito semelhantes ao longo dos dois períodos de ensaio (**Figura 4.2**) contrariamente à precipitação. No período de Agosto de 1997 a Março de 1998 a precipitação total foi de 523 mm enquanto que no ano seguinte apenas se registaram 205 mm.

4.2.1.3. Caracterização física e química do solo

De acordo com a classificação de solos do Serviço de Reconhecimento e Ordenamento Agrários (S.R.O.A.) o solo da parcela utilizada para os ensaios pertence à família dos solos vermelhos de calcário friável (Vc), a que corresponde um Cambissolo cálcico nas categorias taxonómicas da FAO (FAO-Unesco, 1985).

De um modo geral, estes solos caracterizam-se pelos elevados teores em carbonato de cálcio que podem oscilar entre 2 – 70% ao longo do perfil. O calcário pode existir na forma pulverulenta, na forma de concreções compactas ou macias, ou ainda como crostas lamelares ou não lamelares (Kopp *et al.*, 1989). Apresentam também elevados teores em calcário activo, parâmetro limitativo para a fisiologia de plantas pouco tolerantes à clorose férrica e determinante na selecção do porta-enxerto a utilizar quando da instalação de pomares nestas unidades pedológicas.

De forma a especificar a caracterização física e química do solo do pomar em estudo, no início dos ensaios foi efectuada uma amostragem aleatória na camada superficial (0-30 cm) da parcela seleccionada da qual resultou uma amostra composta, uma mistura de várias porções de solo retiradas de diferentes pontos e entre as linhas das árvores da parcela seleccionada do pomar.

As análises químicas e físicas foram realizadas de acordo com os métodos descritos por A.O.A.C. (1990) e os resultados estão apresentados na **Tabela 4.1**. O fósforo foi extraído com bicarbonato de sódio e o potássio com acetato de amónio. A classificação da textura foi efectuada de acordo com o diagrama de Pereira Gomes e Antunes da Silva (1962) *in* Costa (1995). Relativamente às características físicas salientam-se os elevados teores em argila, factor que pode afectar tanto a porosidade como a permeabilidade do solo.

De um modo geral, os valores obtidos enquadram-se nas características apresentadas por Kopp *et al.* (1989) para os solos da família Vc. Contudo, os teores de fósforo e potássio estão muito acima dos valores esperados, provavelmente por este solo ser cultivado, e portanto fertilizado, há vários anos.

Tabela 4.1 – Análise química e física da amostra de solo composta obtida a 30 cm de profundidade, na parcela experimental.

Parâmetros	Valores
K (mg kg ⁻¹)	259
P (mg kg ⁻¹)	133
Matéria orgânica (%)	2,4
Calcário total (%)	59
Calcário activo (%)	11
pH (H ₂ O)	7,7
Condutividade eléctrica (mS cm ⁻¹)	0,34
Areia (%)	64
Limo (%)	10
Argila (%)	26
Textura	Franco-argilo-arenosa

4.2.1.4. Sistema de rega

A rega do pomar, a cargo do agricultor, foi efectuada através de um sistema de micro-aspersão, com 2 micro-aspersores colocados junto ao tronco de cada árvores. Cada aspersor tem uma dispersão de 180° e debita, segundo o fabricante, 10 L de água por hora.

4.2.2. Delineamento experimental

Seleccionaram-se duas espécies citrícolas, um híbrido de tangerineira (*Citrus deliciosa* Tan. x *Citrus nobilis* Lour., ‘Encore’) e uma laranjeira (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck, cv. ‘Valencia late’) estabelecidas na mesma parcela do pomar conforme indicado na **Figura 4.1**. Ambas as espécies estavam enxertadas em laranjeira azeda (*Citrus aurantium* L.) que é um porta-enxerto caracterizado pela sua pouca tolerância ao calcário activo (Obreza *et al.*, 1993). Para corrigir a clorose férrica, efectuaram-se aplicações foliares com diversos compostos caracterizados por actuar como uma fonte de ferro (sulfato ferroso e quelato férrico) ou por permitirem a mobilização das “pools” de ferro existentes nas folhas cloróticas (ácido sulfúrico e ácido cítrico). Entre 1997 e 1999, realizaram-se três ensaios:

- **Ensaio 1**

Neste ensaio utilizaram-se árvores de tangerineira com 7 anos de idade. O compasso de plantação é de 3 por 4 m, o que equivale a 833 árvores por hectare. O ensaio iniciou-se a 5 de Agosto de 1997, altura em que os frutos apresentavam um diâmetro de 30 mm. A última pulverização foi efectuada a 14 de Dezembro de 1997 e a colheita dos frutos efectuou-se a 29 de Dezembro de 1997.

Testaram-se aplicações foliares com quatro produtos diferentes. Os tratamentos foram com sulfato Fe (II) (500 mg Fe L^{-1}), ácido sulfúrico ($0,5 \text{ mM H}_2\text{SO}_4$), quelato de Fe (III) (Fe-EDDHA, Hampiron 654 GS - Rhône-Poulenc, 120 mg Fe L^{-1}) e água destilada como testemunha. Estas soluções apresentaram um pH de 3,4, 2,3, 6,4 e 6,2, respectivamente. Durante o ensaio foram realizadas um total de 6 pulverizações em cada um dos ramos marcados. Avaliou-se o efeito dos tratamentos na recuperação dos sintomas de clorose fêrrica e em diversos parâmetros de qualidade da produção.

- **Ensaio 2**

Para este ensaio utilizaram-se árvores de laranjeira que estavam distribuídas no pomar com um compasso de 3 por 4 m o que corresponde a 833 árvores por hectare. Em 1997, as laranjeiras tinham 6 anos de idade e os frutos apresentavam um diâmetro de aproximadamente 50 mm. Em Agosto de 1997 as folhas apresentavam a seguinte composição mineral (g kg^{-1}): P ($1,4 \pm 0,03$), K ($10,3 \pm 0,16$), Ca ($57,1 \pm 1,0$), Mg ($3,9 \pm 0,05$) e (mg kg^{-1}): Fe (268 ± 10), Mn (25 ± 1), Zn ($27 \pm 0,4$) e Cu ($9 \pm 0,7$).

As pulverizações foliares decorreram, quinzenalmente, de 15 de Agosto de 1997 até 9 de Março de 1998. Os frutos, as folhas e flores foram colhidos a 22 de Março de 1998, altura que se realizaram as últimas medições do ensaio. Os tratamentos estudados neste ensaio foram iguais aos aplicados no **ensaio 1**.

Com este ensaio pretendeu-se analisar o efeito dos tratamentos no reverdecimento das folhas cloróticas, nos parâmetros de qualidade dos frutos e na composição mineral das folhas e flores.

Por fim e de forma a avaliar os efeitos residuais dos tratamentos, a 23 de Março de 1999 foram de novo colhidos frutos de acordo com a metodologia anteriormente descrita. Estudou-se o

efeito dos tratamentos, aplicados em 1997-98, no tamanho e na qualidade dos frutos colhidos em 1999. Determinaram-se ainda os coeficientes de correlação (r) entre a composição mineral das folhas e das flores em 1998 e os frutos colhidos em 1999. Saliente-se que não foram efectuadas quaisquer pulverizações desde Março de 1998 (final do **ensaio 2**) a Março de 1999 (nova colheita de frutos).

- **Ensaio 3**

Para este ensaio seleccionaram-se outras árvores de laranjeira localizadas na mesma parcela do ensaio anterior. As pulverizações foliares iniciaram-se a 11 de Agosto de 1998, altura em que o diâmetro dos frutos era aproximadamente de 50 mm e terminaram a 8 de Março de 1999. As medições finais bem como a colheita dos frutos, folhas e flores foram efectuadas 15 dias depois da última pulverização (23 de Março de 1999).

Os tratamentos aplicados por via foliar foram com sulfato Fe (II) (500 mg Fe L⁻¹), ácido cítrico (C₆H₈O₇.H₂O, 10 mM), sulfato Fe(II) (500 mg Fe L⁻¹) e ácido cítrico (10 mM), sulfato Fe(II) (500 mg Fe L⁻¹) e ácido sulfúrico (0,5 mM H₂SO₄), e água destilada como testemunha. O pH destas soluções foi respectivamente 3,4, 2,6, 2,5, 3,1 e 6,2. Com este ensaio pretendeu-se analisar o efeito dos tratamentos na recuperação dos sintomas de clorose férrica, nos parâmetros de qualidade da produção, na eficiência fotoquímica e na composição mineral das folhas novas, folhas velhas e flores.

Na **Tabela 4.2** está resumida a informação sobre o material vegetal, o período em que decorreram os ensaios, os tratamentos aplicados por ensaio, bem como o código de identificação de cada um dos tratamentos testados.

Tabela 4.2 - Identificação do material vegetal, dos tratamentos realizados e da duração de cada um deles.

Ensaio	Cultivar	Início - Final	Produtos estudados	Código
Ensaio 1	‘Encore’	5-8-97 a 29-12-97	Sulfato de Ferro (II)	SF
Ensaio 2	‘Valencia late’	15-8-97 a 22-3-98	Quelato de Ferro (III)	QF
			Ácido Sulfúrico	AS
			Água Destilada	T
Ensaio 3	‘Valencia late’	11-8-98 a 23-3-99	Sulfato de Ferro (II)	SF
			Ácido Cítrico	AC
			Sulfato de Ferro (II) e Ácido Cítrico	SFAC
			Sulfato de Ferro (II) e Ácido Sulfúrico	SFAS
			Água Destilada	T

O procedimento experimental foi o mesmo nos três ensaios realizados. Para testar cada uma das aplicações foliares seleccionaram-se, aleatoriamente, 4 árvores. Em cada árvore e para cada um dos tratamentos marcaram-se, em diferentes orientações da copa, quatro ramos homogêneos que apresentavam sintomas moderados de clorose férrica nas folhas jovens.

Os tratamentos foram efectuados com um pulverizador manual de modo a molhar todas as folhas dos ramos marcados. Para pulverizar todos os 16 ramos tratados, utilizaram-se 3 L de cada solução, o que equivale a uma taxa de aproximadamente 2500 L ha⁻¹. Adicionou-se um agente molhante não iónico a todos os tratamentos (Etaldyne – monifenol polietilenado, Rhône-Poulenc, 0,5 mL L⁻¹ – 10 mM).

Em Outubro de 1997, período em que decorriam os **ensaios 1 e 2**, e no final de Setembro de 1998, altura em que decorria somente o **ensaio 3** não foi possível efectuar pulverizações devido a condições climáticas desfavoráveis.

Todas as operações culturais inerentes à manutenção do pomar citrícola, nomeadamente o controlo da rega, das doenças e pragas, foram efectuadas pelo agricultor de forma a reproduzir as condições habituais de produção. Saliente-se, no entanto, que nas árvores marcadas não foram aplicados fertilizantes contendo ferro. Durante o período em que decorreram os ensaios, apenas foram efectuadas três adubações de cobertura com 800 g árvore⁻¹ do adubo composto NPK (10:10:10, com o N na forma amoniacal), respectivamente em Novembro de 1997, Janeiro e Agosto de 1998.

4.2.3. Parâmetros estudados

Neste ponto descreve-se a metodologia utilizada para cada um dos parâmetros estudados.

4.2.3.1. Quantificação da clorofila total (SPAD)

A clorofila total foi estimada pelo aparelho SPAD-502 (Minolta Co., Osaka, Japão). O princípio de funcionamento deste aparelho consiste em medir a luz transmitida através de uma folha depois de submetida, sequencialmente, a dois tipos de luz; primeiro com uma radiação na zona do vermelho (≈ 650 nm), e que corresponde a um pico de absorção das moléculas de clorofila e de seguida com uma luz na zona do infravermelho (≈ 940 nm) e que funciona como referência. A intensidade luminosa transmitida pela folha é convertida, primeiro em sinais eléctricos e depois,

através de um microprocessador, em unidades de SPAD conforme definido pela Minolta. Este aparelho pode ser utilizado como um método não destrutivo de estimar a concentração clorofilina uma vez que os valores de SPAD são proporcionais à quantidade relativa de clorofila total existente nas folhas.

De forma a converter os valores de SPAD na correspondente concentração de clorofila total efectuaram-se, previamente, duas curvas de calibração; uma para as árvores de tangerineira e outra para as árvores de laranjeira. As curvas de calibração foram realizadas de igual modo para as duas espécies estudadas. Antes de iniciar os ensaios colheram-se folhas, das árvores seleccionadas e com diferentes graus de clorose, que foram de imediato transportadas, numa arca térmica, para o laboratório onde se efectuaram medições de SPAD em diversos discos foliares (diâmetro = 1 cm; área = 0,7854 cm²). De seguida, procedeu-se à extracção dos pigmentos com acetona a 100% na presença de ascorbato de sódio, de forma a evitar a rápida degradação da clorofila *a*. A absorvância das amostras foi determinada por leitura colorimétrica num espectrofotómetro UV-Visível (Shimadzu, Kyoto, Japão) a dois comprimentos de onda (661,6 nm e 644,8 nm). Todo o procedimento de extracção e leitura foi efectuado conforme descrito por Abadía e Abadía (1993).

A conversão dos valores de absorvância (*A*), obtidos no comprimento de onda indicado, para concentração de clorofila (mg L⁻¹) foi realizada com base nas seguintes equações propostas por Lichtenthaler (1987):

$$\text{Clorofila } a = 11,24 * A_{661,6} - 2,04 * A_{664,8}$$

$$\text{Clorofila } b = 20,13 * A_{644,8} - 4,19 * A_{661,6}$$

$$\text{Clorofila total} = \text{Clorofila } a + \text{Clorofila } b$$

Todos os valores de SPAD medidos ao longo dos ensaios foram convertidos em µmol de clorofila total por unidade de área (m²) através da utilização das curvas de calibração apresentadas na **Figura 4.3**, para as duas espécies estudadas tangerineira (**a**) e laranjeira (**b**).

Durante os ensaios, a capacidade de recuperação das árvores foi determinada, em campo, através dos acréscimos na concentração foliar de clorofila total estimados pelo SPAD. Segundo diversos autores (Abadía *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1994) este parâmetro é adequado para medir o reverdecimento de folhas cloróticas.

No início dos ensaios e imediatamente antes de cada pulverização, efectuaram-se medições de SPAD em todos os ramos marcados. Em cada um dos ramos, consideraram-se pelo menos 3 valores de SPAD que consistiam na média de 5 leituras efectuadas em 5 folhas diferentes. Todas as medições foram efectuadas na 2ª e 3ª folhas recentemente expandidas. Para cada uma das datas de amostragem foram considerados no mínimo um total de 48 valores por tratamento (4 árvores x 4 ramos x 3 médias SPAD).

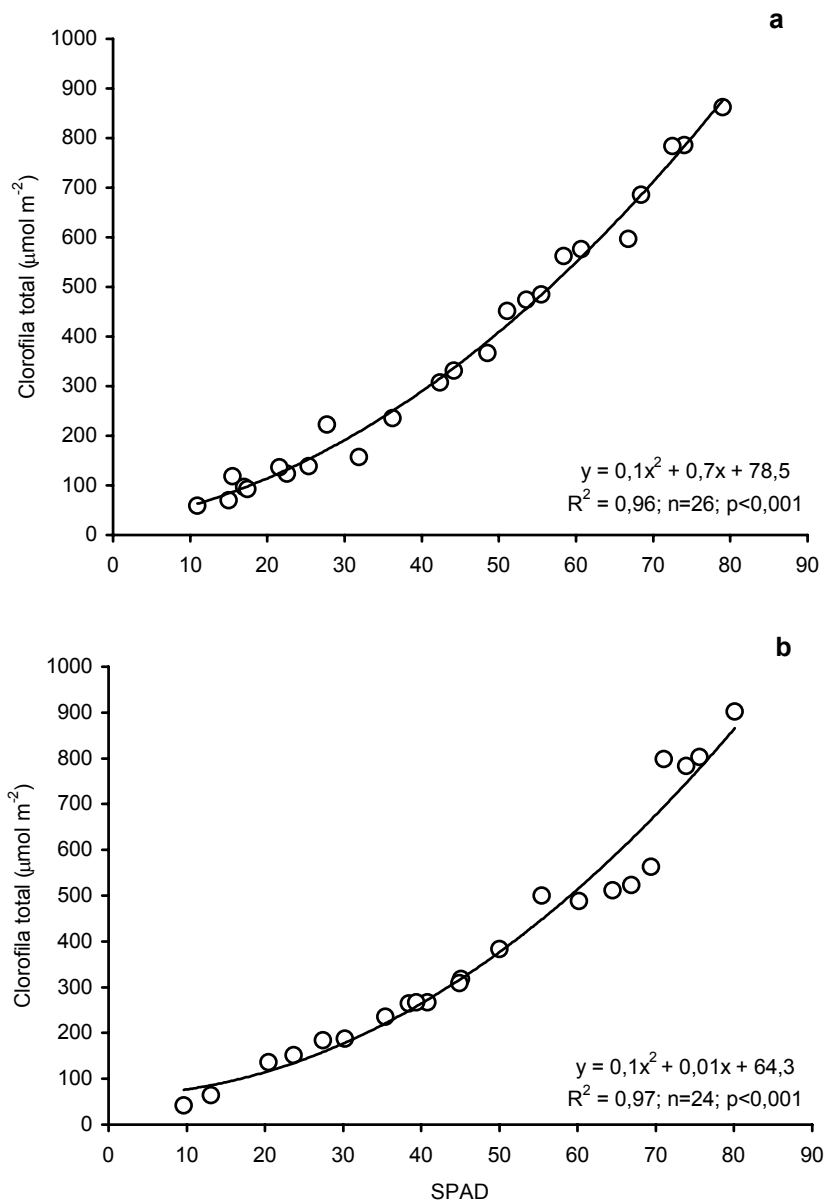


Figura 4.3 – Relação entre os valores de SPAD e a concentração foliar da clorofila total ($\mu\text{mol m}^{-2}$), em árvores de tangerineira - ‘Encore’ (a) e em árvores de laranja - cv. ‘Valencia late’ (b).

A percentagem (%) de variação da clorofila total, utilizada para comparar os ensaios realizados, foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de variação da clorofila total} = (C_f - C_i) / C_i * 100$$

em que C_i e C_f são respectivamente, a concentração de clorofila total ($\mu\text{mol m}^{-2}$) obtida no início e no final do ensaio.

4.2.3.2. Parâmetros de fluorescência da clorofila *a*

Em condições óptimas, a radiação absorvida por uma folha não é totalmente utilizada nas reacções fotoquímicas da fotossíntese e é dissipada pela clorofila *a* na forma de fluorescência (cerca de 3 a 5%) e de calor (Lichtenthaler e Rinderle, 1988; Walker, 1990). Sempre que os processos fotossintéticos de conversão de energia são de algum modo limitados a emissão de energia na forma de fluorescência aumenta e a sua quantificação permite medir a eficiência fotossintética *in vivo* (Schreiber e Bilger, 1985; Abadía *et al.*, 1991).

No final do **ensaio 3**, os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (F_0 , fluorescência basal; F_m , fluorescência máxima; $F_v = F_m - F_0$, fluorescência variável) foram medidos no campo através de um fluorímetro portátil (PEA - Plant Efficiency Analyser, Hansatech, Kyngs Lynn, U.K.). A fluorescência basal (F_0) é determinada com uma luz de intensidade muito baixa (cerca de $1,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e corresponde à energia base de excitação dos pigmentos antena antes de migrar para os centros de reacção. A fluorescência máxima (F_m) é determinada em resposta a um único pulso de luz saturante ($2100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, previamente determinado) de forma a reduzir todos os aceitadores primários e em folhas adaptadas ao escuro corresponde à capacidade máxima de captação de energia pelo fotossistema II (PSII). A eficiência de conversão de energia pelos centros de reacção do PSII foi estimada pela razão entre a fluorescência variável ($F_v = F_m - F_0$) e a fluorescência máxima (F_m). Foi demonstrado por Björkman e Demmig (1987) que em folhas intactas o rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) tem uma estrita correlação com o rendimento quântico da fotossíntese líquida.

As medições foram efectuadas na 2ª folha mensurável e em pelo menos 5 dos ramos marcados por tratamento, após 20 minutos de adaptação ao escuro seguidos de uma exposição a uma radiação com $2100 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 5s. O tempo de adaptação ao escuro e a

intensidade de luz saturante utilizados foram previamente determinados para o material vegetal em estudo e para as condições de campo.

4.2.3.3. Análise da composição mineral das folhas e flores

Como inicialmente referido, a composição mineral das folhas e das flores foi apenas determinada nos **ensaios 2 e 3** (laranjeiras cv. ‘Valencia late’). No final destes dois ensaios colheram-se, aleatoriamente, pelo menos 30 flores e 30 folhas sãs e recentemente expandidas (2ª e 3ª folha) do total de ramos marcados de cada árvore seleccionada. Nas árvores referentes ao **ensaio 3** foram também colhidas folhas velhas (folhas do ano anterior).

As folhas foram colhidas dos ramos não frutíferos enquanto que as flores foram colhidas independentemente do tipo de ramo. As amostras (foliares ou florais) colhidas por árvore foram analisadas separadamente de forma a constituírem uma repetição por tratamento.

A lavagem das folhas foi efectuada com detergente não iónico (Teepol), ácido diluído (HCl - 0,01 mM), e seguidamente com 3 passagens por água desionizada. Após a lavagem foram removidas as nervuras principais das folhas. As flores completas (incluindo as sépalas) foram lavadas apenas com água destilada. De seguida, procedeu-se à secagem das amostras foliares e florais em estufa a 60° C durante 48 horas. Posteriormente as amostras foram finamente moídas através de um moinho do tipo almofariz de ágata (RM 0, Retsch, Alemanha). A composição mineral, de qualquer uma amostras analisadas, foi determinada através dos métodos normalizados descritos pela “Association of Official Analytical Chemists” (A.O.A.C., 1990). O azoto foi determinado pelo método de Kjeldhal, utilizando como catalisador uma mistura de sulfato de cobre, sulfato de sódio e selénio. Após incineração a 450°C as amostras permaneceram em solução, por digestão ácida (HCl 1N), num volume final de 25 ml para a determinação dos restantes nutrientes, conforme indicado por Abadía *et al.* (1985) e por Belkhodja *et al.* (1998b). O fósforo foi determinado através da análise do complexo molibdovanadato fosfórico a 420 nm, no espectrofotómetro de UV-Visível (Shimadzu, Kyoto, Japão). O potássio foi determinado por fotometria de chama (Corning Ltd., Halstead, Inglaterra) e os restantes nutrientes (Mg, Ca, Fe, Mn, Cu e Zn) por espectrofotometria de absorção atómica (Shimadzu, Kyoto, Japão).

4.2.3.4. Parâmetros de qualidade dos frutos

Como anteriormente referido em cada um dos ensaios a data de colheita dos frutos foi diferente e está referida no ponto 4.2.2.

No final de cada um dos ensaios colheram-se todos os frutos existentes numa área de 1m² de copa de cada um dos ramos marcados, o que correspondeu a pelo menos um total de 20 frutos por cada uma das árvores seleccionadas. Os frutos foram rapidamente transportados numa arca frigorífica para o laboratório e mantidos no frigorífico (4°C) até se realizarem as análises.

Em cada fruto determinou-se o seu peso fresco (g), o calibre (mm) e o volume de sumo (expresso em ml e em percentagem do peso fresco do fruto). No sumo de cada fruto efectuou-se a leitura do índice de refração que traduz o total de sólidos solúveis (° Brix) através da utilização de um refractómetro de bancada (Atago Co. Ltd., Tóquio, Japão) e a determinação da acidez através da titulação do sumo com NaOH a 0,1 M na presença do indicador fenolftaleína (pH=8,1). A acidez do sumo foi convertida em percentagem de ácido cítrico (m/v de sumo) ou em mg de ácido cítrico por volume de sumo. Estas análises foram realizadas de acordo com os métodos descritos por A.O.A.C. (1990). O índice de maturação dos frutos foi avaliado pela razão entre o total de sólidos solúveis e a concentração de ácido cítrico (%) conforme proposto por Spiegel-Roy e Goldschmidt (1996).

A concentração de ácido ascórbico (Vitamina C) no sumo de laranja foi determinada nos frutos utilizados para avaliar os efeitos residuais dos tratamentos (**ensaio 2**, colheita de 1999) e no final do **ensaio 3**. Em ambos os ensaios, as determinações foram efectuadas em pelo menos 5 frutos por tratamento, aleatoriamente seleccionados do total de frutos colhidos. Pesaram-se 10 g de sumo por fruto que foram homogeneizados com 50 ml de uma solução de ácido cítrico a 3% (m/v). A amostra depois de filtrada sob vácuo foi sujeita a nova filtração utilizando um filtro Millipore tipo HA, com poro de dimensão 0,45 µm de diâmetro. A solução foi então passada por um cartucho Sep-Pak C18-Waters Millipore. Depois de lavado com 10 ml de água destilada, o cartucho foi eluído com 4 ml de metanol. As análises foram efectuadas num cromatógrafo equipado com um detector UV-visível (254nm; Beckman módulo 166), uma coluna de aço inoxidável (Lichrocart NH₂, 250 mm x 4 mm) com partículas de 5 µm de diâmetro, um injector Rheodyne com um “loop” de 20 µl acoplado a um registador. Como eluente utilizou-se uma solução de acetonitrilo : tampão dihidrogenofosfato de amónio a 0,01 M e pH=4,3 (70:30, v/v) a

um fluxo de 2 ml minuto⁻¹. O ácido ascórbico foi determinado pelo método do padrão externo. Para tal injectaram-se 20 µl de uma solução de ácido ascórbico com ácido cítrico nas concentrações de 1, 10 e 50 mg por 100 ml. Os valores apresentados correspondem a uma média de duas injeções por amostra. Os resultados expressaram-se em valores relativos, percentagem de ácido ascórbico (m/m de sumo).

Com o objectivo de avaliar a possibilidade de estimar o peso fresco do fruto através do seu calibre, a relação entre estes 2 parâmetros foi testada em todos os ensaios realizados. Nos ensaios com árvores de ‘Valencia late’ (**ensaio 2** –1998 e 1999 e **ensaio 3**) os resultados foram agrupados de forma a aumentar a representatividade do modelo proposto.

4.2.4. Procedimento estatístico

O desenho experimental de qualquer dos ensaios realizados foi totalmente casualizado. Os valores obtidos para cada um dos parâmetros por ramo foram introduzidos individualmente e foram considerados como uma repetição independente. De modo a obter material (foliar ou floral) suficiente para análise da composição mineral, as colheitas provenientes dos 4 ramos marcados de cada árvore foram juntas numa só amostra. Assim, para cada um dos tratamentos estudados foram efectuadas 4 análises correspondentes a cada uma das árvores.

A comparação das médias obtidas entre modalidades, em cada data de observação e para cada parâmetro medido, foi efectuada através da análise de variância (ANOVA) e do teste de comparação múltiplo de médias de Duncan (DMRT) para um intervalo de confiança de 95%.

O valor do coeficiente de correlação (r) foi indicado como medida da inter-relação entre as variáveis.

A selecção da melhor regressão linear efectuou-se com base no coeficiente de determinação (R^2), no teste t efectuado ao declive e na respectiva análise de variância do modelo, para um intervalo de confiança de 95% e 99%.

Toda a análise estatística dos dados foi efectuada no programa de estatística SAS - Versão 6 (SAS Institute, 1989).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Ensaio 1

4.3.1.1. Clorofila total

No início do ensaio, as árvores de tangerineira apresentavam sintomas moderados de clorose férrica aos quais correspondia uma concentração média de clorofila total de $311 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}$.

Na **Figura 4.4** estão apresentados os valores de clorofila total registados ao longo do ensaio para cada um dos tratamentos aplicados.

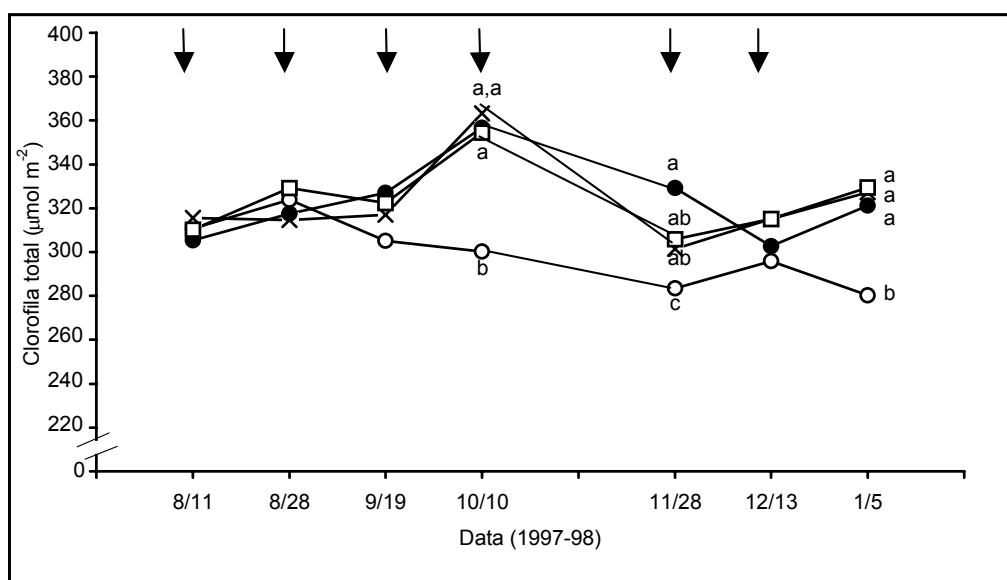


Figura 4.4 - Variação da concentração de clorofila total ($\mu\text{mol m}^{-2}$) ao longo do ensaio nas árvores de tangerineira. Os tratamentos aplicados por via foliar foram: Testemunha (○), Sulfato de ferro (●), Ácido sulfúrico (×) e Quelato de ferro (□). As setas indicam as datas em que se efectuaram as pulverizações foliares. Para cada uma das datas, médias com a mesma letra não são significativamente diferentes a 95% (teste de Duncan). A análise estatística está apenas apresentada nas datas em que houve diferenças significativas.

Após a 3ª pulverização, efectuada a 19 de Setembro, a recuperação da clorose férrica nas árvores tratadas com ferro e/ou com ácido sulfúrico foi evidente pois apresentaram valores de clorofila total superiores aos da testemunha.

Desde 10 de Outubro até 28 de Novembro, não se efectuaram aplicações foliares devido a condições climatéricas adversas e conseqüentemente, a concentração da clorofila total das árvores tratadas decresceu. No final do ensaio a recuperação da clorose fêrrica das árvores tratadas foi visível em todos os tratamentos, com excepção da testemunha. Contudo, a concentração de clorofila total nas folhas não permitiu distinguir os diferentes tratamentos testados. No final do ensaio, não se observaram necroses nas folhas nem nos frutos motivadas pelas pulverizações foliares efectuadas.

4.3.1.2. Parâmetros de qualidade dos frutos

A comercialização de produtos susceptíveis de corrigir a clorose fêrrica passa pela avaliação dos efeitos da sua aplicação no calibre e na qualidade da produção citrícola. Na **Tabela 4.3** está apresentado o efeito das aplicações foliares em diversos parâmetros de qualidade dos frutos no final do ensaio. O peso fresco e o calibre dos frutos foram superiores em todas as árvores tratadas, comparativamente com os frutos das testemunha. No entanto, o tratamento mais efectivo foi registado nas árvores tratadas com quelato de ferro.

O volume de sumo dos frutos provenientes das árvores tratadas com ácido sulfúrico ou com quelato de ferro foi superior ao obtido nos frutos da testemunha, no entanto, quando se expressou o volume de sumo relativo ao peso fresco dos frutos não se verificaram diferenças entre tratamentos.

Tabela 4.3 - Efeito das aplicações foliares na qualidade dos frutos de tangerineira, colhidos no final do ensaio (Dezembro 97).

Tratamentos	PFF	C	VS	VS	TSS	AC	ACF	IM
	(g)	(mm)	(ml)	(% PFF)	(° Brix)	(% m/v)	(mg/VS)	
Testemunha	66 c	55 c	33 c	47 a	8,5 b	2,0 a	0,6 b	4,5 c
Ácido sulfúrico	89 b	60 b	46 ab	48 a	9,2 a	1,4 b	0,6 ab	6,9 a
Quelato de ferro	107 a	65 a	51 a	47 a	9,2 a	1,5 b	0,7 a	6,7 ab
Sulfato de ferro	87 b	60 b	39 bc	48 a	9,0 a	1,7 b	0,6 ab	5,7 b

PFF – peso fresco do fruto; C – calibre; VS – volume de sumo; TSS – total de sólidos solúveis; AC – ácido cítrico; ACF – ácido cítrico por fruto; IM – índice de maturação. Na coluna, médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes a 95% (teste de Duncan).

Comparativamente com a testemunha, a percentagem de ácido cítrico nos frutos das árvores tratadas diminuiu e o total de sólidos solúveis aumentou, não se tendo verificado diferenças significativas entre tratamentos.

O efeito das pulverizações no índice de maturação dos frutos determinou-se através da razão entre o total de sólidos solúveis e a concentração de ácido cítrico. As aplicações foliares com ferro conduziram a frutos com um estado de maturação intermédio, entre os frutos das árvores tratadas com ácido sulfúrico e os frutos das árvores não tratadas, os quais apresentaram os valores mais baixos.

Considerando o principal objectivo do citricultor, é importante quantificar o benefício económico da correcção da clorose férrica. Na **Tabela 4.4** estão apresentadas as cotações médias por calibre de tangerina Encore praticadas no Algarve durante o ano de 1998 as quais oscilaram entre 0,25 e 0,65 Euros por kg.

Tabela 4.4 - Preços médios por calibre comercial de tangerina Encore relativos à campanha de 1998, praticados na região do Algarve.

Calibre	Tamanho (mm)	Preço (Euros por Kg)
I	(≥63)	0,650
II	(58-62)	0,535
III-IV	(50-57)	0,350
IV-X	(≤49)	0,250

Os frutos da testemunha enquadraram-se na classe de calibres III-IV, enquanto que os frutos das árvores tratadas com sulfato de ferro ou ácido sulfúrico situaram-se no calibre II, ou no calibre I nas árvores pulverizadas com quelato de ferro.

De acordo com as cotações apresentadas, a clorose férrica afectou a produção em 1998 e a sua correcção originou acréscimos de preço pagos ao citricultor entre os 53% (sulfato de ferro ou ácido sulfúrico) e os 86% (quelato de ferro), consoante o tratamento aplicado.

4.3.2. Ensaio 2

4.3.2.1. Clorofila total

No início do ensaio, as folhas das laranjeiras caracterizavam-se por ter uma concentração média de clorofila total de $278 \pm 6 \mu\text{mol m}^{-2}$ e sintomas moderados de clorose férrica. Quando esta cultivar está instalada num solo não calcário pode apresentar, com frequência, valores da ordem das $800 \mu\text{mol}$ de clorofila total por m^2 .

As variações na concentração média de clorofila total, por tratamento, ao longo do ensaio estão apresentadas na **Figura 4.5**.

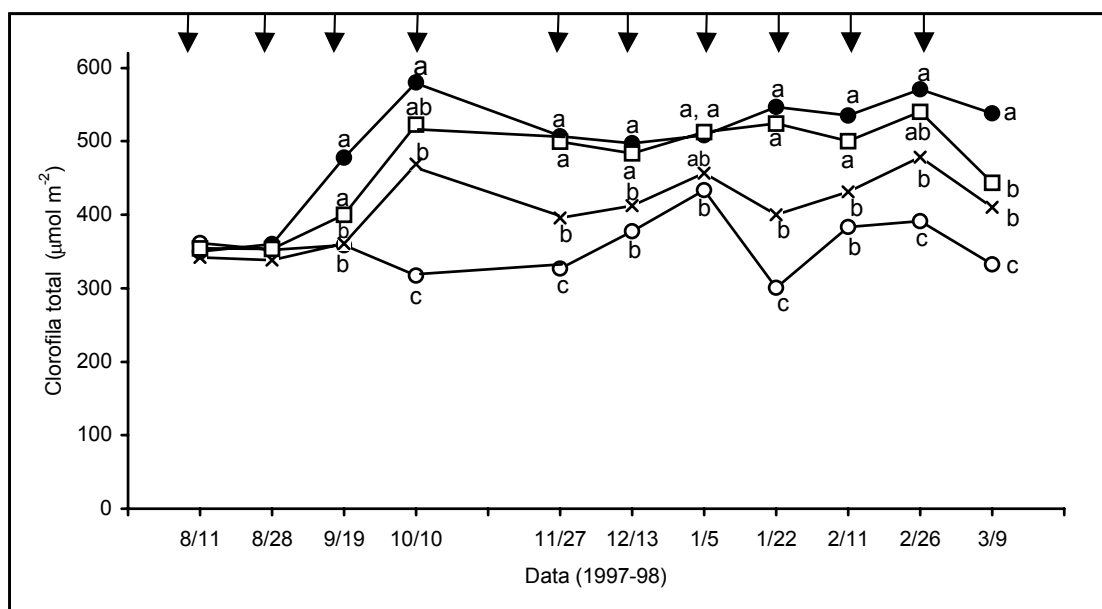


Figura 4.5 – Efeito das aplicações foliares na concentração de clorofila total ($\mu\text{mol m}^{-2}$) das árvores de laranja ('Valencia late') ao longo do ensaio. As aplicações foliares foram: Testemunha (○), Sulfato de ferro (●), Ácido sulfúrico (×) e Quelato de ferro (□). As setas indicam as datas em que se efectuaram as pulverizações foliares. Para cada data, médias com a mesma letra não são significativamente diferentes a 95% (teste de Duncan). A análise estatística está apenas apresentada nas datas em que se registaram diferenças significativas.

Os valores de clorofila total aumentaram ao fim da 3ª pulverização (19 de Setembro de 1997) em todas as árvores tratadas, com excepção das árvores testemunha. Todavia, estes acréscimos foram mais pronunciados nas árvores tratadas com ferro (na forma de sulfato ferroso

ou de quelato férrico) que apresentaram sempre concentrações de clorofila total superiores às das árvores tratadas com ácido sulfúrico e portanto sem ferro. Por outro lado, as árvores tratadas com ferro apresentaram, quase sempre, valores de clorofila total muito idênticos entre si. Na maioria das datas de amostragem, as pulverizações com ácido sulfúrico induziram a concentrações de clorofila total mais altas do que as verificadas nas árvores tratadas com água destilada (testemunha).

As fertilizações de cobertura realizadas em Novembro e em Janeiro com um adubo composto (NPK) motivaram acréscimos na clorofila total das árvores tratadas com ácido sulfúrico e nas árvores testemunha. No entanto, passado um mês, as árvores retomaram os valores obtidos antes da adubação. As árvores tratadas com ferro não foram afectadas pelas adubações de cobertura.

Todas as pulverizações foliares efectuadas com ferro foram eficientes no controlo da clorose férrica. No final do ensaio (Março de 1998), verificaram-se decréscimos nas concentrações de clorofila total em todas as árvores independentemente do tratamento aplicado apesar de não se verificarem sintomas de clorose férrica. Não foram observadas necroses foliares nem manchas nos frutos motivadas pelas pulverizações foliares.

4.3.2.2. Composição mineral das folhas e das flores

No final do ensaio, a composição mineral das folhas e das flores foi afectada pelas pulverizações foliares. A concentração de cada um dos elementos analisados está apresentada por tratamento na **Tabela 4.5**.

As concentrações foliares e florais de Fe e de Zn aumentaram significativamente nas árvores tratadas com sulfato de ferro, onde se registaram os valores mais elevados. Os restantes tratamentos conduziram a concentrações foliares e florais de Zn, bem como a concentrações florais de Fe, iguais entre si. As árvores tratadas com ácido sulfúrico ou com quelato de ferro apresentaram concentrações mais altas de Fe e Zn nas flores quando comparadas com as árvores não tratadas.

A concentração de K nas folhas foi superior no tratamento com sulfato de ferro enquanto que nas flores foi superior no tratamento com quelato de ferro, relativamente à testemunha. A concentração de P e Mg nas folhas foi em geral superior nas árvores tratadas.

A concentração dos outros nutrientes analisados (Ca, Cu e Mn) nas folhas e nas flores não foi afectada pelos tratamentos aplicados.

Tabela 4.5 – Efeito das diferentes aplicações foliares na composição mineral das folhas e flores de laranja no final do ensaio (22 de Março de 1998).

Tratamentos	P	K	Ca	Mg	Zn	Fe	Cu	Mn
	g kg ⁻¹				mg kg ⁻¹			
Folhas								
Testemunha	1,8 b	13,0 b	21,7 a	2,5 b	24,0 b	52,3 c	24,5 a	10,5 a
Ácido sulfúrico	2,3 a	15,4 ab	26,5 a	3,1 a	27,2 b	66,0 b	27,3 a	10,3 a
Quelato de ferro	2,1 ab	15,5 ab	26,2 a	2,9 ab	26,2 b	64,8 b	25,8 a	11,3 a
Sulfato de ferro	2,3 a	17,2 a	26,0 a	3,0 ab	32,2 a	109,2 a	32,2 a	13,3 a
Flores								
Testemunha	2,6 a	20,2 b	5,1 a	1,9 a	23,5 b	51,8 b	24,8 a	13,0 a
Ácido sulfúrico	2,5 a	19,9 b	5,5 a	2,0 a	25,0 b	44,2 b	24,2 a	12,8 a
Quelato de ferro	2,6 a	22,1 a	5,2 a	2,1 a	25,5 b	51,8 b	26,8 a	14,5 a
Sulfato de ferro	2,6 a	20,7 ab	5,5 a	2,1 a	28,8 a	73,8 a	27,5 a	14,8 a

Para cada tipo de amostra e cada nutriente analisado, médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes a 95% (teste de Duncan).

Comparando as concentrações de cada nutriente nas folhas com as concentrações nas flores, apenas se verificam diferenças respeitantes aos valores de cálcio e de ferro. Assim, a concentração de cálcio nas flores é cerca de 4 vezes inferior à sua concentração nas folhas e independente do tratamento aplicado. Por outro lado, a amplitude de variação dos valores de ferro nas folhas é superior à das flores.

4.3.2.3. Parâmetros de qualidade dos frutos

O efeito das pulverizações foliares no tamanho e na qualidade dos frutos colhidos no final do ensaio está apresentado na **Tabela 4.6**. Verificou-se que, para além do calibre, alguns parâmetros de qualidade dos frutos foram afectados pelas pulverizações foliares testadas.

Os frutos das árvores pulverizadas com sulfato de ferro foram significativamente maiores (peso fresco e calibre) e apresentaram volumes de sumo superiores aos frutos da testemunha e das árvores tratadas com ácido sulfúrico. Porém, não foram significativamente diferentes dos frutos das árvores pulverizadas com quelato de ferro.

Tabela 4.6 – Efeito das aplicações foliares na qualidade dos frutos das laranjeiras ‘Valencia late’, colhidos no final do ensaio (22 de Março 1998).

Tratamentos	PFF (g)	C (mm)	VS (ml)	VS (% PFF)	TSS (° Brix)	AC (% m/v)	ACF (mg/VS)	IM
Testemunha	184 b	72 b	89 b	49 a	10,2 a	1,2 a	1,1 a	9,1 b
Ácido sulfúrico	179 b	72 b	90 b	50 a	9,9 a	1,1 ab	1,0 ab	9,3 b
Quelato de ferro	193 ab	74 ab	94 ab	49 a	10,1 a	1,0 bc	0,9 b	10,4 ab
Sulfato de ferro	206 a	76 a	98 a	48 a	9,3 a	0,9 c	0,9 b	10,9 a

PFF – peso fresco do fruto; C – calibre; VS – volume de sumo; TSS – total de sólidos solúveis; AC – ácido cítrico; ACF – ácido cítrico por fruto; IM – índice de maturação. Na coluna, médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes a 95% (teste de Duncan).

Os valores relativos à percentagem de sumo, expressa em relação ao peso fresco do fruto, e ao total de sólidos solúveis foram iguais entre si e portanto independentes do tratamento aplicado. O sumo dos frutos provenientes das árvores pulverizadas com ferro (na forma de sulfato ferroso ou de quelato férrico) apresentaram concentrações de ácido cítrico mais baixas do que o sumo dos frutos da testemunha.

Conforme constatado no ensaio anterior com tangerineiras, verificou-se que a clorose férrica atrasou o estado de maturação dos frutos das laranjas uma vez que os frutos das árvores tratadas com ferro tendem a apresentar índices de maturação mais elevados. As aplicações foliares com ácido sulfúrico, apesar de atenuarem os sintomas de clorose férrica, não melhoraram nem o tamanho nem a qualidade dos frutos no final do ensaio.

Na **Tabela 4.7** estão apresentados os preços médios por calibre das laranjas ‘Valencia late’ pagos ao agricultor, durante a campanha de 1998, praticados na região do Algarve.

Tabela 4.7 – Preços por calibre comercial das laranjas relativos à campanha de 1998.

Calibre	Tamanho (mm)	Preço (Euros por Kg)
I-III	(≥82)	0,232
V	(76-81)	0,226
VI	(73-75)	0,220
VII	(63-72)	0,163
VIII-XIII	(≤62)	0,122

O tratamento com ácido sulfúrico conduziu a frutos com um calibre médio idêntico aos da testemunha, calibre VII, e portanto com um preço de venda semelhante. A correcção da clorose fêrrica através de pulverizações foliares com ferro resultou em frutos com um calibre superior, calibre VI, representando um acréscimo de pagamento ao citricultor da ordem dos 35%.

4.3.2.4. Efeito residual dos tratamentos

Um ano após o final do **ensaio 2**, foi efectuada uma nova colheita de frutos (Março de 1999) por tratamento com o objectivo de avaliar qual a duração dos efeitos das pulverizações foliares no tamanho e na qualidade dos frutos.

As médias obtidas para cada um dos parâmetros analisados por tratamento apresentam-se na **Tabela 4.8**. Os frutos da testemunha apresentaram calibre, peso fresco e volume de sumo menores, bem como a maior percentagem de ácido cítrico. Os frutos das árvores tratadas com ácido sulfúrico apresentaram médias semelhantes às dos frutos das árvores pulverizadas com ferro, na forma de sulfato ou de quelato.

O total de sólidos solúveis existente no sumo foi independente dos tratamentos aplicados no ano anterior. Apesar dos frutos da testemunha apresentarem valores mais baixos, o índice de maturação não foi estatisticamente diferente do obtido para os restantes tratamentos. Os valores médios de ácido ascórbico existentes no sumo de laranja no final do ensaio apesar de não serem significativamente diferentes variaram entre 0,033 % para os frutos da testemunha e 0,041 % para os frutos das árvores tratadas com ácido sulfúrico.

Tabela 4.8 – Efeito residual das aplicações foliares efectuadas de Agosto de 1997 a Março de 1998 no tamanho e na qualidade das laranjas ‘Valencia late’ colhidas em Março de 1999.

Tratamentos (1997-98)	Frutos (1999)								
	PFF (g fruto ⁻¹)	C (mm)	VS (ml)	VS (% PFF)	TSS (° Brix)	AC (% m/v)	ACF (mg/VS)	IM	AA (% m/m)
Testemunha	143 b	65 b	67 c	47 b	10,2 a	1,8 a	1,2 b	5,7 a	0,033 a
Ácido sulfúrico	179 a	71 a	87 b	49 ab	10,2 a	1,7 ab	1,6 a	5,9 a	0,041 a
Quelato de ferro	183 a	71 a	88 ab	49 ab	9,9 a	1,7 ab	1,5 a	6,1 a	0,039 a
Sulfato de ferro	193 a	72 a	95 a	50 a	9,9 a	1,6 b	1,6 a	6,1 a	0,040 a

PFF – peso fresco do fruto; C – calibre; VS – volume de sumo; TSS – total de sólidos solúveis; AC – ácido cítrico; ACF – ácido cítrico por fruto; IM – índice de maturação; AA – ácido ascórbico. Na coluna, médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes a 95% (teste de Duncan).

Comparativamente com os resultados obtidos no ano anterior (1998) e apresentados na **Tabela 4.6**, os valores médios relativos ao peso fresco, calibre e volume de sumo dos frutos da testemunha em 1999 diminuíram significativamente, salientando-se o decréscimo de cerca de 30% no peso fresco médio de cada fruto.

Os tratamentos aplicados afectaram o equilíbrio nutritivo das árvores (**Tabela 4.5**) o que possivelmente teve efeitos na produção do ano seguinte (**Tabela 4.8**). Esta hipótese foi avaliada através das relações obtidas entre estes dois parâmetros.

Na **Tabela 4.9** apresentam-se os coeficientes de correlação (r) obtidos entre a composição mineral das folhas e das flores em Março de 1998 e os parâmetros de qualidade dos frutos, colhidos em Março de 1999, independentemente do tratamento aplicado.

Tabela 4.9 – Coeficientes de correlação (r) obtidos entre a concentração de nutrientes nas folhas e nas flores (1998) e o tamanho e a qualidade das laranjas ‘Valencia late’ (1999).

Nutrientes (1998)	Frutos (1999)						
	PFF	C	VS	TSS	AC	AA	
Flores	P	0,17	0,20	0,20	- 0,17	- 0,14	- 0,33
	K	0,12	0,12	0,03	- 0,14	- 0,30	- 0,08
	Ca	0,39	0,22	0,33	- 0,33	- 0,20	0,27
	Mg	0,48*	0,44*	0,37	- 0,39	- 0,66**	0,23
	Cu	0,36	0,28	0,28	- 0,17	- 0,26	0,34
	Mn	0,20	0,36	0,24	- 0,17	- 0,60**	- 0,43
	Fe	0,46*	0,40	0,47*	- 0,22	- 0,51*	- 0,25
	Zn	0,51*	0,48*	0,58**	- 0,44*	- 0,22	- 0,12
Folhas	P	0,57**	0,48*	0,56**	- 0,44*	- 0,08	- 0,01
	K	0,46*	0,46*	0,46*	- 0,33	- 0,10	- 0,47*
	Ca	0,41	0,40	0,30	- 0,14	- 0,26	- 0,19
	Mg	0,41	0,37	0,32	- 0,10	- 0,14	- 0,20
	Cu	0,33	0,30	0,24	- 0,17	- 0,44*	0,16
	Mn	0,37	0,30	0,26	- 0,22	- 0,57**	- 0,23
	Fe	0,59**	0,50*	0,63**	- 0,40	- 0,36	- 0,18
	Zn	0,54**	0,48*	0,54**	- 0,32	- 0,20	- 0,31

PFF – peso fresco do fruto; C – calibre; VS – volume de sumo; TSS – total de sólidos solúveis; AC – ácido cítrico; AA – ácido ascórbico. Significativo para $p > 0,95$ (*) ou $p > 0,99$ (**).

Verificou-se um número elevado de relações estatisticamente significativas. A variação do peso fresco dos frutos foi directamente proporcional à concentração foliar de P, K, Fe e Zn e à

concentração floral de Mg, Fe e Zn. O calibre e o volume de sumo também se correlacionaram positivamente com a concentração foliar de P, K, Fe e Zn. Por outro lado, o calibre apresentou uma relação positiva com a concentração de Mg e Zn nas flores e o volume de sumo correlacionou-se directamente com os níveis florais de Fe e Zn.

Relativamente ao total de sólidos solúveis existente no sumo, verificou-se uma relação inversamente proporcional tanto com a concentração de Zn nas flores como com a concentração de P nas folhas. A concentração de ácido cítrico no sumo esteve negativamente relacionada com a concentração floral de Mg, Mn e Fe e com a concentração foliar de Cu e Mn. A percentagem de ácido ascórbico existente no sumo apenas se relacionou, negativamente, com a concentração de K nas folhas.

4.3.3. Ensaio 3

4.3.3.1. Clorofila total

No início do ensaio, eram visíveis sintomas moderados de clorose férrica nas laranjeiras ‘Valencia late’ utilizadas no **ensaio 3** as quais apresentavam concentrações médias de clorofila total de $310 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}$.

Na **Figura 4.6** está apresentada a variação da concentração da clorofila total, por tratamento e ao longo do ensaio. Após a primeira pulverização registou-se um acréscimo na concentração de clorofila total para todos os tratamentos incluindo as árvores da testemunha. A partir da segunda pulverização, realizada a 24 de Agosto, os valores de clorofila total das árvores não tratadas (testemunha) decresceram e mantiveram-se sempre mais baixos do que os das árvores tratadas.

Nas primeiras medições efectuadas, as árvores pulverizadas com sulfato de ferro mais ácido sulfúrico apresentaram valores mais altos de clorofila total, mas nos últimos 2 meses de ensaio foram idênticos aos registados para o tratamento com sulfato de ferro mais ácido cítrico. De entre os tratamentos aplicados, as árvores tratadas com sulfato de ferro isoladamente foram as que apresentaram as concentrações de clorofila total mais baixas nos primeiros meses de ensaio.

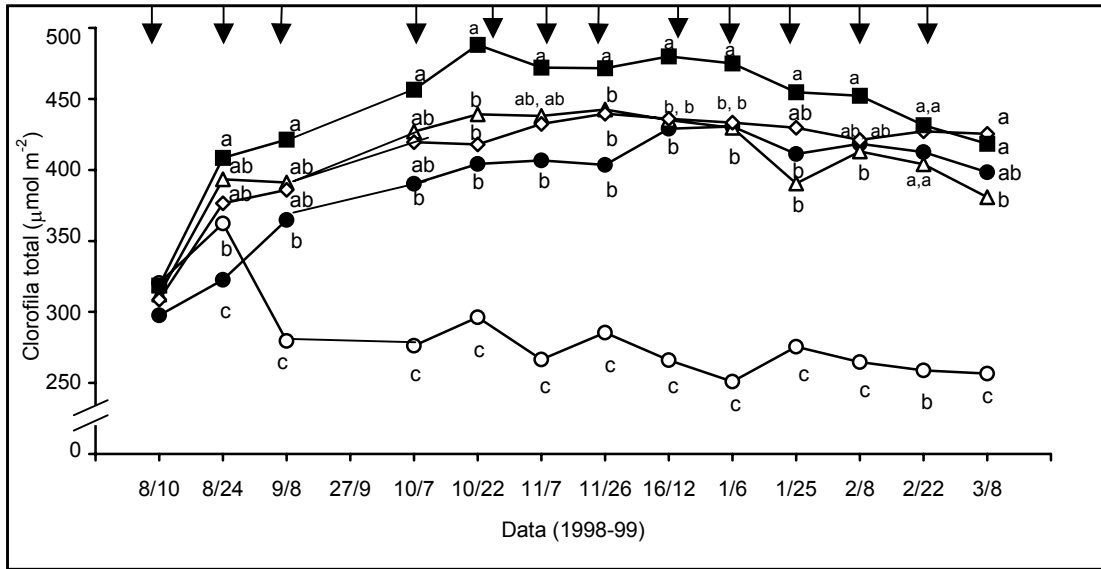


Figura 4.6 – Efeito dos tratamentos na clorofila total ($\mu\text{mol m}^{-2}$) das árvores de laranjeira ao longo do ensaio. As aplicações foliares foram: Testemunha (\circ), Ácido cítrico (Δ), Sulfato de ferro (\bullet), Sulfato de ferro + ácido sulfúrico (\blacksquare) e Sulfato de ferro + ácido cítrico (\diamond). As setas indicam as datas em que se efectuaram as pulverizações foliares. Para cada data, médias com a mesma letra não são significativamente diferentes a 95% (teste de Duncan). A análise estatística está apenas apresentada nas datas em que se registaram diferenças significativas.

No final do ensaio, registou-se um decréscimo na concentração de clorofila em todas as árvores independentemente do tratamento aplicado. O grau de clorose mais intenso foi observado nas árvores da testemunha. Nas árvores dos restantes tratamentos não se verificaram sintomas típicos desta carência nutritiva.

4.3.3.2. Parâmetros de fluorescência da clorofila *a*

Na **Figura 4.7** apresentam-se os valores médios obtidos nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (F_0 – fluorescência basal, F_m – fluorescência máxima e F_v/F_m) para cada um dos tratamentos, no final do ensaio.

As árvores não tratadas (testemunha) apresentaram, conjuntamente com sintomas de clorose fêrrica, os valores mais baixos, para qualquer um dos parâmetros medidos. A fluorescência basal (F_0) e a fluorescência máxima (F_m) foram sempre superiores nas árvores tratadas, independentemente do tratamento aplicado. Os valores mais elevados da razão F_v/F_m registaram-se no tratamento com sulfato de ferro mais ácido cítrico que por sua vez não foram estatisticamente diferentes dos obtidos com ácido cítrico ou com sulfato de ferro mais ácido sulfúrico. Os

tratamentos com sulfato de ferro isoladamente resultaram em razões de F_v/F_m intermédias entre a testemunha e os restantes tratamentos.

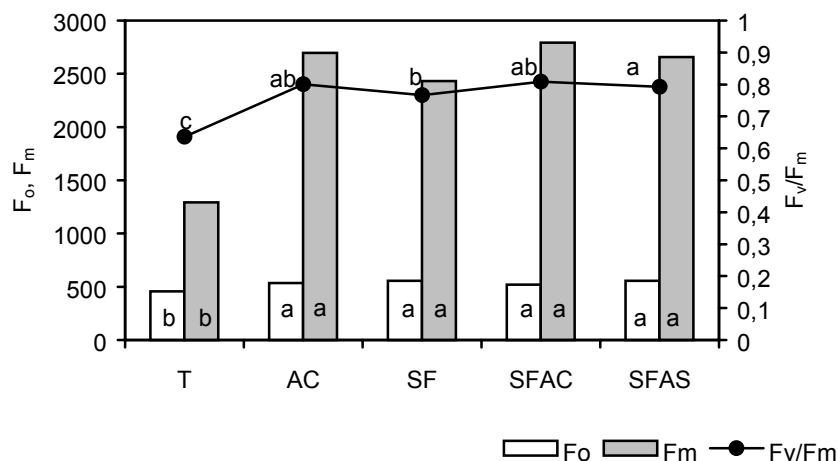


Figura 4.7 – Efeito dos tratamentos nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (F_0 , fluorescência basal; F_m , fluorescência máxima; F_v , fluorescência variável = $F_m - F_0$) para cada um dos tratamentos no final do ensaio 3. As aplicações foliares foram: Testemunha (T), Ácido cítrico (AC), Sulfato de ferro (SF), Sulfato de ferro + ácido sulfúrico (SFAS) e Sulfato de ferro + ácido cítrico (SFAC). Para cada parâmetro medido, comparando cada tratamento, colunas com a mesma letra não são significativamente diferentes a 95% (teste de Duncan).

Na **Figura 4.8** está representada graficamente a relação obtida entre a razão F_v/F_m e a fluorescência máxima.

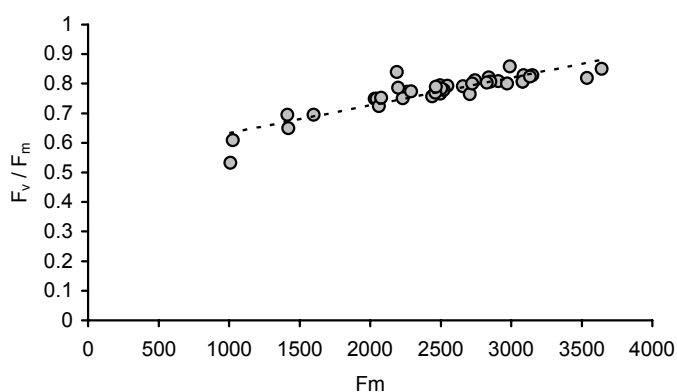


Figura 4.8 – Relação entre a fluorescência máxima (F_m) e a razão F_v/F_m , sendo F_v a fluorescência variável, obtida pela diferença entre a fluorescência máxima e a fluorescência basal.

Da análise da figura, constata-se que cerca de 80% da variação dos valores de F_v/F_m está dependente da fluorescência máxima ($R^2= 0,79$; $p= 0,0001$; $n= 39$), relação que se traduz pela equação linear: $F_v/F_m = 0,00009 * F_m + 0,54$. No entanto, este parâmetro (F_v/F_m) é independente da fluorescência basal (F_o) uma vez que o coeficiente de determinação obtido ($R^2= 0,079$; $n= 39$) não é significativo ($p= 0,8$).

4.3.3.3. Composição mineral das folhas e flores

Na **Tabela 4.10** estão apresentados os resultados obtidos na análise da composição mineral das flores, folhas novas e folhas velhas colhidas no final do ensaio para cada tratamento.

Independentemente dos tratamentos aplicados, as concentrações de Ca, Fe, Cu e Mn nas folhas novas foram superiores às encontradas nas folhas velhas. Contrariamente, as concentrações de N, P, K e Zn foram inferiores e os valores de Mg foram idênticos nos dois tipos de material vegetal.

Tabela 4.10 – Efeito das diferentes aplicações foliares na composição mineral das folhas e flores de laranja no final do ensaio (23 de Março de 1999).

Tratamentos	N	P	K	Ca	Mg	Zn	Fe	Cu	Mn
	g kg ⁻¹					mg kg ⁻¹			
Folhas Velhas									
Testemunha	12 b	2,5 a	9,5 a	20,2 a	2,5 a	24,3 a	137,2 a	17,3 a	9,5 a
Ácido cítrico	16 a	2,4 a	9,1 a	17,3 a	2,2 a	23,0 a	73,8 b	18,2 a	10,0 a
Sulfato de ferro	16 a	2,9 a	10,2 a	15,6 a	2,3 a	25,8 a	71,0 b	24,2 a	9,3 a
Sulfato Fe + Ácido cítrico	14 ab	2,9 a	9,7 a	19,3 a	2,4 a	26,3 a	91,3 b	18,2 a	10,2 a
Sulfato Fe + Ácido sulfúrico	13 ab	2,9 a	9,9 a	19,8 a	2,6 a	24,8 a	69,0 b	19,7 a	8,0 a
Folhas Novas									
Testemunha	9 a	1,1 a	3,7 a	34,4 b	2,3 a	18,3 a	172,0 b	37,5 a	16,8 a
Ácido cítrico	9 a	0,9 a	2,6 b	45,5 a	2,4 a	18,8 a	164,7 b	24,3 a	19,7 a
Sulfato de ferro	9 a	1,0 a	2,7 ab	41,4 ab	2,0 a	19,2 a	742,5 a	26,2 a	16,3 a
Sulfato Fe + Ácido cítrico	9 a	1,1 a	3,1 ab	43,3 a	2,4 a	18,8 a	650,0 a	31,5 a	16,0 a
Sulfato Fe + Ácido sulfúrico	10 a	1,1 a	2,3 b	39,8 ab	2,2 a	17,3 a	660,1 a	30,3 a	16,2 a
Flores									
Testemunha	14 a	2,4 b	15,2 a	5,9 a	1,8 a	25,3 a	46,0 a	11,5 a	13,3 a
Ácido cítrico	15 a	2,3 b	12,0 a	4,5 a	1,6 a	21,8 a	48,2 a	15,8 a	13,2 a
Sulfato de ferro	17 a	2,9 ab	15,6 a	6,0 a	1,8 a	24,0 a	67,7 a	15,7 a	13,0 a
Sulfato Fe + Ácido cítrico	15 a	3,1 a	14,9 a	5,2 a	1,8 a	25,7 a	56,0 a	15,5 a	13,3 a
Sulfato Fe + Ácido sulfúrico	16 a	2,5 ab	13,3 a	5,3 a	1,8 a	25,3 a	61,8 a	15,3 a	13,3 a

Para cada tipo de amostra (folhas ou flores) e para cada nutriente analisado, médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes a 95% (teste de Duncan).

Comparando as concentrações de cada nutriente nas folhas e nas flores, apenas se verificam diferenças respeitantes aos valores de Ca, K e Fe. A concentração de Ca e Fe nas flores é inferior e a concentração de K é superior à concentração nas folhas (novas ou velhas).

A concentração de K, Ca e Fe das folhas novas foi afectada pelos tratamentos aplicados. As árvores da testemunha apresentaram os valores mais altos de K e os mais baixos de Ca. As folhas novas das árvores tratadas com ferro apresentaram valores de Fe idênticos entre si e superiores, cerca do triplo, aos das restantes árvores.

Nas folhas velhas apenas se registaram variações nos níveis de N e Fe. Nas árvores não tratadas verificaram-se as concentrações mais baixas de N e mais elevadas de Fe.

Em relação às flores, o P foi o único nutriente que foi significativamente afectado pelos tratamentos, tendo se registado os valores mais elevados nas árvores tratadas com sulfato de ferro mais ácido cítrico. Apesar de não significativa, a concentração de Fe nas flores foi superior nas árvores tratadas com ferro, comparativamente com os tratamentos em que não se adicionou Fe.

4.3.3.4. Parâmetros de qualidade dos frutos

No final do ensaio os valores de alguns dos parâmetros de qualidade dos frutos da testemunha (peso fresco, calibre e percentagem de ácido cítrico) foram mais baixos do que os dos tratamentos, que foram idênticos entre si (**Tabela 4.11**). Contudo, quando se expressaram os valores de ácido cítrico em mg de ácido cítrico por volume de sumo do fruto verificou-se que as árvores tratadas com sulfato de ferro produziram frutos com uma média de ácido cítrico inferior à dos frutos dos tratados com ferro mais ácido cítrico.

Em relação aos restantes parâmetros analisados, o volume de sumo (ml) dos frutos foi superior para os dois tratamentos com ácido cítrico mas em termos de percentagem de sumo (relativamente ao peso fresco de cada fruto) os valores dos frutos das árvores tratadas só com ácido cítrico decresceram e passaram a ser semelhantes aos da testemunha. O total de sólidos solúveis existente no sumo e o índice de maturação foram independentes dos tratamentos aplicados. Contudo, as árvores não tratadas apresentaram índices de maturação inferiores aos das árvores tratadas. No final do ensaio, não se observaram necroses foliares nem manchas nos frutos motivadas pelos tratamentos testados.

Tabela 4.11 – Efeito das pulverizações foliares no tamanho e na qualidade dos frutos de ‘Valencia late’ colhidos no final do ensaio (23 de Março de 1999).

Tratamentos	PFF (g)	C (mm)	VS (ml)	VS (% PFF)	TSS (° Brix)	AC (% m/v)	ACF (mg/VS)	IM	AA (% m/m)
Testemunha	121 b	62 b	59 c	49 c	10,8 a	1,8 a	1,0 c	6,2 b	0,037 a
Ácido cítrico	162 a	68 a	83 ab	50 c	10,7 a	1,5 b	1,2 ab	7,2 a	0,041 a
Sulfato de ferro	157 a	68 a	80 b	52 ab	10,8 a	1,5 b	1,1 bc	7,6 a	0,040 a
Sulfato de ferro + Ácido cítrico	169 a	69 a	89 a	53 a	10,4 a	1,5 b	1,3 a	7,0 a	0,039 a
Sulfato de ferro + Ácido sulfúrico	159 a	68 a	79 b	51 bc	10,9 a	1,6 b	1,2 ab	7,1 a	0,033 a

PFF – peso fresco do fruto; C – calibre; VS – volume de sumo; TSS – total de sólidos solúveis; AC – ácido cítrico; ACF – ácido cítrico por fruto; IM – índice de maturação; AA – ácido ascórbico. Na coluna, médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes a 95% (teste de Duncan).

Os valores de ácido ascórbico (Vitamina C) existentes no sumo de laranja, no final do ensaio variaram entre 0,033 % para os frutos das árvores tratadas com sulfato de ferro mais ácido sulfúrico e 0,041 % para os frutos das árvores pulverizadas com ácido cítrico, apesar de não serem significativamente diferentes.

As cotações médias por calibre das laranjas ‘Valencia late’ praticadas durante a campanha de 1999, na região do Algarve estão apresentadas na **Tabela 4.12**. Oscilaram entre os 0,333 Euros para os calibres mais elevados (I a III) e os 0,149 Euros para os calibres inferiores, apenas utilizados para indústria.

Tabela 4.12 – Preços médios por calibre comercial da ‘Valencia late’ relativos à campanha de 1999, praticados na região do Algarve.

Calibre	Tamanho (mm)	Preço (Euros por Kg)
I-III	(≥82)	0,333
V	(76-81)	0,386
VI	(73-75)	0,356
VII	(63-72)	0,304
VIII-XIII	(≤62)	0,149

Os frutos das árvores tratadas, independentemente do tratamento, incluem-se no calibre VII e os frutos da testemunha na classe de calibre inferior (VIII). A diferença de preço entre estes dois calibres corresponde a uma duplicação do preço pago ao citricultor e portanto a um acréscimo muito significativo do rendimento bruto.

4.3.4. Comparação entre os ensaios realizados

Na **Figura 4.9** está apresentada a percentagem de variação da clorofila total, obtida entre o início e o final do ensaio, para cada um dos tratamentos testados no **ensaio 1** (tangerineira) e no **ensaio 2** (laranjeira), com o objectivo de comparar o efeito dos mesmos tratamentos em duas espécies de citrinos diferentes.

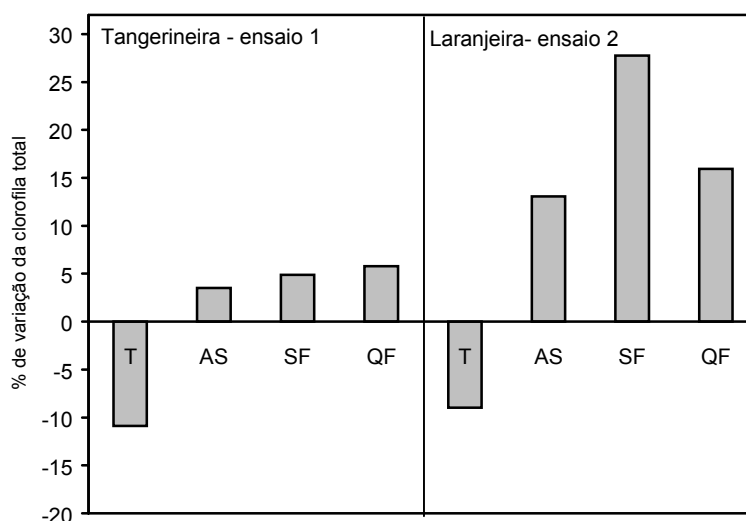


Figura 4.9 – Percentagem (%) de variação da clorofila total registada nos ensaios 1 (tangerineira) e 2 (laranjeira). Os tratamentos aplicados foram: Testemunha (T), Ácido sulfúrico (AS), Sulfato de ferro (SF) e Quelato de ferro (QF).

Verificou-se que as árvores da testemunha apresentaram um decréscimo de cerca de 10% para ambas as variedades. Independentemente do tratamento aplicado, as laranjeiras tiveram acréscimos de clorofila total superiores aos registados nas tangerineiras. A pulverização com quelato fêrrico foi o tratamento que motivou uma variação da concentração de clorofila total

superior ($\approx 6\%$) nas folhas de tangerineira, enquanto que para nas de laranjeira os melhores resultados foram obtidos com a aplicação de sulfato ferroso ($\approx 28\%$).

A comparação entre o efeito de diferentes pulverizações foliares aplicadas na mesma espécie (laranjeira), em anos consecutivos 1998 (**ensaio 2**) e 1999 (**ensaio 3**) baseou-se na percentagem de variação da clorofila total e está apresentada na **Figura 4.10**.

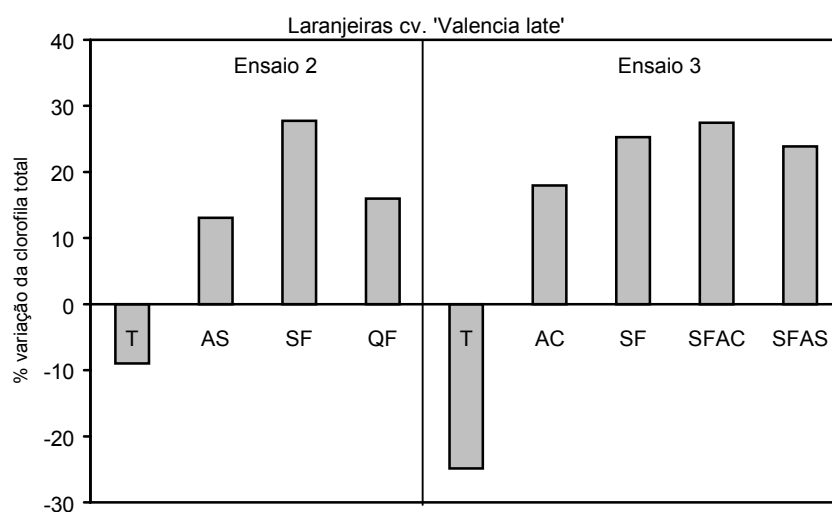


Figura 4.10 – Percentagem de variação da clorofila total registada nos ensaios 2 e 3 em folhas de laranjeira. Os tratamentos aplicados foram: testemunha (T), Ácido sulfúrico (AS), Ácido cítrico (AC), Quelato de ferro (QF), Sulfato de ferro (SF), Sulfato de ferro mais ácido sulfúrico (SFAS), Sulfato de ferro mais ácido cítrico (SFAC).

As árvores não tratadas do **ensaio 2** tiveram um decréscimo inferior (9%) relativamente ao verificado nas árvores não tratadas do **ensaio 3** (25%). Os tratamentos com soluções ácidas (ácido sulfúrico ou cítrico) ou com quelato de ferro originaram uma variação da clorofila total menor à registada nas árvores tratadas com sulfato de ferro, que apresentaram os valores mais altos (25 e 28%). Por sua vez, as árvores tratadas com sulfato de ferro mais ácidos, tiveram acréscimos de clorofila muito semelhantes aos do sulfato de ferro.

4.3.5. Estimativas do peso fresco do fruto

Na **Tabela 4.13** estão apresentadas as equações lineares estabelecidas entre o peso fresco do fruto (g) e o calibre (mm) obtidas para cada uma das espécies estudadas, no final de cada um dos ensaios. O calibre relacionou-se sempre positivamente com o peso fresco dos frutos. No entanto, enquanto que nos frutos de tangerineira (Encore) o declive da recta obtida é de 3,7 nos frutos de laranjeira (cv. ‘Valencia late’) o declive é superior, aproximadamente 6.

Tabela 4.13 –Equações de regressões lineares que permitem estimar o peso fresco do fruto (g) a partir do calibre (mm) para cada um dos ensaios, considerando todos os tratamentos testados.

	Ano	Equação	R ²	p	n
Encore					
Ensaio 1	1997	$PF\!F = 3,7 * C - 134$	0,97	0,0001	290
‘Valencia late’					
Ensaio 2	1998	$PF\!F = 6,4 * C - 276$	0,85	0,0001	118
	1999	$PF\!F = 6,4 * C - 271$	0,88	0,0001	120
Ensaio 3	1999	$PF\!F = 6,0 * C - 248$	0,92	0,0001	145
Ensaio 2 e 3		$PF\!F = 6,2 * C - 261$	0,90	0,0001	383

PF_F - peso fresco do fruto; C - calibre; R² - coeficiente de determinação; p - probabilidade; n - número de observações.

Em qualquer um dos ensaios com laranjeiras verificou-se que o declive e o valor da ordenada na origem das equações lineares obtidas entre o peso fresco e o calibre foram idênticos entre si. Com base neste facto determinou-se o modelo conjunto (**ensaios 2 e 3**) com os resultados obtidos nos três anos de ensaio, de forma a incluir um maior número de repetições e aumentar a representatividade do modelo proposto.

4.4. DISCUSSÃO

4.4.1. Recuperação da clorose férrica

Os tratamentos foliares com soluções ácidas (ácido sulfúrico ou ácido cítrico) aplicados quer em tangerineiras quer em laranjeiras, instaladas em solos calcários, foram efectivos no reverdecimento das folhas cloróticas. Este acréscimo do teor clorofilino terá resultado da maior actividade metabólica do ferro, originada pela diminuição do pH apoplástico (Mengel e Geurtzen, 1988; Tagliavini *et al.*, 1993; Mengel, 1995). As pulverizações com ácido cítrico poderão ter também aumentado a mobilidade do ferro no interior da planta, na forma de citrato de Fe(III) tal como sugerido por Brown (1961). Adicionalmente, o citrato de ferro é o substracto com maior afinidade para a quelato Fe(III)-redutase localizada nas folhas, enzima responsável pela redução e entrada do ferro nas células (Rombolà *et al.*, 1999). Por outro lado, o enxofre proveniente do ácido sulfúrico favorece a biossíntese da clorofila (Graziano, 1995; Imsande, 1998). Diversos autores obtiveram resultados idênticos em ervilheira (Sahu *et al.*, 1987), kiwi (Tagliavini *et al.*, 1995c) e pimenteiro (Varenes *et al.*, 1997).

Em ambas as espécies, a recuperação eficaz dos sintomas de clorose férrica pela aplicação foliar de ferro, na forma de sulfato de Fe(II) ou de quelato de Fe(III), parece ter sido devida ao aumento das reservas de Fe nas folhas. A eficácia das pulverizações foliares com ferro depende, entre outros, dos factores que condicionam a entrada, a mobilidade e a metabolização deste elemento na planta (Rombolà *et al.*, 2000). O acréscimo de clorofila total ocorreu em todos os tratamentos em que se aplicou ferro sugerindo que os citrinos em condições de campo, apresentam capacidade de reduzir o Fe(III) presente no quelato usado, processo necessário à entrada do ferro nas células do mesófilo. A adição de ácidos, minerais ou orgânicos, aos tratamentos com sulfato de ferro para efeitos de correcção da clorose férrica originou valores de clorofila total mais elevados devido aos efeitos conjuntos de fornecimento de ferro e de poder acidificante superior, tal como citado por Toselli *et al.* (1995) em pessegueiros.

4.4.2. Eficiência fotoquímica

Em campo, a eficiência fotoquímica das laranjeiras não tratadas (testemunha) foi significativamente afectada pela clorose férrica. As árvores não tratadas apresentaram,

conjuntamente com sintomas de clorose fêrrica, os valores mais baixos de fluorescência basal (F_o) e de fluorescência máxima (F_m), independentemente do tratamento aplicado. As variações da F_o estão associadas com os centros de reacção do fotossistema II (PSII). Contudo a diminuição do rendimento quântico do PSII poderá ser apenas atribuído a alterações ao nível da cadeia de transporte de electrões uma vez que apenas se correlacionou com a F_m (Ouzounidou *et al.*, 1998). Apesar das diferenças obtidas não se considerarem fisiologicamente significativas (Belkhodja *et al.*, 1998a), apenas nas árvores tratadas com sulfato de ferro é que não foi possível recuperar os valores de fluorescência atingidos nos restantes tratamentos.

4.4.3. Composição mineral

A resposta das laranjeiras à adição de ferro (sobretudo na forma de sulfato de ferro) foi mais efectiva do que a resultante da pulverização com soluções ácidas, que originaram frequentemente menores teores foliares e florais de ferro. No início dos três ensaios, as árvores apresentavam provavelmente uma deficiência absoluta deste elemento já que a pulverização foliar com ácidos permitiu aumentar a mobilidade do ferro na planta, mas não colmatou as deficiências neste elemento; por outro lado, o aumento da mobilidade do ferro na planta pode estar associada apenas a curtas distâncias não afectando muito a distribuição deste elemento na árvore. Comparando os efeitos das duas formas de ferro aplicado, os melhores resultados foram obtidos com a aplicação de sulfato de Fe (II), que pode não só mobilizar o Fe e o Zn das reservas existentes nas folhas, devido ao seu efeito acidificante, como também pode actuar como uma fonte de ferro. Estes efeitos simultâneos do sulfato de ferro podem explicar o reverdecimento das folhas tratadas e os aumentos de Fe e de Zn, quer nas folhas quer nas flores (**ensaio 2**) tal como observado por Belkhodja *et al.* (1998b) em pessegueiros.

Quando se compara o efeito dos tratamentos em diferente material vegetal, folhas velhas e folhas novas (**ensaio 3**), constata-se que as folhas novas são as mais afectadas provavelmente porque no momento da colheita estão a actuar como “sink” mais forte do que as folhas velhas que actuam essencialmente como “source” (Goldschmidt e Koch, 1996). A menor concentração de ferro existente nas folhas mais velhas das árvores tratadas poderá estar associada a uma pequena mobilização deste elemento para as folhas novas e flores uma vez que simultaneamente a concentração de ferro nestes órgãos aumentou. Convém salientar a menor suberificação das folhas novas e portanto a maior capacidade de absorção do ferro relativamente às folhas velhas, bem

como o facto do transporte do ferro a longa distância se encontrar limitado pelas condições edáficas. Por outro lado, a absorção de ferro ocorre preferencialmente na época em que há maiores crescimentos vegetativos e tenderá a direccionar-se para os órgãos em crescimento (Drossopoulos *et al.*, 1994).

4.4.4. Parâmetros de qualidade da produção

O aumento do tamanho dos frutos e a melhoria dos parâmetros de qualidade resultante da aplicação foliar de ácido sulfúrico apenas se verificou nas tangerineiras provavelmente devido ao efeito das fertilizações de cobertura realizadas em Novembro de 1997 e em Janeiro e Agosto de 1998, enquanto que nas laranjeiras estas fertilizações apenas evitaram o habitual agravamento dos sintomas da clorose férrica das árvores não tratadas. Deste modo, as características dos frutos provenientes das laranjeiras testemunha foram semelhantes às dos frutos das árvores tratadas com ácido sulfúrico. Estes resultados parecem dever-se ao efeito acidificante do amónio (Hoffmann *et al.*, 1992; Tagliavini *et al.*, 1995a) existente nos fertilizantes aplicados que terão mascarado qualquer acção benéfica do tratamento com ácido.

Contrariamente ao referido por Varennes *et al.* (1997) em pimenteiros e por Tagliavini *et al.* (1996) em kiwi, não se registaram sintomas de fitotoxicidade nem necroses nos tecidos foliares ou nos frutos, em qualquer dos tratamentos testados. Estas diferenças podem dever-se à utilização de soluções com concentrações de um modo geral mais baixas, repartidas por um maior número de aplicações, ou devido ao tipo de folhas das espécies envolvidas.

A clorose férrica induzida em solos calcários está directa ou indirectamente associada à deficiência de outros nutrientes, nomeadamente de P, Mg, K e Zn, os quais em conjunto afectam as características da produção. Em mangueira, a correcção da deficiência de Zn originou um aumento no total de sólidos solúveis (Bahadur *et al.*, 1998). Tal como foi reportado por El-Kassa (1984) para limeiras, verificou-se o aumento do total de sólidos solúveis e o decréscimo do ácido cítrico em todos os frutos de tangerineira tratados, por outro lado, nos frutos de laranjeira apenas foi afectada a percentagem de ácido cítrico. O índice de maturação aumentou nos tratamentos com ferro em ambas as espécies, o que indica que, em citrinos, a clorose férrica origina um atraso na maturação dos frutos e portanto na colheita, tal como foi observado por Sanz *et al.* (1997) em pessegueiros.

A clorose férrica não afectou o teor em Vitamina C (ácido ascórbico) uma vez que o sumo das laranjas colhidas de árvores cloróticas apresentou valores inferiores, mas não significativamente diferentes, dos observados no sumo dos frutos provenientes de árvores tratadas. Ojo e Oputa (1999) obtiveram decréscimos nos teores de ácido ascórbico em folhas cloróticas de *Celosia* sp. devido ao papel do ferro na síntese deste ácido orgânico.

Os tratamentos testados, ao afectarem o equilíbrio nutritivo das laranjeiras, alteraram as características da produção desse ano, assim como as do ano seguinte, o que também foi observado noutras fruteiras por Tagliavini *et al.* (2000). As diferenças obtidas entre o primeiro e o segundo ano de ensaio deveram-se essencialmente ao agravamento de sintomas de clorose férrica das árvores não tratadas, com o conseqüente decréscimo da qualidade da produção. Deste modo, nos citrinos e noutras árvores de fruto a clorose férrica afecta, não só os parâmetros de qualidade da produção anual de fruto, como também os novos crescimentos vegetativos e florais que surgem durante a Primavera, os quais estão dependentes das reservas de ferro conseguidas no ano anterior (Tagliavini *et al.*, 1993; Mengel, 1995; Rombolà *et al.*, 2000). Os resultados obtidos permitem concluir que as pulverizações efectuadas durante 1997-98 tiveram efeito na produção obtida um ano depois (Março 1999).

Nas duas espécies estudadas, o calibre apresentou uma relação muito forte com o peso fresco do fruto e pode vir a ser utilizado como um método não destrutivo de estimar o desenvolvimento do fruto na árvore.

4.4.5. Comparação entre as duas espécies

Quando comparamos a respostas das duas espécies citrícolas estudadas, verificamos que a forma de ferro adicionado, sulfato ou quelato, condicionou os resultados obtidos. Enquanto que nas laranjeiras se obtiveram melhores resultados de produção com as aplicações foliares de sulfato de Fe (II), nas tangerineiras estes foram obtidos com o quelato de Fe(III), embora sem diferenças significativas em relação ao tratamento com sulfato de ferro. Como as aplicações foliares foram efectuadas durante o período de desenvolvimento dos frutos, é possível que também tenha ocorrido absorção de ferro pelo pericarpo dos frutos. Assim, as diferenças obtidas podem dever-se às diferentes fases do ciclo produtivo em que se encontravam estas duas espécies citrícolas e/ou à diferente capacidade de difusão do sulfato de Fe(II) ao nível da cutícula dos dois tipos de frutos (Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996). Por fim, e relativamente à tangerineira (**ensaio 1**), a maior

estabilidade do quelato de ferro relativamente à forma iónica pode ter-se reflectido na translocação do ferro, ou dos hidratos de carbono, das folhas para os frutos. Os decréscimos na concentração de clorofila total registados nas laranjeiras no final dos ensaios (**ensaio 2 e 3**) devem-se, possivelmente, ao efeito de diluição provocado pelo reiniciar do crescimento vegetativo que se observou em Março. Este efeito não foi observado nas tangerineiras uma vez que o ciclo vegetativo desta espécie é diferente (Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996).

Comparativamente com os outros tratamentos, o sulfato de ferro mais ácido cítrico originou valores de alguns parâmetros de qualidade de produção mais elevados, possivelmente devido ao papel deste ácido orgânico no transporte do ferro dentro da planta.

4.4.6. Análise económica

A instalação de espécies susceptíveis à clorose férrica em solos calcários sem a utilização de medidas preventivas eficazes para o controlo deste problema nutritivo, pode ter um impacto económico negativo para os produtores (Tagliavini *et al.*, 2000). Os resultados obtidos sugerem que as aplicações foliares com ferro podem evitar as perdas de produção e de qualidade provocadas pela clorose férrica nos pomares citrícolas. Além do mais, estes tratamentos podem ser efectuados com produtos economicamente mais viáveis como sejam as soluções com sulfato de Fe(II). A aplicação de quelatos de ferro ao solo é a forma mais frequentemente utilizada para corrigir a clorose férrica em solos calcários, no entanto também é a mais dispendiosa. Na região do Algarve, o preço médio do quelato comercial (Fe-EDDHA, 6% de Fe) é de aproximadamente 31 Euros por kg de adubo, e em contrapartida, o sulfato de ferro comercial custa 14 Euros por 50 kg de adubo e contém 12 % de Fe solúvel em água. Convertendo os preços por unidade de fertilizante adicionado, verifica-se que 1kg de Fe proveniente do quelato custa 570 Euros enquanto que 1kg de Fe obtido a partir do sulfato apenas custa 3 Euros. Por outro lado, e devido ao preço elevado do quelato, este produto é geralmente aplicado de uma forma localizada, ao redor de cada árvore, encarecendo ainda mais a sua aplicação. Os produtos testados nestes ensaios com citrinos podem ser adicionados através de pulverizadores comerciais e portanto com menor tempo e custo de aplicação, embora estes custos não tenham sido calculados e dependam do número de aplicações realizadas.

4.4.7. Perspectivas futuras

Futuramente, a forma mais eficaz de resolver o problema da clorose férrica em fruteiras passa pela selecção de porta-enxertos tolerantes (Socias i Company *et al.*, 1995). Actualmente, a utilização de porta-enxertos de citrinos tolerantes à clorose férrica só pode ser adoptado em algumas circunstâncias, porque na maioria dos casos estes porta-enxertos não apresentam simultaneamente características agronómicas favoráveis. Mundialmente, existem diversos programas de melhoramento que contemplam a selecção de porta-enxertos tolerantes através do estudo da variabilidade genética entre espécies (Wallace, 1990). De qualquer forma até as investigações ao nível do melhoramento serem bem sucedidas é necessário otimizar o processo de prevenção e correcção da clorose férrica para benefício dos produtores.

Conforme anteriormente referido, o impacto ambiental das aplicações de quelato de ferro ao solo não estão suficientemente estudadas e as práticas alternativas discutidas neste capítulo são de extrema importância para os pomares que seguem as normas inerentes à produção integrada.

4.5. CONCLUSÕES

Os resultados indicam que pulverizações foliares frequentes com soluções com ferro podem atenuar os problemas inerentes à clorose férrica em pomares de citrinos, melhorando significativamente a qualidade das produções obtidas. Nestes ensaios os tratamentos foram aplicados durante o crescimento e maturação dos frutos. Futuros trabalhos de investigação deverão avaliar o impacto do controlo da clorose férrica antes da formação do fruto, na produção e na qualidade dos frutos.

De qualquer modo, é necessário realizar estudos de demonstração a larga escala e a longo prazo em pomares citrícolas, com pulverizadores comerciais de forma a estabelecer as taxas de aplicação por unidade de área, o número mínimo de aplicações por ano e a melhor época de aplicação. A aplicação de pequenas quantidades de ferro, em diferentes formas no sistema de rega, bem como a reutilização de resíduos/desperdícios provenientes de actividades industriais que possuam ferro e agentes naturais que complexem o ferro deve também ser contemplada.

4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadía, J.**; Nishio, J.; Monge, N.E.; Montañés, L.; Heras, L. 1985. Mineral composition of peach affected by iron chlorosis. *Journal of Plant Nutrition*, 8(8):697-707.
- Abadía, A.**; Poc, A.; Abadía, J. 1991. Could iron nutrition status be evaluated through photosynthetic pigment changes. *Journal of Plant Nutrition*, 14(9):987-999.
- Abadía, J.** e **Abadía, A.** 1993. Iron and plant pigments, pp. 327-344, In: L.L. Barton e B. Hemming (eds.), Iron chelation in plants and soil microorganisms. Academic Press, San Diego, EUA.
- Alva, A.K.** e **Obreza, T.A.** 1998. By-product iron humate increases tree growth and fruit production of orange and grapefruit. *HortScience*, 33(1):71-74.
- A.O.A.C.** 1990. Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis. 12ª ed., Washington, EUA.
- Bahadur, L.**; Malhi, C.S.; Singh, Z. 1998. Effects of foliar and soil applications of zinc sulphate on zinc uptake, tree size, yield and fruit quality of mango. *Journal of Plant Nutrition*, 21(3):589-600.
- Belkhodja, R.**; Morales, F.; Quílez, R.; López-Millán, A.F.; Abadía, A.; Abadía, J. 1998a. Iron deficiency causes changes in chlorophyll fluorescence due to the reduction in the dark of the photosystem II acceptor side. *Photosynthesis Research*, 56:265-276.
- Belkhodja, R.**; Morales, F.; Sanz, M.; Abadía, A.; Abadía, J. 1998b. Iron deficiency in peach trees: effects on leaf chlorophyll and nutrient concentrations in flowers and leaves. *Plant and Soil*, 203:257-268.
- Björkman, O.** e **Demmig, B.** 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170:489-504.
- Brown, J.C.** 1961. Iron chlorosis in plants. *Advances in Agronomy*, 13:329-369.
- Costa, J.B.** 1995. Caracterização e constituição do solo. 5ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 527p.
- Drossopoulos, J.B.**; Bouranis, D.L.; Bairaktari, B.D. 1994. A pattern of mineral nutrient fluctuations in soybean leaves in relation to their position. *Journal of Plant Nutrition*, 17(6):1017-1035.
- El-Kassa, S.E.** 1984. Effect of iron nutrition on the growth, yield, fruit quality, and leaf composition of balady lime trees grown on sandy calcareous soils. *Journal of Plant Nutrition*, 7(1-5):301-311.
- FAO-Unesco** 1985. Soil map of the world. Vol. 5 - Europe. Roma, Itália, 199p.
- Goldschmidt, E.E.** e **Koch, K.E.** 1996. Citrus, pp. 797-824, In: E. Zamski e A.A. Schaffer (eds.), Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-Sink relationships. Marcel Dekker Inc., New York, EUA.
- Graziano, P.L.** 1995. Preventing iron chlorosis in fruit trees using elemental sulphur. *Sulphur in Agriculture*, 19:63-69.
- Hoffmann, B.**; Planker, R.; Mengel, K. 1992. Measurements of pH in the apoplast of sunflower leaves by means of fluorescence. *Physiology Plantarum*, 84:146-153.
- Imssande, J.** 1998. Iron, sulfur, and chlorophyll deficiencies: A need for an integrative approach in plant physiology. *Physiology Plantarum*, 103:139-144.
- Kopp, E.**; Sobral, M.; Soares, T.; Woerner, M. 1989. Os solos do Algarve e suas características. Vista geral. MAPA-GDHA-DRAAG-GTZ. Faro. 180p.
- Legaz, F.**; Serna, M.D.; Primo-Millo, E.; Martin, B. 1992. Leaf spray and soil application of Fe-chelate to Navelina orange trees. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 2:613-617.
- Lichtenthaler H.K.** 1987. Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148:350-382.
- Lichtenthaler, H.K.** e **Rinderle, U.** 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 19:529-585.
- Mengel, K.** e **Geurtzen, G.** 1988. Relationship between iron chlorosis in alkalinity in *Zea mays*. *Physiology Plantarum*, 72:460-465.
- Mengel, K.** 1995. Iron availability in plant tissues - iron chlorosis on soil calcareous, pp. 389-397, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Miller, J.E.**; Swanepoel, J.; Miller, D.; Plessis, S.F. 1994. Correction of lime-induced chlorosis of citrus in the Sundays river valley. *Subtropica*, 15(8):18-20.

- Norvell**, W.A. 1991. Reactions of metal chelates in soil and nutrients solutions, pp. 187-227, In: J.J. Mortvedt, P.M. Giodano, W.L. Lindsay (eds.), Micronutrients in agriculture. 2^a ed, Soil Science Society in Agriculture Inc., Madison, EUA.
- Obreza**, T.A.; Alva, A.K.; Calvert, D.V. 1993. Citrus fertilizer management on calcareous soils. Circular of Florida Cooperative Extension Service, 1127-1136.
- Ojo**, D.O. e Oputa, O.C. 1999. Influence of sulphur on growth, yield and quality of Celosia. Journal of Plant Nutrition, 22(9):1379-1388.
- Ouzounidou**, G.; Ilias, I.; Traopoulou, H.; Karataglis, S. 1998. Amelioration of copper toxicity by iron on spinach physiology. Journal of Plant Nutrition, 21(10):2089-2101.
- Papastylianou**, I. 1990. Effectiveness of iron and FeSO₄ for correcting iron chlorosis of peanut on calcareous soils. Journal of Plant Nutrition, 13(5):555-566.
- Rocha Faria**, J.M.; Godinho, S.; Almeida, M.J.R.; Machado, M.S. 1981. O clima de Portugal. Vol. XXVII, INMG, Lisboa, 155p.
- Rombolà**, A.D.; Quartieri, M.; Marangoni, B.; Tagliavini, M.; Scudellari, D.; Abadía, J. 1999. Strategie di cura della clorosi ferrica nella frutticoltura integrata. Frutticoltura, 5:59-64.
- Rombolà**, A.D.; Brüggemann, W.; Tagliavini, M.; Marangoni, B.; Mogg, P.R. 2000. Iron sources affects Fe reduction and re-greening of kiwifruit (*Actinidea deliciosa*) leaves. Journal of Plant Nutrition, 23(11): in press.
- Sahu**, M.P.; Sharma, D.D.; Jain, G.L.; Singh, H.G. 1987. Effects of growth substances, sequestrene 138-Fe and sulfuric acid on iron chlorosis of garden peas (*Pisum sativum L.*). Journal of Horticultural Science, 62:391-394.
- Sanz**, M.; Carrera, M.; Montañés, L. 1993. El estado nutricional del peral. Possibilidad del diagnóstico floral. Hortofruticultura, 10:60-62.
- Sanz**, M.; Montañés, L.; Carrera, M. 1994. The possibility of using analysis to diagnose the nutritional status of pear trees. Acta Horticulturae, 367:290-295.
- Sanz**, M. e Montañés, L. 1995. Floral analysis: A novel approach for the prognosis of iron deficiency in pear (*Pyrus communis L.*) and peach (*Prunus persica L. Batsch*), pp. 371-374, In: J. Abadía (eds.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Sanz**, M.; Pascual, J.; Machín, J. 1997. Prognosis and correction of iron chlorosis in peach trees: Influence on fruit quality. Journal of Plant Nutrition, 20(11):1567-1572.
- SAS Institute**. 1989. SAS/STAT User's Guide. 6^a Versão, Vol. 1 e 2, SAS Institute Inc., Cary, EUA.
- Schreiber**, U. e Bilger, W. 1985. Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements, pp. 22-53, In: D.L. Lange (ed.), Plant response to stress. Verlag, Berlin, Alemanha.
- Socias i Company**, R.; Aparisi, G.; Felipe, A.J. 1995. A genetical approach to iron chlorosis in deciduous fruit trees, pp. 167-174, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Spiegel-Roy**, P. e Goldschmidt, E.E. 1996. Biology of Citrus. Cambridge University Press. New York, EUA.
- Tagliavini**, M.; Bassi, D.; Marangoni, B. 1993. Growth and mineral nutrition of pear rootstocks in lime soils. Scientia Horticulturae, 54:13-22.
- Tagliavini**, M.; Masia, A.; Quartieri, M. 1995a. Bulk soil and pH rhizosphere of peach trees in calcareous and alkaline soils as affected by the form of nitrogen fertilizers. Plant and Soil, 176:263-271.
- Tagliavini**, M.; Rombolà, D.; Marangoni, B. 1995b. Response to iron-deficiency stress of pear and quince genotypes. Journal of Plant Nutrition, 18(11):2465-2482.
- Tagliavini**, M.; Scudellari, D.; Marangoni, B.; Toselli, M. 1995c. Acid-spray regreening of kiwifruit leaves affected by lime-induced iron chlorosis, pp. 191-196, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Tagliavini**, M.; Scudellari, D.; Marangoni, B.; Pelliconi, F.; Valli, S. 1996. Valutazione di method alternativi ai chelati per superare la clorosi ferrica dell'actinidea. Actas do Convegno Nazionale SOI "La coltura dell'actinidea", pp. 197-202.

- Tagliavini**, M.; Abadía, J.; Rombolà, D.; Abadía, A.; Tsipouridis, C.; Marangoni, B. 2000. Agronomic means for the control of iron chlorosis in deciduous fruit plants. *Journal of Plant Nutrition*, 23(11): in press.
- Toselli**, M.; Tagliavini, M.; Marangoni, B. 1995. La clorosi ferrica el pesco: conoscenza, prevenzione e terapia. *Actas do XXII Convegno Peschicollo*, pp. 108-113.
- Varenes**, A. de; Vicente, M.F.; Faria, E.A. 1997. Tratamento da clorose férrica em pimenteiro. *Revista das Ciências Agrárias*, 20(3):49-55.
- Walker**, D. 1990. The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. 2ª ed., Hansatech Instruments Limited, Kyngs Lynn, Reino Unido, 196 p.
- Wallace**, A. 1990. The decade of the 1981s for iron nutrition and interactions in plants. *HortScience*, 25:8.
- Wallace**, A. e Wallace, G.A. 1992. Some of the problems concerning iron nutrition of plants after four decades of synthetic chelating agents. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1487-1508.
- Wallace**, A.; Wallace, G.A.; Cha, J.W. 1992. Some modifications in trace metal toxicities and deficiencies in plants resulting from interactions with other elements and chelating agents - the special case of iron. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1589-1598.

Parte III

Discussão e Conclusões

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES FINAIS

5.1. DISCUSSÃO GERAL

O estudo da clorose férrica em citrinos reveste-se de particular interesse para o Algarve, principal região produtora de citrinos em Portugal. Apesar desta zona dispor de condições climáticas favoráveis à produção de frutos de qualidade diferenciada, a maioria dos pomares encontra-se instalado em solos de origem calcária, favoráveis ao aparecimento desta deficiência nutritiva. A situação agrava-se face à predominância da citranjeira ‘Troyer’ como porta-enxerto mais utilizado no Algarve, que apesar de apresentar uma tolerância mediana à clorose férrica, em situações de baixa disponibilidade de Fe no meio e na presença de carbonato de cálcio desenvolve sintomas de clorose férrica, afectando não só a produção como a qualidade do fruto. Por outro lado, a correcção da clorose férrica faz-se, sobretudo, recorrendo a aplicações massivas ao solo de quelatos férricos sintéticos, técnica que apresenta elevados custos e um impacto ambiental negativo, ainda pouco estudado. Até que as pesquisas científicas ao nível do melhoramento sejam bem sucedidas é necessário otimizar o processo de prevenção e correcção da clorose férrica para benefício dos produtores. Neste contexto, torna-se importante colmatar a insuficiente informação que existe sobre a clorose férrica em citrinos, visando não só a caracterização dos processos fisiológicos inerentes à resposta dos porta-enxertos bem como o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico que permitam uma detecção precoce e uma correcção que não apresentem os impactos ambientais negativos associados às práticas culturais correntes.

A utilização de **tratamentos foliares** com soluções ácidas (ácido sulfúrico ou ácido cítrico) quer em tangerineiras quer em laranjeiras, instaladas em solos calcários, como prática alternativa de correcção da clorose férrica foi possível, uma vez que estas aplicações foram efectivas no reverdecimento das folhas cloróticas. Este acréscimo do teor clorofilino terá resultado da maior actividade metabólica do ferro, originada pela diminuição do pH apoplástico (Kosegarten *et al.*, 1999). As pulverizações com ácido cítrico poderão ter também aumentado a mobilidade do ferro no interior da planta, na forma de citrato de Fe(III) tal como sugerido por Brown (1961). Adicionalmente, o citrato de ferro é o substrato com maior afinidade para a quelato Fe(III)-redutase localizada nas folhas, enzima responsável pela redução e entrada do ferro nas células (Rombolà *et al.*, 1999). Por outro lado, o enxofre proveniente do ácido sulfúrico favorece a biossíntese da clorofila (Imsande, 1998). Em ambas as espécies, a recuperação eficaz dos sintomas de clorose férrica pela aplicação foliar de ferro, na forma de sulfato de Fe(II) ou de quelato de Fe(III), parece ter sido devida ao aumento das reservas de Fe nas folhas. O acréscimo de clorofila total ocorreu em

todos os tratamentos em que se aplicou ferro sugerindo que os citrinos em condições de campo, apresentam capacidade de reduzir o Fe(III) presente no quelato usado, processo necessário à entrada do ferro nas células do mesófilo (Rombolà *et al.*, 2000). A adição de ácidos, minerais ou orgânicos, aos tratamentos com sulfato de ferro para efeitos de correcção da clorose férrica originou valores de clorofila total mais elevados devido aos efeitos conjuntos de fornecimento de ferro e de poder acidificante superior, tal como citado por Toselli *et al.* (1995) em pessegueiros.

Em campo, a eficiência fotoquímica das laranjeiras não tratadas (testemunha) foi significativamente afectada pela clorose férrica. As árvores não tratadas apresentaram, conjuntamente com sintomas de clorose férrica, os valores mais baixos de fluorescência basal (F_0) e de fluorescência máxima (F_m), independentemente do tratamento aplicado. As variações da F_0 estão associadas com os centros de reacção do fotossistema II (PSII). Contudo a diminuição do rendimento quântico do PSII poderá ser apenas atribuído a alterações ao nível da cadeia de transporte de electrões uma vez que apenas se correlacionou com a F_m (Ouzounidou *et al.*, 1998), apesar das diferenças obtidas não se considerarem fisiologicamente significativas (Belkhodja *et al.*, 1998a).

A resposta das laranjeiras à adição de ferro (sobretudo na forma de sulfato ferroso) foi mais efectiva do que a resultante da pulverização com soluções ácidas pois permitiu aumentar a mobilidade do ferro e simultaneamente colmatar a deficiência efectiva neste elemento. Comparando os efeitos das duas formas de ferro aplicado, os melhores resultados foram obtidos com a aplicação de sulfato de Fe (II), que pode não só mobilizar o Fe e o Zn das reservas existentes nas folhas, devido ao seu efeito acidificante, como também pode actuar como uma fonte de ferro. Estes efeitos simultâneos do sulfato de ferro podem explicar o reverdecimento das folhas tratadas e os aumentos de Fe e de Zn, quer nas folhas quer nas flores tal como observado por Belkhodja *et al.* (1998b) em pessegueiros. Quando se comparou o efeito dos tratamentos em diferente material vegetal, folhas velhas e folhas novas, constatou-se que as folhas novas são as mais afectadas, provavelmente porque no momento da colheita estão a actuar como “sink” mais forte do que as folhas velhas que actuam essencialmente como “source” (Goldschmidt e Koch, 1996). A menor concentração de ferro existente nas folhas mais velhas das árvores tratadas poderá estar associada a uma pequena mobilização deste elemento para as folhas novas e flores uma vez que, simultaneamente, a concentração de ferro aumentou nestes órgãos.

A clorose férrica induzida em solos calcários está directa ou indirectamente associada à deficiência de outros nutrientes, nomeadamente de P, Mg, K e Zn, os quais em conjunto afectaram as características da produção. O índice de maturação foi maior nos tratamentos com ferro em

ambas as espécies, o que indica que, em citrinos, a clorose férrica origina um atraso na maturação dos frutos e portanto na colheita, tal como foi observado por Sanz *et al.* (1997) em pessegueiros. A clorose férrica não afectou o teor em Vitamina C (ácido ascórbico) uma vez que as laranjas colhidas de árvores cloróticas apresentaram valores inferiores, mas não significativamente diferentes, dos observados nos frutos provenientes de árvores tratadas. Os tratamentos testados, ao afectarem o equilíbrio nutritivo das laranjeiras, alteraram as características da produção do ano, assim como as do ano seguinte, o que também foi observado noutras fruteiras por Tagliavini *et al.* (2000). As diferenças obtidas entre o primeiro e o segundo ano de ensaio deveram-se essencialmente ao agravamento de sintomas de clorose férrica das árvores não tratadas, com o conseqüente decréscimo da qualidade da produção. Deste modo, nos citrinos e noutras árvores de fruto a clorose férrica afecta, não só os parâmetros de qualidade da produção anual de fruto, como também os novos crescimentos vegetativos e florais que surgem durante a Primavera, os quais estão dependentes das reservas de ferro obtidas no ano anterior (Toselli *et al.*, 2000).

A instalação de espécies susceptíveis à clorose férrica em solos calcários sem a utilização de medidas preventivas eficazes para o controlo deste problema nutritivo, pode ter um impacto económico negativo para os produtores (Tagliavini *et al.*, 2000). Os resultados obtidos sugerem que as aplicações foliares com ferro podem evitar as perdas de produção e de qualidade provocadas pela clorose férrica nos pomares citrícolas. Além disso, estes tratamentos podem ser efectuados com produtos economicamente mais viáveis como sejam as soluções com sulfato de Fe (II).

A eficiência de aplicação dos tratamentos foliares também depende da utilização de métodos de diagnóstico precoce que possibilitem a correcção atempada da clorose férrica, antes da produção ter sido afectada. Para que as flores possam ser utilizadas como um método de **diagnóstico** alternativo à análise foliar é necessário identificar e caracterizar o padrão de variação nutricional destes órgãos. Assim, o gradiente nutricional mais consistente encontrado nas flores, nos três anos de ensaio, é o que expressa a variação inversa do N, P e K relativamente ao Ca, Fe e Zn. Sempre que as concentrações nutritivas de N, P e K aumentaram nas flores, as concentrações de Ca, Fe e Zn, decresceram. Estes resultados são parcialmente idênticos aos obtidos por Igartua *et al.* (2000) em flores de pessegueiro onde o Fe, Ca, P e o Zn apresentaram uma variação contrária à de K, Mg e Mn. Por sua vez, o padrão de variação encontrado nas folhas e que contrasta o aumento do N, P e K com o aumento de Fe foi verificado de igual modo nos meses imediatamente anteriores e posteriores à plena floração. Durante a plena floração, são as flores que passam a traduzir esse gradiente nutricional. Além disso, tal como as folhas, as flores também expressam a interacção nutritiva, a concentração de alguns nutrientes na flor depende em alguma extensão do nível de

outros nutrientes. Os resultados obtidos sugerem que as flores, tal como as folhas, podem ser utilizadas como órgãos que expressam o equilíbrio nutritivo de toda a árvore tal como observado em outras fruteiras como pessegueiro (Igartua *et al.*, 2000), macieira (Sanz *et al.*, 1998) e pereira (Sanz e Montañés, 1995). Contudo, para que as flores possam ser utilizadas como método de diagnóstico da clorose férrica é necessário que a composição nutritiva das flores se relacione também com a clorofila total, um dos parâmetros mais utilizados na caracterização e identificação desta deficiência. O gradiente nutricional existente nas flores durante a plena floração condicionou os valores de clorofila observados 90 dias após a plena floração enquanto que, em outras árvores de fruto como, pessegueiro (Toselli *et al.*, 2000), pereira (Sanz *et al.*, 1994) e macieira (Sanz *et al.*, 1998) foi verificado que aquelas relações eram efectivas 120 dias após a plena floração. Assim, a maior competição nutritiva presente nas árvores de laranjeira induz a um aparecimento antecipado dos sintomas. A concentração foliar de Fe não acompanhou o padrão de variação da clorofila total nos meses seguintes à plena floração fenómeno denominado por Römheld (1997) como o paradoxo da clorose férrica. O Fe pode existir nas folhas em elevadas concentrações mas estar metabolicamente inactivo, confinado ao apoplasto foliar devido a valores de pH intracelular limitantes (Kosegarten *et al.*, 1999). A razão nutritiva Mg/Zn nas flores pode ser utilizada para estimar a concentração clorofilina nas folhas 90 dias após a plena floração (Julho). Estes nutrientes estão associados com a clorose férrica (Köseoglu, 1995b), uma vez que o Mg é constituinte da molécula de clorofila e o Zn partilha diversos mecanismos com o Fe, nomeadamente ao nível da absorção e translocação para a parte aérea (Köseoglu, 1995a; Grusak *et al.*, 1999). Se a razão entre o Mg e o Zn for inferior a 100 as folhas de laranjeira apresentam sintomas de clorose férrica 90 dias após a plena produção (clorofila total $< 400 \mu\text{mol m}^{-2}$), valores intermédios poderão estar associados a uma clorose férrica latente, enquanto que para valores acima de 200 as folhas permanecerão verdes (clorofila total $> 500 \mu\text{mol m}^{-2}$).

A importância de determinar um método de diagnóstico para a clorose férrica é acentuada pelo efeito da clorose férrica na produção (Sanz *et al.*, 1997; 1998). Através da composição mineral das flores foi possível estimar alguns dos parâmetros de qualidade da produção obtidos no ano seguinte, nomeadamente o peso fresco do fruto e o índice de maturação, dois parâmetros afectados pela clorose férrica (Sanz *et al.*, 1997). A variação do peso fresco e do calibre dos frutos está associada a um gradiente nutricional que contrasta o aumento de P, N e K com o aumento de Ca, Fe e Zn nas flores. A variação do índice de maturação dependeu do aumento coordenado do Mg, K e N nas flores.

Através da concentração de N, Mg, Ca e de Zn nas flores foi possível estimar o peso fresco dos frutos do ano seguinte. Carranca *et al.* (1993) obtiveram também relações positivas entre o tamanho das laranjas ‘Valencia late’ e a concentração de Mg nas folhas de ramos frutíferos que eventualmente, expressam um comportamento idêntico ao das flores. O facto das concentrações de Mg e de Zn nas flores terem sido incluídas nos modelos com a clorofila e com os parâmetros de produção salienta o efeito cumulativo destes dois elementos em estimar o aparecimento da clorose férrica e em quantificar o decréscimo de qualidade da produção. Sabendo a concentração de N, P, Mg e Fe nas flores é possível prever o estado de maturação das laranjas. O Fe afectou significativamente a percentagem de ácido cítrico existente nas laranjas devido ao seu papel na actividade da enzima aconitase (Sadka *et al.*, 2000). O P nas flores teve um efeito contrário ao dos restantes elementos. Com base nos modelos estabelecidos entre a composição mineral das flores e os parâmetros de qualidade da produção do ano seguinte torna-se possível corrigir o estado nutritivo da árvore antes de a produção ter sido afectada. Estes resultados foram comprovados através da interpolação de valores com base em dados externos, diferentes dos utilizados para estabelecer o modelo. A utilização das flores como método de diagnóstico da clorose férrica, permite antecipar a avaliação nutricional das árvores de Outubro (data de colheita foliar recomendada para citrinos) para Abril.

As respostas obtidas, quer no tratamento quer no diagnóstico da clorose férrica, estiveram associadas ao material vegetal estabelecido nos pomares. Assim, a clorose férrica, induzida pelo ião bicarbonato, afectou diversos parâmetros fisiológicos tanto ao nível da parte aérea como da raiz dos porta-enxertos citrícolas estudados (citranjeira ‘Troyer’, *Citrus taiwanica* e citrumeleiro ‘Swingle’), que estiveram associadas com a **tolerância** daquele material vegetal à clorose férrica. Estes porta-enxertos responderam à clorose férrica induzida através da diminuição da altura e da produção de biomassa total à semelhança do observado para outras espécies (Marschner *et al.*, 1996). As plantas de citranjeira ‘Troyer’ e de *C. taiwanica*, que se desenvolveram sem Fe e na presença de carbonato de cálcio, apresentaram valores da razão entre o peso seco da raiz e o peso seco da parte aérea mais elevados que as plantas verdes, demonstrando o efeito da clorose férrica no aumento da biomassa radicular, preferencialmente à da parte aérea. Este facto pode ser motivado pela activação de mecanismos de resposta, como o aumento do número de raízes secundárias e a diferenciação de células de transferência nos ápices radiculares (Bavaresco *et al.*, 1994), os quais são genotipicamente determinados e estão associados a espécies mais tolerantes à clorose férrica

(Socias i Company *et al.*, 1995). Deste modo, o porta-enxerto ‘Swingle’ não evidenciou este mecanismo de resposta e poderá ser considerado como susceptível à clorose férrica.

O acréscimo de ferro à solução nutritiva, na presença de carbonato de cálcio, permitiu evidenciar a resposta diferenciada dos três porta-enxertos, expressa em clorofila total. Enquanto que as plantas dos porta-enxertos citranjeira ‘Troyer’ e *C. taiwanica* apenas apresentaram sintomas característicos desta deficiência nas concentrações mais baixas (0 e 5 μM de Fe), as plantas de citrumeleiro ‘Swingle’ apresentaram sintomas nas modalidades com 0, 5, 10 e 15 μM de Fe na solução nutritiva.

Nas diferentes abordagens aos mecanismos de susceptibilidade à clorose férrica o aumento ou a redução da biomassa parece estar relacionada com a eficiência de conversão da energia captada pelo aparelho fotossintético (Lichtenthaler e Rinderle, 1988). Os baixos valores da razão F_v/F_m verificados nas plantas cloróticas de ‘Troyer’ e *C. taiwanica*, significam que a eficiência de conversão da energia fotossintética foi significativamente afectada pela clorose férrica (Morales *et al.*, 1998). Na citranjeira ‘Troyer’ esta redução foi devida apenas a alterações ao nível do transporte de electrões, expressa pela diminuição da F_m , enquanto que no *C. taiwanica* se deveu simultaneamente a alterações estruturais ao nível dos pigmentos do PSII, uma vez que também se verificou a variação da F_0 . Os acréscimos verificados na F_0 podem ser originados pela redução da plastoquinona ocorrida no escuro, como verificado por Belkhodja *et al.* (1998a) em beterraba sacarina. Contrariamente aos resultados obtidos com o porta-enxerto ‘Troyer’, os valores de fluorescência das folhas de laranjeira ‘Newhall’ quando enxertada nesse porta-enxerto foram apenas ligeiramente afectados pela clorose férrica e estiveram associados a variações no PSII, tal como referido por Abadía *et al.* (1999) para beterraba sacarina e pereira.

O teor nutritivo, quer da parte aérea quer da raiz, dos três porta-enxertos utilizados foi afectado pela clorose férrica e apresentou tendências crescentes com o aumento de Fe na solução nutritiva. A diminuição de crescimento e da biomassa devida à ausência de Fe, agravada pela presença de carbonato de cálcio, pode justificar os baixos teores nutritivos observados (Abadía *et al.*, 1989). De um modo geral, os teores médios de Fe existentes na parte aérea foram em todos os porta-enxertos inferiores aos obtidos na raiz tal como verificado por Viti e Cinelli (1993). Comparativamente com os outros porta-enxertos, a translocação do Fe no citrumeleiro ‘Swingle’ foi mais afectada pelo ião bicarbonato uma vez que o Fe se acumulou preferencialmente na raiz (razão $F_{\text{epa}}/F_{\text{er}} < 1$), tal como obtido por Cinelli (1995) no porta-enxerto de marmeleiro mais susceptível à clorose férrica. A razão Fe/Mn foi a que apresentou relações mais significativas com a clorofila

total, nos três porta-enxertos indicando ser um parâmetro adequado para avaliar a tolerância à clorose férrica.

A concentração do elemento, por si só, não foi suficiente para explicar a clorose férrica induzida pelo ião bicarbonato (Fernandez-Lopez *et al.*, 1993) e deste modo os resultados obtidos não podem ser explicados apenas pela deficiência de Fe mas sim pela interação nutritiva observada. De um modo geral, a ausência de Fe motivou um decréscimo da concentração de P, K, Ca, Zn e de Mn das folhas cloróticas de laranjeira ‘Newhall’, nutrientes que são referenciados por diversos autores em condições de clorose férrica (Belkhodja *et al.*, 1998b). Na presença de carbonato de cálcio, a razão nutritiva K/Ca diminuiu com a adição de Fe à solução nutritiva do mesmo modo ao verificado por Hamzé *et al.* (1980), que associam este resultado ao equilíbrio existente entre catiões monovalentes e divalentes, característico das espécies calcícolas. A diferença entre a melhor razão identificada para os porta-enxertos e para a laranjeira ‘Newhall’ deve-se provavelmente às características genótípicas e portanto às necessidades nutritivas intrínsecas de cada espécie.

Na presença de carbonato de cálcio e nas concentrações 0 e 5 μM de Fe, o sistema radicular das plantas de laranjeira, ou seja do porta-enxerto ‘Troyer’, apresentou raízes menores e menos ramificadas, que por sua vez apresentavam cerca de 2 a 4 mm de comprimento da zona subapical dilatada. Algumas destas alterações morfológicas foram idênticas às observadas por Bavaresco *et al.* (1991) em raízes de videira e por Landsberg (1995) em beterraba sacarina. O aumento da actividade da quelato de Fe(III)-redutase (cerca de 2,5 vezes) registado nos ápices radiculares das plantas que cresceram com 0 ou 5 μM de Fe, na presença de carbonato de cálcio está de acordo com Manthey *et al.* (1994) que evidenciam que os acréscimos de actividade desta enzima ocorrem entre menos de 1 até 10 vezes. Tem sido assumido que resultam da activação de uma enzima ligada à membrana plasmática, denominada por “turbo-redutase” que ocorre preferencialmente, nas zonas subapicais e mais dilatadas dos ápices radiculares (Schmidt, 1999). O aumento da actividade radicular da quelato de Fe(III)-redutase apenas se verificou na presença de carbonato de cálcio o que indica que a deficiência de Fe por si só não foi suficiente para desencadear este mecanismo de resposta ao nível radicular. Apesar de ter aumentado a redução e presumivelmente, a absorção do Fe para a parte aérea, a activação da quelato de Fe(III)-redutase a nível radicular não foi suficiente para contrariar os efeitos do ião bicarbonato na translocação do Fe (Mengel, 1995), uma vez que as plantas continuam a apresentar sintomas de clorose férrica. É possível concluir que, relativamente aos porta-enxertos estudados, a citranjeira ‘Troyer’ é o mais tolerante, seguido do *Citrus taiwanica* e apresentando-se citrumeleiro ‘Swingle’ como o mais sensível à clorose férrica. Esta classificação

está, de um modo geral, de acordo com a apresentada por diversos autores (Sudahomo *et al.*, 1994), baseada em parâmetros medidos na parte aérea. Segundo estes autores, a citranjeira ‘Troyer’ e o *Citrus taiwanica* situam-se no mesmo grupo, o dos porta-enxertos medianamente tolerantes. Os resultados suplementares obtidos em outros parâmetros, nomeadamente a nível radicular, permitiram distinguir o comportamento dos dois porta-enxertos salientando-se a maior tolerância do ‘Troyer’ relativamente ao *C. taiwanica*.

5.2. CONCLUSÕES FINAIS

Os parâmetros fisiológicos medidos permitiram caracterizar e avaliar a eficiência de utilização do ferro dos porta-enxertos citrícolas estudados (citraneira ‘Troyer’, *Citrus taiwanica* e citrumeleiro ‘Swingle’). É possível concluir que, relativamente aos porta-enxertos estudados, o ‘Troyer’ é o mais tolerante, seguido do *C. taiwanica* e apresentando-se o ‘Swingle’ como o mais sensível à clorose férrica. A susceptibilidade do citrumeleiro ‘Swingle’ está essencialmente associada à maior necessidade de Fe na solução nutritiva de forma a conseguir contrariar os efeitos do ião bicarbonato. A clorose férrica induzida pelo ião bicarbonato está relacionada, não só com a deficiência de ferro como também com as interacções entre diversos nutrientes, quer na parte aérea quer na parte radicular. Apesar da citranjeira ‘Troyer’ ser um dos porta-enxertos mais utilizados na região Sul do país, em situações de baixa disponibilidade de Fe no meio e na presença de carbonato de cálcio, continua a manifestar sintomas de clorose férrica, sendo importante conduzir estudos para a selecção de porta-enxertos de citrinos adaptados a solos calcários. Contudo, a selecção de porta-enxertos tolerantes à clorose férrica não elimina o estudo das combinações entre o porta-enxerto e o garfo.

A análise floral permite avaliar em Abril o estado nutritivo das árvores de laranjeira ‘Valencia late’ em vez de Outubro, data de colheita foliar recomendada para citrinos. A concentração nutritiva das flores durante a plena floração de um determinado ano permite estimar alguns parâmetros de qualidade da produção do ano seguinte, nomeadamente o peso fresco do fruto. Nas condições de ensaio, determinaram-se valores referência, ou níveis adequados, para a concentração de alguns nutrientes nas flores associados com a produção de frutos com um calibre comercialmente favorável

(> 76 mm). O diagnóstico precoce ou prognóstico da clorose férrica possibilita uma correcção atempada, prevenindo o aparecimento dos sintomas na rebentação seguinte (Verão) com a consequente melhoria da qualidade da produção.

A clorose férrica induzida em solos calcários está directa ou indirectamente associada à deficiência de outros nutrientes, nomeadamente de P, Mg, K e Zn, os quais em conjunto afectam as características da produção.

Aplicações foliares com ferro podem evitar as perdas de produção e de qualidade provocadas pela clorose férrica nos pomares citrícolas. Em ambas as espécies, o índice de maturação foi superior nos frutos tratados com ferro o que indica que, em citrinos, a clorose férrica origina um atraso na maturação dos frutos e portanto na colheita. A clorose férrica afectou não só os parâmetros de qualidade da produção anual de fruto, como também os novos crescimentos vegetativos e florais que surgem durante a Primavera, os quais estão dependentes das reservas de ferro conseguidas no ano anterior.

A instalação de espécies susceptíveis à clorose férrica em solos calcários sem a utilização de medidas preventivas eficazes para o controlo deste problema nutritivo, pode ter um impacto económico negativo para os produtores.

5.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadía, A.**; Lemoine, Y.; Trémolières, A.; Ambard-Bretteville, F.; Rémy, R. 1989. Iron deficiency in pea: effects on pigment, lipid and pigment-protein complex composition of thylacoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 27:679-687.
- Abadía, J.**; Morales, F.; Abadía, A. 1999. Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-deficient leaves. *Plant and Soil*, 215:183-192.
- Bavaresco, L.**; Fregoni, M.; Frascini, P. 1991. Investigations on iron uptake and reduction by excised roots of different rootstocks and a *V. vinifera* cultivar, pp. 139-143, In: Y. Chen e Y. Hadar (eds.) Iron nutrition and interactions in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Bavaresco, L.**; Fregoni, M.; Perino, A. 1994. Physiological aspects of lime-induced chlorosis in some *Vitis* species. I. Pot trial on calcareous soil. *Vitis*, 33:123-126.
- Belkhodja, R.**; Morales, F.; Quilez, R.; López-Millán, A.F.; Abadía, A.; Abadía, J. 1998a. Iron deficiency causes changes in chlorophyll fluorescence due to the reduction in the dark of the photosystem II acceptor side. *Photosynthesis Research*, 56:265-276.
- Belkhodja, R.**; Morales, F.; Sanz, M.; Abadía, A.; Abadía, J. 1998b. Iron deficiency in peach trees: effects on leaf chlorophyll and nutrient concentrations in flowers and leaves. *Plant and Soil*, 203:257-268.
- Brown, J.C.** 1961. Iron chlorosis in plants. *Advances in Agronomy*, 13:329-369.
- Carranca, C.F.**; Baeta, J.; Fragoso, M.A.C. 1993. Effect of NK fertilization on leaf nutrient content and fruit quality of 'Valencia late' orange trees, pp. 445-448, In: M.A.C. Fragoso e M.L. van Beusichem (eds.), Optimization of plant nutrition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Cinelli, F.** 1995. Physiological responses of clonal quince rootstocks to iron-deficiency induced by addition of bicarbonate to nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition*, 18(1):77-89.
- Fernandez-Lopez, J.A.**; Lopez-Roca, J.M.; Almela, L. 1993. Mineral composition of iron chlorotic *Citrus lemon* L. leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 16(8):1395-1407.
- Goldschmidt, E.E.** e Koch, K.E. 1996. Citrus, pp. 797-824, In: E. Zamski e A.A. Schaffer (eds.), Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-Sink relationships. Marcel Dekker Inc., New York, EUA.
- Grusak, M.A.**; Pearson, J.N.; Marentes, E. 1999. The physiology of micronutrient homeostasis in field crops. *Field Crops Research*, 60:41-56.
- Hamzé, M.**; Salsac, L.; Wacquant, J.P. 1980. Recherche de tests pour déceler précocement l'aptitude des agrumes résister à la chlorose calcaire: I. Capacité d'échange cationique et degré d'estérification des racines. *Agrochimica*, XXIV:432-442.
- Igartua, E.**; Grasa, R.; Sanz, M.; Abadía, A.; Abadía, J. 2000. Prognosis of iron chlorosis from the mineral composition of flowers in peach. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 75:111-118.
- Imsande, J.** 1998. Iron, sulfur, and chlorophyll deficiencies: A need for an integrative approach in plant physiology. *Physiology Plantarum*, 103:139-144.
- Kosegarten, H.**; Hoffmann, B.; Mengel, K. 1999. Apoplastic pH and Fe³⁺ reduction in intact sunflower leaves. *Plant Physiology*, 121:1069-1079.
- Köseoglu, A.T.** 1995a. Effect of iron chlorosis on mineral composition of peach leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 18(4):765-776.
- Köseoglu, A.T.** 1995b. Investigation of relationships between iron status of peach leaves and soil properties. *Journal of Plant Nutrition*, 18(9):1845-1859.
- Landsberg, E.** 1995. Transfer cell formation in sugar beet roots induced by latent Fe deficiency, pp. 67-75, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Lichtenthaler, H.K.** e Rinderle, U. 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 19:529-585.
- Manthey, J.A.**; McCoy, D.L.; Crowley, D.E. 1994. Stimulation of rhizosphere iron reduction and uptake in response to iron deficiency in citrus rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry*, 32(2):211-215.
- Marschner, H.**; Kirkby, E.A.; Cakmak, I. 1996. Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *Journal of Experimental Botany*, 47: 1255-1265.

- Mengel, K.** 1995. Iron availability in plant tissues - iron chlorosis on soil calcareous, pp. 389-397, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Morales, F.; Abadía, A.; Abadía, J.** 1998. Mecanismos de protección frente al exceso de luz en hojas deficientes en hierro. Actas do VII Simposio Nacional-III Iberico sobre Nutrición Mineral de las Plantas, pp. 101-106.
- Ouzounidou, G.; Ilias, I.; Traopoulou, H.; Karataglis, S.** 1998. Amelioration of copper toxicity by iron on spinach physiology. *Journal of Plant Nutrition*, 21(10):2089-2101.
- Rombolà, A.D.; Quartieri, M.; Marangoni, B.; Tagliavini, M.; Scudellari, D.; Abadía, J.** 1999. Strategie di cura della clorosi ferrica nella frutticoltura integrata. *Frutticoltura*, 5:59-64.
- Rombolà, A.D.; Brüggemann, W.; Tagliavini, M.; Marangoni, B.; Mogg, P.R.** 2000. Iron sources affects Fe reduction and re-greening of kiwifruit (*Actinidea deliciosa*) leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 23(11): in press.
- Römheld, V.** 1997. The chlorosis paradox: Fe inactivation as a secondary event in chlorotic leaves of grapevine. Livro de resumos do 9th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants. Hohenheim, Stuttgart, Alemanha, 10p.
- Sadka, A.; Dahan, E.; Cohen, L.; Marsh, K.B.** 2000. Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit. *Physiologia Plantarum*, 108:255-262.
- Sanz, M.; Montañés, L.; Carrera, M.** 1994. The possibility of using analysis to diagnose the nutritional status of pear trees. *Acta Horticulturae*, 367:290-295.
- Sanz, M. e Montañés, L.** 1995. Floral analysis: A novel approach for the prognosis of iron deficiency in pear (*Pyrus communis* L.) and peach (*Prunus persica* L. Batsch), pp. 371-374, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Sanz, M.; Pascual, J.; Machin, J.** 1997. Prognosis and correction of iron chlorosis in peach trees: Influence on fruit quality. *Journal of Plant Nutrition*, 20(11):1567-1572.
- Sanz, M.; Pérez, J.; Pascual, J.; Machín, J.** 1998. Prognosis of iron chlorosis in apple trees by floral analysis. *Journal of Plant Nutrition*, 21(8):1697-1703.
- Schmidt, W.** 1999. Review. Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist*, 141:1-26.
- Socias i Company, R.; Aparisi, G.; Felipe, A.J.** 1995. A genetical approach to iron chlorosis in deciduous fruit trees, pp. 167-174, In: J. Abadía (ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Sudahomo, M.; Byrne, D.H.; Rouse, R.E.** 1994. Greenhouse screening of citrus rootstocks for tolerance to bicarbonate-induced iron chlorosis. *HortScience*, 29(2):113-116.
- Tagliavini, M.; Abadía, J.; Rombolà, D.; Abadía, A.; Tsipouridis, C.; Marangoni, B.** 2000. Agronomic means for the control of iron chlorosis in deciduous fruit plants. *Journal of Plant Nutrition*, 23(11): in press.
- Toselli, M.; Tagliavini, M.; Marangoni, B.** 1995. La clorosi ferrica el pisco: conoscenza, prevenzione e terapia. Actas do XXII Convegno Peschicollo, 108-113.
- Toselli, M.; Marangoni, B.; Tagliavini, M.** 2000. Iron content in vegetative and reproductive organs of nectarine trees in calcareous soils during the development of chlorosis. *European Journal of Agronomy*, 13(4):279-286.
- Viti, R. e Cinelli, F.** 1993. Lime-induced chlorosis in quince rootstocks: methodological and physiological aspects. *Journal of Plant Nutrition*, 16(4):631-641.

PERSPECTIVAS FUTURAS

PERSPECTIVAS FUTURAS

Futuramente, a forma mais eficaz de resolver o problema da clorose férrica em fruteiras passa pela selecção de porta-enxertos tolerantes. Mundialmente, existem diversos programas de melhoramento que contemplam a selecção de porta-enxertos tolerantes através do estudo da variabilidade genética entre espécies. No entanto, torna-se pertinente a selecção de parâmetros fisiológicos como indicadores da clorose férrica permitindo o estabelecimento de protocolos de selecção menos morosos. Neste âmbito, os resultados obtidos com o aumento da actividade da quelato de Fe(III)-redutase são promissores uma vez que parecem associados à expressão de uma enzima que apenas ocorre nos genótipos mais tolerantes, quando sujeitos às condições indutoras de clorose férrica.

No entanto, até a obtenção de resultados ao nível do melhoramento ser bem sucedida é necessário otimizar, a curto prazo, o processo de diagnóstico e correcção da clorose férrica para benefício dos produtores. Os padrões de variação nutricional identificados nas folhas e nas flores realçam a necessidade de avaliar a contribuição relativa das diferentes fontes de ferro, endógena (reservas do ano anterior) ou exógena (absorção do ano), nos crescimentos vegetativos, na floração e na qualidade da produção obtida. Estes trabalhos de investigação deverão quantificar os fluxos de ferro no sistema solo-planta, quer em condições limitantes quer não-limitantes à absorção do ferro.

O impacto ambiental das aplicações de quelato de ferro ao solo não está suficientemente estudada e apesar de ser necessário realizar estudos de desenvolvimento experimental em pomares citrícolas, as práticas alternativas ao nível da selecção de material vegetal, de diagnóstico e correcção da clorose férrica apresentadas neste trabalho podem ser de extrema importância para os pomares que seguem as normas inerentes à produção integrada.