

Pêra 'Rocha' do Oeste em pomares com sistema integrado de rega de precisão: variação sazonal de parâmetros fisiológicos e bioquímicos

Susana Silvestre¹, Miguel Leão de Sousa², Jorge Soares², Délio Raimundo², Daniel Ribeiro³, Bárbara Rodrigues³, Sandra Pires³, Ana Rita Matos¹, João Daniel Arrabaça¹, Jorge Marques da Silva¹ & Anabela Bernardes da Silva¹

¹ Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Center for Biodiversity, Functional and Integrative Genomics (BioFIG), and Departamento de Biologia Vegetal, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal. arsilva@fc.ul.pt

² Campotec, S.A., EN 9, Zona Industrial de Casalinhos de Alfaiata, 2560-393 Silveira, Torres Vedras, Portugal.

³ Hidrosoph, Lda., Rua Alcárcova de Baixo, 54 Sala C, 7000-841 Évora, Portugal.

Resumo

O fornecimento adequado de água para a agricultura é um imperativo cada vez mais premente, dadas as implicações económicas, sociais e ecológicas que acarreta e deverá ser ajustado a cada cultura. Tal implica uma gestão de rega criteriosa, em última análise ditada pelo desenvolvimento da cultura e a sustentabilidade do sistema. Neste projeto, foram determinados parâmetros fisiológicos e bioquímicos em árvores de quatro pomares de pêra 'Rocha', zona do Oeste, com modelos de produção diferentes, e com um sistema de rega de elevada precisão instalado (Smart Irrigation Management-Hidrovolution™ e Irristrat™, Hidrosoph, Portugal). A taxa fotossintética máxima foi tendencialmente muito idêntica (média 22 $\mu\text{mol CO}_2$ fixado $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mas a eficiência intrínseca do uso de água diferiu entre os pomares e decresceu ao longo do ciclo de produção. Também o conteúdo em sacarose decresceu de maio para agosto, não sendo compensado pelo aumento da concentração de frutose que ocorreu em três pomares. No outro, Quinta da Junqueira, a frutose nas folhas diminuiu de maio para agosto e o conteúdo em glucose foi sempre mais elevado do que nos restantes pomares. A composição em ácidos gordos membranares mostrou que o ácido linolénico (C18:3) aumentou de maio para agosto, ao contrário do seu precursor, o ácido linoleico (C18:2). Além desta tendência geral dependente da época do ano, observaram-se diferenças específicas entre pomares, nomeadamente nos ácidos trans-hexadecenoico (C16:1t) e hexadecadienoico (C16:2), específicos dos cloroplastos. Os resultados mostram diferenças interessantes dependentes da época do ano e dos pomares, que contribuirão para uma posterior avaliação do sistema de rega de precisão e optimização da produção de pêra Rocha na zona do Oeste.

Palavras-chave: açúcares, ácidos gordos, eficiência do uso de água, fotossíntese, gestão de rega

Abstract

Seasonal variation of biochemical and physiological parameters in 'Rocha' pear orchards with precision irrigation

Water consumption is an important determinant of the environmental sustainability and economic viability of irrigated fruit orchards. Therefore a careful water management is required, where precision irrigation tuned to each culture and phenological stage plays a pivotal role. In this project, biochemical and physiological parameters were measured in trees from four 'Rocha' pear orchards with different cultural systems. In all orchards a precision irrigation system was set (Smart Irrigation Management-Hidrovolution™ e Irristrat™, Hidrosoph, Portugal). No significant differences were found between orchards and along time in the maximum photosynthetic capacity (mean value circa 22 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Nevertheless,

intrinsic water use efficiency differed between orchards and decreased along the season. Also the leaf sucrose content decreased from May to August and the fructose content increase in all except Junqueira, where a decrease was observed and the glucose content was, in turn, always high. However, the observed increase in fructose was not enough to compensate the decrease in sucrose and thereby a decrease on total soluble sugars was found. Linolenic acid (C18:3) increased from May to August, in contrast with its precursor, linoleic acid (C18:2). Differences between orchards were also found in specific chloroplast fatty acids (C16:1t and C16:2). The biochemical and physiological differences found along the season and between orchards will be incorporated in a production model of “Rocha” pear, expectedly supporting a more efficient irrigation.

Keywords: sugars, fatty acids, water use efficiency, photosynthesis, irrigation management

Introdução

A disponibilidade de água para agricultura é uma das maiores preocupações dos produtores, decisores políticos e do público em geral, pela importância que tem a nível económico, ecológico e social. Como tal, é relevante desenvolver uma estratégia de compromisso entre o gasto de água e uma maior e melhor produção. A nível nacional pretende-se um consumo médio de água para a agricultura de 800 m³/ha (INE, 2011), que deverá ser ajustado a cada cultura de modo a não comprometer uma maior e melhor produção. Tal implica uma gestão de rega criteriosa, adequada à topografia, área da parcela, tipo de solo, clima da região e ao estado de desenvolvimento da planta. A complexidade dos modelos de crescimento, desenvolvimento e produtividade das culturas agrícolas, incluindo das frutícolas, resulta da diversidade de processos envolvidos e das interações estabelecidas com as condições edafo-climáticas (para revisão ver Sousa, 2013). A fotossíntese, base da produção de matéria orgânica nas plantas, depende muito do meio edafo-climático. No entanto, em condições não limitantes de nutrientes, a fotossíntese depende essencialmente da eficiência da captação da radiação e da disponibilidade de água. (Sinclair & Hori, 1989). Assim, a maioria dos modelos de previsão da produção recorre à correlação entre a assimilação fotossintética de CO₂ e a perda de água por transpiração, isto é, à eficiência do uso de água (Penning de Vries et al., 1989).

O projecto PRODER, 4.1 Cooperação para a Inovação, nº 44894 explora o desenvolvimento experimental de um sistema de rega inteligente de elevada precisão (Smart Irrigation Management - Hidrovolution™, Hidrosoph, Évora, Portugal), ligado a um sistema de integração de dados (Irristrat™, Hidrosoph, Évora, Portugal) em pomares de pêra Rocha da zona do Oeste. Foram escolhidos quatro pomares localizados em quatro zonas de produção da região Oeste (Acipreste, Cela, Alfeizerão e Lourinhã), com densidades de plantação, susceptibilidade à alternância e técnicas de produção distintas, bem como diferentes necessidades hídricas. No âmbito deste projecto, tem sido estudada a capacidade fotossintética de pereiras representativas de cada pomar.

Espera-se que as determinações *in vivo* das trocas gasosas de CO₂ e H₂O foliares de pereiras ‘Rocha’, conjuntamente com a quantificação de açúcares solúveis (sacarose, glucose e frutose) e de ácidos gordos, permitam avaliar alterações ao longo do ciclo de produção e em diferentes condições de cultura, contribuindo para o desenvolvimento experimental do sistema de rega de elevada precisão.

Material e Métodos

Selecionaram-se quatro pomares de pêra ‘Rocha’ em quatro zonas da região Oeste de Portugal (fig. 1), localizados nas quintas do Brejo (Alfeizerão, Alcobaça), Rol (Lourinhã), Ruiva (Acipreste, Alcobaça) e Junqueira (Cela, Alcobaça). A Quinta do Brejo possui um histórico de elevada produtividade e baixa alternância, é constituída por pomares de baixa densidade (compasso de 4,5x2 m), plantadas em solos frequentemente sujeitos a alagamento no

período invernal. A Quinta do Rol é constituída por pomares intensivos (3,7x1 m) e apresenta um historial de produção mais irregular (elevada alternância). A Quinta da Junqueira apresenta densidade intermédia, alternância baixa a moderada e algumas dificuldades de crescimento na fase final de ciclo. A Quinta da Ruiva apresenta os pomares de maior densidade (3,7x1,0x0,40 com árvores em fila dupla) e uma regularidade de produção baixa, caracterizada por anos de elevada alternância. Em todos estes pomares foram instaladas sondas no solo, de forma a controlar e monitorizar a rega dos mesmos pelo *Smart Irrigation Management - Hidrovolution™* (Hidrosoph, Portugal). Foram escolhidas 3 árvores representativas de cada pomar e as medições realizadas mensalmente em folhas jovens de verdascas totalmente expandidas, (maio a agosto).

A taxa fotossintética foi medida em duas folhas não-destacadas de cada árvore com um analisador de gás por infravermelhos (LCpro+ Adc BioScientific Ltd, Great Amwell, Hertfordshire, UK) em condições controladas (50 ±5 % relative humidity, 390 ppm CO₂, 25 ±2 °C) e irradiâncias crescentes, curvas A/I, tal como descrito em Nunes et al. (2009). As curvas A/I foram posteriormente analisadas e os respectivos parâmetros calculados segundo Lambers et al. (1998). A eficiência intrínseca do uso de água (WUEi) foi calculada como a razão fotossíntese/conduância estomática a 1200 µmol m⁻² s⁻¹. Após as medições das curvas A/I, as folhas foram congeladas, em azoto líquido para posterior extração e quantificação de fotoassimilados e de ácidos gordos. A quantificação de fotoassimilados foi realizada em seis amostras foliares por árvore, por método enzimático utilizando o kit *Sucrose/D-Glucose/D-Fructose, UV method* (Boehringer Mannheim / R-Biopharm, Enzymatic BioAnalysis / Food Analysis. Cat. Nr. 10 716 260 035; R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) e espectrofotómetro Heλios β, Thermo, Electron Corporation, England).

Os ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) foram preparados por trans-esterificação directa de discos foliares (0,785 cm²) numa solução de metanol sulfúrico como previamente descrito em Matos et al. (2007). A separação e quantificação dos FAME foi realizada por cromatografia gasosa (3900 Gas Chromatograph, Varian) e ionização de chama numa coluna capilar de sílica (0.25 mm i.d. × 50 m, WCOT Fused Silica, CP-Sil 88 for FAME, Varian). Analisaram-se três amostras combinadas, correspondentes a duas árvores de cada pomar, para cada tempo de amostragem. O índice de duplas ligações (DBI) foi calculado de acordo com a formula DBI=Σ (% de ácidos gordos × no. de duplas ligações) / 100. A análise estatística foi realizada com SigmaPlot® Versão 11, utilizando a análise de variâncias (ANOVA) bidireccional (P < 0,05) para verificar a existência de diferenças entre quintas e o efeito dos meses. Os valores representados nas figuras correspondem a média ± SD e letras diferentes por cima das barras indicam diferenças significativas entre quintas (maiúsculas) e meses (minúsculas) (P < 0,05).

Resultados e Discussão

A taxa fotossintética foi determinada a temperatura, humidade relativa e concentração de CO₂ constantes, e a intensidades crescentes de radiação fotossinteticamente activa (PAR, do acrónimo inglês, *Photosynthetic Active Radiation*), tendo sido calculada a taxa fotossintética máxima (A_{max}) em pereiras 'Rocha' de quatro pomares da zona do Oeste (fig. 1). De maio a agosto a A_{max} foi muito idêntica nos quatro pomares (fig. 2A), em média próxima dos 22 µmol CO₂ fixado m⁻² s⁻¹, excepto em maio onde foi significativamente menor que nos restantes meses nas pereiras das quintas do Brejo e Junqueira. Noutros trabalhos, as taxas fotossintéticas máximas em pereiras 'Rocha' (Sousa, 2013) e em pereiras asiáticas (Xi et al, 2003), determinadas também em folhas do exterior da copa do terço médio dos ramos do ano, variaram um pouco mais, provavelmente porque o período em análise foi mais vasto.

A eficiência intrínseca do uso de água (WUEi, do acrónimo inglês *Water Use Efficiency*) calculada a elevada irradiância (fig. 2B), foi maior em maio e decresceu ao longo do ciclo de produção, excepto nas pereiras da parcela em estudo na quinta do Rol, evidenciando diferenças

significativas na capacidade das folhas no uso de água para fixação de CO₂ atmosférico. Sendo mais elevados os valores de WUEi obtidos em maio nas pereiras Rocha em que a A_{max} foi significativamente menor (fig. 2A), é provável que as limitações da capacidade fotossintética tenham ocorrido a nível estomático. De facto, em maio, a condutância estomática determinada nas pereiras das quintas do Brejo e Junqueira foi de 0,23 e 0,16 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente, enquanto nas restantes parcelas e meses o valor médio se situou entre 0,35-0,65 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A hipótese das folhas não terem ainda atingido a plena expansão em maio, nas parcelas referidas, não se aplica aqui dados os cuidados na escolha das folhas utilizadas nas determinações. Também nesse caso se esperaria uma maior capacidade fotossintética, como determinado em folhas de pereiras “Nijisseiki” a 70% da sua expansão máxima (Teng et al, 2002).

O conteúdo em sacarose das folhas bem expandidas variou em média entre 0,4 $\mu\text{mol cm}^{-2}$ e 0,85 $\mu\text{mol cm}^{-2}$ e foi sempre significativamente maior em maio do que em agosto (fig. 3A). Estes resultados estão de acordo com os obtidos em outras cultivares de pera em que se determinou um menor conteúdo em açúcares no início da estação de crescimento (quando as folhas não estavam completamente desenvolvidas) aumentando a partir daí até meio do período de desenvolvimento do fruto e decrescendo depois na folha por aumento da translocação para o fruto (Hudina et al., 2007). Apesar da variação idêntica do conteúdo em sacarose nos dois meses em análise, cada pomar apresentou teores de sacarose diferentes, tendo as pereiras das quintas do Brejo e Junqueira valores mais elevados e as da quinta do Rol o menor valor. É de notar que a maior concentração de sacarose foi encontrada nas folhas que apresentaram significativamente menor capacidade fotossintética, o que sugere que possa existir um diferente balanço de açúcares em maio nas pereiras dessas parcelas. Em folhas bem expandidas de pereiras Conference, Concorde e Williams a sacarose foi o açúcar solúvel encontrado em maior quantidade, seguido da frutose, sorbitol e glucose, mas esse padrão variou ao longo do desenvolvimento dos frutos e foi geneticamente dependente das cultivares (Hudina et al., 2007). Também têm sido referidas diferenças no padrão de variação dos açúcares de pereiras dependentes das práticas culturais, como a irrigação (Hudina & Stampar, 2000), nutrição (Hudina et al., 2003) ou mesmo a condução dos ramos (Ito et al., 2004), que poderão justificar as diferenças observadas entre as parcelas dos pomares de pereiras ‘Rocha’ na mesma época do ano. A concentração de glucose (fig. 3B) foi sempre menor que a de sacarose, atingindo valores médios mais elevados de cerca de 0,3 $\mu\text{mol cm}^{-2}$ e, em cada pomar, não variou entre maio e agosto. A diferença entre os pomares foi muito significativa e semelhante à que ocorreu com a sacarose. A concentração de frutose (fig. 3C) aumentou em todos os pomares de maio para agosto, com valores médios tendencialmente semelhantes em todos os pomares excepto na Junqueira. Nas pereiras deste pomar, o teor de frutose foi maior em maio e decresceu em agosto.

Sendo a sacarose um dímero de glucose e frutose, as diferenças observadas poderiam resultar dessa interconversão. Nesse caso a razão entre a sacarose e a glucose mais frutose (sac/gl+fr) deveria tender a ser constante, o que não acontece (fig. 3D). A razão sac/gl+fr foi muito diferente nos vários pomares, sendo essa diferença mais acentuada em maio em que houve cerca de 10 vezes mais sacarose do que glucose e frutose na quinta do Rol enquanto que na quinta da Junqueira essa proporção é cerca de 2,5. A concentração total nestes açúcares solúveis foi sempre maior nas folhas das pereiras da quinta da Junqueira, principalmente devido ao maior conteúdo em glucose (fig 3). Não se pode excluir que o carbono fixado pela fotossíntese possa ter sido armazenado em amido, polímero insolúvel de glucose, ou em sorbitol, alterando a disponibilidade em açúcares solúveis facilmente metabolizados e transportados. Estes carboidratos são também importantes fotoassimilados de reserva das plantas da família das Rosaceae (Noiraud et al., 2001).

A análise dos lípidos totais de folhas de pereira permitiu a identificação de oito ácidos gordos diferentes. Dois saturados (C16:0 e C18:0) e seis insaturados (C16:1, C16:2, C16:3, C18:1, C18:2 e C18:3). Do ponto de vista da biossíntese lipídica, as plantas superiores são classificadas em “18:3” ou “16:3”, sendo estas últimas caracterizadas pela presença de “16:3”

que é sintetizado no cloroplasto pela chamada “via procariótica”, ao passo que as plantas “18:3” não contêm C16:3. Visto a percentagem de C16:3 na pereira ser muito baixa relativamente à encontrada nas plantas “16:3” considera-se que se trata de uma das raras plantas com metabolismo intermédio. Os nossos resultados mostram que nas folhas de pereira o ácido linolénico (C18:3) correspondeu a cerca de 70 % dos ácidos gordos totais, quantidade essa que aumentou de Maio para Agosto (fig.4A). Por outro lado observou-se uma diminuição no conteúdo no seu precursor, ácido linoleico (C18:2) o que resultou na ausência de alterações no DBI e TPUFA (Fig 4C e D). No que diz respeito à via procariótica, observou-se um aumento em Agosto do C16:2 nas quintas do Rol e Brejo e tendência para diminuição do seu produto de dessaturação C16:3. Das diferenças observadas entre os pomares estudados destacou-se a grande variabilidade do teor em C16:1t, que apresentou valores bastante elevados na quinta do Junqueiro em Maio (Fig. 4B) (fig. 4B), o que se refletiu no elevado valor de TMUFA (fig. 4C). A quantidade deste ácido gordo diminuiu em Agosto nas amostras da Junqueira e Rol. O C16:1t está presente exclusivamente no fosfatidilglicerol do cloroplasto em estreita associação com o complexo de captação de luz da clorofila *a* e *b*. Os dois ácidos gordos saturados quando avaliados em conjunto (TSA) sofreram um aumento em Agosto, significativo apenas no pomar do Brejo (Fig 4C). Os processo de insaturação dos ácidos gordos são dependente da temperatura, da intensidade luminosa e podem sofrer alterações ao longo do desenvolvimento. Variações no teor em 18:3 foram observadas em resposta ao stress (Matos et al., 2009). O facto do teor em 18:3 aumentar nos meses estudados em paralelo com a capacidade fotossintética e o teor em clorofilas (resultados não apresentados) sugere que se trata de um processo relacionado com o desenvolvimento das folhas. A futura avaliação dos parâmetros climáticos nos períodos de amostragem permitirá também relacionar as alterações nos ácidos gordos com possíveis diferenças nos factores ambientais dos diferentes pomares no período em análise.

Conclusões

Em pereiras Rocha, parâmetros fisiológicos e bioquímicos relacionados com as trocas gasosas de CO₂ e H₂O mostraram diferenças ao longo do ciclo de produção e entre pomares, que contribuirão para uma posterior avaliação do sistema de rega de precisão em desenvolvimento experimental na zona do Oeste.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro ao projecto PRODER, 4.1 Cooperação para a Inovação, nº 44894.

Referências

- Hudina, M. & Štampar, F. 2000. Influence of water regimes and mineral contents in soil upon the contents of minerals, sugars and organic acids in pear fruits (*Pyrus communis* L.) cv. ‘Williams’. *Phyton* 40: 91–96.
- Hudina, M., Colaric, M. & Stampar, F. 2007. Primary metabolites in the leaves and fruits of three pear cultivars during the growing season. *Canadian Journal of Plant Science* 87: 327–332.
- Hudina, M., Solar, A. & Stampar, F. 2003. Does foliar nutrition influence the pear fruit quality? *International Journal of Horticultural Science* 9: 25–28.
- Hudina, M., Solar, A. & Stampar, F. 2003. Influence of location on internal fruit quality of pear (*Pyrus communis* L.) cv. ‘Williams’. *Research reports Biotechnical Faculty University of Ljubljana* 81: 15–24.
- INE- Instituto Nacional de Estatística, I. P., 2011. O uso da água na agricultura, Lisboa, Portugal.

- Ito, A., Yoshioka, H., Hayama, H. & Kashimura, Y. 2004. Reorientation of shoots to the horizontal position influences the sugar metabolism of lateral buds and shoot internodes in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* (Burm.) Nak.). Journal of Horticultural Science Biotechnology 79: 416–422.
- Lambers, H., Chapin III, F.S., Pons, T.L. 1998. Photosynthesis. pp. 11-91. In: Plant Physiological Ecology. Springer, The Netherlands.
- Matos, A.R., Hourton-Cabassa, C., Çiçek, D., Rezé, N., Arrabaça, J.D., Zachowski, A. & Moreau, F. 2007. Alternative oxidase involvement in cold stress response of *Arabidopsis thaliana fad2* and *FAD3+* cell suspensions altered in membrane lipid composition. Plant Cell Physiology 48: 856-865
- Matos, A.R., Laffray, D., Zuily-Fodil, Y. & Pham Thi. A.T. (2004) Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia) Annals of Botany 94: 345-51
- Noiraud, N., Maurousset, L. & Lemoine, R. 2001. Transport of polyols in higher plants. Plant Physiology and Biochemistry 39: 717–728.
- Nunes, C.M., Araújo, S.S., Silva J.M., Fevereiro, P.S. & Silva, A.B. 2009. Photosynthesis light curves: a method for screening water deficit resistance in the model legume *Medicago truncatula*. Annals of Applied Biology, 155: 321–332
- Sinclair, T. R. & Horie, T., 1989. Leaf Nitrogen, Photosynthesis, and Crop Radiation Use Efficiency: A Review. Crop Science 29:90-98.
- Sousa, M.A.L. 2013. Avaliação de novos sistemas de produção de Pera Rocha em alta densidade com recurso à modelação e à integração de processos fisiológicos. ISA, Lisboa.
- Teng, Y., Tamura, F., Tanabe, K. & Nakai, T. 2002. Partitioning patterns of photosynthates from different shoot types in “Nijisseiki” pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). Journal of Horticultural Science & Biotechnology 77: 758-765.
- Teo, G., Suzuki, Y., Uratsu, S.L., Lampinen, B., Ormonde, N., Hu, W.K., DeJong, T.M. & Dandekar, A.M. 2006. Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American 103: 18842–18847.



Figura 1- Mapa da zona Oeste com indicação da localização das Quintas do Rol (Lourinhã), do Brejo (Alfeizerão), da Junqueira (Cela) e Ruiva (Acipreste).

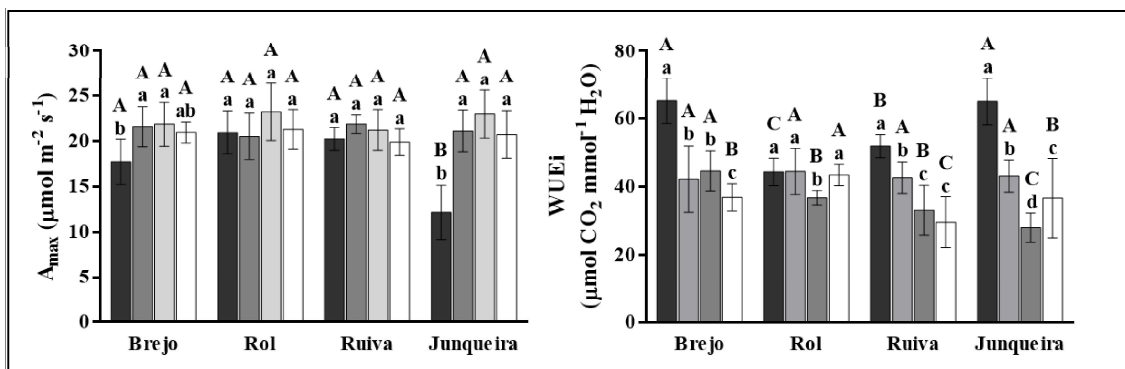


Figura 2 - A) Capacidade fotossintética máxima (A_{max}) e B) eficiência intrínseca do uso de água (WUE_i) para as Quintas do Brejo, Rol, Ruiva e Junqueira nos meses de maio, junho, julho e agosto. Letras diferentes em cima das barras indicam diferenças significativas entre quintas (maiúsculas) e meses (minúsculas) ($P < 0,05$).

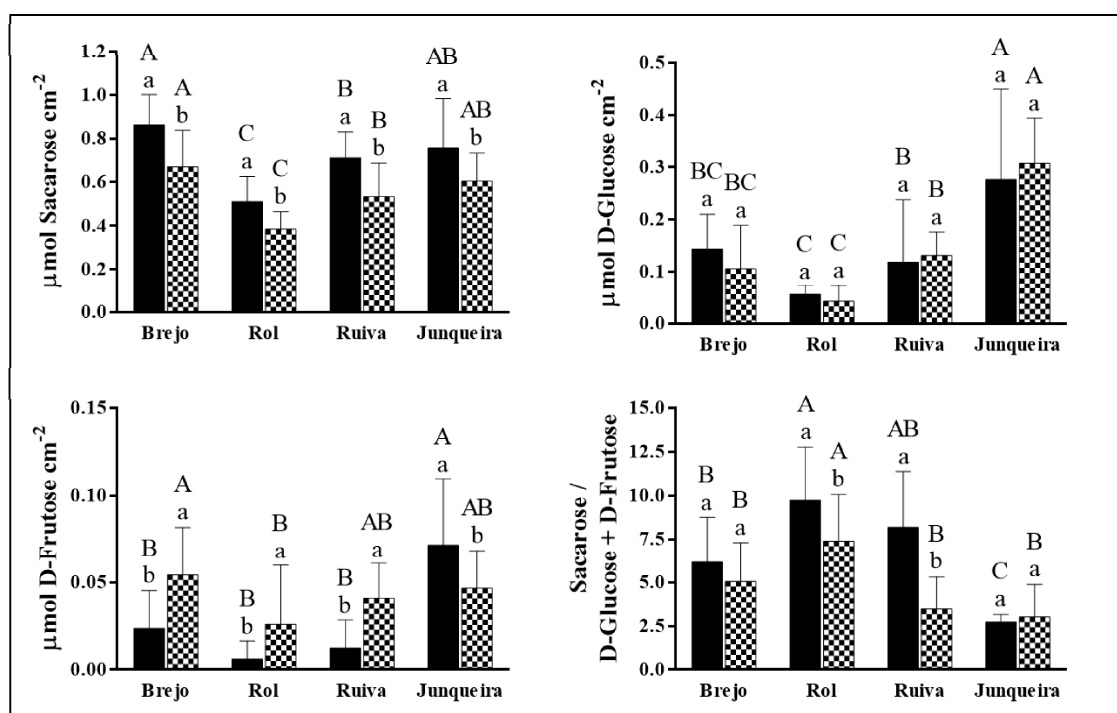


Figura 3 - Concentração de A) Sacarose, B) D-Glucose e C) D-Frutose por área de folha, e D) razão entre Sacarose e D-Glucose + D-Frutose para as Quintas do Brejo, Rol, Ruiva e Junqueira nos meses de maio (sem padrão) e agosto (com padrão). Letras diferentes em cima das barras indicam diferenças significativas entre quintas (maiúsculas) e meses (minúsculas) ($P < 0,05$).

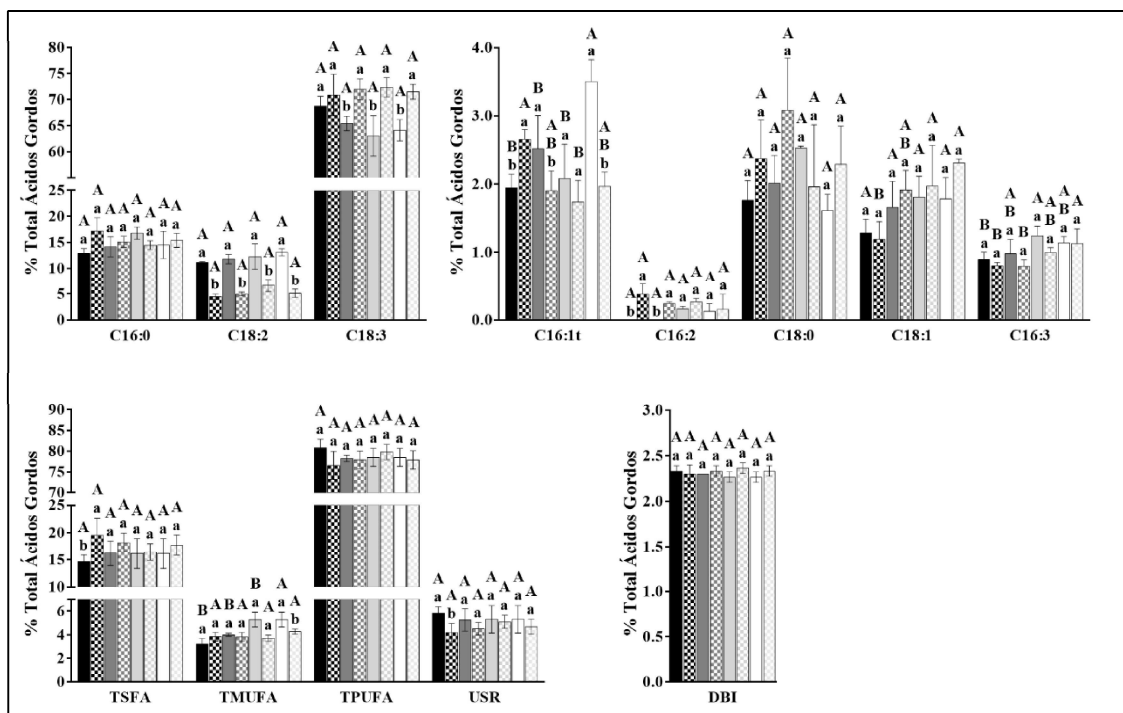


Figura 4 – Composição dos lípidos totais foliares em ácidos gordos A) C16:0, C18:2 e C18:3; B) C16:1t, C16:2, C18:0, C18:1 e C16:3; C) ácidos gordos saturados (TSFA), monoinsaturados (TMUFA), polinsaturados (TPUFA), e razão insaturados/saturados (USR); D) índice de duplas ligações (DBI) para as Quintas do ■ Brejo, ■ Rol, ■ Ruiva e □ Junqueira nos meses de maio (sem padrão) e agosto (com padrão). Letras diferentes em cima das barras indicam diferenças significativas entre quintas (maiúsculas) e meses (minúsculas) ($P < 0,05$).