

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

LEONARDO VALANDRO ZANETTI

**RADIAÇÃO UV-B E ADUBAÇÃO SILICATADA SOBRE A MORFOLOGIA,
FISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DE *Theobroma cacao* L. (MALVACEAE)**

VITÓRIA-ES

2017

LEONARDO VALANDRO ZANETTI

**RADIAÇÃO UV-B E ADUBAÇÃO SILICATADA SOBRE A MORFOLOGIA,
FISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DE *Theobroma cacao* L. (MALVACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Camilla Rozindo Dias Milanez

VITÓRIA-ES

2017

**RADIAÇÃO UV-B E ADUBAÇÃO SILICATADA SOBRE A MORFOLOGIA,
FISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DE *Theobroma cacao* L. (MALVACEAE)**

LEONARDO VALANDRO ZANETTI

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 24 de agosto de 2017.

Comissão Examinadora:

Dr.^a Camilla Rozindo Dias Milanez - UFES
Orientador e Presidente da Comissão

Dr. Geraldo Fastini Cuzzuol - UFES
Examinador Interno

Dr. Antelmo Ralph Falqueto - UFES
Examinador Interno

Dr. Anderson Geyson Alves de Araújo - UFES
Examinador Externo

Dr.^a Liana Hilda Golin Mengarda - UFES
Examinador Externo

Aos meus pais, Antonio e Marlene, pelo exemplo de vida e incentivo.

À minha filha Beatriz, meu maior amor.

À minha esposa Lorenza, por todo amor, paciência e apoio.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, pois sem Ele esta jornada não seria cumprida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, pela infraestrutura para realização do trabalho.

À Comissão Executiva de Planejamento da Lavoura Cacauera (CEPLAC) de Linhares, pelo fornecimento dos frutos de cacau.

Ao Laboratório Experimental de Petróleo (LabPetro) da UFES, pelo uso do equipamento Raman.

À Prof.^a Dr.^a Camilla Rozindo Dias Milanez, minha orientadora e amiga. Muito obrigado pelo incentivo, confiança e ensinamentos que me levaram à execução e conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Geraldo Rogério F. Cuzzuol, pelos valiosos conselhos e sugestões.

Ao Dr. Carlos Alberto Spaggiari Souza, da CEPLAC de Linhares-ES, pela infinita disponibilidade e ensinamentos.

À Prof.^a Dr.^a Glória Maria de Farias Viegas Aquije, Instituto Federal do Espírito Santo (IFES) de Vila Velha, pela constante disponibilidade para que as análises de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia Raman fossem realizadas.

Ao Prof. Dr. Miguel A. Schettino Junior, do Laboratório de Materiais Carbonosos e Cerâmicos/ Laboratório de Plasma Térmico (LMC/LPT) da UFES, pela assistência na realização das análises de microscopia eletrônica de varredura e microanálises de raio X.

Ao doutorando Enrique Ronald Yapuchura Ocaris, pela atenção e dedicação nas medições de espectroscopia Raman.

À técnica Luar Santana de Paula, do Laboratório de Plasma Térmico da UFES, pelo auxílio na realização das análises de microscopia eletrônica de varredura e microanálises de raio X.

A toda equipe do Laboratório de Anatomia Vegetal (LABAV) da UFES: Dayana, Jehová, Caroline, Daniely, Felipe e Ranna, pelo convívio, companheirismo e apoio recebido ao longo do tempo.

Aos profissionais da UFES, professores, gestores e coordenadores pelo aprendizado e imprescindível apoio administrativo.

Ao meu irmão Jeremias, meus sobrinhos Raquel e Isaque, e a todos meus familiares que mesmo distantes, sempre me motivaram.

Aos amigos de ciência Vinícius, Dayana e Tatiane, pelo companheirismo na execução dos experimentos.

A todos os amigos da Botânica, em especial Ian, Liliane, Lívia e Fran, pela convivência, força e apoio.

A todos meus amigos e aqueles que, direta ou indiretamente, acreditaram e me incentivaram a concluir este trabalho.

A todos, muito obrigado!

RESUMO

RADIAÇÃO UV-B E ADUBAÇÃO SILICATADA SOBRE A MORFOLOGIA, FISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DE *Theobroma cacao* L. (MALVACEAE)

Vários estudos relatam os efeitos prejudiciais da radiação ultravioleta-B (UV-B) sobre os crescimento e processos fisiológicos fundamentais de diversas espécies de plantas cultivadas. Entretanto, as espécies apresentam sensibilidade variável à radiação UV-B e, o silício (Si) pode atuar como agente amenizador do estresse causado por esse tipo de radiação, resultando, em alguns casos, em incremento de crescimento. O cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) é considerado uma das culturas perenes mais importantes devido as suas sementes serem a matéria prima para produção do chocolate. O cultivo do cacaueteiro que, tradicionalmente, é realizado à sombra, tem dado lugar ao cultivo a pleno sol, devido a maior produtividade das plantas nesta condição, porém, com maiores custos de manutenção. As plantas a pleno sol ficam totalmente expostas à radiação UV-B a qual pode prejudicar o desenvolvimento vegetal. Tecnologias que possibilitem maior desempenho das plantas às condições estressantes são de grande interesse para os produtores, e nesse contexto, o Si o parece ser promissor por apresentar efeitos positivos sobre as plantas nas diversas tensões ambientais. No presente trabalho, baseando-se no crescimento, anatomia foliar e alterações fisiológicas e bioquímicas, avaliaram-se os efeitos da radiação UV-B sobre mudas de dois genótipos de cacaueteiro (Catongo e PH16) com folhas de coloração antociânica contrastante. Identificado o genótipo mais suscetível à UV-B, determinou-se os efeitos interativos desta radiação com plantas adubadas com Si, buscando uma possível ação do Si na redução do estresse por UV-B. Ao final, investigou-se a localização, morfologia e composição química dos cristais foliares encontrados no genótipo Catongo de *T. cacao*, verificando-se a possível composição silicatada de alguns cristais. Para isso, mudas de cacaueteiro de dois genótipos, Catongo e PH16, foram mantidas em condições controladas de crescimento, durante 42 dias, sendo submetidas a dois níveis de radiação UV-B (0 e 3 KJ m⁻² dia⁻¹) e duas concentrações de Si na adubação (0 e 2 mM). O genótipo Catongo foi caracterizado como o mais suscetível e, por esse motivo, foi o genótipo selecionado para avaliar o efeito do Si sobre as plantas expostas à radiação UV-B. Foram analisados: crescimento, anatomia foliar, trocas gasosas, fluorescência da clorofila, pigmentos fotossintéticos, polifenóis, carboidratos solúveis, lignina, mucilagem, enzimas antioxidantes, teores de peróxido de hidrogênio e malondialdeído e teor de Si. Além disso, secções foliares e cristais isolados foram analisados por meio de microscopias de luz transmissível e polarizada e eletrônica de varredura, sendo a composição química dos cristais

determinada por meio de testes histoquímicos, microanálise de raio X e espectroscopia Raman. Os dados mostraram que ambos os genótipos sofreram danos foliares com a exposição à radiação UV-B, porém, foram mais evidentes no genótipo Catongo, que evidenciou um alto custo energético com as alterações metabólicas. Em contrapartida, o genótipo PH16 demonstrou tolerância à radiação UV-B, apresentando maior eficiência energética com um elevado ganho de biomassa. A avaliação do efeito do Si sobre as plantas de Catongo submetidas à UV-B, mostrou que a adubação silicatada atuou de forma regulada com a radiação UV-B proporcionando economia energética pela redução do consumo de carbono pela respiração e produções de pigmentos clorofilianos, antocianinas, flavonoides e fenóis, o que levou a um maior acúmulo de biomassa. Por último, as investigações relacionadas aos cristais foliares de *T. cacao* revelaram uma elevada diversidade de formas e composição química dos cristais observados, sendo de oxalato de cálcio, sílica ou uma mistura destes dois primeiros.

Palavras-chave: Anatomia. Cacao. Cristal. Espectroscopia Raman. Fotossíntese. MEV-EDS.

ABSTRACT

UV-B RADIATION AND SILICATED FERTILIZATION ON THE MORPHOLOGY, PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF *Theobroma cacao* L. (MALVACEAE)

Several studies report the ultraviolet-B (UV-B) damaging effects on the growth and fundamental physiological processes from several species of cultivated plants. However, species have variable sensitivity to UV-B radiation, and silicon (Si) can act as reliever agent stress caused by this type of radiation, resulting in some cases in increased growth. Cacao (*Theobroma cacao* L.) is considered one of the most important perennial crops because its seeds are the raw material for chocolate production. The cacao crop that is traditionally held in the shade, has given rise to growing in full sun, due to the higher productivity of plants in this condition, however, with higher maintenance costs. The plants in full sun are fully exposed to UV-B radiation which can damage the plant development. Technologies that enable higher performance of plants to stressful conditions is of great interest to producers, and in this context, silicon appears to be promising for presenting positive effects on plants in various environmental stresses. Based on growth, foliar anatomy and physiological and biochemical changes, the effects of UV-B radiation on leaves of two cacao genotypes (Catongo and PH16) with contrasting anthocyanin coloration were evaluated. Identified the most susceptible genotype to UV-B, it was determined the interactive effects of this radiation with plants fertilized with silicon, in order to determine a possible Si actions as reliever agent to UV-B. Finally, we investigated the location, morphology and chemical composition of the leaf crystals found in genotypes Catongo *T. cacao*, verifying the possible composition of some silicate crystals. For this, cacao seedlings of two genotypes, Catongo and PH16, were kept in controlled growth conditions for 42 days, being submitted to two levels of UV-B (0 and 3 KJ m⁻² day⁻¹) and two concentrations of Si at fertilization (0 and 2 mM). The Catongo genotype was characterized as the most susceptible and was therefore the genotype selected to evaluate the effect of Si on plants exposed to UV-B radiation. Leaf growth, foliar anatomy, gas exchange, chlorophyll fluorescence, photosynthetic pigments, polyphenols, soluble carbohydrates, lignin, mucilage, antioxidant enzymes, hydrogen peroxide and malondialdehyde content and silicon content were analyzed. In addition, leaf sections and isolated crystals were analyzed by means of transmissible and polarized light microscopy and scanning electron microscopy, and crystals chemical composition was determined by histochemical tests, X-ray microanalysis and Raman spectroscopy. The data showed that both genotypes suffered leaf damage with exposure to UV-B radiation, however it was more

evident in the Catongo genotype, which showed a high energy cost with metabolic alterations. In contrast, the PH16 genotype showed tolerance to UV-B radiation, presenting higher energy efficiency with a high biomass gain. The evaluation of Si effect on Catongo plants submitted to UV-B, showed that the silicate fertilization acted in a regulated way with the radiation, providing energy savings by reducing carbon consumption from respiration and productions the chlorophyll pigments, anthocyanins, flavonoids and phenols, leading to a greater accumulation of biomass. Finally, the investigations related to the *T. cacao* leaf crystals revealed a high diversity of shapes and chemical composition on the observed crystals such as calcium oxalate, silica or a mixture of these two.

Keywords: Anatomy. Cacao. Crystal. Photosynthesis. Raman spectroscopy. SEM-EDX.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Efeitos da radiação UV-B em mudas de cacauero. (A-C) Genótipo Catongo. (A) Necrose e distorção foliar. (B) Abcisão de folhas recém-emergidas. (C) Alteração de número de estípulas. (D-F) Genótipo PH16. (D) Folhas jovens em expansão mostrando poucas alterações visuais. (E) Necrose e distorção em folha jovem expandida. (F) Alteração de número de estípulas. Barras iguais: 2 cm (A, B, D e E) e 1 cm (C e F). 44

Figura 2 – Partição da matéria seca dos genótipos de cacauero Catongo e PH16 submetidos à radiação UV-B. O asterisco indica diferença significativa entre a média da planta controle e a tratada com UV-B dentro de um mesmo genótipo ($P \leq 0,05$, teste F). 45

Figura 3 – Efeitos da radiação UV-B sobre a anatomia foliar de cacauero. (A-D) Secções transversais. (A e B) Genótipo Catongo, tratamentos controle e UV-B, respectivamente. (C e D) Genótipo PH16, tratamentos controle e UV-B, respectivamente. (E-H) Impressão epidérmica da face abaxial foliar. (E e F) Genótipo Catongo, tratamentos controle e UV-B, respectivamente. (G e H) Genótipo PH16, tratamentos controle e UV-B, respectivamente. As barras em A-D são iguais a 50 μm , e em E-H iguais a 20 μm 46

Figura 4 – Efeito da radiação UV-B sobre a concentração de malondialdeído (MDA), peróxido de hidrogênio, e sobre as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) em folhas dos genótipos de cacauero Catongo e PH16. O asterisco indica diferença significativa entre a média da planta controle e a tratada com UV-B dentro de um mesmo genótipo ($P \leq 0,05$, teste F). 49

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Efeito da adubação com silício (0 e 2 mM de Si, respectivamente, Si- e Si+) e seu acúmulo no substrato e nas folhas de mudas de T. cacao, sob dois níveis de radiação UV-B (0 e 3 $\text{KJ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente, UV-B- e UV-B+). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam os tratamentos de silício para o mesmo nível de radiação, e letras maiúsculas comparam os níveis de radiação para mesmo tratamento de silício. As barras indicam o erro padrão da média ($n = 5$). Valores da significância para UV-B ($P_{(\text{UV-B})}$), silício ($P_{(\text{Si})}$) e para a interação entre ambos $P_{(\text{UV-B} \times \text{Si})}$ 72

Figura 2 – Partição da matéria seca de mudas de cacauero submetidas à radiação UV-B (0 e 3 $\text{KJ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente, UV-B- e UV-B+) e à adubação com silício (0 e 2 mM de Si, respectivamente, Si- e Si+). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam os tratamentos de silício para o mesmo nível de radiação, e letras maiúsculas comparam os níveis de radiação para mesmo tratamento de silício. Os valores são médias ($n = 5$). Valores da significância para UV-B ($P_{(\text{UV-B})}$), silício ($P_{(\text{Si})}$) e para a interação entre ambos $P_{(\text{UV-B} \times \text{Si})}$ 73

Figura 3 – Efeitos da radiação UV-B (0 e 3 $\text{KJ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente, UV-B- e UV-B+) e da adubação com silício (0 e 2 mM de Si, respectivamente, Si- e Si+) sobre a eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m) e sobre a eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII (F_v'/F_m') em folhas de mudas de cacauero. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam os tratamentos de silício para o mesmo nível de radiação, e letras maiúsculas comparam os níveis

de radiação para mesmo tratamento de silício. As barras são médias \pm erro padrão (n = 5). Valores da significância para UV-B ($P_{(UV-B)}$), silício ($P_{(Si)}$) e para a interação entre ambos ($P_{(UV-B \times Si)}$). 75

Figura 4 – Efeitos da radiação UV-B (0 e 3 KJ m⁻² dia⁻¹, respectivamente, UV-B- e UV-B+) e da adubação com silício (0 e 2 mM de Si, respectivamente, Si- e Si+) sobre a assimilação líquida de CO₂ (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E), concentração interna de CO₂ (C_i), eficiência intrínseca de uso da água (A/g_s) e respiração noturna (Rd) em folhas de mudas de cacau. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05). Letras minúsculas comparam os tratamentos de silício para o mesmo nível de radiação, e letras maiúsculas comparam os níveis de radiação para mesmo tratamento de silício. As barras são médias \pm erro padrão (n = 5). Valores da significância para UV-B ($P_{(UV-B)}$), silício ($P_{(Si)}$) e para a interação entre ambos ($P_{(UV-B \times Si)}$). 76

CAPÍTULO 3

Figura 1 – Fotomicrografias de amostras foliares clarificadas de *T. cacao*, evidenciando diferentes tipos de cristais e sua localização, em luz transmissível (A, C, E, G, I, K) e polarizada (B, D, F, H, J, L). (A e B) Visão paradérmica da face abaxial foliar evidenciando cristais prismáticos ao longo de nervuras de 3^a a 5^a ordem e drusas no mesofilo. (C e D) Secção transversal do limbo evidenciando cristais prismáticos em torno dos feixes vasculares e drusas dispersas no mesofilo. (E e F) Secção transversal da nervura central mostrando drusa e cristais prismáticos tabular losangular e piramidal no parênquima fundamental. (G e H) Secção transversal da nervura central mostrando cristal lamelar losangular e cristal prismático tabular retangular, no parênquima fundamental. (I e J) Detalhe de cristal tabular losangular e drusa junto à bainha do feixe, e cristal esférico na epiderme, em secção transversal. (K e L) Secção transversal mostrando drusas no parênquima paliçádico. (M e N) Visão ampliada de cristais prismáticos de diferentes formatos próximos a um feixe vascular. Barras iguais a 25 μ m. 93

Figura 2 – Fotomicrografias de diferentes cristais foliares de *T. cacao* vistos isolados sob luz transmissível (A, C, E G, I, K, M, O, Q, S, U, W) e polarizada (B, D, F, H, J, L, N, P, R, T, V, X). Drusas (A-D). Cristais prismáticos (E-R). Tabular losangular (E e F). Tabular hexagonal (G e H). Cúbico (I e J). Trapeziforme (K e L). Cuneiforme (M e N). Quiliforme (O e P). Estilóde (Q e R). Blocos pseudoprismáticos (S-V). Cristal lamelar amorfo (W e X). Barra equivale a 10 μ m. 95

Figura 3 – Espectro Raman de três cristais prismáticos extraídos de folhas de *Theobroma cacao* L. (A) Cristal prismático cúbico. (B) Cristal prismático trapeziforme. (C) Cristal prismático tabular losangular..... 96

Figura 4 – Eletromicrografias de varredura de alguns morfotipos de cristais encontrados em folhas de *Theobroma cacao* L. (A) Parede de idioblastos rompidos (ponta de seta) mostrando cristais prismáticos (setas). (B) Cristal prismático paralelepipedal. (C) Cristal prismático cúbico. (D) Cristal esférico (ponta de seta) e cristal lamelar amorfo (seta). (E) Cristal lamelar amorfo. (F) Cristal lamelar losangular. 97

Figura 5 – Espectros de raio-X por dispersão em energia mostrando os padrões de composição química elementar da parede do idioblasto e dos cristais encontrados no limbo de *T. cacao*. A. Parede do idioblasto (Figura 4A). B. Cristal prismático paralelepipedal e cúbico (Figura 4 B-C). C. Cristal esférico (Figura 4D). D-E. Cristais lamelares amorfos (Figura 4 D-E). F. Cristal lamelar losangular (Figura 4F). Os picos de absorvância de ouro (Au) são

resultantes da metalização das amostras. Carbono (C). Oxigênio (O). Sódio (Na). Alumínio (Al). Silício (Si). Potássio (K). Cálcio (Ca). Titânio (Ti). Ferro (Fe).....99

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Efeitos da radiação UV-B sobre a altura, diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF), número de estípulas (NE), área foliar total (AFT), área foliar unitária (AFU), área foliar específica (AFE), massa seca total (MST) e razão raiz/parte aérea (R:PA) dos genótipos de cacauero Catongo e PH16.....44

Tabela 2 – Efeitos da radiação UV-B sobre a anatomia foliar dos genótipos de cacauero Catongo e PH16.....45

Tabela 3 – Efeitos da radiação UV-B sobre a concentração de clorofilas, carotenoides, antocianinas, flavonoides e fenóis solúveis em folhas dos genótipos de cacauero Catongo e PH16.....47

Tabela 4 – Efeitos da radiação UV-B sobre a eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m), eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII (F_v'/F_m'), coeficiente de extinção fotoquímico (q_p), coeficiente de extinção não-fotoquímico (q_N) e taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) dos genótipos de cacauero Catongo e PH16.....47

Tabela 5 – Efeitos da radiação UV-B sobre a assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), concentração interna de CO_2 (C_i), transpiração (E), eficiência intrínseca de uso da água (A/g_s) e respiração noturna (Rd) dos genótipos de cacauero Catongo e PH16. ..48

Tabela 6 – Efeitos da radiação UV-B sobre a sacarose, carboidratos totais, carboidratos redutores, lignina e mucilagem em folhas dos genótipos de cacauero Catongo e PH16.48

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Efeitos da radiação UV-B (0 e 3 $KJ m^{-2} dia^{-1}$, respectivamente, UV-B- e UV-B+) e da adubação com silício (0 e 2 mM de Si, respectivamente, Si- e Si+) sobre o número de folhas (NF), área foliar total (AFT), área foliar unitária (AFU), massa seca radicular (MSR), massa seca caulinar (MSC), massa seca foliar (MSF), massa seca total (MST), razão raiz/parte aérea (R:PA), razão de área foliar (RAF) e área foliar específica de mudas de cacauero (AFE).....72

Tabela 2 – Efeitos da radiação UV-B (0 e 3 $KJ m^{-2} dia^{-1}$, respectivamente, UV-B- e UV-B+) e da adubação com silício (0 e 2 mM de Si, respectivamente, Si- e Si+) sobre as espessuras da epiderme da face adaxial (Ead), epiderme da face abaxial (Eab), parênquima paliçádico (PP), parênquima esponjoso (PE), limbo e da densidade estomática de mudas de cacauero.....73

Tabela 3 – Efeitos da radiação UV-B (0 e 3 $KJ m^{-2} dia^{-1}$, respectivamente, UV-B- e UV-B+) e da adubação com silício (0 e 2 mM de Si, respectivamente, Si- e Si+) sobre as concentrações de clorofilas, carotenoides, antocianinas, flavonoides e fenóis solúveis em folhas de mudas de cacauero.74

Tabela 4 – Efeitos da radiação UV-B (0 e 3 $KJ m^{-2} dia^{-1}$, respectivamente, UV-B- e UV-B+) e da adubação com silício (0 e 2 mM de Si, respectivamente, Si- e Si+) sobre o concentração de sacarose, carboidratos totais, carboidratos redutores, lignina e mucilagem em folhas de mudas de cacauero.....77

Tabela 5 – Efeitos da radiação UV-B (0 e 3 KJ m⁻² dia⁻¹, respectivamente, UV-B- e UV-B+) e da adubação com silício (0 e 2 mM de Si, respectivamente, Si- e Si+) sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT), e sobre a concentração de malondialdeído (MDA) e peróxido de hidrogênio em folhas de mudas de cacauero.....77

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Morfotipos, localização e caracterização histoquímica de cristais observados no limbo de T. cacao quanto à solubilidade ao ácido acético PA (C₂H₄O₂) e ao ácido sulfúrico (H₂SO₄) 10% V/V. BF (bainha do feixe vascular), CP (cristal prismático), EP (epiderme), PC (parênquima clorofiliano), PF (parênquima fundamental). Ânion presente (+) ou ausente (-).94

Tabela 2 – Composição elementar química, tamanho e localização de alguns morfotipos de cristais encontrados em folhas de Theobroma cacao L. BF (bainha do feixe vascular), CP (cristal prismático), EP (epiderme), PC (parênquima clorofiliano), PF (parênquima fundamental).....98

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	A radiação ultravioleta-B	19
2.2	O silício e seu acúmulo nas plantas	21
2.3	Cultura do cacauero	23
2.4	Biom mineralização	24
	REFERÊNCIAS	27
	CAPÍTULO 1 – Variação intraespecífica das características morfofisiológicas e bioquímicas de cacauero à radiação UV-B	34
	Resumo	34
1	Introdução	35
2	Material e métodos	36
2.1	Material vegetal e condições de crescimento	36
2.2	Análises de crescimento	36
2.3	Anatomia foliar	37
2.4	Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a	37
2.5	Extração e determinação de pigmentos cloroplastídicos, compostos absorventes de UV-B e carboidratos solúveis	38
2.6	Teores de lignina e mucilagem	40
2.7	Extração e atividade enzimática	41
2.8	Extração e quantificação do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e malonaldeído (MDA)	42
2.9	Análises estatísticas	43
3	Resultados	43
4	Discussão	49
	Referências	55
	CAPÍTULO 2 – Mitigação da radiação UV-B em cacauero por meio da adubação silicatada ..	61
	Resumo	61
1	Introdução	62
2	Material e métodos	63
2.1	Material vegetal e delineamento experimental	63
2.2	Análises de Si	64
2.3	Análises de crescimento	65
2.4	Anatomia foliar	65
2.5	Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a	66
2.6	Extração e determinação de pigmentos cloroplastídicos, compostos absorventes de UV-B e carboidratos solúveis	66
2.8	Extração e atividade enzimática	69

2.9	Extração e quantificação do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e malonaldeído (MDA)	70
2.10	Análises estatísticas	71
3	Resultados	71
4	Discussão	78
	Referências	82
	CAPÍTULO 3 – Caracterização morfoquímica de cristais em folhas de Theobroma cacao L. (Malvaceae): registros inéditos de morfotipos e de sílica	87
	Resumo	87
1	Introdução	88
2	Material e métodos	90
2.1	Material vegetal.....	90
2.2	Testes histoquímicos	90
2.3	Microscopia de luz	90
2.4	Microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raio X	91
2.5	Espectroscopia Raman	91
2.6	Caracterização dos cristais	91
3	Resultados	92
4	Discussão	100
	Referências	103

1 INTRODUÇÃO GERAL

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) pertence à família Malvaceae (Alverson et al., 1999) e tem seu centro de origem na América do Sul, ocorrendo em florestas quentes e úmidas das bacias do Rio Amazonas e Orinoco (Cheesman, 1944; Motamayor et al., 2002; Thomas et al., 2012). A principal importância econômica do cacauzeiro provém de suas sementes que são utilizadas, principalmente, para a produção de chocolate. Além disso, seus derivados e subprodutos também são utilizados nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (Almeida e Valle, 2007). A cultura do cacau é considerada uma das culturas perenes mais importantes do planeta, com uma produção mundial estimada de 4,45 milhões de toneladas em 2014 (FAO, 2014).

Historicamente, *T. cacao*, é cultivada sob sombreamento de outras espécies, crescendo sob níveis quase nulos de radiação UV-B. Entretanto, o cultivo do cacauzeiro a pleno sol tem se expandido devido aos ganhos na produtividade de alguns genótipos que se mostram aclimatáveis a essa condição de luminosidade. Com a exposição ao pleno sol, as plantas ficam completamente expostas à radiação UV-B, cujos efeitos ainda são desconhecidos sobre as plantas de cacauzeiro. Embora a UV-B seja o menor componente da luz solar, ela corresponde a maior energia do espectro da luz do dia e, portanto, possui um impacto substancial na biosfera (Kataria et al., 2014; Lidon et al., 2012). Sabe-se que durante a primavera em diversas regiões da superfície terrestre os níveis de UV-B estão entre 2-12 $\text{kJ m}^{-2} \text{dia}^{-1}$, o que significa um aumento de 6-14% da radiação UV-B em relação aos níveis pré-1980, quando iniciaram-se as medições (Forster et al., 2011; Lidon et al., 2012).

Devido aos diversos relatos de danos causados pela UV-B às plantas (Kataria et al., 2014; Jansen et al., 1998), práticas de baixo custo que visem minimizar esses danos, são desejáveis. Nesse contexto, a adubação com Si tem se mostrado eficiente para reduzir os impactos nocivos da radiação UV-B sobre as plantas. O Si exerce efeitos positivos sobre as plantas nos diferentes tipos de tensões ambientais, bióticas e abióticas, e até mesmo em plantas não estressadas, melhorando o desempenho e reduzindo alterações com maiores rendimentos das culturas por meio da alteração da relação fonte-dreno (Detmann et al., 2013; Fauteux et al., 2006). Após ser absorvido, o ácido silícico deposita-se na forma de sílica amorfa hidratada nos tecidos foliares mais jovens e, posteriormente, como sílica polimerizada, na forma de cristais, comumente chamados de fitólitos (Dayanandan et al., 1983; He et al., 2014).

Assim, objetivou-se analisar os efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia, fisiologia, e bioquímica de dois genótipos de *T. cacao* com folhas de coloração antociânica

contrastante, bem como, os efeitos interativos desta radiação com a adubação silicatada, buscando uma possível ação desse elemento químico na redução do estresse por UV-B. Além disso, investigou-se a localização, morfologia e composição química dos cristais presentes nas folhas do genótipo Catongo, a fim de se verificar a presença de Si na composição química de alguns cristais.

A presente tese foi dividida em três capítulos. No primeiro capítulo, testou-se a hipótese de que cacauzeiros com folhas jovens em expansão e de coloração antociânica poderiam ser mais tolerantes à UV-B que àqueles sem essa coloração. O segundo capítulo surgiu após a confirmação da hipótese do primeiro experimento e, portanto, hipotetizou-se que a adubação com Si poderia estimular a tolerância das plantas sem coloração antociânica à radiação UV-B. O último capítulo da tese traz um estudo sobre os cristais foliares encontrados em *T. cacao* e, surgiu através de observações prévias do alto teor de Si e da elevada quantidade de cristais encontrada nas folhas dessa espécie, levando a hipótese de que o Si poderia estar fazendo parte da composição química desses cristais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A radiação ultravioleta-B

Sete por cento da radiação eletromagnética emitida pelo sol está na faixa UV (200-400 nm). O fluxo total de radiação UV que atravessa a atmosfera é muito reduzido e a composição da radiação UV é modificada. A radiação UV-C de ondas curtas (200-280 nm) é completamente absorvida pelos gases atmosféricos. A radiação UV-B (280-320 nm) é adicionalmente absorvida pelo ozônio estratosférico e, portanto, apenas uma proporção muito pequena é transmitida à superfície da Terra. Já a radiação UV-A (320-400 nm) é pouco absorvida pelo ozônio (Frohnmeyer e Staiger, 2003).

Embora a UV-B seja relativamente o menor componente da luz solar, que corresponde menos de 0,5% da energia luminosa total que atinge a superfície da Terra, ela tem a maior energia do espectro da luz do dia e, portanto, tem um impacto substancial na biosfera (Kataria et al., 2014; Lidon et al., 2012). Os níveis atuais de UV-B, durante a primavera, nas diversas regiões da superfície terrestre, estão entre 2-12 $\text{kJ m}^{-2} \text{dia}^{-1}$, o que significa um aumento de 6-14% da radiação UV-B (Forster et al., 2011) sobre a níveis pré-1980, quando estes começaram a ser medidos (Lidon et al., 2012). Os maiores níveis de UV-B são relatados em função do aumento da altitude ou de uma diminuição da latitude, sendo altamente variáveis no decorrer do dia devido à cobertura de nuvens. Efeitos locais, incluindo poluentes e reflexões superficiais diminuem as irradiações de UV-B sobre a superfície terrestre (Madronich et al., 1998; Paul e Gwynn-Jones, 2003).

A interceptação da luz no dossel das árvores pode ter grandes efeitos sobre a quantidade de UV-B incidente no sub-bosque. Por essa razão, as plantas estão expostas a níveis de UV-B muito diferentes dependendo da sua posição em relação ao dossel (Flint e Caldwell, 1998). A penetração de UV-B através de um dossel de floresta fechado, por exemplo, pode estar na faixa 1 a 2%, copas de árvores sem folhas podem absorver até 30% da radiação UV-B incidente (Paul e Gwynn-Jones, 2003). Além disso, a transmissão de radiação UV através de folhas individuais é geralmente baixa, portanto superfícies foliares superiores e inferiores também podem fornecer ambientes UV muito diferentes (Liakoura et al., 1997).

As plantas necessitam de luz solar e, inevitavelmente, são expostas à radiação UV-B. Muitos estudos têm demonstrado que altas taxas de fluência de UV-B podem causar alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares nas plantas. Contudo, há evidências de que sob condições de exposição realista de UV-B, o efeito prejudicial dessa radiação não impede substancialmente o crescimento das plantas, sugerindo que os danos

causados por essa radiação sejam, provavelmente, a exceção e não a regra (Hideg et al., 2013; Paul e Gwynn-Jones, 2003). Porém, a ausência de danos não significaria uma falta de impacto biológico, pois a UV-B é reconhecidamente um regulador ambiental cujo efeito pode ser observado sob baixas fluências dessa radiação (Brosche e Strid, 2003).

O conhecimento da regulação das funções celulares vegetais são, parcialmente, mediados pela proteína UVR8 (UV RESISTENCE LOCUS 8), uma fotorreceptora para UV-B (Di Wu et al., 2012; Müller-Xing et al., 2014; Wu et al., 2016). Respostas percebidas pela UVR8, sob baixa fluência de UV-B, são mediadas por fatores de transcrição, tais como, HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5) e a proteína reguladora fotomorfológica COP1 (CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1) (Favory et al., 2009; Stracke et al., 2010).

Os efeitos morfológicos induzidos pela UV-B nas plantas incluem reduções de altura, número de folhas, raízes e da biomassa total (Kataria et al., 2014). As alterações fotomorfológicas induzidas pela UV-B nas folhas incluem redução do tamanho e enrolamento foliar, clorose e necrose dos tecidos, alterações na anatomia com aumento da espessura foliar, degradação de pigmentos fotossintéticos e síntese de compostos fenólicos considerados filtros de UV-B, tais como, antocianinas e flavonoides (Inostroza-Blancheteau et al., 2014; Jansen et al., 1998; Lidon e Ramalho, 2011; Ravindran et al., 2010).

A UV-B afeta vários aspectos da fotossíntese, com efeitos prejudiciais sobre os complexos proteicos envolvidos nas reações fotoquímicas, bem como, nas enzimas específicas das reações da etapa bioquímica, afetando a biossíntese de assimilados e a produção de biomassa. O dano ao fotosistema II é atribuído, principalmente, às espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas como subproduto do mau funcionamento da cadeia de transporte de elétrons, causado pela absorção de UV-B no complexo de evolução de oxigênio ou outros componentes do transporte de elétrons (Jansen et al., 1998).

As ERO são potencialmente capazes de provocar danos às biomoléculas através da oxidação de lipídeos e proteínas e danos ao DNA, incluindo a peroxidação de lipídios (Kataria et al., 2014). Por serem tóxicas para as células, as ERO são eficientemente eliminadas por mecanismos antioxidantes não-enzimáticos (α -tocoferol, β -caroteno, compostos fenólicos, ascorbato, glutatona) e enzimáticos (Noctor e Foyer, 1998; Smirnov, 1993). Uma estratégia comum para estudar o metabolismo das ERO é quantificar a atividade dos componentes enzimáticos do sistema antioxidante e de seus substratos e produtos de reação. As atividades enzimáticas medidas incluem as dismutases Cu- ou Zn-superóxido (SOD) que catalisa a reação de $O_2^{\cdot -}$ à H_2O_2 , a peroxidase do ascorbato (APX) e a catalase (CAT), que são capazes de desintoxicar o H_2O_2 produzido. Apesar da grande dificuldade na interpretação desses

dados, há um consenso de maiores atividades dessas enzimas em exposição à UV-B (Czégény et al., 2016; Hideg et al., 2013). Embora, a produção de radicais livres induzida por UV-B tenha sido detectável em folhas apenas em condições laboratoriais extremas, com tempos de irradiação curtos e fluxos elevados, existem várias indicações de que o estresse oxidativo e a capacidade das plantas de substituí-lo são partes essenciais das respostas à UV-B (Czégény et al., 2016; Hideg e Vass, 1996).

2.2 *O silício e seu acúmulo nas plantas*

O Si é o segundo elemento em abundância na crosta terrestre, após o oxigênio, sendo o óxido de Si (SiO_2) o mineral mais abundante nos solos, constituindo a base da estrutura da maioria dos argilominerais (Epstein e Bloom, 2006). Em solos tropicais, devido ao aumento da intemperização, o Si é encontrado basicamente na forma de opala e quartzo ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) sendo estas formas não disponíveis às plantas (Prabhu et al., 2001). A solubilidade dos minerais silicatados no solo é variável e influenciada por temperatura, pH, tamanho de partículas, composição química e pela absorção do Si nas superfícies de minerais (Savant et al., 1999).

As plantas absorvem o Si da solução do solo apenas na forma de ácido silícico $\text{Si}(\text{OH})_4$, um ácido muito fraco (Exley, 2015; Mitani, 2005). Por ser uma molécula pequena e neutra, sem interações bioquímicas com substâncias orgânicas, acredita-se que sua entrada nas raízes siga o fluxo de água, podendo ser via apoplasto ou simplasto, sendo neste último caso, por aquaporinas permeáveis ao $\text{Si}(\text{OH})_4$ (Exley, 2015). Os mecanismos simplásticos de absorção do Si são realizados por proteínas de membranas específicas, codificadas por genes específicos, como verificado em diferentes grupos de plantas (Chiba et al., 2009; Deshmukh et al., 2015; Grégoire et al., 2012; Ma et al., 2006; Mitani et al., 2009). A permeabilidade seletiva das aquaporinas é responsável pelas diferentes concentrações de Si observadas nos grupos de plantas (Exley, 2015).

Após ser absorvido e transportado até parte aérea, o $\text{Si}(\text{OH})_4$ deposita-se, inicialmente, na forma de sílica amorfa hidratada, nos tecidos mais jovens e, posteriormente, acumula-se em células maduras, sob a forma de sílica polimerizada (SiO_2), conhecida por opala biogênica e fitólitos (Dayanandan et al., 1983). O acúmulo de Si é governado pelo desenvolvimento celular e, portanto, pode ser influenciado por vários fatores, tais como idade, tipo de tecido ou órgão, taxa de transpiração e absorção radicular (Sangster et al., 2001).

A forma como o Si é absorvido e depositado difere entre as espécies, as quais podem ser classificadas em três categorias principais: acumuladoras de Si, intermediárias e

excludentes de Si. Ao primeiro grupo pertencem plantas da ordem Equisetales e Poales, que acumulam > 4% Si (do peso seco dos brotos) em seus tecidos, plantas com > 1% de Si (entre 2 e 4%, por exemplo, Cucurbitales e Urticales) são do tipo intermediário, e as excludentes mostram < 0,5% de Si (Guerriero et al., 2016; Mitani e Ma, 2005).

Embora o Si não tenha sido considerado um elemento essencial para as plantas superiores, provou-se que esse elemento é benéfico para o crescimento e o desenvolvimento de muitas espécies vegetais (Liang et al., 2007). As concentrações de Si variam muito nos órgãos da parte aérea da planta, variando de 0,1 a 10,0% de peso seco (Epstein, 1999). Esta grande variação é atribuída, principalmente, a diferenças nas características de absorção e transporte de Si das plantas (Ma et al., 2006).

O Si exerce efeitos positivos sobre as plantas nos diferentes tipos de tensões ambientais, bióticas e abióticas, e até mesmo, em plantas não estressadas, melhorando o rendimento das culturas por meio da alteração da relação fonte-dreno (Detmann et al., 2013; Fauteux et al., 2006). Esse elemento funciona como um fator de sinalização, redirecionando o metabolismo primário das plantas (Guerriero et al., 2016).

O Si pode aumentar a defesa das plantas contra patógenos, estimulando a produção de substâncias químicas biologicamente ativas como quitinases, peroxidases, oxidases de polifenol, fitoalexinas, flavonoides e jasmonatos (Bélangier et al., 2003; Shetty et al., 2011; Ye et al., 2013). Para os estresses abióticos, são relatados de efeitos de alívio mediados pelo Si para déficit hídrico (Zanetti et al., 2016), estresse salino (Wang et al., 2015), toxidez de metais pesados (Wang et al., 2004; Wu et al., 2015) e radiação UV-B (Chen et al., 2016; Shen et al., 2014).

Os efeitos benéficos do Si são atribuídos, principalmente, a sua deposição em diferentes tecidos e órgãos, tais como raízes, folhas, caules e frutos. A deposição de Si como SiO₂ funciona como uma barreira física, que não só aumenta a resistência e a rigidez dos tecidos, mas também impede, mecanicamente, a penetração de patógenos e a herbivoria (Ma e Yamaji, 2015). Nas folhas, a deposição de Si reduz a transpiração cuticular e estomática, proporcionando economia de água (Ma e Yamaji, 2006), interfere na sua arquitetura tornando as folhas mais eretas e, possivelmente, melhorando a interceptação de luz (Hossain et al., 2007) para a fotossíntese e aumenta a capacidade de defesa antioxidante em várias espécies vegetais (Liang et al., 2007).

2.3 Cultura do cacau

O cacau (*Theobroma cacao*, L.) pertence à ordem Malvales, família Malvaceae, e tem seu centro de origem na América do Sul, ocorrendo em florestas quentes e úmidas das bacias do Rio Amazonas e Orinoco, sendo introduzido e cultivado há mais de 2000 anos nas terras baixas do México e da América Central (Alverson et al., 1999; Cheesman, 1944; Motamayor et al., 2002; Thomas et al., 2012). É um arbusto de sub-bosque, com altura variável, quando cultivado, apresenta altura entre 3 a 5 m e, em condições naturais, pode chegar a 25 m (Almeida e Valle, 2007). Apresenta copa globosa, com pequenas flores inseridas no tronco, nos ramos principais e na axila das folhas caducas, de onde surgem os frutos de tamanho e formato variáveis (Lorenzi e Matos, 2002).

É considerada uma das culturas perenes mais importantes do planeta, com uma produção mundial estimada de 4,45 milhões de toneladas em 2014 (FAO, 2014). A principal importância econômica do cacau provém de suas sementes, que são utilizadas principalmente para a produção de chocolate. Além disso, seus derivados e subprodutos também são utilizados pelas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (Almeida e Valle, 2007).

O Brasil que, historicamente, sempre esteve entre os dois maiores produtores mundiais de cacau, tendo seu auge na safra de 1984/85 com mais de 400 mil toneladas/ano, teve expressiva redução de sua produção com o surgimento da doença vassoura-de-bruxa em 1989 (Dias, 2001; Marita et al., 2001). Atualmente, o Brasil ocupa a quinta posição com a produção em 273,8 mil toneladas/ano (FAO, 2014).

Do seu provável centro de origem, na região do alto Amazonas (Motamayor et al., 2002), a espécie *T. cacao* espalhou-se em duas direções principais que resultaram em dois grupos raciais principais: o Crioulo, cultivado na América Central e no norte da América do Sul; e o Forasteiro, cultivado no norte do Brasil, Guianas e na Venezuela (Sounigo et al., 2003). Um terceiro grupo denominado Trinitário, é originário do cruzamento natural entre Forasteiro e Crioulo (Motamayor et al., 2002)

O cacau Crioulo constitui o primeiro cacau domesticado (Motamayor et al., 2002; Sounigo et al., 2003). Este grupo é composto por variedades que produzem frutos com sementes espessas, brancas ou rosadas que produzem sementes mais saborizadas e chocolates finos, entretanto, altamente suscetível às doenças (Marita et al., 2001). As variedades do grupo Forasteiro são amplamente cultivadas devido ao seu alto rendimento e resistência a doenças, correspondendo a cerca de 80% da produção mundial (Marita et al., 2001). Seus frutos possuem forma mais arredondada, casca dura e superfície quase lisa, com sementes achatadas e de forma triangular, e os cotilédones possuem coloração violeta (Dias, 2001). A

partir da associação de caracteres dos grupos anteriores, surgiram os Trinitários, cuja designação foi utilizada inicialmente para materiais provenientes de Trinidad que apresenta cotilédones das sementes com coloração variando do branco ao violeta-pálida (Dias, 2001).

A zona produtora de cacau no mundo está localizada na faixa entre 20° de latitude ao norte e ao sul do equador. Tradicionalmente, o cacau é cultivado no sistema de Cabruca (Piasentin e Saito, 2014). No qual o sub-bosque é drasticamente suprimido para introduzir o cacau e, a densidade de árvores de grande porte é reduzida (Piasentin e Saito, 2014).

O cacauero, frequentemente é consorciado em sistemas planejados com outras espécies de valor econômico (Almeida e Valle, 2007). Entretanto, o cacauero também é cultivado sob maior intensidade de irradiância. Em Gana e na Costa do Marfim, por exemplo, a área cultivada de cacau em pleno sol é de 10% e 35%, respectivamente (Padi e Owusus, 1998). Em um ensaio de sombra e fertilizante com o cacauero da Amazônia, ao longo de 20 anos em Gana, a produção de plantas cultivadas a pleno sol foi cerca do dobro daquelas sob sombreamento (Ahenkorah et al., 1987). Entretanto, os autores também inferiram que a vida econômica de uma fazenda de cacauero Amelonado, cultivados a pleno sol, não poderia durar mais de 15 anos de cultivo intensivo. Sugeriu-se que genótipos de cacauero apresentam comportamentos distintos quando cultivados em pleno sol, podendo ser produzido, economicamente, com práticas adequadas de manejo e reabastecimento de água e nutrientes (Almeida e Valle, 2007).

2.4 *Biomineralização*

A formação e deposição de biominerais em diferentes tecidos e órgãos vegetais é um processo observado em todos os níveis taxonômicos (Franceschi e Nakata, 2005). Os tipos mais comuns de biominerais em plantas são cristais de oxalato de cálcio e de sílica, sendo pouco frequentes, os cristais de carbonato de cálcio (He et al., 2014). Cristais de oxalato de cálcio ocorrem na forma de cristais prismáticos de formato variável, ráfides em forma de agulha, agrupadas em feixes, drusas, como agregados esféricos, estiloides de formato colunar com extremidades pontiagudas ou cumeadas e, areia cristalina, cristais muito pequenos, geralmente, em aglomerados (Haberlandt, 1914). Outros formatos são variações desses morfotipos (Franceschi e Horner, 1980).

A composição química dos cristais é diversa, sendo o cálcio o metal mais frequente (Weiner e Dove, 2003). Outros elementos como o silício, sódio, potássio, alumínio, ferro, manganês, cádmio e zinco também são encontrados em cristais de algumas plantas (Ernst et al., 1995; He et al., 2012; Sarret et al., 2007; Taylor et al., 1993).

A localização e o tipo de cristal de oxalato de cálcio dentro de um determinado táxon pode ser bastante consistente, e por isso, essas características podem ser utilizadas para fins taxonômicos (Horner e Wanke, 2012; Lersten e Horner, 2011; Silva et al., 2014). Metcalfe e Chalk (1950) relatam a presença de oxalato de cálcio solitários e agregados no limbo dos representantes de Sterculiaceae e Malvaceae, sendo as formas agregadas as mais comuns. Para *Theobroma*, há registros de cristais prismáticos e drusas no caule (Cuatrecasas, 1964) e folha (Garcia et al., 2014).

As funções dos cristais dependem da sua forma, tamanho, abundância, posição e composição química (He et al., 2014). Dentre as hipóteses para as funções da biomineralização em plantas, destacam-se a regulação dos níveis de cálcio citoplasmático, a desintoxicação de metais pesados e de alumínio, absorção e dispersão da luz minimizando o estresse por temperatura e regulação de equilíbrio iônico (por exemplo, potássio e sódio) (Franceschi e Nakata, 2005; He et al., 2014). A biomineralização, também, possui importância ecológica (Raven e Giordano, 2009) na proteção contra herbivoria e ataque de patógenos proporcionada pela rigidez tecidual e suporte mecânico. Além disso, tem importância na ciclagem biogeoquímica de carbono, cálcio e silício, e sequestro de CO₂ atmosférico (Braissant e Cailleau, 2004; Garvie, 2006).

Em muitas plantas, o silício é incorporado nas paredes celulares, e a coprecipitação de alumínio e metais pesados com o silício pode ser responsável pelo alívio de suas toxicidades (He et al., 2014). Cristais de sílica, comumente chamados de fitólitos, são mais comuns em monocotiledôneas, especialmente, em gramíneas (He et al., 2014). Em Malvaceae, a presença de depósitos de sílica é relatada para os gêneros *Heritiera*, *Scaphium* e *Tarrietia* (Metcalfe e Chalk, 1950). A função dos fitólitos nas plantas ainda é incerta, não existindo um consenso entre os pesquisadores (Massey et al., 2006; Tsutsui et al., 2016). Entretanto, alguns estudos mostram a relação dessas estruturas com a defesa contra a herbivoria (Epstein, 2009; Hunt et al., 2008; Reynolds et al., 2012) e na detoxificação de alumínio e metais pesados (Da Cunha e Do Nascimento, 2009; Hodson e Sangster, 1993).

A posição dos cristais pode ser alterada com a intensidade da luz, ajudando a distribuir a luz uniformemente aos cloroplastos. Cristais localizados nas regiões mediana ou inferior da célula, em baixos níveis de luz, podem auxiliar a distribuição da luz limitada aos cloroplastos nas células do parênquima paliçádico, maximizando a captura da luz. Em contrapartida, em níveis elevados de luz, os cristais localizados na parte superior das células do parênquima paliçádico podem dissipar o excesso de luz (Franceschi, 2001; Kuo-Huang et al., 2007). Nesse sentido, cistólitos e drusas podem funcionar como dispersores de luz e reduzem

o gradiente de luz íngreme gerado por pigmentos fotossintéticos, permitindo que a folha use o fluxo de luz de forma mais eficiente (Gal et al., 2012).

REFERÊNCIAS

- Ahenkorah, Y., Halm, B.J., Appiah, M.R., Akrofi, G.S., Yirenkyi, J.E.K., 1987. Twenty Years' Results from a Shade and Fertilizer Trial on Amazon Cocoa (*Theobroma cacao*) in Ghana. *Exp. Agric.* 23, 31. doi:10.1017/S0014479700001101
- Almeida, A.-A.F. de, Valle, R.R., 2007. Ecophysiology of the cacao tree. *Brazilian J. Plant Physiol.* 19, 425–448. doi:10.1590/S1677-04202007000400011
- Alverson, W.S., Whitlock, B. a., Nyffeler, R., Bayer, C., Baum, D. a., 1999. Phylogeny of the core Malvales: Evidence from ndhF sequence data. *Am. J. Bot.* 86, 1474–1486. doi:10.2307/2656928
- Bélanger, R.R., Benhamou, N., Menzies, J.G., 2003. Cytological Evidence of an Active Role of Silicon in Wheat Resistance to Powdery Mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*). *Phytopathology* 93, 402–12. doi:10.1094/PHYTO.2003.93.4.402
- Braissant, O., Cailleau, G., 2004. Biologically induced mineralization in the tree *Milicia excelsa* (Moraceae): its causes and consequences to the environment. *Geobiology* 59–66. doi:10.1111/j.1472-4677.2004.00019.x
- Brosche, M., Strid, A., 2003. Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. *Physiol. Plant.* 117, 1–10. doi:10.1034/j.1399-3054.2003.1170101.x
- Cheesman, E.E., 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. *Trop. Agric.* 21, 144–159.
- Chen, J., Zhang, M., Eneji, A.E., Li, J., 2016. Influence of exogenous silicon on UV-B radiation-induced cyclobutane pyrimidine dimers in soybean leaves and its alleviation mechanism. *J. Plant Physiol.* 196–197, 20–27. doi:10.1016/j.jplph.2016.01.019
- Chiba, Y., Mitani, N., Yamaji, N., Ma, J.F., 2009. HvLsi1 is a silicon influx transporter in barley. *Plant J.* 57, 810–818. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03728.x
- Cuatrecasas, J., 1964. Cacao and its Allies A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Natl. Herb.* 35, 379–607.
- Czégény, G., Máтай, A., Hideg, É., 2016. UV-B effects on leaves-Oxidative stress and acclimation in controlled environments. *Plant Sci.* 248, 57–63. doi:10.1016/j.plantsci.2016.04.013
- Da Cunha, K.P. V, Do Nascimento, C.W.A., 2009. Silicon effects on metal tolerance and structural changes in Maize (*Zea mays* L.) grown on a cadmium and zinc enriched soil. *Water. Air. Soil Pollut.* 197, 323–330. doi:10.1007/s11270-008-9814-9
- Dayanandan, P., Kaufman, P.B., Franklin, C.I., 1983. Detection of Silica in Plants. *Am. J. Bot.* 70, 1079. doi:10.2307/2442818
- Deshmukh, R.K., Vivancos, J., Ramakrishnan, G., Guérin, V., Carpentier, G., Sonah, H., Labbé, C., Isenring, P., Belzile, F.J., Bélanger, R.R., 2015. A precise spacing between the NPA domains of aquaporins is essential for silicon permeability in plants. *Plant J.* 83, 489–500. doi:10.1111/tpj.12904

- Detmann, K., Araújo, W., Martins, S., Fernie, A.R., DaMatta, F., 2013. Metabolic alterations triggered by silicon nutrition: Is there a signaling role for silicon? *Plant Signal. Behav.* 8, e22523. doi:10.4161/psb.22523
- Dias, L.A. dos S., 2001. *Melhoramento genético do cacauzeiro*, 1st ed. FUNAPE, UFG, Viçosa.
- Di Wu, D., Hu, Q., Yan, Z., Chen, W., Yan, C., Huang, X., Zhang, J., Yang, P., Deng, H., Wang, J., Deng, X., Shi, Y., 2012. Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. *Nature* 484, 214–219. doi:10.1038/nature10931
- Epstein, E., Bloom, A.J., 2006. *Nutrição mineral de plantas : princípios e perspectivas*, 2nd ed. PLANTA, Londrina.
- Epstein, E., 2009. Silicon: Its manifold roles in plants. *Ann. Appl. Biol.* 155, 155–160. doi:10.1111/j.1744-7348.2009.00343.x
- Epstein, E., 1999. Silicon. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 641–664. doi:10.1146/annurev.arplant.50.1.641
- Ernst, W.H.O., Vis, R.D., Piccolo, F., 1995. Silicon in developing nuts of the sedge *Schoenus nigricans*. *J. Plant Physiol.* 146, 481–488. doi:10.1016/S0176-1617(11)82012-2
- Exley, C., 2015. A possible mechanism of biological silicification in plants. *Front. Plant Sci.* 6, 853. doi:10.3389/fpls.2015.00853
- FAO, 2014. Food and agriculture organization of the united Nations, Production quantities of Cocoa. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (accessed 3.11.17).
- Fauteux, F., Chain, F., Belzile, F., Menzies, J.G., Bélanger, R.R., 2006. The protective role of silicon in the *Arabidopsis*-powdery mildew pathosystem. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17554–9. doi:10.1073/pnas.0606330103
- Favory, J.J., Stec, A., Gruber, H., Rizzini, L., Oravec, A., Funk, M., Albert, A., Cloix, C., Jenkins, G.I., Oakeley, E.J., Seidlitz, H.K., Nagy, F., Ulm, R., 2009. Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *EMBO J* 28, 591–601. doi:10.1038/emboj.2009.4
- Flint, S.D., Caldwell, M.M., 1998. Solar UV-B and visible radiation in tropical forest gaps: Measurements partitioning direct and diffuse radiation. *Glob. Chang. Biol.* 4, 863–870. doi:10.1046/j.1365-2486.1998.00191.x
- Forster, P.M., Thompson, D.W.J., Baldwin, M.P., Chipperfield, M.P., Dameris, M., Haigh, J.D., Karoly, D.J., Kushner, P.J., Randel, W.J., Rosenlof, K.H., Seidel, D.J., Solomon, S., 2011. Stratospheric Changes and Climate, in: *Scientific Assessment of Ozone Depletion: 2010, Global Ozone Research and Monitoring Project–Report No. 52*. World Meteorological Organization, Geneva, Switzerland, p. 516.
- Franceschi, V., 2001. Calcium oxalate in plants. *Trends Plant Sci.* 6, 331. doi:10.1016/S1360-1385(01)02014-3
- Franceschi, V.R., Horner, H.T., 1980. Calcium oxalate crystals in plants. *Bot. Rev.* 46, 361–427. doi:10.1007/BF02860532

- Franceschi, V.R., Nakata, P.A., 2005. Calcium oxalate in plants: Formation and Function. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 41–71. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106
- Frohnmeier, H., Staiger, D., 2003. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiol.* 133, 1420–1428. doi:10.1104/pp.103.030049
- Gal, A., Brumfeld, V., Weiner, S., Addadi, L., Oron, D., 2012. Certain biominerals in leaves function as light scatterers. *Adv. Mater.* 24. doi:10.1002/adma.201104548
- Garcia, T.B., Potiguara, R.C. de V., Kikuchi, T.Y.S., Demarco, D., Aguiar-Dias, A.C.A. de, 2014. Leaf anatomical features of three *Theobroma* species (Malvaceae s.l.) native to the Brazilian Amazon. *Acta Amaz.* 44, 291–300. doi:10.1590/1809-4392201300653
- Garvie, L.A.J., 2006. Decay of cacti and carbon cycling. *Naturwissenschaften* 93, 114–118. doi:10.1007/s00114-005-0069-7
- Grégoire, C., Rémus-Borel, W., Vivancos, J., Labbé, C., Belzile, F., Bélanger, R.R., 2012. Discovery of a multigene family of aquaporin silicon transporters in the primitive plant *Equisetum arvense*. *Plant J.* 72, 320–330. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05082.x
- Guerriero, G., Hausman, J.-F., Legay, S., 2016. Silicon and the Plant Extracellular Matrix. *Front. Plant Sci.* 7, 1–9. doi:10.3389/fpls.2016.00463
- Haberlandt, G., 1914. *Physiological plant anatomy*, tr. by Montagu Drummond., 4th ed. MacMillan, London. doi:10.5962/bhl.title.28492
- He, H., Bleby, T.M., Veneklaas, E.J., Lambers, H., Kuo, J., 2012. Precipitation of calcium, magnesium, strontium and barium in tissues of four *Acacia* species (Leguminosae: Mimosoideae). *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0041563
- He, H., Veneklaas, E.J., Kuo, J., Lambers, H., 2014. Physiological and ecological significance of biomineralization in plants. *Trends Plant Sci.* 19, 166–174. doi:10.1016/j.tplants.2013.11.002
- Hideg, E., Jansen, M.A.K., Strid, A., 2013. UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends Plant Sci.* 18, 107–115. doi:10.1016/j.tplants.2012.09.003
- Hideg, É., Vass, I., 1996. UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes. *Plant Sci.* 115, 251–260. doi:10.1016/0168-9452(96)04364-6
- Hodson, M., Sangster, A.G., 1993. The Interaction Between Silicon and Aluminium in *Sorghum bicolor* (L.) Moench: Growth Analysis and X-ray Microanalysis. *Ann. Bot.* 72, 389–400. doi:10.1006/anbo.1993.1124
- Horner, H.T., Wanke, S., 2012. A comparison of leaf crystal macropatterns in the two sister genera *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). doi:10.3732/ajb.1200007
- Hossain, M.T., Soga, K., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., Fujii, S., Yamamoto, R., Hoson, T., 2007. Modification of chemical properties of cell walls by silicon and its role in regulation of the cell wall extensibility in oat leaves. *J. Plant Physiol.* 164, 385–393. doi:10.1016/j.jplph.2006.02.003

- Hunt, J.W., Dean, A.P., Webster, R.E., Johnson, G.N., Ennos, A.R., 2008. A Novel Mechanism by which Silica Defends Grasses Against Herbivory. *Ann. Bot.* 102, 653–656. doi:10.1093/aob/mcn130
- Inostroza-Blancheteau, C., Reyes-Díaz, M., Arellano, A., Latsague, M., Acevedo, P., Loyola, R., Arce-Johnson, P., Alberdi, M., 2014. Effects of UV-B radiation on anatomical characteristics, phenolic compounds and gene expression of the phenylpropanoid pathway in highbush blueberry leaves. *Plant Physiol. Biochem. PPB* 85, 85–95. doi:10.1016/j.plaphy.2014.10.015
- Jansen, M. a K., Gaba, V., Greenberg, B.M., 1998. Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci.* 3, 131–135. doi:10.1016/S1360-1385(98)01215-1
- Kataria, S., Jajoo, A., Guruprasad, K.N., 2014. Impact of increasing Ultraviolet-B (UV-B) radiation on photosynthetic processes. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 137, 55–66. doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.02.004
- Kuo-Huang, L.L., Ku, M.S.B., Franceschi, V.R., 2007. Correlations between calcium oxalate crystals and photosynthetic activities in palisade cells of shade-adapted *Peperomia glabella*. *Bot. Stud.* 48, 155–164.
- Lersten, N.R., Horner, H.T., 2011. Unique calcium oxalate “duplex” and “concretion” idioblasts in leaves of tribe Naucleaeae (Rubiaceae). *Am. J. Bot.* 98, 1–11. doi:10.3732/ajb.1000247
- Liakoura, V., Stefanou, M., Manetas, Y., Cholevas, C., Karabourniotis, G., 1997. Trichome density and its UV-B protective potential are affected by shading and leaf position on the canopy. *Environ. Exp. Bot.* 38, 223–229. doi:10.1016/S0098-8472(97)00005-1
- Liang, Y., Sun, W., Zhu, Y.G., Christie, P., 2007. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: A review. *Environ. Pollut.* 147, 422–428. doi:10.1016/j.envpol.2006.06.008
- Lidon, F.C., Ramalho, J.C., 2011. Impact of UV-B irradiation on photosynthetic performance and chloroplast membrane components in *Oryza sativa* L. *J. Photochem. Photobiol. B.* 104, 457–66. doi:10.1016/j.jphotobiol.2011.05.004
- Lidon, F.J.C., Reboredo, F.H., Leitão, A.E., Silva, M.M.A., Duarte, M.P., Ramalho, J.C. 2012. Impact of UV-B radiation on photosynthesis – an overview. *Emirates J. Food Agric.* 24, 546–556. doi:10.9755/ejfa.v24i6.14673
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas, *Medicina*. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Ma, J.F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y., Yano, M., 2006. A silicon transporter in rice. *Nature* 440, 688–691. doi:10.1038/nature04590
- Ma, J.F., Yamaji, N., 2015. A cooperative system of silicon transport in plants. *Trends Plant Sci.* 20, 435–442. doi:10.1016/j.tplants.2015.04.007
- Ma, J.F., Yamaji, N., 2006. Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends Plant Sci.* 11, 392–397. doi:10.1016/j.tplants.2006.06.007

- Madronich, S., McKenzie, R.L., Björn, L.O., Caldwell, M.M., 1998. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 46, 5–19. doi:10.1016/S1011-1344(98)00182-1
- Marita, J.M., Nienhuis, J., Pires, J.L., Aitken, W.M., 2001. Analysis of Genetic Diversity in with Emphasis on Witches' Broom Disease Resistance. *Crop Sci.* 41, 1305. doi:10.2135/cropsci2001.4141305x
- Massey, F.P., Ennos, A.R., Hartley, S.E., 2006. Silica in grasses as a defence against insect herbivores: Contrasting effects on folivores and a phloem feeder. *J. Anim. Ecol.* 75, 595–603. doi:10.1111/j.1365-2656.2006.01082.x
- Metcalf, C., Chalk, L., 1950. *Anatomy of the Dicotyledons Leaves, Stem, and Wood in relation to Taxonomy with notes on Economic Uses*, 1st ed. Clarendon Press, Oxford.
- Mitani, N., Ma, J.F., 2005. Uptake system of silicon in different plant species. *J Exp Bot.* 56, 1255–1261. doi:10.1093/jxb/eri121
- Mitani, N., Yamaji, N., Ma, J.F., 2009. Identification of maize silicon influx transporters. *Plant Cell Physiol.* 50, 5–12. doi:10.1093/pcp/pcn110
- Motamayor, J.C., Risterucci, A.M., Lopez, P.A., Ortiz, C.F., Moreno, A., Lanaud, C., 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity (Edinb).* 89, 380–386. doi:10.1038/sj.hdy.6800156
- Müller-Xing, R., Xing, Q., Goodrich, J., 2014. Footprints of the sun: memory of UV and light stress in plants. *Front. Plant Sci.* 5, 474. doi:10.3389/fpls.2014.00474
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249–279. doi:10.1146/annurev.arplant.49.1.249
- Padi, B., Owusus, G.K., 1998. Towards an Integrated Pest Management for Sustainable Cocoa Production in Ghana. Pap. from Work. held Panama, 30 March - 2 April. 1998.
- Paul, N.D., Gwynn-Jones, D., 2003. Ecological roles of solar UV radiation: Towards an integrated approach. *Trends Ecol. Evol.* doi:10.1016/S0169-5347(02)00014-9
- Piasentin, F.B., Saito, C.H., 2014. Os diferentes métodos de cultivo de cacau no sudeste da Bahia, Brasil: Aspectos históricos e percepções. *Bol. do Mus. Para. Emilio Goeldi Ciências Humanas* 9, 61–78. doi:10.1590/S1981-81222014000100005
- Prabhu, A.S., Barbosa Filho, M.P., Filippi, M.C., Datnoff, L.E., Snyder, G.H., 2001. Chapter 18 Silicon from rice disease control perspective in Brazil, in: *Studies in Plant Science*. pp. 293–311. doi:10.1016/S0928-3420(01)80022-7
- Raven, J.A., Giordano, M., 2009. Biomineralization by photosynthetic organisms: Evidence of coevolution of the organisms and their environment? *Geobiology* 7, 140–154. doi:10.1111/j.1472-4669.2008.00181.x
- Ravindran, K.C., Indrajith, a, Pratheesh, P. V, Sanjiviraja, K., Balakrishnan, V., 2010. Effect of ultraviolet-B radiation on biochemical and antioxidant defence system in *Indigofera tinctoria* L . seedlings. *Int. J. Eng. Sci. Technol.* 2, 226–232. doi:10.4314/ijest.v2i5.60154

- Reynolds, J.J.H., Lambin, X., Massey, F.P., Reidinger, S., Sherratt, J.A., Smith, M.J., White, A., Hartley, S.E., 2012. Delayed induced silica defences in grasses and their potential for destabilising herbivore population dynamics. *Oecologia* 170, 445–456. doi:10.1007/s00442-012-2326-8
- Sangster, A.G., Hodson, M.J., Tubb, H.J., 2001. Chapter 5 Silicon deposition in higher plants. *Stud. Plant Sci.* 8, 85–113. doi:10.1016/S0928-3420(01)80009-4
- Sarret, G., Isaure, M., Marcus, M.A., Harada, E., Choi, Y., Pairis, S., Fakra, S., Manceau, A., 2007. Chemical forms of calcium in Ca, Zn- and Ca, Cd- containing grains excreted by tobacco trichomes. *Can. J. Chem.* 746, 738–746. doi:10.1139/V07-076
- Savant, N.K., Korndorfer, G.H., Datnoff, L.E., Snyder, G.H., 1999. Silicon nutrition and sugarcane production: A review. *J. Plant Nutr.* 22, 1853–1903. doi:10.1080/01904169909365761
- Shen, X., Li, Z., Duan, L., Eneji, A.E., Li, J., 2014. Silicon Mitigates Ultraviolet-B Radiation Stress on Soybean by Enhancing Chlorophyll and Photosynthesis and Reducing Transpiration. *J. Plant Nutr.* 37, 837–849. doi:10.1080/01904167.2013.873459
- Shetty, R., Fretté, X., Jensen, B., Shetty, N.P., Jensen, J.D., Jørgensen, H.J.L., Newman, M.-A., Christensen, L.P., 2011. Silicon-induced changes in antifungal phenolic acids, flavonoids, and key phenylpropanoid pathway genes during the interaction between miniature roses and the biotrophic pathogen *Podosphaera pannosa*. *Plant Physiol.* 157, 2194–205. doi:10.1104/pp.111.185215
- Silva, R.J.F., Aguiar-Dias, A.C.A. de, Mendonça, M.S. de, 2014. Rosetas e concrecências cristalinas silicificadas em *Piper* (Piperaceae): registros inéditos de macropadrões. *Acta Amaz.* 44, 435–446. doi:10.1590/1809-4392201305553
- Smirnoff, N., 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125, 27–58. doi:10.1111/j.1469-8137.1993.tb03863.x
- Sounigo, O., Lachenaud, P., Bastide, P., Cilas, C., 'goran, J.N., Lanaud, C., 2003. Assessment of the value of doubled haploids as progenitors in cocoa (*Theobroma cacao* L.) breeding. *J. Appl. Genet* 44, 339–353.
- Stracke, R., Favory, J.J., Gruber, H., Bartelniewoehner, L., Bartels, S., Binkert, M., Funk, M., Weisshaar, B., Ulm, R., 2010. The Arabidopsis bZIP transcription factor HY5 regulates expression of the PFG1/MYB12 gene in response to light and ultraviolet-B radiation. *Plant, Cell Environ.* 33, 88–103. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02061.x
- Taylor, M.G., Simkiss, K., Greaves, G.N., Okazaki, M., Mann, S., 1993. An x-ray absorption spectroscopy study of the structure and transformation of amorphous calcium carbonate from plant cystoliths. *Proc. R. Soc. London Ser. B-Biological Sci.* 252, 75–80. doi:10.1098/rspb.1993.0048
- Thomas, E., van Zonneveld, M., Loo, J., Hodgkin, T., Galluzzi, G., van Etten, J., 2012. Present Spatial Diversity Patterns of *Theobroma cacao* L. in the Neotropics Reflect Genetic Differentiation in Pleistocene Refugia Followed by Human-Influenced Dispersal. *PLoS One* 7, e47676. doi:10.1371/journal.pone.0047676
- Tsutsui, O., Sakamoto, R., Obayashi, M., Yamakawa, S., Handa, T., Nishio-hamane, D., 2016. Light and SEM observation of opal phytoliths in the mulberry leaf. *Flora* 218, 44–

50. doi:10.1016/j.flora.2015.11.006

- Wang, S., Liu, P., Chen, D., Yin, L., Li, H., Deng, X., 2015. Silicon enhanced salt tolerance by improving the root water uptake and decreasing the ion toxicity in cucumber. *Front. Plant Sci.* 6, 759. doi:10.3389/fpls.2015.00759
- Wang, Y., Stass, A., Horst, W.J., 2004. Apoplastic binding of aluminum is involved in silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in maize. *Plant Physiol.* 136, 3762–70. doi:10.1104/pp.104.045005
- Weiner, S., Dove, P.M., 2003. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Rev. Mineral. Geochemistry* 54, 1–29. doi:10.2113/0540001
- Wu, J., Guo, J., Hu, Y., Gong, H., 2015. Distinct physiological responses of tomato and cucumber plants in silicon-mediated alleviation of cadmium stress. *Front. Plant Sci.* 6, 453. doi:10.3389/fpls.2015.00453
- Wu, Q., Su, N., Zhang, X., Liu, Y., Cui, J., Liang, Y., 2016. Hydrogen peroxide, nitric oxide and UV RESISTANCE LOCUS8 interact to mediate UV-B-induced anthocyanin biosynthesis in radish sprouts. *Sci. Rep.* 6, 29164. doi:10.1038/srep29164
- Ye, M., Song, Y., Long, J., Wang, R., Baerson, S.R., Pan, Z., Zhu-Salzman, K., Xie, J., Cai, K., Luo, S., Zeng, R., 2013. Priming of jasmonate-mediated antiherbivore defense responses in rice by silicon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E3631-9. doi:10.1073/pnas.1305848110
- Zanetti, L.V., Rozindo, C., Milanez, D., Gama, V.N., Milanez, C.R.D., Gama, V.N., Aguilar, M.A.G., Souza, C.A.S., Campostrini, E., Ferraz, T.M., Figueiredo, F.A.M.M. de A., 2016. Leaf application of silicon in young cacao plants subjected to water deficit. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 51, 215–223. doi:10.1590/S0100-204X2016000300003

CAPÍTULO 1

Varição intraespecífica das características morfofisiológicas e bioquímicas de cacauero à radiação UV-B

Resumo

Buscando compreender os efeitos da UV-B sobre o cacauero, esse trabalho avaliou o crescimento, anatomia foliar, fisiologia e bioquímica de mudas de dois genótipos (Catongo e PH16) com folhas de coloração antociânica contrastante. As plantas foram mantidas durante 42 dias em câmara de crescimento, com condições controladas e receberam $3 \text{ KJ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ de UV-B. Ambos os genótipos apresentaram danos foliares sob radiação UV-B, contudo, o genótipo PH16 mostrou um maior acúmulo de biomassa no caule e raiz. A espessura do limbo, também, foi maior nas plantas de PH16, que tiveram aumento na espessura do parênquima esponjoso e redução na densidade estomática. Já, plantas de Catongo apresentaram parênquima paliçádico mais espesso, sem alteração na densidade estomática. Os compostos absorventes de UV-B, antocianinas, flavonoides e fenóis, foram maiores em ambos os genótipos, enquanto, os pigmentos clorofilianos elevaram-se apenas em Catongo. A fotossíntese foi maior em ambos genótipos expostos à UV-B, já a respiração noturna foi menor nas plantas de PH16 e maior nas de Catongo. O teor foliar de carboidratos totais e redutores foi maior nas plantas sob UV-B. Catongo mostrou redução para a concentração de mucilagem e aumento de lignina, sendo o oposto observado para PH16. O aumento da concentração de peróxido de hidrogênio e das atividades das enzimas SOD e CAT foi observado apenas no genótipo Catongo. Os dados mostraram que Catongo apresentou alto custo energético com as alterações metabólicas ocasionadas pela UV-B, não lhe permitindo acúmulo de biomassa. Em contrapartida, o genótipo PH16 demonstrou tolerância à radiação UV-B, apresentando maior eficiência energética e um elevado ganho de massa.

Palavras-chave: anatomia, antioxidantes, cacau, carboidratos, fotossíntese, ultravioleta-B.

1 Introdução

As plantas necessitam de luz solar e, inevitavelmente, estão expostas a radiação ultravioleta-B (UV-B). Embora a radiação UV-B seja uma pequena fração da radiação UV que chega à superfície terrestre, sabe-se que mesmo aumentos pequenos da sua incidência podem causar danos biológicos (Jansen et al., 1998).

A preocupação com o progressivo aumento dos níveis de UV-B tem despertado o interesse de muitos pesquisadores sobre suas possíveis consequências no crescimento das plantas. Para exemplificar, os níveis de UV-B em 2013 nas áreas cultiváveis da superfície da Terra, no período da primavera, estavam entre 2 e 12 kJ m⁻² por dia, o que corresponde a um aumento de 6-14% da radiação UV-B em relação aos níveis anteriores ao ano de 1980 (Forster et al., 2011; Kataria et al., 2014).

Os efeitos fotomorfológicos induzidos pela UV-B nas plantas incluem reduções de altura, número e tamanho de folhas, raízes e da biomassa total (Kataria et al., 2014). Além disso, é observado enrolamento foliar, clorose e necrose dos tecidos, alterações na anatomia com aumento da espessura foliar, degradação de pigmentos fotossintéticos e síntese de compostos fenólicos tais como, antocianinas e flavonoides (Inostroza-Blancheteau et al., 2014; Jansen et al., 1998; Lidon e Ramalho, 2011; Ravindran et al., 2010).

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie de grande importância comercial, sendo suas sementes a matéria-prima para a fabricação do chocolate, além de outros produtos para indústria farmacêutica e cosmética (Almeida e Valle, 2007). Seu cultivo é predominante em áreas sombreadas, contudo, a prática do plantio em pleno sol tem ganhado destaque devido à vantagem de maior produtividade, apesar da menor longevidade e alto custo de manutenção da plantação (Piasentin e Saito, 2014).

Uma característica comum na grande maioria dos cacauieiros é a coloração antociânica de suas brotações, apesar de algumas exceções naturais existirem (Figueira e Cascardo, 2001). As antocianinas são um grupo de pigmentos que tem uma importante função na absorção da UV-B (Gould et al., 2000). O genótipo PH16 possui folhas jovens avermelhadas, coloração característica das antocianinas, enquanto, que o genótipo Catongo caracteriza-se pela ausência de coloração antociânica em suas folhas jovens que são verde-claros.

Hipotetizou-se que genótipos de cacauieiro com folhas jovens em expansão, de coloração antociânica, poderiam apresentar maior tolerância à UV-B que àqueles sem essa coloração. Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da radiação UV-B no crescimento e anatomia foliar, baseando-se em aspectos fisiológicos e bioquímicos de mudas

de dois genótipos (Catongo e PH16) de cacauero com coloração antociânica foliar contrastante.

2 Material e métodos

2.1 Material vegetal e condições de crescimento

Mudas de cacauero (*Theobroma cacao* L.) de dois genótipos, Catongo e PH16, foram produzidas a partir de sementes coletadas de um mesmo fruto de plantas clonais isoladas e localizadas na Estação Experimental Filogônio Peixoto (ESFIP) em Linhares - ES, órgão de pesquisa da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC). As sementes foram germinadas em água e, após três dias, quando se verificou a protrusão da raiz primária, foram transferidas para tubetes de 290 mL com substrato comercial Forth[®] e adubadas a cada 15 dias com solução nutritiva de Hogland (pH 6,2) (Hoagland e Arnon, 1950). As plantas foram irrigadas diariamente até 80% da capacidade de campo do substrato.

O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado, sendo conduzido em câmara de crescimento (Shellab Modelo LI15, Oregon, EUA) com fotoperíodo de 12 horas, radiação fotossinteticamente ativa de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionadas com quatro lâmpadas de luz branca de 32 W (GE - F32T8/SP41/ECO), temperatura constante de 27 °C e umidade relativa de 60%.

Aos 55 dias de idade das plantas, iniciou-se a exposição à radiação UV com duas lâmpadas especiais (Sankyo Denki - G15T8E, Kanagawa, Japan) com emissão característica na faixa de 280–360 nm (pico em 306 nm, UV-B). As lâmpadas foram dispostas a 30 cm do ápice das plantas e periodicamente ajustadas para que fosse mantida a mesma quantidade de radiação UV-B cuja medição foi realizada com medidor de UV (Spectrum Technologies, Illinois, USA). Neste caso, foi padronizado em $5,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 15 minutos diários, durante 42 dias, produzindo, aproximadamente, $3 \text{ KJ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ de UV-B. Ao final dos 42 dias de exposição, as análises de fotossíntese e crescimento foram realizadas e, as folhas jovens totalmente expandidas, localizadas no segundo nó abaixo do ápice, foram particionadas para as análises anatômicas e bioquímicas. As amostras foliares para a análises bioquímicas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas.

2.2 Análises de crescimento

Ao final do experimento foram realizadas as medidas da altura, diâmetro do caule, número de folhas e de estípulas do ápice caulinar. A área foliar foi determinada em um medidor de área (LI-COR Modelo 3100, Lincoln, Nebraska, USA). Os órgãos vegetativos foram pesados para a determinação das massas frescas, sendo posteriormente secos em estufa a 60 °C, até atingirem massa constante. A partir dos dados obtidos foram determinados, conforme Hunt (1982), a área foliar específica (AFE = área foliar total/massa seca foliar total), área foliar total (AFT), razão de área foliar (RAF = AF/MST), razão raiz:parte aérea (R:PA). Onde, MF = massa foliar, MC = massa caulinar, MR = massa radicular, AF = área foliar e MST = massa seca total.

2.3 Anatomia foliar

As análises da anatomia foliar foram realizadas em amostras do terço médio de folhas totalmente expandidas, localizadas no segundo nó a partir do ápice. As amostras foliares foram fixadas em FAA 50 (formaldeído, ácido acético e etanol 50%) por 48 horas (Johansen, 1940) e, posteriormente, conservadas em etanol 70%. Foram realizadas secções transversais com auxílio de um micrótomo de mesa, as quais foram submetidas ao reagente floroglucinol acidificado com cloreto de cálcio (Herr, 1992) para evidenciar paredes lignificadas permitindo melhor distinção de células e tecidos. A análise anatômica quantitativa foi realizada por meio de medições da espessura do limbo, das faces adaxial e abaxial da epiderme, e dos parênquimas paliçádico e esponjoso. A densidade estomática (número de estômatos por mm²) da face abaxial das folhas foi determinada pela técnica de impressão epidérmica em lâmina de vidro, utilizando-se adesivo instantâneo (Super Bonder[®]). As fotomicrografias foram obtidas com câmera fotográfica digital (Nikon digital DS-Ri1, unidade digital DS-U3, Nikon Tec. Corporation, Tokyo, Japan) acoplada ao microscópio óptico (Nikon Eclipse 50i, Nikon Tec. Corporation, Tokyo, Japan) e a um microcomputador com software de captura de imagem (Nikon NIS-Elements, Nikon Tec. Corporation, Tokyo, Japan). As análises quantitativas das espessuras dos tecidos e da densidade estomática, foram realizadas com auxílio do software ImagJ1 (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.4 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

As medições de trocas gasosas foram realizadas nas folhas totalmente expandidas do segundo nó, após duas horas do início do período luminoso, utilizando-se um analisador de gás infravermelho (LI-6400XT LI-COR, Lincoln, USA) acoplado com fonte de luz

vermelho/azul (LI-6400-02B LED) e com fluorômetro acoplado (LI-6400-40, LI-COR Inc.). O sistema foi mantido constante sob irradiância de $500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, valor definido previamente atrav\u00e9s de curvas de luz, $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$ e temperatura de $27 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo obtidos os dados de assimila\u00e7\u00e3o l\u00edquida de CO_2 (A), condut\u00e2ncia estom\u00e1tica (g_s), concentra\u00e7\u00e3o subestom\u00e1tica de CO_2 (C_i) e taxa de transpira\u00e7\u00e3o (E). A efici\u00eancia intr\u00ednseca de uso da \u00e1gua foi determinada atrav\u00e9s da raz\u00e3o A/g_s . Com o mesmo equipamento e nas mesmas folhas, tamb\u00e9m foi determinada a taxa respirat\u00f3ria no escuro (R_d), que se iniciou ap\u00f3s duas horas do t\u00e9rmino do per\u00edodo luminoso.

A determina\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia da clorofila a foi realizada com um fluor\u00f4metro acoplado ao IRGA. As folhas previamente adaptadas ao escuro, durante 30 minutos, foram inicialmente expostas a um fraco pulso de luz vermelho-distante ($0,03 \mu\text{mol}$ de f\u00f3tons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para a determina\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia inicial (F_0). Em seguida, um pulso de luz saturante, com irradi\u00e2ncia de $8000 \mu\text{mol}$ de f\u00f3tons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e dura\u00e7\u00e3o de $0,8 \text{ s}$ foi aplicado para estimar a fluoresc\u00eancia m\u00e1xima emitida (F_m). Com base nos valores de F_0 e F_m , calculou-se o rendimento fotoqu\u00edmico m\u00e1ximo do fotossistema II (FSII) $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (Butler, 1978).

Ap\u00f3s os registros dos par\u00e2metros de trocas gasosas, aferiu-se o rendimento da fluoresc\u00eancia no estado estacion\u00e1rio (F_s), ap\u00f3s o qual, um pulso de luz act\u00ednia saturante de $8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com dura\u00e7\u00e3o de $0,8 \text{ s}$ foi aplicado para a obten\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia m\u00e1xima da clorofila adaptada a luz (F_m'). Foi ent\u00e3o desligada a luz act\u00ednia e aplicou-se uma luz na faixa do vermelho distante de $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para obten\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia inicial adaptada a luz (F_0'). Em posse desses dados estimou-se os coeficientes de extin\u00e7\u00e3o fotoqu\u00edmico [$q_p = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0)$] e n\u00e3o-fotoqu\u00edmico [$q_N = (F_m - F_m')/(F_m - F_0')$], e a efici\u00eancia de captura de energia de excita\u00e7\u00e3o pelos centros de rea\u00e7\u00e3o abertos do FSII ($F_v'/F_m' = (F_m' - F_0')/F_m'$) (Logan et al., 2007). A propor\u00e7\u00e3o de luz absorvida pelas clorofilas associadas ao FSII, a qual \u00e9 utilizada na etapa fotoqu\u00edmica da fotoss\u00edntese, foi expressa como $\phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_s)/F_m'$ (Genty et al., 1989). A taxa aparente de transporte de el\u00e9trons (ETR), foi calculado segundo Loriaux et al. (2013), conforme a equa\u00e7\u00e3o $\text{ETR} = \phi_{\text{PSII}} \cdot \beta \cdot \alpha \cdot \text{DFFF}$, em que β \u00e9 o fator que leva em considera\u00e7\u00e3o o particionamento da energia luminosa entre os dois fotossistemas e α \u00e9 a absorv\u00eancia foliar, e DFFF \u00e9 definida como a densidade de fluxo de f\u00f3tons fotossint\u00e9ticos.

2.5 Extra\u00e7\u00e3o e determina\u00e7\u00e3o de pigmentos cloroplast\u00eddicos, compostos absorventes de UV-B e carboidratos sol\u00faveis

Para a determina\u00e7\u00e3o do teor dos pigmentos cloroplast\u00eddicos (clorofilas a e b , e caroten\u00f3ides), dos compostos absorventes de UV-B (antocianinas, flavonoides e fen\u00f3is totais)

e dos carboidratos solúveis (carboidratos totais solúveis e sacarose), um extrato único foi preparado a partir de 18 mg de tecido foliar liofilizado que foi macerado em gral de porcelana com 15 mL de etanol 95%, a 4 °C. O extrato foi mantido por 24 h a 8 °C, no escuro e com agitação constante sobre uma mesa agitadora. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 1450 x g, durante 20 min, a 4 °C, e o sobrenadante coletado para as análises.

Para a quantificação das clorofilas e carotenoides o extrato foi lido em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) nos comprimentos de onda 470, 648 e 664 nm. As concentrações dos pigmentos foram determinadas segundo as equações de Lichtenthaler e Buschmann (2001): Clorofila *a* = $13,36.A_{664} - 5,19.A_{648}$; Clorofila *b* = $27,43.A_{648} - 8,12.A_{664}$; Clorofila Total = Clorofila *a* + Clorofila *b*; Carotenoides = $(1000.A_{470} - 2,13.clorofila\ a - 97,64.clorofila\ b)/209$. Onde: A_{470} = absorvância a 470 nm; A_{664} = absorvância a 664 nm; A_{648} = absorvância a 648 nm. Os resultados foram apresentados em mg por grama de massa seca (mg g⁻¹ MS).

O teor de antocianinas nas folhas foi realizada de acordo com o método de Beggs e Wellmann (1994), com modificações. O extrato etanólico foi misturado com HCl (100:1) e mantido no escuro a 4 °C, por 24 h, com agitações esporádicas. As leituras foram aferidas a 535 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). O teor de antocianina foi expresso em absorvância a 535 nm por grama de massa seca ($A_{535} g^{-1}$ MS).

O teor de flavonoides totais foi estimado pelo método colorimétrico com cloreto de alumínio baseado em Park et al. (1998), com modificações. A mistura de reação consistiu de 500 µL do extrato etanólico, 100 µL cloreto de alumínio (10%), 100 µL de acetato de potássio (1M) e 4,3 mL de água destilada. Após 30 min de reação a 25 °C foi determinada a absorvância da amostra a 428 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Como padrão de flavonoides foi usada quercetina para a curva de calibração (0 a 100 µg/mL). Os resultados da concentração de flavonoides foram expressos em mg equivalentes de quercetina por g de massa seca (mg quercetina g⁻¹ MS).

A determinação do teor de fenólicos totais nos extratos alcoólicos foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, segundo metodologia proposta por Singleton e Rossi (1965), com modificações. A reação consistiu na mistura de 200 µL do extrato etanólico com 200 µL do reagente Folin-Ciocalteu, em agitação. Depois de 4 min, à temperatura de 25 °C, 1 mL de Na₂CO₃ (15%) foi adicionado. Após 2 horas, a absorvância foi medida a 760 nm em um espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Realizou-se uma curva de calibração utilizando-se ácido gálico como padrão (de 0 a 60 µg

mL⁻¹ de ácido gálico) e os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama de massa seca (mg ác. Gálico g⁻¹ MS).

A quantificação de carboidratos totais solúveis seguiu o método fenol-sulfúrico conforme Dubois et al. (1956), que quantifica os carboidratos redutores mais a sacarose. Para isso, utilizou-se uma alíquota de 500 µL de extrato etanólico, 500 µL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico. As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), a 490 nm. Realizou-se uma curva de calibração utilizando glicose como padrão (0 a 40 µg mL⁻¹) e os resultados foram expressos em mg de glicose por grama de massa seca (mg glicose g⁻¹ MS).

A dosagem do teor de sacarose baseou-se no método da antrona, que degrada os carboidratos redutores mediante a ação do hidróxido de potássio (Riazi et al., 1985). Para isso, utilizou-se alíquota de 250 µL de extrato etanólico com 100 µL de solução de KOH 5,4 N, por 10 minutos, a 100 °C. Posteriormente, acrescentou-se 3,0 mL de solução de antrona que permaneceu por 5 minutos, a 100 °C. Após o resfriamento, as amostras foram lidas a 620 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Um padrão de sacarose foi usado para a curva de calibração (0 a 5 µg mL⁻¹). Os resultados da concentração de sacarose foram expressos em mg de sacarose por g de massa seca (mg sacarose g⁻¹ MS).

A estimativa do teor de carboidratos redutores em cada amostra foi obtida subtraindo-se os valores dos carboidratos solúveis totais dos valores obtidos para a sacarose (Chaves Filho e Stacciarini-Seraphin, 2001).

2.6 Teores de lignina e mucilagem

A extração e quantificação de ligninas baseou-se no método descrito por Dos Santos et al. (2008). Para isso, amostras de 0,05g de folhas secas, moídas em moinho de bolas (TE-350, Tecnal, BR), foram homogenizada em 5 mL de Tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 em tubo de centrífuga de 15 mL. O precipitado foi centrifugado (2500 x g, 4 minutos) e lavado por meio de agitação e centrifugação sucessivas, como segue: duas vezes com tampão de fosfato de pH 7,0 (5 ml); três vezes com 1% (v / v) de Triton X-100 em tampão fosfato pH 7,0 (5 mL); duas vezes com 1 M de NaCl em tampão Fosfato pH 7,0 (5 mL); duas vezes com água destilada (5 ml) e duas vezes com acetona (5 mL). O precipitado foi seco em estufa 60 °C por 24 h e arrefeceu-se num dessecador de vácuo. A massa seca foi definida como uma fração da parede celular livre de proteínas. Além disso, todo o tecido seco sem proteína foi transferido para um tubo de centrífuga com tampa de rosca contendo a mistura reacional (1,2

ml de ácido tioglicólico mais 6 ml de HCl 2 M) e aquecido a 95 °C por 4 h. Após arrefecimento à temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada (2500 x g, 4 min) e o sobrenadante foi descartado. O sedimento contendo ácido lignina-tioglicólico complexo (LTGA) foi lavado três vezes com água destilada (5 ml) e o LTGA extraído em NaOH 0,5 M (6 ml) por agitação a 30 °C por 18 h a 115 oscilações por minuto. Após centrifugação (2500 x g, 5 min), o sobrenadante foi guardado. O sedimento foi lavado novamente com NaOH 0,5 M (3 ml) e misturou-se com o sobrenadante obtido anteriormente. Os extratos alcalinos combinados foram acidificados com HCl concentrado (1,8 ml). Após precipitação a 0 °C por 4 h, LTGA foi recuperado por centrifugação (2500 x g, 4 min) e lavou-se duas vezes com água destilada (10 ml). O sedimento foi seco a 60 °C por 48 h sendo posteriormente, dissolvido em 10 mL de NaOH 0,5 M. Uma alíquota de 250 µL desse extrato foi diluída com 1500 µL de NaOH 0,5 M e lido em espectrofotômetro a 280 nm. Realizou-se uma curva de calibração utilizando-se lignina como padrão (0 a 50 µg mL⁻¹) e os resultados foram expressos em mg de lignina por grama de massa seca (mg lignina g⁻¹ MS).

A extração da mucilagem foi baseada no método descrito por Edmond Ghanem et al. (2010), com modificações. Amostras foliares foram imersas em álcool etílico absoluto até a completa despigmentação, sendo posteriormente, secas e moídas em um moinho de bolas. Os polissacarídeos solúveis em água foram extraídos a partir de 100 mg desse material, em 3 ml de água. Os extratos foram agitados e colocados em um banho de ultrassom a 35 °C, durante 15 minutos, sendo posteriormente, agitados durante 2 h num agitador horizontal. Posteriormente, o extrato foi centrifugado (1400 x g, 5 min) e o sobrenadante com a mucilagem armazenado a 4 °C. O precipitado foi submetido mais duas vezes ao procedimento inicial, e os sobrenadantes aquosos combinados. Adicionou-se à solução de mucilagem, 27 mL de etanol 95% para obtenção de um precipitado (24 h, 4 °C) o qual foi separado por centrifugação (1400 x g, 5 min) e o sobrenadante etanólico descartado. O precipitado contendo a mucilagem foi lavado com etanol (três vezes) e seco a vácuo. Na sequência, realizou-se a pesagem da mucilagem seca.

2.7 Extração e atividade enzimática

Para a extração das enzimas antioxidantes, 50 mg do tecido foliar liofilizado foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,8), EDTANa₂ 0,1 mM, ácido ascórbico 10 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v). As extrações foram realizadas em almofariz e pistilo com nitrogênio líquido e o homogeneizado centrifugado a 12000 x g

durante 15 min, a 4 °C. Utilizou-se o sobrenadante para os ensaios das atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX).

A atividade da SOD foi baseada no método descrito por (Giannopolitis e Ries, 1977). O meio de reação final de 3 mL continha tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,5), metionina 13 mM, riboflavina 2 µM, EDTANa₂ 0,1 mM, azul nitro tetrazólio (NBT) 75 µM e 50 µL do extrato enzimático. A reação foi iniciada em uma câmara de fotorredução equipada com uma lâmpada fluorescente branca (25 W), a 25 °C por 10 min. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para resultar numa inibição de 50% da taxa de redução de NBT medida a 560 nm, sendo expressa por g de massa seca (unidade SOD g⁻¹ MS).

A atividade da CAT foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático, a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0) e H₂O₂ 10 mM (Aebi, 1984). O decréscimo na absorbância medido a 240 nm foi monitorado durante 3 min, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 mol⁻¹ L cm⁻¹ e expressa em µmol de H₂O₂ min⁻¹ g⁻¹ MS.

Determinou-se a atividade de APX baseado no método descrito por Nakano e Asada (1981). Uma alíquota de 100 µL do extrato enzimático foi misturada com 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0), EDTANa₂ 0,1 mM, ácido ascórbico 0,5 mM. A reação foi iniciada com a adição de H₂O₂ 0,2 mM e o decaimento da absorbância a 290 nm foi monitorado, durante 3 min, a 25 °C. O cálculo da atividade de APX foi feito com base no coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ e a atividade enzimática foi expressa em µmol ascorbato min⁻¹ g⁻¹ MS.

2.8 Extração e quantificação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malonaldeído (MDA)

Os extratos para análise dos teores de H₂O₂ e MDA foram obtidos a partir de 40 mg de tecido foliar liofilizado, triturados em nitrogênio líquido acrescido de PVPP (20%) e homogeneizados em 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 10.000 x g a 4 °C por 10 min, e o sobrenadante utilizado para as reações de quantificação das substâncias.

O teor de H₂O₂ foi baseado em Alexieva et al. (2001). O meio de reação consistiu-se de 0,4 mL do sobrenadante do extrato, 0,4 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e 1,6 mL de iodeto de potássio (1 M). A reação desenvolveu-se por 1 h no escuro e a absorbância lida em 390 nm. A concentração de H₂O₂ foi calculada através de curva padrão de 0 a 250 µM de H₂O₂.

O teor de MDA foi utilizado para determinar o nível de danos nas membranas. O método utilizado foi de acordo com Buege e Aust (1978), baseado na reação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Uma alíquota de 0,5 mL do extrato foi adicionada a 1,5 mL do meio de reação contendo TBA 0,5% (m/v) e TCA 10% (m/v), reagindo a 95 °C, por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e centrifugada a 10.000 x g, durante 10 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, a 440, 532 e 600 nm e o teor de MDA calculado segundo Du e Bramlage (1992). A concentração de MDA foi expressa em nmol equivalentes de MDA por grama de massa seca (nmol MDA g⁻¹ MS).

2.9 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos foram comparadas por meio do teste *F*, considerando diferenças significativas para valores de $P \leq 0,05$. As análises foram realizadas utilizando-se o software InfoStat (Versão 2011, Grupo InfoStat, FCA, Universidade Nacional de Córdoba, Argentina).

3 Resultados

Ambos os genótipos, sob radiação UV-B, apresentaram alterações foliares como necrose, distorção foliar e bronzeamento, e ainda, abscisão de folhas recém-emergidas (Figura 1). Contudo, essas alterações foram mais acentuadas em plantas de Catongo (Figura 1 A e B).

Os genótipos Catongo e PH16 também mostraram redução significativa do número de folhas (31% e 17%, respectivamente) e aumento do número de estípulas (75% e 41%, respectivamente) (Tabela 1 e figuras 1C e 1F). O genótipo Catongo apresentou também redução da área foliar total (52%) e unitária (20%) (Tabela 1). Para o genótipo PH16, a UV-B proporcionou incremento do diâmetro do caule (17%), da massa seca total (63%) e da razão raiz parte aérea (34%), sendo observada também redução da área foliar específica (37%) (Tabela 1).

A radiação UV-B aumentou a massa das raízes (23%), caules (24 %) e reduziu a massa foliar (58%) do genótipo PH16 (Figura 2). Para o genótipo Catongo, com exceção das raízes, observaram-se efeitos semelhantes nos caules (18%) e folhas (40%) (Figura 2).

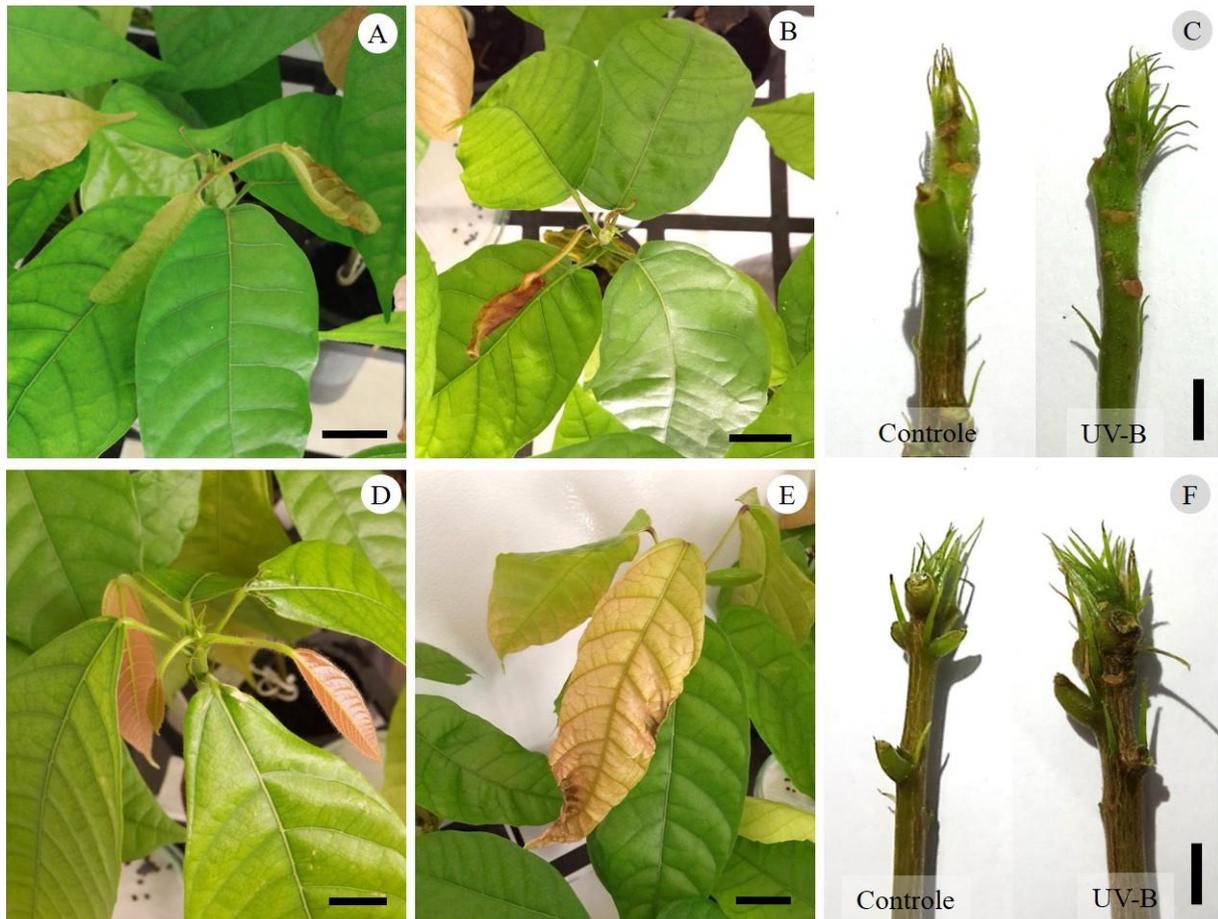


Figura 1 – Efeitos da radiação UV-B em mudas de cacauero. (A-C) Genótipo Catongo. (A) Necrose e distorção foliar. (B) Abscisão de folhas recém-emergidas. (C) Alteração de número de estípulas. (D-F) Genótipo PH16. (D) Folhas jovens em expansão mostrando poucas alterações visuais. (E) Necrose e distorção em folha jovem expandida. (F) Alteração de número de estípulas. Barras iguais: 2 cm (A, B, D e E) e 1 cm (C e F).

Tabela 1 – Efeitos da radiação UV-B sobre a altura, diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF), número de estípulas (NE), área foliar total (AFT), área foliar unitária (AFU), área foliar específica (AFE), massa seca total (MST) e razão raiz/parte aérea (R:PA) dos genótipos de cacauero Catongo e PH16.

Variáveis	Catongo		PH16	
	Controle	UV-B	Controle	UV-B
Altura (cm)	17,0 ± 0,88	17,8 ± 0,67	19,24 ± 1,13	19,7 ± 1,72
DC (mm)	6,01 ± 0,16	5,97 ± 0,03	6,01 ± 0,33	7,05 ± 0,22*
NF	6,80 ± 0,58*	5,20 ± 0,37	7,00 ± 0,32*	5,80 ± 0,20
NE	6,60 ± 0,51	11,8 ± 0,37*	10,0 ± 0,32	14,1 ± 0,34*
AFT (cm ²)	297 ± 22,5*	195 ± 16,5	319 ± 46,1	234 ± 16,5
AFU (cm ²)	44,1 ± 2,05*	36,9 ± 0,90	45,6 ± 6,37	40,3 ± 2,20
AFE (cm ² g ⁻¹)	428 ± 13,2	421 ± 9,12	428 ± 44,3*	313 ± 21,4
MST (g)	1,97 ± 0,10	1,84 ± 0,05	1,81 ± 0,15	2,95 ± 0,22*
R:PA (g g ⁻¹)	0,45 ± 0,04	0,53 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,47 ± 0,02*

O asterisco indica diferença significativa entre a média da planta controle e a tratada com UV-B dentro de um mesmo genótipo ($P \leq 0,05$, teste F). Os valores são médias ± erro padrão (n=5).

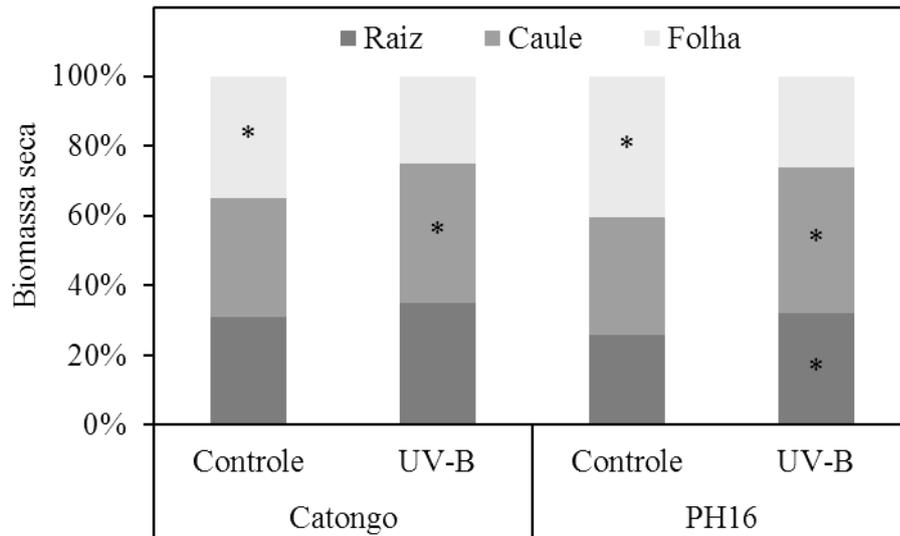


Figura 2 – Partição da matéria seca dos genótipos de cacauero Catongo e PH16 submetidos à radiação UV-B. O asterisco indica diferença significativa entre a média da planta controle e a tratada com UV-B dentro de um mesmo genótipo ($P \leq 0,05$, teste F).

Os dois genótipos estudados apresentaram respostas diferentes para as variáveis anatômicas quando foram submetidos à UV-B (Tabela 2 e Figura 3). As plantas de Catongo mostraram aumento de 13% do parênquima paliçádico. Já, o genótipo PH16 apresentou 25% de aumento do parênquima esponjoso e 9% da espessura do limbo (9%), e redução em 42% da densidade estomática.

Tabela 2 – Efeitos da radiação UV-B sobre a anatomia foliar dos genótipos de cacauero Catongo e PH16.

Variáveis	Catongo		PH16	
	Controle	UV-B	Controle	UV-B
Epiderme face adaxial (μm)	$19,7 \pm 0,60$	$19,9 \pm 0,57$	$19,9 \pm 0,77$	$19,4 \pm 0,46$
Epiderme face abaxial (μm)	$12,8 \pm 0,45$	$12,5 \pm 0,18$	$11,3 \pm 0,13$	$12,0 \pm 0,45$
Parênquima paliçádico (μm)	$25,5 \pm 0,63$	$28,7 \pm 0,94^*$	$26,2 \pm 1,10$	$26,6 \pm 0,58$
Parênquima esponjoso (μm)	$21,9 \pm 0,83$	$21,0 \pm 0,95$	$25,8 \pm 1,29$	$32,3 \pm 0,82^*$
Limbo (μm)	$80,0 \pm 1,16$	$82,2 \pm 1,00$	$83,2 \pm 2,56$	$90,4 \pm 0,72^*$
Densidade estomática ($\text{n}^\circ \text{mm}^{-2}$)	$353 \pm 35,1$	$364 \pm 30,7$	$600 \pm 41,1^*$	$422 \pm 18,0$

O asterisco indica diferença significativa entre a média da planta controle e a tratada com UV-B dentro de um mesmo genótipo ($P \leq 0,05$, teste F). Os valores são médias \pm erro padrão ($n=5$).

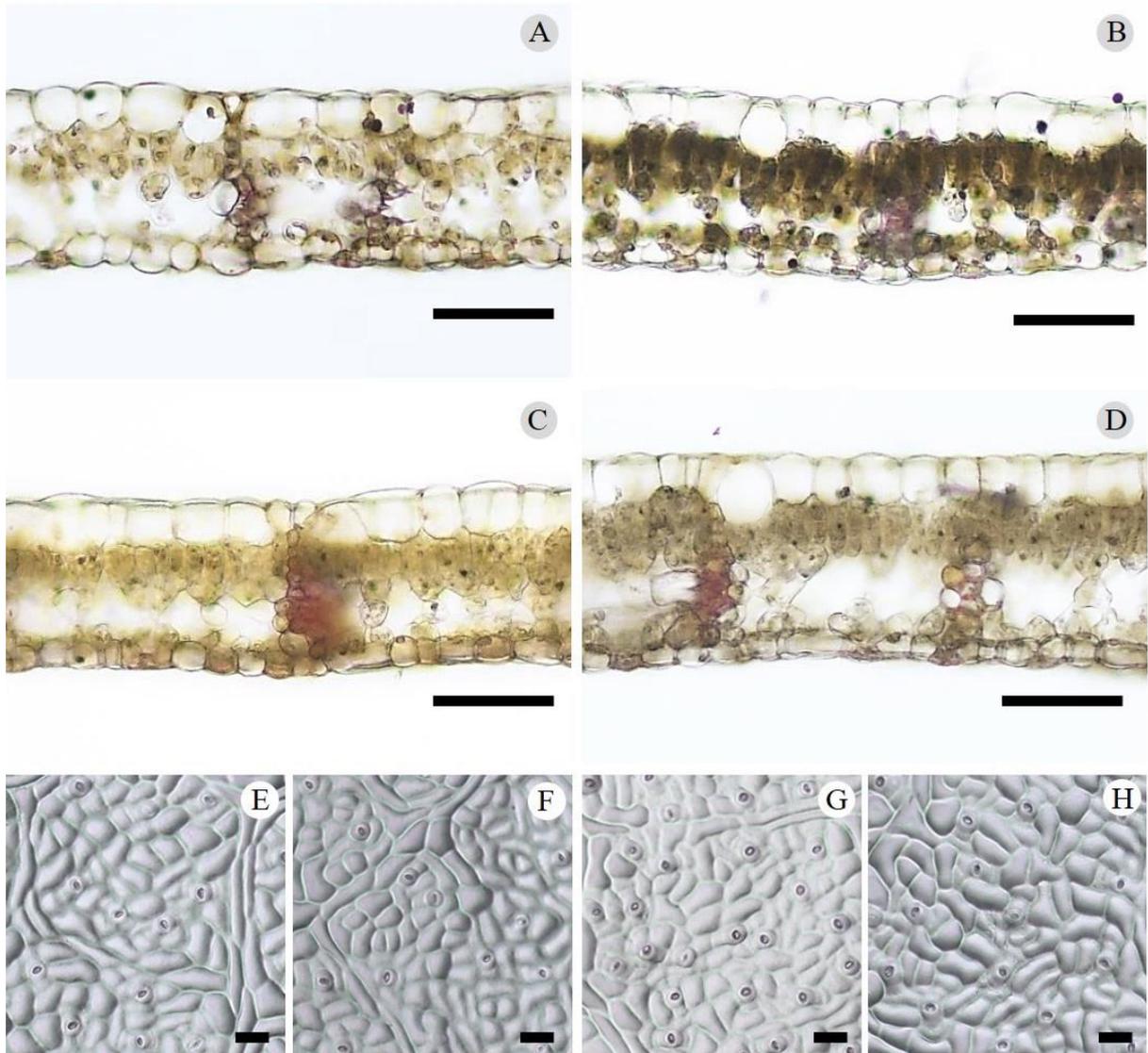


Figura 3 – Efeitos da radiação UV-B sobre a anatomia foliar de cacauero. (A-D) Secções transversais. (A e B) Genótipo Catongo, tratamentos controle e UV-B, respectivamente. (C e D) Genótipo PH16, tratamentos controle e UV-B, respectivamente. (E-H) Impressão epidérmica da face abaxial foliar. (E e F) Genótipo Catongo, tratamentos controle e UV-B, respectivamente. (G e H) Genótipo PH16, tratamentos controle e UV-B, respectivamente. As barras em A-D são iguais a 50 μm , e em E-H iguais a 20 μm .

De modo geral, quando as plantas foram expostas à radiação UV-B, os pigmentos e os fenóis foram significativamente aumentados (Tabela 3). As folhas do genótipo Catongo tiveram aumento das clorofilas *a* (64%) e *b* (64%) e carotenoides (60%), bem como das antocianinas (68%), flavonoides (59%) e fenóis (49%). O genótipo PH16 apresentou aumento na razão das clorofilas (12%) e redução na razão das clorofilas/carotenoides (14%), sendo observado, também, aumento na concentração de antocianinas (52%), flavonoides (17%) e fenóis (33%).

Tabela 3 – Efeitos da radiação UV-B sobre a concentração de clorofilas, carotenoides, antocianinas, flavonoides e fenóis solúveis em folhas dos genótipos de cacauero Catongo e PH16.

Variáveis	Catongo		PH16	
	Controle	UV-B	Controle	UV-B
Clorofila <i>a</i> (mg g ⁻¹ MS)	2,96 ± 0,23	4,84 ± 0,39*	3,64 ± 0,19	3,61 ± 0,42
Clorofila <i>b</i> (mg g ⁻¹ MS)	0,91 ± 0,07	1,49 ± 0,13*	1,31 ± 0,12	1,15 ± 0,15
Clorofila Total (mg g ⁻¹ MS)	3,87 ± 0,30	6,32 ± 0,52*	4,94 ± 0,30	4,76 ± 0,57
Carotenoides (mg g ⁻¹ MS)	0,77 ± 0,05	1,23 ± 0,09*	0,92 ± 0,05	1,00 ± 0,11
Clorofila <i>a/b</i>	3,25 ± 0,06	3,26 ± 0,04	2,82 ± 0,13	3,17 ± 0,03*
Clorofila total/carotenoides	5,02 ± 0,11	5,13 ± 0,06	5,39 ± 0,08	4,72 ± 0,13*
Antocianinas (A535nm g ⁻¹ MS)	3,14 ± 0,20	5,27 ± 0,39*	2,87 ± 0,35	4,37 ± 0,34*
Flavonoides (mg quercetina g ⁻¹ MS)	72,4 ± 5,41	115 ± 5,24*	63,3 ± 3,35	74,3 ± 3,21*
Fenóis (mg ác. gálico g ⁻¹ MS)	30,7 ± 1,63	45,6 ± 3,62*	26,9 ± 2,02	35,8 ± 1,50*

O asterisco indica diferença significativa entre a média da planta controle e a tratada com UV-B dentro de um mesmo genótipo ($P \leq 0,05$, teste *F*). Os valores são médias ± erro padrão (n=5).

Os genótipos Catongo e PH16 quando submetidos à UV-B apresentaram aumento da taxa aparente de transporte de elétrons (38% e 65%, respectivamente), sendo observado também aumento do coeficiente de extinção fotoquímico (64%) para o genótipo PH16 (Tabela 4).

Tabela 4 – Efeitos da radiação UV-B sobre a eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m), eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII (F_v'/F_m'), coeficiente de extinção fotoquímico (q_p), coeficiente de extinção não-fotoquímico (q_N) e taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) dos genótipos de cacauero Catongo e PH16.

Variáveis	Catongo		PH16	
	Controle	UV-B	Controle	UV-B
F_v/F_m	0,75 ± 0,01	0,74 ± 0,01	0,77 ± 0,01	0,76 ± 0,01
F_v'/F_m'	0,40 ± 0,02	0,45 ± 0,01	0,46 ± 0,02	0,40 ± 0,04
q_p	0,17 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,18 ± 0,02*
q_N	1,67 ± 0,06	1,82 ± 0,04	1,87 ± 0,08	1,69 ± 0,11
ETR ($\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	14,9 ± 0,70	20,5 ± 1,08*	9,8 ± 0,83	16,2 ± 1,29*

O asterisco indica diferença significativa entre a média da planta controle e a tratada com UV-B dentro de um mesmo genótipo ($P \leq 0,05$, teste *F*). Os valores são médias ± erro padrão (n=5).

As trocas gasosas foram significativamente alteradas com a radiação UV-B (Tabela 5). O genótipo Catongo teve aumento da assimilação líquida de CO₂ (60%), condutância estomática (15%), transpiração (21%), eficiência intrínseca de uso da água (31%) e da respiração noturna (63%). Já o genótipo PH16 apresentou apenas aumento da assimilação líquida de CO₂ (61%) e da eficiência intrínseca de uso da água (64%), com redução da respiração noturna (43%).

Tabela 5 – Efeitos da radiação UV-B sobre a assimilação líquida de CO₂ (*A*), condutância estomática (*g_s*), concentração interna de CO₂ (*C_i*), transpiração (*E*), eficiência intrínseca de uso da água (*A/g_s*) e respiração noturna (*Rd*) dos genótipos de cacauero Catongo e PH16.

Variáveis	Catongo		PH16	
	Controle	UV-B	Controle	UV-B
<i>A</i> (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	1,60 ± 0,05	2,56 ± 0,12*	1,03 ± 0,20	1,66 ± 0,09*
<i>g_s</i> (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	0,020 ± 0,001	0,023 ± 0,001*	0,019 ± 0,001	0,021 ± 0,001
<i>C_i</i> (μmol CO ₂ mol ⁻¹ ar)	302 ± 3,32*	274 ± 3,09	338 ± 10,0*	305 ± 3,29
<i>E</i> (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	0,28 ± 0,01	0,34 ± 0,01*	0,29 ± 0,01	0,30 ± 0,01
<i>A/g_s</i> (μmol CO ₂ mol ⁻¹ H ₂ O)	83,0 ± 3,10	109 ± 2,90*	49,1 ± 9,42	80,7 ± 3,06*
<i>Rd</i> (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	0,82 ± 0,04	1,34 ± 0,04*	1,34 ± 0,09*	0,94 ± 0,07

O asterisco indica diferença significativa entre a média da planta controle e a tratada com UV-B dentro de um mesmo genótipo ($P \leq 0,05$, teste *F*). Os valores são médias ± erro padrão (n=5).

A exposição à radiação UV-B não alterou a concentração de sacarose em ambos os genótipos, entretanto, provocou mudanças nas concentrações de carboidratos totais e redutores, lignina e mucilagem (Tabela 6). Para o genótipo Catongo, observou-se aumento da concentração de carboidratos totais (186%) e redutores (228%), de lignina (7%), e redução da mucilagem (6%). Já para o genótipo PH16, a UV-B aumentou os carboidratos totais (56%) e redutores (66%), e a porcentagem de mucilagem (6%), reduzindo a concentração de lignina (8%).

Tabela 6 – Efeitos da radiação UV-B sobre a sacarose, carboidratos totais, carboidratos redutores, lignina e mucilagem em folhas dos genótipos de cacauero Catongo e PH16.

Variáveis	Catongo		PH16	
	Controle	UV-B	Controle	UV-B
Sacarose (mg g ⁻¹ MS)	4,24 ± 0,69	4,60 ± 0,71	4,68 ± 0,09	4,92 ± 0,60
Carboidratos Totais (mg g ⁻¹ MS)	21,8 ± 3,00	62,4 ± 9,71*	28,8 ± 1,88	44,8 ± 4,28*
Carboidratos redutores (mg g ⁻¹ MS)	17,6 ± 2,62	57,8 ± 9,10*	24,1 ± 1,85	39,9 ± 3,92*
Lignina (mg g ⁻¹ MS)	42,8 ± 0,30	45,8 ± 0,43*	41,2 ± 0,33*	37,9 ± 0,57
Mucilagem (%)	11,1 ± 0,07*	10,5 ± 0,07	11,0 ± 0,17	11,7 ± 0,18*

O asterisco indica diferença significativa entre a média da planta controle e a tratada com UV-B dentro de um mesmo genótipo ($P \leq 0,05$, teste *F*). Os valores são médias ± erro padrão (n=5).

Não foram observadas diferenças estatísticas para a concentração de MDA e atividade da APX nos dois genótipos expostos à radiação UV-B. Apenas o genótipo Catongo apresentou aumento da concentração de peróxido de hidrogênio (35%) e da atividade das enzimas SOD (20%) e CAT (18%) (Figura 4).

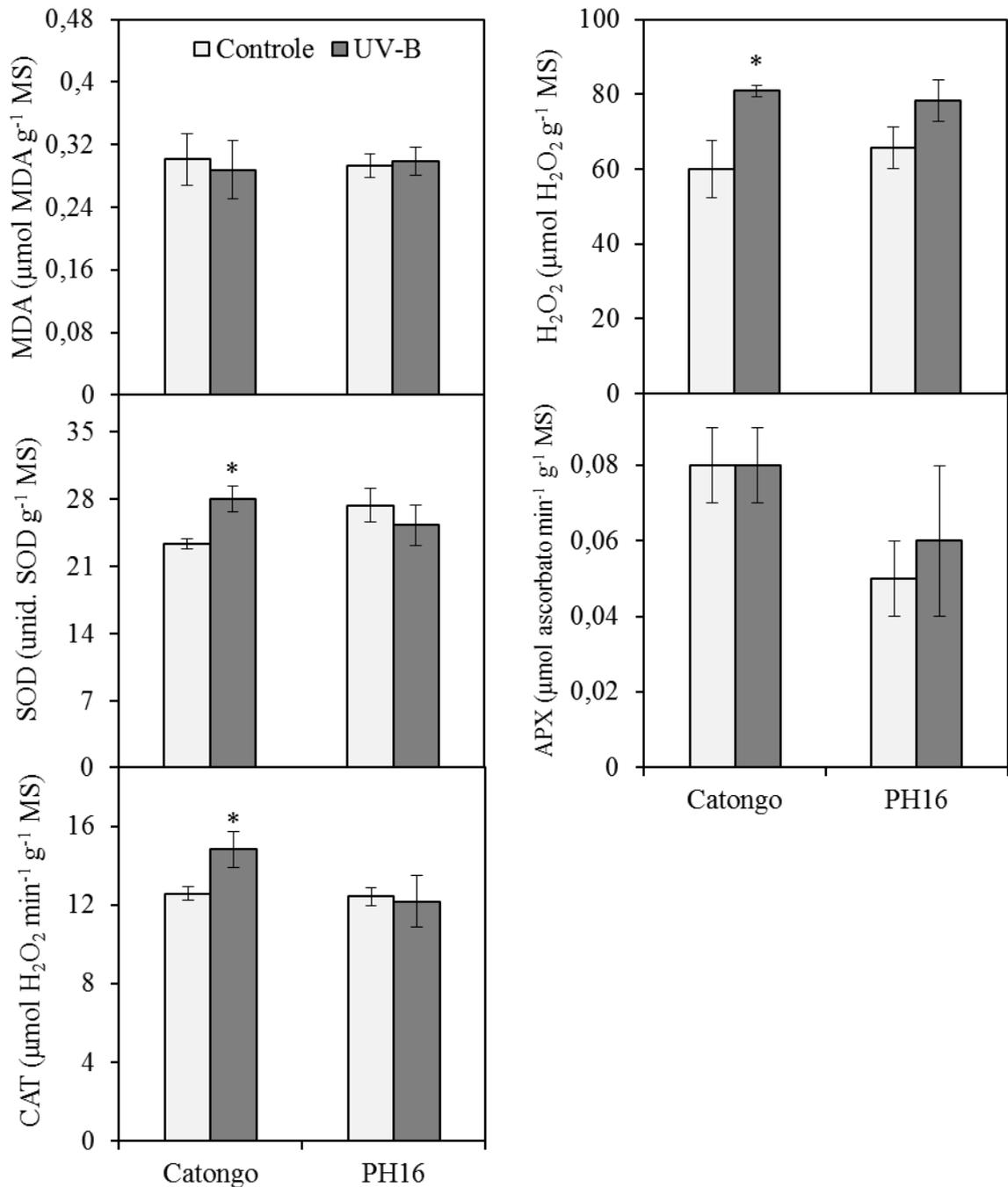


Figura 4 – Efeito da radiação UV-B sobre a concentração de malondialdeído (MDA), peróxido de hidrogênio, e sobre as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) em folhas dos genótipos de cacauero Catongo e PH16. O asterisco indica diferença significativa entre a média da planta controle e a tratada com UV-B dentro de um mesmo genótipo ($P \leq 0,05$, teste F).

4 Discussão

A exposição à radiação UV-B afetou de forma distinta a fisiologia, bioquímica e anatomia dos dois genótipos de *T. cacao* estudados, os quais apresentaram graus diferenciados de tolerância às condições de radiação a que foram expostos.

As alterações foliares visuais provocadas pela exposição à UV-B nos dois genótipos de *T. cacao* também foram relatadas para *Passiflora edulis* e *Indigofera tinctoria* (Cechin et al., 2012; Ravindran et al., 2010), e são relacionadas a alterações na divisão e alongamento celular (Ravindran et al., 2010; Singh et al., 2014). As distorções foliares poderiam indicar um mecanismo para minimizar a radiação UV-B (Boeger e Poulson, 2006; Cechin et al., 2012). Além disso, a abscisão de folhas recém-emergidas observada nas plantas de cacau, pode estar associada às baixas concentrações de compostos absorventes de UV-B nessas folhas (Correia et al., 1998), tornando-as mais susceptíveis aos danos da radiação UV-B. Como as folhas recém-emergidas do genótipo Catongo possuem como característica baixo teor de antocianinas, os efeitos da radiação UV-B sobre essas folhas mostrou-se mais acentuado, afetando diretamente o número de folhas, a área foliar total e unitária dessas plantas ao final dos 42 dias de exposição à UV-B.

O aumento no número de estípulas da gema apical das plantas submetidas à UV-B poderia indicar um mecanismo de proteção dessa região meristemática que também é sítio de produção do fitormônio ácido indol-acético (AIA), que é degradado pela UV-B (Ros e Tevini, 1995). Essa proteção seria a responsável pela manutenção do crescimento em altura das plantas de cacau. A observação do efeito da radiação UV-B sobre o desenvolvimento de estípulas também foi relatada por Gonzalez et al., (1998) em plantas de ervilha, porém a radiação UV-B teria reduzido o comprimento das estípulas com consequente redução do crescimento das plantas.

De modo geral, os efeitos negativos da radiação UV-B sobre o crescimento vegetal são observados em várias espécies (Ravindran et al., 2010; Singh et al., 2014; Tripathi et al., 2016), enquanto que os efeitos positivos são escassos na literatura. O genótipo PH16 demonstrou beneficiar-se com a radiação UV-B, apresentando incrementos de massa na raiz e caule, que afetaram significativamente o aumento da massa seca total desse genótipo, além de alterar a razão raiz/parte aérea. Alterações na partição da biomassa dos órgãos vegetais sob UV-B, com o aumento da alocação para o caule, tem sido demonstradas em outros estudos (Correia et al., 1998; Kataria e Guruprasad, 2012). Esses processos de investimento em raiz e caule propiciam maior eficiência na absorção/condução de água e nutrientes para a parte aérea do vegetal, permitindo a manutenção do processo fotossintético, em compensação à perda de área foliar.

O efeito da UV-B em aumentar o parênquima paliçádico no genótipo Catongo seria um mecanismo de proteção aos tecidos fotossintéticos pelo maior percurso a ser percorrido pela radiação (Verdaguer et al., 2012). O aumento do parênquima esponjoso nas folhas sob UV-B do genótipo PH16 foi suficiente para ocasionar o aumento da espessura total do limbo,

além da redução da área foliar específica, já que a área foliar unitária nesse genótipo não foi modificada. O aumento de espessura do parênquima esponjoso, com um maior número de espaços intercelulares, afetaria a transmitância da luz difusa no interior da folha (Bornman e Vogelmann, 1991) minimizando os danos da radiação sobre os tecidos fotossintéticos mais próximos da face abaxial (Boeger e Poulson, 2006).

Nas plantas de PH16 submetidas à UV-B, a redução da densidade estomática parece ser resposta ao maior desenvolvimento do sistema radicular e caulinar dessas plantas que propiciou aumento da eficiência de uso da água. É sabido que plantas de cacaueteiro em condições hídricas ideais apresentam menores densidades estomáticas que aquelas sob déficit hídrico (Zanetti et al., 2016). A redução da densidade estomática em plantas expostas a UV-B também foi relatada por outros autores em estudos com *Oryza sativa*, *Glycine max* e *Arabidopsis thaliana* (Dai et al., 1995; Gitz et al., 2005; Boeger e Poulson, 2006). Entretanto, os mecanismos para essa redução não são claros, sendo por vezes associadas ao aumento da área foliar unitária, a danos causados pela UV no desenvolvimento das células iniciais dos estômatos, ou ainda a um processo fotomorfogênico ocasionado pela luz UV-B.

Os valores maiores de clorofilas e carotenoides observados nas plantas de Catongo submetidas à UV-B parece ser uma resposta de plantas aclimatadas a essa radiação. Plantas submetidas às quantidades de radiações UV-B próximas ao encontrado no meio-ambiente e expostas o tempo suficiente para se aclimatar, apresentam aumento dos valores de clorofila e carotenoides (Sangtarash et al., 2009; Boeger e Poulson, 2006). Possivelmente, esse aumento de pigmentos coletores de luz compensaria a perda de área foliar observada nessas plantas, permitindo assim a manutenção da atividade fotossintética.

A redução da razão clorofila/carotenoides para as plantas de PH16 sob UV-B podem indicar um estado de fotoproteção dessas plantas, o que possibilitaria a manutenção e até mesmo incremento no teor das clorofilas, em especial da clorofila *a*, o que justificaria o aumento na razão das clorofilas *a/b*. Isso se deve a capacidade dos carotenoides prevenirem a foto-oxidação das clorofilas (Hendry e Price, 1993), além de possuírem um papel importante na extinção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Krieger-Liszkay, 2004).

Maiores concentrações de antocianinas, flavonoides e fenóis em plantas expostas à UV-B, parece ser uma resposta comum (Agati et al., 2013; Biever e Gardner, 2016; Inostroza-Blancheteau et al., 2014). O acúmulo de compostos fenólicos, principalmente flavonoides, nas células epidérmicas, permite absorver a radiação UV-B, prevenindo a foto-oxidação, além de atuar como antioxidante não-enzimático nos cloroplastos e nos vacúolos de células do mesófilo contra a ação do H₂O₂ e oxigênio singleto (Agati et al., 2013; Martínez-Lüscher et al., 2015).

A maior atividade SOD nas plantas do genótipo Catongo submetidas a radiação UV-B justificaria o aumento do H_2O_2 e este da atividade da CAT. A SOD é considerada uma enzima de segunda linha de defesa contra o estresse oxidativo ocasionado por EROs, convertendo o radical superóxido em H_2O_2 que, em parte, é decomposto pela atividade da CAT (Møller, 2001). Essa linha de defesa enzimática parece ser suficiente para combater o estresse oxidativo nas plantas de Catongo, uma vez que não se observou aumento da concentração de MDA proveniente da peroxidação lipídica ocasionada pelas EROs. O aumento da atividade de enzimas antioxidantes e da peroxidação lipídica são respostas comuns de plantas submetidas a radiação UV-B (Kataria et al., 2014). A ausência de resposta significativa para o genótipo PH16 referente às atividades enzimáticas e a concentração de H_2O_2 e MDA, sugerem que essas plantas sejam mais tolerantes, ou já estejam aclimatadas às condições de UV-B impostas.

Apesar de não serem observadas diferenças no rendimento quântico da etapa fotoquímica da fotossíntese das plantas submetidas a UV-B, o aumento do transporte de elétrons para ambos os genótipos e maior coeficiente de extinção fotoquímico para o genótipo PH16, sugerem que a etapa fotoquímica da fotossíntese foi otimizada. Possivelmente, os maiores teores de pigmentos fotossintéticos e fotoprotetores observados nas plantas de cacau, aos 42 dias, possibilitaram melhora desses parâmetros fotoquímicos devido ao ganho de energia luminosa e preservação dos componentes dos fotossistemas.

O aumento da assimilação de CO_2 para o Catongo sob UV-B parece ser, em parte, devido à maior condutância estomática que, possivelmente, foi estimulada pela melhora na condução de água proporcionada pelo desenvolvimento do caule, corroborado pela maior eficiência de uso da água. Já, para as plantas do genótipo PH16, o aumento da assimilação de CO_2 proporcionada pela UV-B parece não ter sido influenciada pela condutância estomática e sim, pela etapa fotoquímica da fotossíntese. Além disso, as maiores taxas fotossintéticas e a ausência de alterações significativas sobre a condutância e a transpiração e, o maior desenvolvimento de raiz e caule para a absorção e condução de água, proporcionaram para essas plantas uma melhora de 65% na eficiência de uso da água.

O efeito benéfico da UV-B sobre a fotossíntese, observada em ambos os genótipos, não tem sido relatado na literatura para outras espécies. Contudo, as espécies *Glycine max*, *Trifolium repens*, *Vigna unguiculata* e *Hippophae rhamnoides* demonstram não sofrer os efeitos danosos sobre os processos fotossintéticos quando aclimatadas ou adaptadas à ambientes com elevada UV-B (Gitz et al., 2005; Hofmann e Campbell, 2012; Singh et al., 2010; Yang et al., 2008). Além disso, doses baixas de UV-B ou próximas às encontradas no meio ambiente possuem efeito regulador sobre o metabolismo, crescimento e morfologia das

plantas (Bandurska et al., 2013) de modo que as respostas das plantas estariam associadas à proteção UV-B ou à melhoria de danos (Hideg et al., 2013).

A maior taxa de respiração no escuro em plantas de Catongo sob UV-B pode ser devido à maior demanda energética associada ao reparo dos componentes celulares, bem como, na produção de pigmentos fotossintéticos, substâncias absorventes de UV-B e de enzimas antioxidantes (Martínez-Lüscher et al., 2015; Prasad et al., 2016). Já, para o genótipo PH16, a redução da respiração noturna nas plantas sob UV-B, parece indicar maior eficiência na manutenção do custo energético de produção e manutenção do aparelho fotossintético, devido a uma maior eficiência respiratória pela menor perda de carbono (Zhang et al., 2003).

Alguns estudos com resultados dos efeitos da radiação UV-B sobre a concentração de carboidratos solúveis são contraditórios (González et al., 2009; Hilal et al., 2004). Apesar disso, os dados aqui apresentados também corroboram os encontrados para *Prunus dulcis*, no aumento dos carboidratos solúveis totais (Ranjbarfordei et al., 2009), para *Zen mays*, na manutenção da concentração de sacarose (Barsig e Malz, 2000) e para *Chenopodium quinoa*, no aumento de carboidratos redutores (González et al., 2009). Possivelmente, o aumento dos carboidratos totais observado nas plantas sob UV-B foi devido ao aumento dos carboidratos redutores, uma vez que não se observaram diferenças significativas na concentração de sacarose.

As maiores taxas de assimilação de CO₂ observadas nos genótipos de cacau submetidos à UV-B aparentemente refletiram nas maiores concentrações de carboidratos, que demonstraram rotas de consumo de carbono diferentes. Além disso, a senescência precoce de folhas recém emergidas que inicialmente funcionam como drenos pode ter influenciado nesse acúmulo de carboidratos para ambos os genótipos. Como observado, plantas de Catongo apresentaram elevada taxa respiratória sob condição de UV-B, sem o aumento da biomassa total. Já as plantas do genótipo PH16 sob UV-B, apresentaram aumento da biomassa total e com reduzida taxa respiratória. Os aumentos de carboidratos solúveis também poderiam justificar a melhor eficiência no uso de água de ambos os genótipos, devido a seus efeitos osmorreguladores (Bandurska et al., 2013; Comont et al., 2012). Uma possível explicação para o aumento dos carboidratos redutores seria um aumento da frutose que pode ser acumulada devido à preferência para a via das pentoses fosfato, que fornece eritrose 4-fosfato para a via de compostos fenólicos (Hilal et al., 2004). Isto também poderia explicar os maiores valores encontrados para os fenóis totais, flavonoides, antocianinas e as ligninas.

A radiação UV-B é um fator que provoca alteração nos teores e na composição de lignina das plantas (Cabane et al., 2012). As plantas do genótipo Catongo apresentaram aumento no teor de lignina de suas folhas, corroborando o encontrado em *Withania somnifera*

e *Linum usitatissimum* (Takshak e Agrawal, 2014; Tripathi e Agrawal, 2013). Maiores concentrações de lignina nas folhas poderiam sugerir maior deposição sobre a epiderme atenuando a penetração da radiação UV-B (Hilal et al., 2004). O aumento nos teores de lignina tem sido correlacionado a níveis elevados de H₂O₂ e da atividade de peroxidases, sendo o inverso também observado (Moura et al., 2010). Logo, os menores teores de lignina observados nas folhas de PH16 sob UV-B, parecem indicar, mais uma vez, a tolerância desse genótipo às condições de radiação UV-B impostas.

Não foram encontrados na literatura relatos do efeito da radiação UV-B sobre a concentração de mucilagem em plantas. É característica de *T. cacao* a presença de células mucilaginosas na epiderme (Nakayama et al., 1996; Zanetti et al., 2016). Há menção do papel das mucilagens na proteção de estruturas ou órgãos em desenvolvimento, retenção de água, reserva de carboidratos, redução da transpiração, além da proteção dos tecidos fotossintéticos contra o excesso de radiação (Clifford et al., 2002; Martini et al., 2003; Rocha et al., 2011; Zanetti et al., 2016; Zimmermann, 2013). Como a maior parte radiação UV-B é absorvida pela epiderme, os maiores teores de mucilagem encontrados nas folhas do genótipo PH16, sob UV-B, poderiam indicar mais um mecanismo de proteção à radiação UV-B para essas plantas.

Em conclusão, a exposição de 42 dias com 3 KJ m⁻² dia⁻¹ de UV-B sobre os genótipos de *T. cacao* não causou danos substanciais, permitindo o ajuste e aclimatação das plantas. As plantas do genótipo PH16 mostraram maior tolerância à radiação UV-B, apresentando maior eficiência energética com elevado ganho de massa. Para o genótipo Catongo, as alterações metabólicas observadas demonstraram ter um alto custo energético de manutenção, não lhe permitindo acúmulo de biomassa. Além disso, esse trabalho traz evidências de que o cacauero poderia não ser uma planta típica de sombra, como amplamente relatado na literatura.

Referências

- Aebi, H., 1984. [13] Catalase in vitro, in: *Methods in Enzymology*. pp. 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., Tattini, M., 2013. Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiol. Biochem.* 72, 35–45. doi:10.1016/j.plaphy.2013.03.014
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell Environ.* 24, 1337–1344. doi:10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x
- Almeida, A.-A.F. de, Valle, R.R., 2007. Ecophysiology of the cacao tree. *Brazilian J. Plant Physiol.* 19, 425–448. doi:10.1590/S1677-04202007000400011
- Bandurska, H., Niedziela, J., Chadzinikolau, T., 2013. Separate and combined responses to water deficit and UV-B radiation. *Plant Sci.* 213, 98–105. doi:10.1016/j.plantsci.2013.09.003
- Barsig, M., Malz, R., 2000. Fine structure, carbohydrates and photosynthetic pigments of sugar maize leaves under UV-B radiation. *Environ. Exp. Bot.* 43, 121–130. doi:10.1016/S0098-8472(99)00049-0
- Beggs, C.J., Wellmann, E., 1994. Photocontrol of flavonoid biosynthesis, in: *Photomorphogenesis in Plants*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 733–751. doi:10.1007/978-94-011-1884-2_26
- Biever, J.J., Gardner, G., 2016. The relationship between multiple UV-B perception mechanisms and DNA repair pathways in plants. *Environ. Exp. Bot.* 124, 89–99. doi:10.1016/j.envexpbot.2015.12.010
- Boeger, M.R.T., Poulson, M., 2006. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). *Acta Bot. Brasilica* 20, 329–338. doi:10.1590/S0102-33062006000200008
- Bornman, J.F., Vogelmann, T.C., 1991. Effect of UV-B radiation on leaf optical properties measured with fibre optics. *J. Exp. Bot.* 42, 547–554. doi:10.1093/jxb/42.4.547
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310. doi:10.1016/S0076-6879(78)52032-6
- Butler, W.L., 1978. Energy Distribution in the Photochemical Apparatus of Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29, 345–378. doi:10.1146/annurev.pp.29.060178.002021
- Cabane, M., Afif, D., Hawkins, S., 2012. Chapter 7 - Lignins and Abiotic Stresses, in: *Lignins Biosynthesis, Biodegradation and Bioengineering*. pp. 219–262. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416023-1.00007-0
- Cechin, I., Rocha, V.D.J., Fumis, T.D.F., 2012. Sensitivity of yellow passion fruit to ultraviolet - B radiation. *Pesq. agropec.* 1422–1427.
- Chaves Filho, J.T., Stacciarini-Seraphin, E., 2001. Alteração no potencial osmótico e teor de

- carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.-Hil.) em resposta ao estresse hídrico. *Rev. Bras. Botânica* 24, 199–204. doi:10.1590/S0100-84042001000200010
- Clifford, S.C., Arndt, S.K., Popp, M., Jones, H.G., 2002. Mucilages and polysaccharides in *Ziziphus* species (Rhamnaceae): localization, composition and physiological roles during drought-stress. *J. Exp. Bot.* 53, 131–138. doi:10.1093/jexbot/53.366.131
- Comont, D., Winters, A., Gwynn-Jones, D., 2012. Acclimation and interaction between drought and elevated UV-B in *A. thaliana*: Differences in response over treatment, recovery and reproduction. *Ecol. Evol.* 2, 2695–2709. doi:10.1002/ece3.387
- Correia, C.M., Areal, E.L. V, Torres-Pereira, M.S., Torres-Pereira, J.M.G., 1998. Intraspecific variation in sensitivity to ultraviolet-B radiation in maize grown under field conditions. I. Growth and morphological aspects. *F. Crop. Res.* 59, 81–89. doi:10.1016/S0378-4290(98)00102-6
- Dai, Q., Peng, S., Chavez, A.Q., Vergara, B.S., 1995. Effects of UVB Radiation on Stomatal Density and Opening in Rice (*Oryza sativa* L.). *Ann. Bot.* 76, 65–70. doi:10.1006/anbo.1995.1079
- Dos Santos, W.D., Ferrarese, M.L.L., Nakamura, C. V., Mourão, K.S.M., Mangolin, C.A., Ferrarese-Filho, O., 2008. Soybean (*Glycine max*) Root Lignification Induced by Ferulic Acid. The Possible Mode of Action. *J. Chem. Ecol.* 34, 1230–1241. doi:10.1007/s10886-008-9522-3
- Du, Z., Bramlage, W.J., 1992. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1566–1570. doi:10.1021/jf00021a018
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. doi:10.1021/ac60111a017
- Edmond Ghanem, M., Han, R.-M., Classen, B., Quetin-Leclerq, J., Mahy, G., Ruan, C.-J., Qin, P., Pérez-Alfocea, F., Lutts, S., 2010. Mucilage and polysaccharides in the halophyte plant species *Kosteletzkya virginica*: Localization and composition in relation to salt stress. *J. Plant Physiol.* 167, 382–392. doi:10.1016/j.jplph.2009.10.012
- Figueira, A.V. de O., Cascardo, J.C. de M., 2001. Marcadores moleculares no melhoramento, in: Dias, L.A. dos S. (Ed.), *Melhoramento Genético Do Cacaueiro*. FUNAPE-UFG, Viçosa, pp. 385–437.
- Forster, P.M., Thompson, D.W.J., Baldwin, M.P., Chipperfield, M.P., Dameris, M., Haigh, J.D., Karoly, D.J., Kushner, P.J., Randel, W.J., Rosenlof, K.H., Seidel, D.J., Solomon, S., 2011. Stratospheric Changes and Climate, in: *Scientific Assessment of Ozone Depletion: 2010, Global Ozone Research and Monitoring Project—Report No. 52*. World Meteorological Organization, Geneva, Switzerland, p. 516.
- Genty, B., Briantais, J.-M., Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 990, 87–92. doi:10.1016/S0304-4165(89)80016-9
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide Dismutases: II. Purification and

- Quantitative Relationship with Water-soluble Protein in Seedlings. *Plant Physiol.* 59, 315–318. doi:10.1104/pp.59.2.315
- Gitz, D.C., Liu-Gitz, L., Britz, S.J., Sullivan, J.H., 2005. Ultraviolet-B effects on stomatal density, water-use efficiency, and stable carbon isotope discrimination in four glasshouse-grown soybean (*Glycine max*) cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 53, 343–355. doi:10.1016/j.envexpbot.2004.04.005
- González, J.A., Rosa, M., Parrado, M.F., Hilal, M., Prado, F.E., 2009. Morphological and physiological responses of two varieties of a highland species (*Chenopodium quinoa* Willd.) growing under near-ambient and strongly reduced solar UV-B in a lowland location. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 96, 144–151. doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.05.003
- González, R., Mepsted, R., Wellburn, A.R., Paul, N.D., 1998. Non-photosynthetic mechanisms of growth reduction in pea (*Pisum sativum* L.) exposed to UV-B radiation. *Plant, Cell Environ.* 21, 23–32. doi:10.1046/j.1365-3040.1998.00243.x
- Gould, K.S., Markham, K.R., Smith, R.H., Goris, J.J., 2000. Functional role of anthocyanins in the leaves of *Quintinia serrata* A. Cunn. *J. Exp. Bot.* 51, 1107–1115. doi:10.1093/jexbot/51.347.1107
- Hendry, G.A.F., Price, A.H., 1993. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids, in: Hendry, G.A.F., Grime, J.P. (Eds.), *Methods in Comparative Plant Ecology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 148–152. doi:10.1007/978-94-011-1494-3_1
- Herr, J.M., 1992. New Uses for Calcium Chloride Solution as a Mounting Medium. *Biotech. Histochem.* 67, 9–13. doi:10.3109/10520299209109998
- Hideg, E., Jansen, M.A.K., Strid, A., 2013. UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends Plant Sci.* 18, 107–115. doi:10.1016/j.tplants.2012.09.003
- Hilal, M., Parrado, M.F., Rosa, M., Gallardo, M., Orce, L., Massa, E.M., González, J.A., Prado, F.E., 2004. Epidermal lignin deposition in quinoa cotyledons in response to UV-B radiations. *Photochem. Photobiol.* 79, 205–210. doi:10.1562/0031-8655(2004)079<0205:ELDIQC>2.0.CO;2
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Circ. Calif. Agric. Exp. Stn.* 347.
- Hofmann, R.W., Campbell, B.D., 2012. Leaf-level responses to ultraviolet-B radiation in *Trifolium repens* populations under defoliation pressure. *Environ. Exp. Bot.* 78, 64–69. doi:10.1016/j.envexpbot.2011.12.019
- Hunt, R., 1982. Plant growth curves. The functional approach to plant growth analysis. *Plant growth curves. Funct. approach to plant growth Anal.*
- Inostroza-Blancheteau, C., Reyes-Díaz, M., Arellano, A., Latsague, M., Acevedo, P., Loyola, R., Arce-Johnson, P., Alberdi, M., 2014. Effects of UV-B radiation on anatomical characteristics, phenolic compounds and gene expression of the phenylpropanoid pathway in highbush blueberry leaves. *Plant Physiol. Biochem. PPB* 85, 85–95. doi:10.1016/j.plaphy.2014.10.015

- Jansen, M. a K., Gaba, V., Greenberg, B.M., 1998. Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci.* 3, 131–135. doi:10.1016/S1360-1385(98)01215-1
- Johansen, D., 1940. *Plant Microtechnique*. New York, 530.
- Kataria, S., Guruprasad, K.N., 2012. Intraspecific variations in growth, yield and photosynthesis of sorghum varieties to ambient UV (280-400nm) radiation. *Plant Sci.* 196, 85–92. doi:10.1016/j.plantsci.2012.07.011
- Kataria, S., Jajoo, A., Guruprasad, K.N., 2014. Impact of increasing Ultraviolet-B (UV-B) radiation on photosynthetic processes. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 137, 55–66. doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.02.004
- Krieger-Liszkay, A., 2004. Singlet oxygen production in photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 56, 337–346. doi:10.1093/jxb/erh237
- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy, in: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi:10.1002/0471142913.faf0403s01
- Lidon, F.C., Ramalho, J.C., 2011. Impact of UV-B irradiation on photosynthetic performance and chloroplast membrane components in *Oryza sativa* L. *J. Photochem. Photobiol. B.* 104, 457–66. doi:10.1016/j.jphotobiol.2011.05.004
- Logan, B.A., Adams, W.W., Demmig-Adams, B., 2007. Avoiding common pitfalls of chlorophyll fluorescence analysis under field conditions. *Funct. Plant Biol.* 34, 853. doi:10.1071/FP07113
- Loriaux, S.D., Avenson, T.J., Welles, J.M., Mcdermitt, D.K., Eckles, R.D., Riensche, B., Genty, B., 2013. Closing in on maximum yield of chlorophyll fluorescence using a single multiphase flash of sub-saturating intensity. *Plant. Cell Environ.* 36, 1755–1770. doi:10.1111/pce.12115
- Martínez-Lüscher, J., Morales, F., Delrot, S., Sánchez-Díaz, M., Gomès, E., Aguirreolea, J., Pascual, I., 2015. Characterization of the adaptive response of grapevine (cv. Tempranillo) to UV-B radiation under water deficit conditions. *Plant Sci.* 232, 13–22. doi:10.1016/j.plantsci.2014.12.013
- Martini, M.H., Lenci, M.C., Tavares, D., 2003. Mucilage Pockets in Cotyledon Tissue of *Theobroma speciosum*. *Acta Microsc.* 12, 65–69.
- Møller, I.M., 2001. : Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 561–591. doi:10.1146/annurev.arplant.52.1.561
- Moura, J.C.M.S., Bonine, C.A.V., de Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M.C., Mazzafera, P., 2010. Abiotic and Biotic Stresses and Changes in the Lignin Content and Composition in Plants. *J. Integr. Plant Biol.* 52, 360–376. doi:10.1111/j.1744-7909.2010.00892.x
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867–880.

- Nakayama, L.H., Soares, M.K., Appezzato da Glória, B., 1996. Contribuição ao estudo anatômico da folha e do caule do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.). *Sci. Agric.* 53, 73–73. doi:10.1590/S0103-90161996000100010
- Park, Y.K., Ikegaki, M., Abreu, J.A. da S., Alcici, N.M.F., 1998. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 18, 313–318. doi:10.1590/S0101-20611998000300011
- Piasentin, F.B., Saito, C.H., 2014. Os diferentes métodos de cultivo de cacau no sudeste da Bahia, Brasil: Aspectos históricos e percepções. *Bol. do Mus. Para. Emilio Goeldi Ciências Humanas* 9, 61–78. doi:10.1590/S1981-81222014000100005
- Prasad, S.M., Kumar, S., Parihar, P., Singh, A., Singh, R., 2016. Evaluating the combined effects of pretilachlor and UV-B on two *Azolla* species. *Pestic. Biochem. Physiol.* 128, 45–56. doi:10.1016/j.pestbp.2015.10.006
- Ranjbarfordei, A., Van Damme, P., Samson, R., 2009. Elevated ultraviolet-B radiation influences photosynthetic pigments and soluble carbohydrates of sweet almond (*Prunus dulcis*). *Electronic J. Environ. Agric. Food Chem.* 8, 1077–1084.
- Ravindran, K.C., Indrajith, a, Pratheesh, P. V, Sanjiviraja, K., Balakrishnan, V., 2010. Effect of ultraviolet-B radiation on biochemical and antioxidant defence system in *Indigofera tinctoria* L. seedlings. *Int. J. Eng. Sci. Technol.* 2, 226–232. doi:10.4314/ijest.v2i5.60154
- Riazi, A., Matsuda, K., Arslan, A., 1985. Water-stress induced changes in concentrations of proline and other solutes in growing regions of young barley leaves. *J. Exp. Bot.* 36, 1716–1725. doi:10.1093/jxb/36.11.1716
- Rocha, J.F., Pimentel, R.R., Machado, S.R., 2011. Estruturas secretoras de mucilagem em *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae): distribuição, caracterização morfoanatômica e histoquímica. *Acta Bot. Brasilica* 25, 751–763. doi:10.1590/S0102-33062011000400003
- Ros, J., Tevini, M., 1995. Interaction of UV-radiation and IAA during growth of seedlings and hypocotyl segments of sunflower. *J. Plant Physiol.* 146, 295–302. doi:10.1016/S0176-1617(11)82057-2
- Sangtarash, M.H.H., Qaderi, M.M.M., Chinnappa, C.C.C., Reid, D.M.M., 2009. Differential sensitivity of canola (*Brassica napus*) seedlings to ultraviolet-B radiation, water stress and abscisic acid. *Environ. Exp. Bot.* 66, 212–219. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.03.004
- Singh, S.K., Kakani, V.G., Surabhi, G.-K., Reddy, K.R., 2010. Cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) genotypes response to multiple abiotic stresses. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 100, 135–146. doi:10.1016/j.jphotobiol.2010.05.013
- Singh, V.P., Kumar, J., Singh, S., Prasad, S.M., 2014. Dimethoate modifies enhanced UV-B effects on growth, photosynthesis and oxidative stress in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings: Implication of salicylic acid. *Pestic. Biochem. Physiol.* 116, 13–23. doi:10.1016/j.pestbp.2014.09.007
- Singleton, V.L., Rossi, J.A.J., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158. doi:10.1017/CBO9781107415324.004

- Takshak, S., Agrawal, S.B.B., 2014. Secondary metabolites and phenylpropanoid pathway enzymes as influenced under supplemental ultraviolet-B radiation in *Withania somnifera* Dunal, an indigenous medicinal plant. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 140, 332–343. doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.08.011
- Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, V.P., Prasad, S.M., Dubey, N.K., Chauhan, D.K., 2016. Silicon nanoparticles more effectively alleviated UV-B stress than silicon in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 1–12. doi:10.1016/j.plaphy.2016.06.026
- Tripathi, R., Agrawal, S.B., 2013. Evaluation of changes in lipid peroxidation, ROS production, surface structures, secondary metabolites and yield of linseed (*Linum usitatissimum* L.) under individual and combined stress of ultraviolet-B and ozone using open top chambers. *Indian J. Biochem. Biophys.* 50, 318–325.
- Verdaguer, D., Llorens, L., Bernal, M., Badosa, J., 2012. Photomorphogenic effects of UVB and UVA radiation on leaves of six Mediterranean sclerophyllous woody species subjected to two different watering regimes at the seedling stage. *Environ. Exp. Bot.* 79, 66–75. doi:10.1016/j.envexpbot.2012.01.008
- Yang, Y., Yao, Y., He, H., 2008. Influence of ambient and enhanced ultraviolet-B radiation on the plant growth and physiological properties in two contrasting populations of *Hippophae rhamnoides*. *J. Plant Res.* 121, 377–385. doi:10.1007/s10265-008-0163-y
- Zanetti, L.V., Rozindo, C., Milanez, D., Gama, V.N., Milanez, C.R.D., Gama, V.N., Aguilar, M.A.G., Souza, C.A.S., Campostrini, E., Ferraz, T.M., Figueiredo, F.A.M.M. de A., 2016. Leaf application of silicon in young cacao plants subjected to water deficit. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 51, 215–223. doi:10.1590/S0100-204X2016000300003
- Zhang, S., Ma, K., Chen, L., 2003. Response of photosynthetic plasticity of *Paeonia suffruticosa* to changed light environments. *Environ. Exp. Bot.* 49, 121–133. doi:10.1016/S0098-8472(02)00063-1
- Zimmermann, U., 2013. The future of water relations of plants. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 25, 241–243. doi:10.1590/S2197-00252013005000005

CAPÍTULO 2

Mitigação da radiação UV-B em cacauero por meio da adubação silicatada

Resumo

A radiação UV-B pode causar sérios danos a diversas espécies vegetais, e a adubação com o silício pode ser uma forma de aumentar a tolerância das plantas a esse tipo de radiação. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo determinar os efeitos interativos da radiação UV-B e da adubação com silício no crescimento de mudas de cacauero e fornecer algumas evidências anatômicas, fisiológicas e bioquímicas da possível ação do silício na redução do estresse por radiação UV-B. Mudas do genótipo Catongo de cacauero foram mantidas em condições controladas de crescimento em um arranjo fatorial 2 x 2, constituído de dois níveis de radiação (0 e 3 KJ m⁻² dia⁻¹) e duas concentrações de Si na adubação (0 e 2 mM de Si). Foram avaliados teores de silício, crescimento, anatomia, trocas gasosas, pigmentos fotossintéticos, polifenóis, carboidratos solúveis, lignina, mucilagem, enzimas antioxidantes, teores de peróxido de hidrogênio e malondialdeído. As plantas adubadas com Si e submetidas à UV-B apresentaram maior concentração de Si foliar. A biomassa foi menor nas plantas sob UV-B, e a adubação silicatada conseguiu reverter parcialmente esse efeito da radiação. A radiação UV-B com o Si proporcionou maiores espessuras da epiderme da face abaxial e do parênquima paliádico. As concentrações maiores de clorofilas, carotenoides, antocianinas, flavonoides e fenóis pela exposição à radiação UV-B foram reduzidas com a adubação silicatada. A respiração noturna nas plantas sob UV-B, bem como, a assimilação de CO₂ foram menores com o Si. O teor de mucilagem foi maior nas plantas sob UV-B adubadas com Si. A concentração de carboidratos solúveis, bem como, de lignina não foi alterada com a adubação silicatada em plantas sob UV-B. Concluiu-se que a adubação silicatada atuou de forma regulada com a radiação UV-B proporcionando economia energética pela redução do consumo de carbono pela respiração e da produção de pigmentos fotossintéticos e de substâncias absorventes de UV-B, levando a um maior acúmulo de biomassa das plantas.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*, estresse, fotossíntese, morfologia, silício.

1 Introdução

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie de grande importância econômica, pois é matéria-prima para a fabricação de chocolate e de outras substâncias de interesse comercial. O genótipo Catongo é reconhecido pela alta qualidade de suas amêndoas que possibilitam a produção de um chocolate de baixa acidez, com sabor suave e com notas frutadas e cítricas (Bonino, 2013). Essas características têm tornado esse genótipo muito valorizado com a ascensão do mercado de chocolate fino.

Apesar do cultivo de *T. cacao* ser realizado, predominantemente sob sombreamento, a condição de cultivo a pleno sol tem aumentado, devido à maior produtividade observada (Almeida e Valle, 2007). Contudo, em pleno sol as plantas ficam totalmente expostas à incidência da radiação ultravioleta-B (UV-B), que tem afetado negativamente diferentes culturas.

Os efeitos danosos da radiação UV-B sobre outras culturas são bem relatados na literatura. A UV-B exerce impactos negativos sobre os processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares das plantas, causando, por exemplo, inibição da fotossíntese, redução da biomassa (Yao e Liu, 2006), oxidação de proteínas, desestabilização de membranas e alteração nos mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Singh et al., 2014; Tripathi et al., 2016). Dentre as alterações estruturais induzidas pela radiação UV-B, são citados o aumento da espessura da epiderme adaxial, do parênquima paliçádico e esponjoso, e do limbo como um todo (Boeger e Poulson, 2006; Verdaguer et al., 2012), além de alterações na densidade de estômatos (Gitz et al., 2005; Kakani et al., 2003a).

O silício (Si) é o segundo elemento em abundância no solo, ocorrendo principalmente na forma de silicatos, com solubilidade variada, o que torna a concentração desse elemento diferente entre os tipos de solo, bem como nas diferentes espécies vegetais (Epstein e Bloom, 2006). Devido seus efeitos sobre as plantas, especialmente em condições de estresse, o Si recebeu a definição de elemento quase essencial (Epstein, 1994), apesar de não ser considerado elemento essencial para a maioria das espécies vegetais. São muitos os relatos na literatura sobre os efeitos positivos do Si em mitigar danos causados por diferentes tipos de estresses, por exemplo, salinidade (Yaghubi et al., 2016), déficit hídrico (Zanetti et al., 2016) e metais pesados (Feng et al., 2010). Porém, poucos trabalhos tentam mostrar os efeitos do silício em amenizar os danos da UV-B ao vegetal (Shen et al., 2010a; Tripathi et al., 2016; Yao et al., 2011).

O cacauzeiro tem se mostrado responsivo à adubação com o Si, sendo considerado por Zanetti et al. (2016) uma planta acumuladora desse elemento, com base na concentração de Si encontrada em suas folhas.

Baseado em observações prévias do efeito negativo da radiação UV-B sobre mudas de genótipo Catongo, hipotetizou-se que o Si poderia estimular a tolerância das plantas de cacauzeiros a essa radiação. Assim, este trabalho teve como objetivo determinar os efeitos interativos da radiação UV-B e da adubação de silício no crescimento de mudas de cacauzeiro e fornecer evidências anatômicas, fisiológicas e bioquímicas da ação do silício na redução do estresse por radiação UV-B.

2 Material e métodos

2.1 Material vegetal e delineamento experimental

Mudas de cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) do genótipo Catongo foram utilizadas no presente estudo. O genótipo Catongo caracteriza-se pela ausência de coloração antociânica em suas folhas jovens que possuem a coloração verde claro. As mudas foram produzidas a partir de sementes coletadas de um mesmo fruto de uma planta clonal na Estação Experimental Filogônio Peixoto (ESFIP), Linhares, ES, órgão de pesquisa da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC). As sementes foram germinadas em água e, após três dias, quando verificou-se a protrusão da raiz primária, foram transferidas para tubetes de 290 mL, com substrato comercial Forth® e adubadas a cada 15 dias com solução nutritiva de Hoagland (pH 6,2) (Hoagland e Arnon, 1950). O experimento foi conduzido em uma câmara de crescimento (Shellab Modelo LI15, Oregon, EUA) com fotoperíodo ajustado para 12 horas, radiação fotossinteticamente ativa de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionadas com quatro lâmpadas de luz branca de 32 W (GE - F32T8/SP41/ECO), temperatura constante de 27 °C e umidade relativa de 60%.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 2 x 2, constituído de dois níveis de radiação (0 e $3 \text{ KJ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) e duas concentrações de Si na adubação (0 e 2 mM de Si).

Aos 40 dias de idade, mudas com mesmo padrão morfológico foram selecionadas e, conforme o tratamento, receberam suplementação de 2 mM de Si na forma de Na_2SiO_3 na solução nutritiva. O sódio adicional foi balanceado nos demais tratamentos com Na_2HPO_4 e o fósforo foi balanceado nos tratamentos de Si com H_2PO_4 (Ming et al., 2012). O pH das

soluções foi corrigido para 6,2, com H₂SO₄. As plantas foram irrigadas diariamente até 80% da capacidade de campo do substrato para não ocorrer lixiviação do Si.

Após 15 dias do início da adubação com o silício, iniciou-se a exposição à radiação UV-B com duas lâmpadas especiais (Sankyo Denki - G15T8E, Kanagawa, Japan) com emissão na faixa de 280–360 nm (pico em 306 nm, UV-B). As lâmpadas foram dispostas a 30 cm do ápice das plantas e periodicamente ajustadas para manter a mesma quantidade de radiação UV, cuja medição foi realizada com medidor de UV (Spectrum Technologies, Illinois, USA). Neste caso, foi padronizado em 5,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 15 minutos diários durante 42 dias, produzindo, aproximadamente, 3 KJ $\text{m}^{-2} \text{dia}^{-1}$ de UV-B. Ao final de 42 dias de exposição, as análises de fotossíntese e crescimento foram realizadas e as folhas localizadas no segundo nó a partir do ápice foram selecionadas para as análises anatômicas e bioquímicas. As amostras foliares para a análises bioquímicas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas.

2.2 Análises de Si

A concentração de Si solúvel no substrato e na folha foi determinada ao final do experimento pelo método do azul de molibdênio conforme Korndörfer et al. (2004) com modificações.

Os substratos foram secos em estufa à 60 °C até atingirem massa constante. Amostras de 10 g do substrato seco e peneirado em malha de 2 mm foram colocadas em copos plásticos e reagiram com 100 mL de ácido acético 0,5 M por 1 hora, em agitação constante. Após a decantação do material, realizou-se a filtração da suspensão que permaneceu em repouso durante 12 horas. Uma alíquota de 10 mL do filtrado foi misturada com 1 mL de solução sulfomolibdica (75 g L⁻¹). Após 10 minutos, adicionou-se 2 mL de ácido oxálico (75 g L⁻¹) e após 5 minutos, acrescentou-se 10 mL de ácido ascórbico (3 g L⁻¹). Após 1 hora, a solução de coloração azul foi lida em espectrofotômetro (ThermoScientific®, Genesys 10S) no comprimento de onda de 660 nm.

Para a quantificação de Si nas folhas, amostras previamente lavadas com água deionizada foram secas em estufa à 60 °C até atingirem massa constante, sendo posteriormente, moídas em moinho de bola. Em seguida, 25 mg do material moído foi transferido para tubos falcon autoclaváveis de 15 mL e misturados com 500 μL de H₂O₂ (30 volumes) e 750 μL de NaOH (500 g L⁻¹). Os tubos foram agitados e colocados em banho-maria a 90 °C por 1 hora e autoclavados por mais 1 hora à 123 °C e 1,5 atm. Ao extrato digerido adicionou-se 11,25 mL de água ultrapura e a mistura permaneceu em repouso por 12

horas. Uma alíquota de 500 μL do sobrenadante foi adicionada em recipiente plástico juntamente com 4,5 mL de água ultrapura, 0,5 mL de HCl (1:1) e 0,5 mL de molibdato de amônio (100 g L^{-1}). Após 10 minutos, adicionou-se 0,5 mL de ácido oxálico (75 g L^{-1}) e, decorridos 5 minutos, acrescentou-se 2,5 mL de ácido ascórbico (3 g L^{-1}). Após 1 hora, a solução de coloração azul foi lida em espectrofotômetro (ThermoScientific®, Genesys 10S) no comprimento de onda de 660 nm. A concentração de Si no substrato e nas folhas foram calculadas através de uma curva padrão (0 a 8 mg L^{-1} de Si) construída por meio de solução padrão de 1 g L^{-1} de Si (Fixanal, Sigma-Aldrich) e os resultados expressos em mg de Si por Kg do substrato (mg Kg^{-1} substrato) e em g de Si por Kg de massa seca foliar (g Kg^{-1} MS foliar).

2.3 *Análises de crescimento*

As medidas de crescimento foram realizadas ao final do experimento. Mediu-se a altura, número de folhas, as massas frescas e secas e a área foliar. A área foliar foi determinada em um medidor de área (LI-COR Modelo 3100, Lincoln, Nebraska, USA). Os órgãos vegetativos foram pesados para a determinação das massas frescas, sendo posteriormente secos em estufa à $60 \text{ }^\circ\text{C}$ até atingirem massa constante. A partir dos dados obtidos, foram determinados, conforme Hunt (1982), os parâmetros: área foliar específica ($\text{AFE} = \text{AFT}/\text{MSF}$), área foliar total (AFT), razão de área foliar ($\text{RAF} = \text{AFT}/\text{MST}$), razão da massa seca da raiz pela massa seca da parte aérea (R:PA). Onde: MSF = massa seca foliar; MST = massa seca total.

2.4 *Anatomia foliar*

Amostras de folhas completamente expandidas localizadas no segundo nó a partir do ápice do eixo ortotrópico, com bom estado fitossanitário, foram fixadas em FAA 50 (formaldeído, ácido acético e etanol 50%) por 48 horas (Johansen, 1940) e, posteriormente, conservadas em etanol 70%. Para as análises foliares foram utilizados segmentos da porção mediana da lamina foliar e os cortes realizados com auxílio de um micrótomo de mesa. A análise anatômica quantitativa foi realizada por meio de medições da espessura do limbo, da epiderme das faces adaxial (Ead) e abaxial (Eab), e dos parênquimas paliçádico (PP) e esponjoso (PE). Foi determinada também a densidade estomática (n° de estômato mm^{-2}) a partir da impressão epidérmica da face abaxial da folha, em lâminas de vidro com uso de adesivo instantâneo (Super Bonder®). As observações e a documentação fotográfica foram

realizadas por meio de fotomicroscópio Nikon Eclipse 50i e software de imagem Nikon NIS-Elements (Nikon Tec Corporation, Tokyo, Japan). As análises quantitativas das espessuras dos tecidos e da densidade estomática foram realizadas com auxílio do software ImagJ1 (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.5 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

Após duas horas do início do período luminoso, iniciaram-se as medições de trocas gasosas utilizando-se um analisador de gás infravermelho (LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, NE, USA) acoplado com fonte de luz vermelho/azul (LI-6400-02B LED) e com fluorômetro acoplado (LI-6400-40, LI-COR Inc.). O sistema foi mantido constante sob irradiância de 500 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, valor definido previamente através de curvas de luz, 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ar e temperatura de 27 °C, sendo obtidos os dados de assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), concentração subestomática de CO_2 (C_i) e taxa de transpiração (E). A eficiência intrínseca de uso da água foi determinada através da razão A/g_s . Com o mesmo equipamento e nas mesmas folhas, também foi determinada a taxa respiratória no escuro (R_d), que se iniciou após duas horas do término do período luminoso.

A determinação da fluorescência da clorofila *a* foi realizada com um fluorômetro acoplado ao IRGA. As folhas previamente adaptadas ao escuro, durante 30 minutos, foram inicialmente expostas a um fraco pulso de luz vermelho-distante (0,03 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para a determinação da fluorescência inicial (F_0). Em seguida, um pulso de luz saturante, com irradiância de 8000 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e duração de 0,8 s, foi aplicado para estimar a fluorescência máxima emitida (F_m), sendo a partir desses parâmetros obtida a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (FSII) $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (Butler, 1978).

A fluorescência máxima (F_m') e mínima (F_0') da clorofila de folhas adaptadas à luz foram determinadas logo após à coleta dos dados de trocas gasosas na luz. Essas medições foram obtidas, respectivamente, a partir de um pulso de saturação de 8000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com duração de 0,8 s, e 2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz na faixa do vermelho distante na ausência de luz actínica. Em posse desses dados estimou-se a eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII (F_v'/F_m') (Butler, 1978).

2.6 Extração e determinação de pigmentos cloroplastídicos, compostos absorventes de UV-B e carboidratos solúveis

Para a determinação do teor dos pigmentos cloroplastídicos (clorofilas *a* e *b*, e carotenóides), dos compostos absorventes de UV-B (antocianinas, flavonoides e fenóis totais) e dos carboidratos solúveis (carboidratos totais solúveis e sacarose), um extrato único foi preparado a partir de 18 mg de tecido foliar liofilizado que foi macerado em gral de porcelana com 15 mL de etanol 95%, a 4 °C. O extrato foi mantido por 24 h a 8 °C, no escuro e com agitação constante sobre uma mesa agitadora. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 1450 x g, durante 20 min, a 4 °C, e o sobrenadante coletado para as análises.

Para a quantificação das clorofilas e carotenoides o extrato foi lido em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) nos comprimentos de onda 470, 648 e 664 nm. As concentrações dos pigmentos foram determinadas segundo as equações de Lichtenthaler e Buschmann (2001): Clorofila *a* = $13,36.A_{664} - 5,19.A_{648}$; Clorofila *b* = $27,43.A_{648} - 8,12.A_{664}$; Clorofila Total = Clorofila *a* + Clorofila *b*; Carotenoides = $(1000.A_{470} - 2,13.clorofila\ a - 97,64.clorofila\ b)/209$. Onde: A_{470} = absorbância a 470 nm; A_{664} = absorbância a 664 nm; A_{648} = absorbância a 648 nm. Os resultados foram apresentados em mg por grama de massa seca (mg g⁻¹ MS).

O teor de antocianinas nas folhas foi realizado de acordo com o método de Beggs e Wellmann (1994), com modificações. O extrato etanólico foi misturado com HCl (100:1) e mantido no escuro a 4 °C, por 24 h, com agitações esporádicas. As leituras foram aferidas a 535 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). O teor de antocianina foi expresso em absorbância a 535 nm por grama de massa seca (A535 g⁻¹ MS).

O teor de flavonoides totais foi estimado pelo método colorimétrico com cloreto de alumínio baseado em Park et al. (1998), com modificações. A mistura de reação consistiu de 500 µL do extrato etanólico, 100 µL cloreto de alumínio (10%), 100 µL de acetato de potássio (1M) e 4,3 mL de água destilada. Após 30 min de reação, à temperatura de 25 °C, foi determinada a absorbância da amostra a 428 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Como padrão de flavonoides foi usada quercetina para a curva de calibração (0 a 100 µg/mL de quercetina). Os resultados da concentração de flavonoides foram expressos em mg equivalentes de quercetina por g de massa seca (mg quercetina g⁻¹ MS).

A determinação do teor de fenólicos totais nos extratos alcoólicos foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, segundo metodologia proposta por Singleton e Rossi (1965), com modificações. A reação consistiu na mistura de 200 µL do extrato etanólico com 200 µL do reagente Folin-Ciocalteu, em agitação. Depois de 4 min, à temperatura de 25 °C, 1 mL de Na₂CO₃ (15%) foi adicionado. Após 2 horas, a absorbância foi medida a 760 nm em um

espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Realizou-se uma curva de calibração utilizando-se ácido gálico como padrão (de 0 a 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido gálico) e os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama de massa seca (mg ác. Gálico g^{-1} MS).

A quantificação de carboidratos totais solúveis seguiu o método fenol-sulfúrico conforme Dubois et al. (1956), que quantifica os carboidratos redutores mais a sacarose. Para isso, utilizou-se uma alíquota de 500 μL de extrato etanólico, 500 μL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), a 490 nm. Realizou-se uma curva de calibração utilizando glicose como padrão (0 a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e os resultados foram expressos em mg de glicose por grama de massa seca (mg glicose g^{-1} MS).

A dosagem do teor de sacarose baseou-se no método da antrona, que degrada os carboidratos redutores mediante a ação do hidróxido de potássio (Riazi et al., 1985). Para isso, utilizou-se alíquota de 250 μL de extrato etanólico com 100 μL de solução de KOH 5,4 N, por 10 minutos, a 100 °C. Posteriormente, acrescentou-se 3,0 mL de solução de antrona que permaneceu por 5 minutos, a 100 °C. Após o resfriamento, as amostras foram lidas a 620 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Um padrão de sacarose foi usado para a curva de calibração (0 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados da concentração de sacarose foram expressos em mg de sacarose por g de massa seca (mg sacarose g^{-1} MS).

A estimativa do teor de carboidratos redutores em cada amostra foi obtida subtraindo-se os valores dos carboidratos solúveis totais dos valores obtidos para a sacarose (Chaves Filho e Stacciarini-Seraphin, 2001).

2.7 Teores de lignina e mucilagem

A extração e quantificação de ligninas baseou-se no método descrito por Dos Santos et al. (2008). Para isso, amostras de 500 mg de folhas secas, moídas em moinho de bolas (TE-350, Tecnal, BR), foram homogeneizadas em 5 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, em tubo de centrífuga de 15 mL. O sedimento foi centrifugado (2500 x g, 4 minutos) e lavado por meio de agitação e centrifugação sucessivas, como segue: duas vezes com tampão de fosfato de pH 7,0 (5 ml); três vezes com 1% (v / v) de Triton X-100 em tampão fosfato pH 7,0 (5 mL); duas vezes com 1 M de NaCl em tampão Fosfato pH 7,0 (5 mL); duas vezes com água destilada (5 ml) e duas vezes com acetona (5 mL). O sedimento foi seco em estufa (60 °C, 24 h) e arrefeceu-se num dessecador de vácuo. A massa seca foi definida como fração da

parede celular livre de proteínas. Além disso, todo o tecido seco sem proteína foi transferido para tubo de centrifuga com tampa de rosca contendo a mistura reacional (1,2 ml de ácido tioglicólico mais 6 ml de HCl 2 M) e aquecido (95 °C, 4 h). Após arrefecimento à temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada (2500 x g, 4 min) e o sobrenadante foi descartado. O sedimento contendo ácido lignina-tioglicólico complexo (LTGA) foi lavado três vezes com água destilada (5 ml) e o LTGA extraído por agitação (30 °C, 18 h, 115 oscilações por minuto), em NaOH 0,5 M (6 ml). Após centrifugação (2500 x g, 5 min), o sobrenadante foi guardado. O sedimento foi lavado novamente com NaOH 0,5 M (3 ml) e misturou-se com o sobrenadante obtido anteriormente. Os extratos alcalinos combinados foram acidificados com HCl concentrado (1,8 ml). Após precipitação (0 °C, 4 h) o LTGA foi recuperado por centrifugação (2500 x g, 4 min) e lavagem por duas vezes com água destilada (10 ml). O sedimento foi seco a 60 °C, por 48 h, sendo posteriormente, dissolvido em 10 mL de NaOH 0,5 M. Uma alíquota de 250 µL desse extrato foi diluída com 1500 µL de NaOH 0,5 M e lido em espectrofotômetro a 280 nm. Realizou-se uma curva de calibração utilizando-se lignina como padrão (0 a 50 µg mL⁻¹) e os resultados foram expressos em mg de lignina por grama de massa seca (mg lignina g⁻¹ MS).

A extração da mucilagem foi baseada no método descrito por Edmond Ghanem et al. (2010), com modificações. Amostras foliares foram imersas em álcool etílico absoluto até a completa despigmentação, sendo posteriormente, secas e moídas em um moinho de bolas. Os polissacarídeos solúveis em água foram extraídos a partir de 100 mg desse material, em 3 ml de água. Os extratos foram agitados e colocados em um banho de ultrassom a 35 °C, durante 15 minutos, sendo posteriormente, agitados durante 2 h num agitador horizontal. Posteriormente, o extrato foi centrifugado (1400 x g, 5 min) e o sobrenadante com a mucilagem armazenado a 4 °C. O precipitado foi submetido mais duas vezes ao procedimento inicial, e os sobrenadantes aquosos combinados. Adicionou-se à solução de mucilagem, 27 mL de etanol 95% para obtenção de um precipitado (24 h, 4 °C) o qual foi separado por centrifugação (1400 x g, 5 min) e o sobrenadante etanólico descartado. O precipitado contendo a mucilagem foi lavado com etanol (três vezes) e seco a vácuo. Na sequência, realizou-se a pesagem da mucilagem seca.

2.8 Extração e atividade enzimática

Para a extração das enzimas antioxidantes, 50 mg do tecido foliar liofilizado foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,8), EDTANa₂ 0,1 mM, ácido ascórbico 10 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v). As extrações foram realizadas

em almofariz e pistilo com nitrogênio líquido e o homogeneizado centrifugado a 12000 x g durante 15 min, a 4 °C. Utilizou-se o sobrenadante resultante para os ensaios das atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX).

A atividade da SOD foi baseada no método descrito por (Giannopolitis e Ries, 1977). O meio de reação final de 3 mL continha tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,5), metionina 13 mM, riboflavina 2 µM, EDTANa₂ 0,1 mM, azul nitro tetrazólio (NBT) 75 µM e 50 µL do extrato enzimático. A reação foi iniciada em uma câmara de fotorredução equipada com uma lâmpada fluorescente branca (25 W), por 10 min, a 25 °C. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para resultar numa inibição de 50% da taxa de redução de NBT medida a 560 nm, sendo expressa por g de massa seca (unidade SOD g⁻¹ MS).

A atividade da CAT foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático, a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0) e H₂O₂ 10 mM (Aebi, 1984). O decréscimo na absorbância medido a 240 nm foi monitorado durante 3 min, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 mol⁻¹ L cm⁻¹ e expressa em µmol de H₂O₂ min⁻¹ g⁻¹ MS.

Determinou-se a atividade de APX baseado no método descrito por Nakano e Asada (1981). Uma alíquota de 100 µL do extrato enzimático foi misturada com 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0), EDTANa₂ 0,1 mM, ácido ascórbico 0,5 mM. A reação foi iniciada com a adição de H₂O₂ 0,2 mM e o decaimento da absorbância a 290 nm foi monitorado, durante 3 min, a 25 °C. O cálculo da atividade de APX foi feito com base no coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ e a atividade enzimática foi expressa em µmol ascorbato min⁻¹ g⁻¹ MS.

2.9 Extração e quantificação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malonaldeído (MDA)

Os extratos para análise dos teores de H₂O₂ e MDA foram obtidos a partir de 40 mg de tecido foliar liofilizado, sendo triturados em nitrogênio líquido acrescido de PVPP (20%) e homogeneizados em 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 10.000 x g, por 10 min, a 4 °C e o sobrenadante utilizado para as reações de quantificação das substâncias.

O teor de H₂O₂ foi baseado em Alexieva et al. (2001). O meio de reação consistiu-se de 0,4 mL do sobrenadante do extrato, 0,4 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e 1,6 mL de iodeto de potássio (1 M). A reação desenvolveu-se por 1 h no escuro e a

absorbância lida em 390 nm. A concentração de H_2O_2 foi calculada através de curva padrão de 0 a 250 μM de H_2O_2 .

O teor de MDA foi utilizado para determinar o nível de danos nas membranas. O método utilizado foi de acordo com Buege e Aust (1978), baseado na reação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Uma alíquota de 0,5 mL do extrato foi adicionada a 1,5 mL do meio de reação contendo TBA 0,5% (m/v) e TCA 10% (m/v), reagindo a 95 °C, por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e centrifugada a 10.000 x g, durante 10 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, a 440, 532 e 600 nm e o teor de MDA calculado segundo Du e Bramlage (1992). A concentração de MDA foi expressa em nmol equivalentes de MDA por grama de massa seca ($nmol\ MDA\ g^{-1}\ MS$).

2.10 Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e realizou-se o desdobramento da interação UV-B x Silício. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, e as diferenças significativas identificadas considerando-se $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando-se software estatístico Assistat (versão 7.7 beta Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, Brasil).

3 Resultados

A adubação com Si aumentou a concentração desse elemento disponível no substrato de plantio das mudas de cacau (Figura 1). A radiação UV-B reduziu a absorção de Si do substrato, ocasionando, ao final do experimento, uma maior concentração desse elemento no substrato das plantas submetidas à UV-B em comparação ao substrato das plantas não submetidas. A concentração de Si nas folhas (Figura 1) apresentou interação entre os fatores, sendo o maior valor observado nas plantas adubadas com Si e submetidas à radiação UV-B (aumento de 46% em relação ao mesmo tratamento sem UV-B).

A radiação UV-B reduziu o número de folhas e a AFU, bem como, as demais variáveis relacionadas, AFT, MSF e RAF (Tabela 1). Já, a MSR não foi afetada pela UV-B (Tabela 1). A adubação com o Si promoveu 24% de acúmulo de massa no caule, porém, sob a radiação UV-B, essa resposta não foi observada devido a interação desses fatores (Tabela 1). A MST das plantas foi menor nas plantas sob UV-B, entretanto, a adubação silicatada

conseguiu reverter em 9,4% esse efeito (Tabela 1). A AFE foi menor nas plantas adubadas com Si.

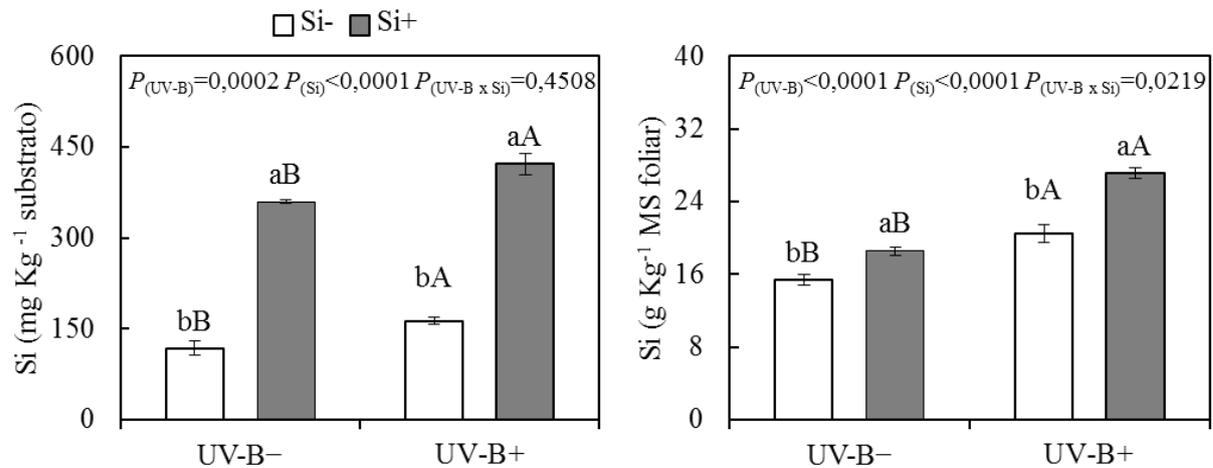


Figura 1 – Efeito da adubação com silício (0 e 2 mM de Si, respectivamente, Si- e Si+) e seu acúmulo no substrato e nas folhas de mudas de *T. cacao*, sob dois níveis de radiação UV-B (0 e 3 KJ m⁻² dia⁻¹, respectivamente, UV-B- e UV-B+). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam os tratamentos de silício para o mesmo nível de radiação, e letras maiúsculas comparam os níveis de radiação para mesmo tratamento de silício. As barras indicam o erro padrão da média (n = 5). Valores da significância para UV-B ($P_{(UV-B)}$), silício ($P_{(Si)}$) e para a interação entre ambos $P_{(UV-B \times Si)}$.

Tabela 1 – Efeitos da radiação UV-B (0 e 3 KJ m⁻² dia⁻¹, respectivamente, UV-B- e UV-B+) e da adubação com silício (0 e 2 mM de Si, respectivamente, Si- e Si+) sobre o número de folhas (NF), área foliar total (AFT), área foliar unitária (AFU), massa seca radicular (MSR), massa seca caulinar (MSC), massa seca foliar (MSF), massa seca total (MST), razão raiz/parte aérea (R:PA), razão de área foliar (RAF) e área foliar específica de mudas de cacaueteiro (AFE).

Variáveis	UV-B-		UV-B+		$P_{(UV-B)}$	$P_{(Si)}$	$P_{(UV-B \times Si)}$
	Si-	Si+	Si-	Si+			
NF	7,00 aA	6,20 aA	5,20 aB	5,40 aA	0,0012	0,3791	0,1512
AFT (cm ²)	312 aA	290 aA	195 aB	204 aB	<0,0001	0,6216	0,227
AFU (cm ²)	44,1 aA	46,5 aA	36,9 aB	35,9 aB	<0,0001	0,6519	0,2522
MSR (g)	0,61 aA	0,60 aA	0,61 aA	0,67 aA	0,185	0,3598	0,2072
MSC (g)	0,71 bA	0,88 aA	0,74 aA	0,78 aB	0,1457	0,0005	0,0167
MSF (g)	0,72 aA	0,80 aA	0,46 aB	0,53 aB	<0,0001	0,0326	0,8953
MST (g)	2,04 bA	2,27 aA	1,81 bB	1,98 aB	<0,0001	<0,0001	0,4067
R:PA (g g ⁻¹)	0,43 aB	0,36 aB	0,51 aA	0,52 aA	0,0002	0,205	0,1313
RAF (cm ² g ⁻¹)	153 aA	128 bA	108 aB	103 aB	0,0001	0,0378	0,1418
AFE (cm ² g ⁻¹)	434 aA	364 bA	422 aA	387 bA	0,5069	<0,0001	0,0453

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam os tratamentos de silício para o mesmo nível de radiação, e letras maiúsculas comparam os níveis de radiação para mesmo tratamento de silício. Os valores são médias (n = 5). Valores da significância para UV-B ($P_{(UV-B)}$), silício ($P_{(Si)}$) e para a interação entre ambos $P_{(UV-B \times Si)}$.

As plantas tratadas com UV-B apresentaram menor alocação de biomassa nas folhas e maior incremento nos caules e raízes, sendo que, nessa condição, a adubação com Si não teve efeito (Figura 2).

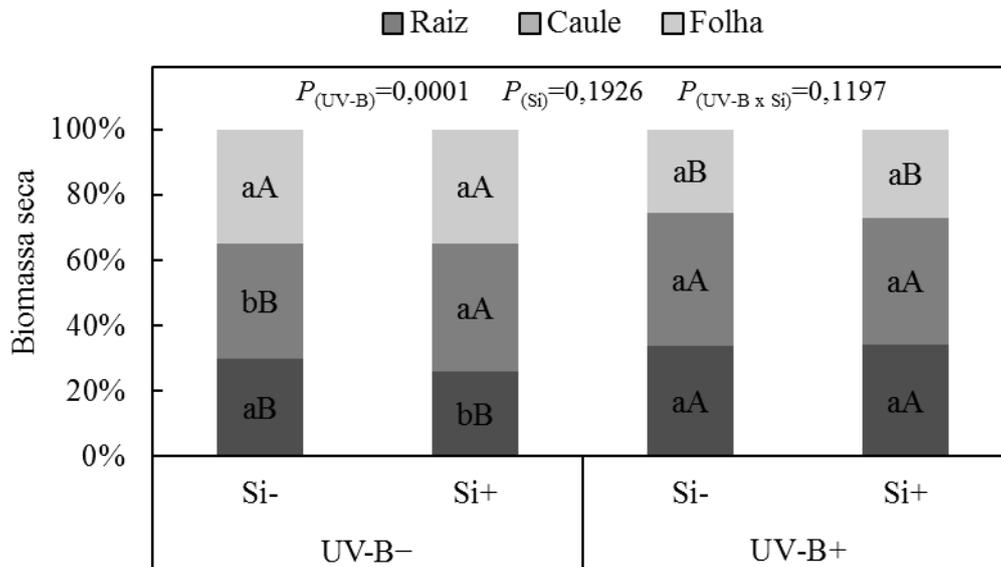


Figura 2 – Partição da matéria seca de mudas de cacaueteiro submetidas à radiação UV-B (0 e 3 KJ m⁻² dia⁻¹, respectivamente, UV-B- e UV-B+) e à adubação com silício (0 e 2 mM de Si, respectivamente, Si- e Si+). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam os tratamentos de silício para o mesmo nível de radiação, e letras maiúsculas comparam os níveis de radiação para mesmo tratamento de silício. Os valores são médias ($n = 5$). Valores da significância para UV-B ($P_{(UV-B)}$), silício ($P_{(Si)}$) e para a interação entre ambos $P_{(UV-B \times Si)}$.

Houve interação da radiação UV-B com o Si, levando a modificação de algumas variáveis da anatomia foliar, sem alteração da espessura total do limbo (Tabela 2). As folhas sob UV-B e com Si mostraram Eab e PP mais espessos (9% e 19,6%, respectivamente) em comparação às plantas sem UV-B e com Si. O Si promoveu o espessamento do PE em 22% e da DE em 40%, entretanto, sua interação com a UV-B reduziu esses valores (Tabela 2).

Tabela 2 – Efeitos da radiação UV-B (0 e 3 KJ m⁻² dia⁻¹, respectivamente, UV-B- e UV-B+) e da adubação com silício (0 e 2 mM de Si, respectivamente, Si- e Si+) sobre as espessuras da epiderme da face adaxial (Ead), epiderme da face abaxial (Eab), parênquima paliçádico (PP), parênquima esponjoso (PE), limbo e da densidade estomática de mudas de cacaueteiro.

Variáveis	UV-B-		UV-B+		$P_{(UV-B)}$	$P_{(Si)}$	$P_{(UV-B \times Si)}$
	Si-	Si+	Si-	Si+			
Ead (µm)	19,7 aA	19,8 aA	20,0 aA	19,5 aA	0,9218	0,7316	0,5844
Eab (µm)	12,1 aA	12,1 aB	12,5 aA	13,1 aA	0,2705	0,8278	0,0435
PP (µm)	25,5 aA	23,5 aB	28,7 aA	28,1 aA	0,0024	0,2401	0,5094
PE (µm)	22,0 bA	26,9 aA	21,0 aA	19,0 aB	0,0029	0,2812	0,0138
Limbo (µm)	80,1 aA	82,4 aA	82,2 aA	79,3 aA	0,8303	0,8871	0,2581
DE (nº mm ⁻²)	333 bA	465 aA	364 aA	372 aB	0,2094	0,0103	0,0201

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam os tratamentos de silício para o mesmo nível de radiação, e letras maiúsculas comparam os níveis de radiação para mesmo tratamento de silício. Os valores são médias ($n = 5$).

O efeito interativo da radiação UV-B e da adubação com o Si foi acentuado nas concentrações de pigmentos (Tabela 3). Os valores da concentração de clorofilas, carotenoides e antocianinas foram menores nas plantas tratadas com Si sob UV-B quando comparadas ao mesmo tratamento sem Si, igualando-se às plantas sem UV-B. As concentrações de flavonoides e de fenóis foram maiores em plantas adubadas com Si ou submetidas à radiação UV-B. Contudo, o efeito interativo desses dois fatores reduziu as concentrações desses pigmentos, sendo esse efeito mais acentuado para a concentração de fenóis que se mostrou menor que o tratamento com Si e sem UV-B.

Tabela 3 – Efeitos da radiação UV-B (0 e 3 KJ m⁻² dia⁻¹, respectivamente, UV-B- e UV-B+) e da adubação com silício (0 e 2 mM de Si, respectivamente, Si- e Si+) sobre as concentrações de clorofilas, carotenoides, antocianinas, flavonoides e fenóis solúveis em folhas de mudas de cacauero.

Variáveis	UV-B-		UV-B+		$P_{(UV-B)}$	$P_{(Si)}$	$P_{(UV-B \times Si)}$
	Si-	Si+	Si-	Si+			
Clorofila <i>a</i> (mg g ⁻¹ MS)	2,96 aB	3,56 aA	4,84 aA	3,66 bA	0,002	0,3039	0,0043
Clorofila <i>b</i> (mg g ⁻¹ MS)	0,91 aB	1,09 aA	1,49 aA	1,02 bA	0,0107	0,112	0,0020
Clorofila (<i>a</i> + <i>b</i>)	3,87 aB	4,65 aA	6,32 aA	4,68 bA	0,0027	0,2345	0,0032
Razão clorofila <i>a/b</i>	3,25 aA	3,29 aA	3,26 aA	3,64 aA	0,1847	0,1123	0,2091
Carotenoides (mg g ⁻¹ MS)	0,77 aB	0,93 aA	1,23 aA	0,88 bA	0,0065	0,1543	0,0010
Antocianinas (A535nm g ⁻¹ MS)	3,14 aB	3,42 aA	5,27 aA	3,37 bA	0,0032	0,0004	0,0003
Flavonoides (mg querc. g ⁻¹ MS)	72,4 bB	82,3 aA	114 aA	68,7 bA	0,0066	0,0011	<0,0001
Fenóis (mg ác. gálico g ⁻¹ MS)	30,7 bB	41,0 aA	45,5 aA	27,6 bB	0,7828	0,1418	<0,0001

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam os tratamentos de silício para o mesmo nível de radiação, e letras maiúsculas comparam os níveis de radiação para mesmo tratamento de silício. Os valores são médias (n = 5).

As plantas adubadas com Si apresentaram os maiores valores de F_v/F_m independente da radiação UV-B, entretanto, nenhuma alteração significativa foi observada para F_v'/F_m' (Figura 3).

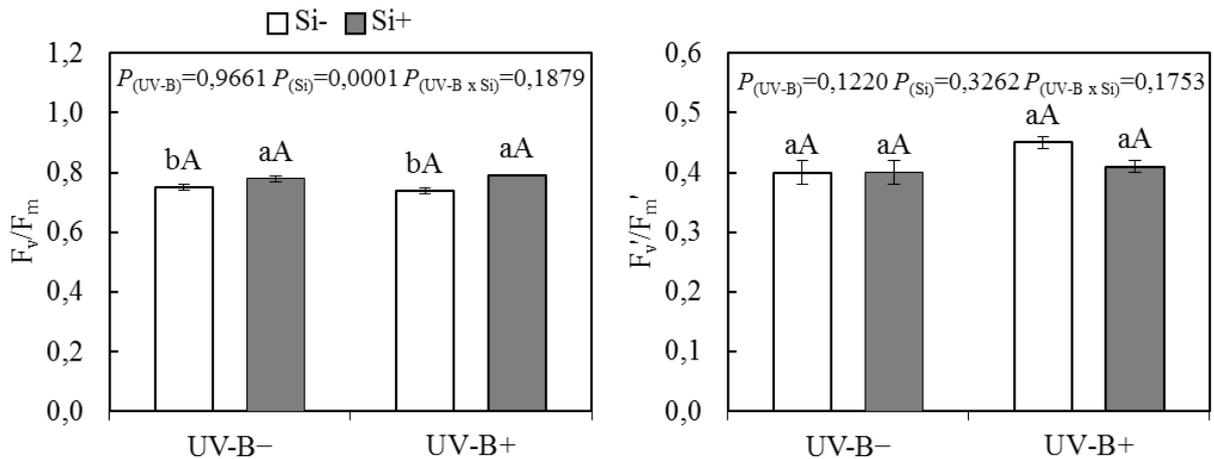


Figura 3 – Efeitos da radiação UV-B (0 e 3 KJ m⁻² dia⁻¹, respectivamente, UV-B- e UV-B+) e da adubação com silício (0 e 2 mM de Si, respectivamente, Si- e Si+) sobre a eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m) e sobre a eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII (F_v'/F_m') em folhas de mudas de cacauzeiro. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam os tratamentos de silício para o mesmo nível de radiação, e letras maiúsculas comparam os níveis de radiação para mesmo tratamento de silício. As barras são médias \pm erro padrão ($n = 5$). Valores da significância para UV-B ($P_{(UV-B)}$), silício ($P_{(Si)}$) e para a interação entre ambos ($P_{(UV-B \times Si)}$).

A assimilação líquida de CO₂ foi estimulada tanto pela adubação com o Si (15%) quanto pela radiação UV-B (63%) em relação ao tratamento sem Si e sem UV-B. Entretanto, o tratamento combinado desses dois fatores mostrou que o Si inibiu parcialmente o efeito proporcionado pela UV-B (Figura 4). A adubação com Si inibiu o estímulo proporcionado pela UV-B aos parâmetros g_s e E , não sendo observada interação significativa entre os fatores para esses parâmetros (Figura 4).

Os valores de C_i foram maiores para o tratamento sem Si e sem UV-B (Figura 4). A adubação com o Si, a exposição à UV-B e a combinação desses dois fatores estimularam a A/g_s (Figura 4). As plantas sob UV-B sem Si apresentaram aumento de R_d (63%) em comparação ao tratamento sem UV-B e sem Si, entretanto, com a adubação silicatada, esse aumento foi apenas de 41% (Figura 4).

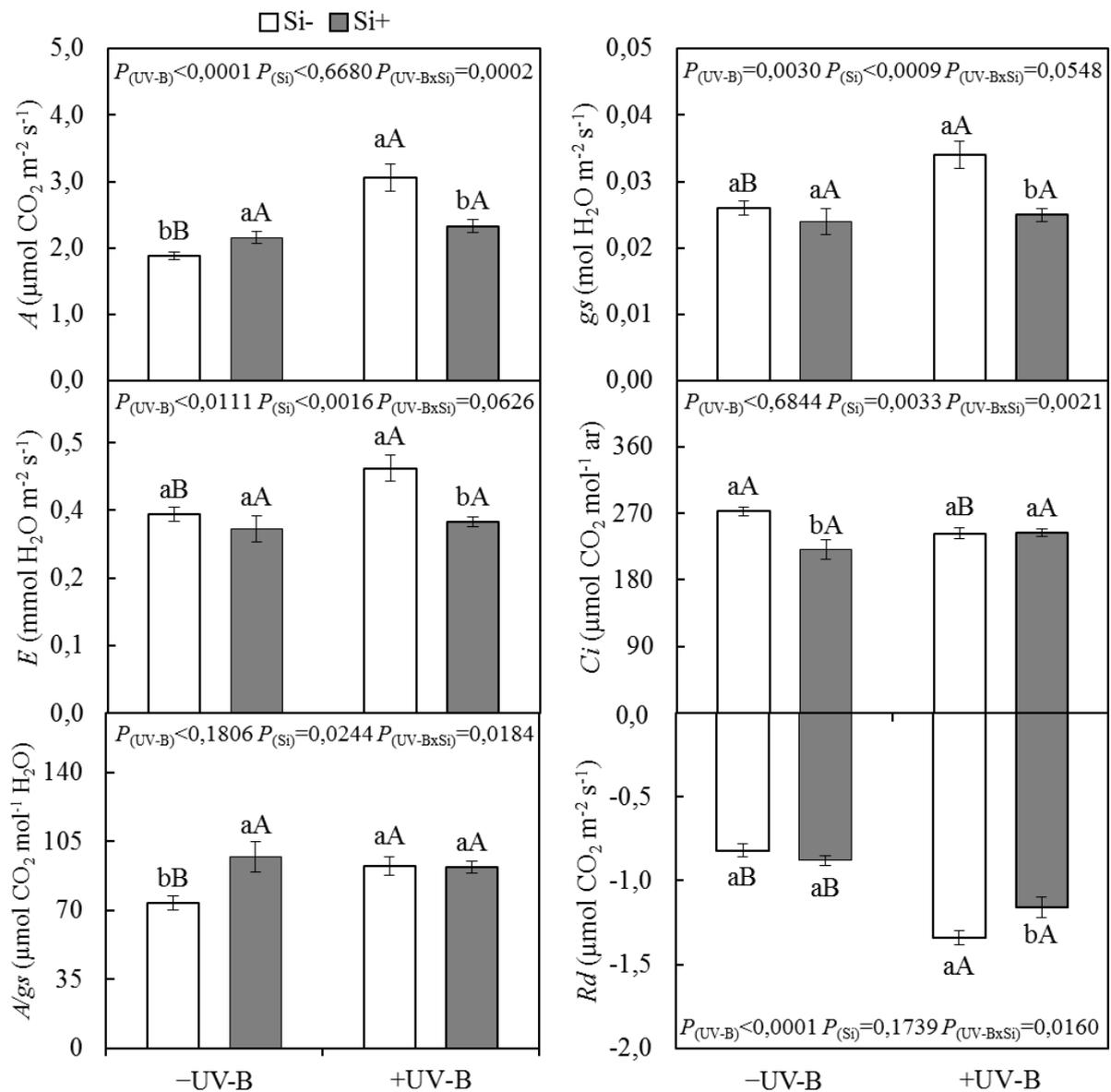


Figura 4 – Efeitos da radiação UV-B (0 e 3 KJ m⁻² dia⁻¹, respectivamente, UV-B- e UV-B+) e da adubação com silício (0 e 2 mM de Si, respectivamente, Si- e Si+) sobre a assimilação líquida de CO₂ (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E), concentração interna de CO₂ (C_i), eficiência intrínseca de uso da água (A/g_s) e respiração noturna (R_d) em folhas de mudas de cacaueteiro. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05). Letras minúsculas comparam os tratamentos de silício para o mesmo nível de radiação, e letras maiúsculas comparam os níveis de radiação para mesmo tratamento de silício. As barras são médias ± erro padrão (n = 5). Valores da significância para UV-B (P_(UV-B)), silício (P_(Si)) e para a interação entre ambos (P_(UV-B x Si)).

Os carboidratos totais e redutores apresentaram os maiores valores nas folhas das plantas sob UV-B independente da adubação com Si. Além disso, as folhas das plantas adubadas com Si sem UV-B também mostraram maior concentração desses carboidratos em relação ao mesmo tratamento sem a adubação com Si (Tabela 4). A concentração de sacarose não apresentou diferença significativa com a radiação UV-B, entretanto, as folhas das plantas adubadas com Si na ausência da UV-B apresentaram os maiores valores em relação ao mesmo tratamento não adubado (Tabela 4).

No tratamento sem UV-B, as folhas das plantas adubadas com Si apresentaram menor concentração de lignina, enquanto, plantas submetidas à UV-B mostraram os maiores valores de lignina, contudo essa concentração não foi alterada com a adubação silicatada (Tabela 4).

A concentração de mucilagem apresentou interação entre os fatores, sendo menor (5,4%) nas folhas das plantas irradiadas com UV-B sem Si em relação ao tratamento sem UV-B e sem Si (Tabela 4). As maiores concentrações de mucilagem foram observadas no tratamento conjunto de UV-B e Si, ultrapassando em 10% o mesmo tratamento sem UV-B, como efeito da interação desses fatores (Tabela 4).

Tabela 4 – Efeitos da radiação UV-B (0 e 3 KJ m⁻² dia⁻¹, respectivamente, UV-B- e UV-B+) e da adubação com silício (0 e 2 mM de Si, respectivamente, Si- e Si+) sobre o concentração de sacarose, carboidratos totais, carboidratos redutores, lignina e mucilagem em folhas de mudas de cacauero.

Variáveis	UV-B-		UV-B+		$P_{(UV-B)}$	$P_{(Si)}$	$P_{(UV-B \times Si)}$
	Si-	Si+	Si-	Si+			
Sacarose (mg g ⁻¹ MS)	3,79 bA	6,10 aA	4,60 aA	5,09 aA	0,8550	0,0223	0,1202
Carb. Totais (mg g ⁻¹ MS)	21,8 bB	42,3 aB	56,9 aA	68,8 aA	0,0001	0,0114	0,4568
Carb. Redutores (mg g ⁻¹ MS)	18,0 bB	36,2 aB	52,31 aA	63,7 aA	<0,0001	0,0152	0,5396
Lignina (mg g ⁻¹ MS)	42,8 aB	40,1 bB	45,8 aA	46,6 aA	<0,0001	0,107	0,0101
Mucilagem (%)	11,1 aA	11,0 aB	10,5 bB	12,1 aA	0,3126	0,0026	0,0016

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam os tratamentos de silício para o mesmo nível de radiação, e letras maiúsculas comparam os níveis de radiação para mesmo tratamento de silício. Os valores são médias (n = 5).

A atividade da SOD e da CAT foi maior nas plantas sob UV-B, não sendo observado efeito da adubação silicatada (Tabela 5). Não foram observadas diferenças estatísticas para a APX e nem para a concentração de MDA (Tabela 5). A concentração de H₂O₂ não apresentou diferença significativa com a radiação UV-B, entretanto, as folhas das plantas adubadas com Si, na ausência da UV-B, apresentaram os maiores valores (55%) em relação ao mesmo tratamento não adubado (Tabela 5).

Tabela 5 – Efeitos da radiação UV-B (0 e 3 KJ m⁻² dia⁻¹, respectivamente, UV-B- e UV-B+) e da adubação com silício (0 e 2 mM de Si, respectivamente, Si- e Si+) sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT), e sobre a concentração de malondialdeído (MDA) e peróxido de hidrogênio em folhas de mudas de cacauero.

Variáveis	UV-B-		UV-B+		$P_{(UV-B)}$	$P_{(Si)}$	$P_{(UV-B \times Si)}$
	Si-	Si+	Si-	Si+			
SOD (unid. SOD g ⁻¹ MS)	23,7 aB	25,0 aB	29,5 aA	29,8 aA	0,0032	0,5986	0,7543
CAT (μmol H ₂ O ₂ min ⁻¹ g ⁻¹ MS)	11,6 aB	11,5 aB	16,6 aA	18,5 aA	0,0009	0,5734	0,5088
APX (μmol ascorbato min ⁻¹ g ⁻¹ MS)	0,08 aA	0,07 aA	0,10 aA	0,09 aA	0,1581	0,5782	0,8979
H ₂ O ₂ (μmol H ₂ O ₂ g ⁻¹ MS)	59,9 bA	92,9 aA	78,6 aA	64,7 aA	0,6224	0,3302	0,0245
MDA (nmol MDA g ⁻¹ MS)	301 aA	307 aA	288 aA	321 aA	0,9929	0,4833	0,6332

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam os tratamentos de silício para o mesmo nível de radiação, e letras maiúsculas comparam os níveis de radiação para mesmo tratamento de silício. Os valores são médias (n = 5).

4 Discussão

As maiores concentrações de Si encontradas nas folhas das plantas adubadas com Si evidenciam a responsividade de plantas de cacauzeiro à adubação silicatada. Além disso, concentrações foliares de Si superiores a 1%, caracterizam essa espécie como acumuladora desse elemento, conforme a definição de Ma et al. (2007), corroborando os dados encontrados por Zanetti et al. (2016). Os resultados da concentração de Si no substrato e nas folhas de cacauzeiro mostram que não existe relação direta entre a depleção do Si no substrato com o aumento desse elemento nas folhas das plantas expostas à radiação UV-B, sugerindo o acúmulo desse elemento também em outros órgãos do vegetal. O maior acúmulo de Si nas plantas de cacau expostas à UV-B pode estar relacionado às maiores transpirações observadas nessa condição. O Si é carregado com o fluxo de água no vegetal e acumulado nas folhas (Exley, 2015). Contudo, Tripathi et al. (2016) observaram redução do acúmulo de Si na parte aérea em *Triticum aestivum* sob exposição à radiação UV-B.

Os danos às folhas dos cacauzeiros provocados pela UV-B parecem ter sido o fator principal para a perda de biomassa total dessas plantas. Os efeitos da radiação UV-B sobre a perda de área foliar e de biomassa nas plantas têm sido relatados por outros trabalhos com diferentes espécies (Kataria e Guruprasad, 2014; Singh et al., 2014; Zhu e Yang, 2015). Em cacauzeiro, a adubação com o Si amenizou os efeitos da UV-B, a ponto de proporcionar ganho de biomassa às plantas expostas a essa condição. Essa resposta, deve-se possivelmente aos pequenos ganhos de massa foliar, caulinar e radicular acumulados. O efeito positivo do Si em amenizar a perda de biomassa provocada pela radiação UV-B também foi relatado para outras espécies (Shen et al., 2010a; Yao et al., 2011).

O aumento na espessura dos tecidos de folhas expostas à UV-B é comumente relatado na literatura, propiciando maior proteção aos tecidos fotossintéticos pelo maior percurso a ser percorrido pela radiação (Gitz et al., 2005; Verdaguer et al., 2012). Entretanto, a exposição à radiação UV-B, em longo prazo, nem sempre causa alterações na espessura foliar (Hofmann e Campbell, 2012), demonstrando a capacidade de aclimação dessas plantas a esta condição. Para o cacauzeiro, a manutenção na espessura total do limbo também poderia estar associada a mecanismos intrínsecos de proteção contra a radiação, tais como, a presença de tricomas e uma epiderme mucilagínosa (Nakayama et al., 1996).

As alterações observadas pelo efeito da interação do Si com a UV-B sobre a anatomia foliar mostram que a resposta das plantas à radiação UV-B é mais acentuada que aquela produzida pela adubação com o Si. A espessura do parênquima esponjoso e densidade

estomática, por exemplo, mostraram valores maiores nas plantas apenas adubadas com Si, sendo esse efeito inibido quando irradiadas com a UV-B.

Sabe-se que a radiação UV-B reduz a concentração de pigmentos cloroplásticos (clorofilas e carotenoides) (Kakani et al., 2003b). Entretanto, as maiores concentrações de clorofilas e carotenoides encontradas nas plantas de cacau irradiadas com UV-B podem demonstrar aclimatação à quantidade e ao tempo de radiação a que as plantas foram expostas, conforme já observado para *Brassica napus* e *Arabidopsis thaliana* (Sangtarash et al., 2009; Boeger e Poulson, 2006).

O efeito da interação do Si com a radiação UV-B em apresentar menores concentrações de pigmentos cloroplásticos em relação às plantas apenas sob UV-B, sugerem que a adubação com Si tornou essas plantas mais tolerantes à exposição a UV-B, possibilitando a manutenção das concentrações de clorofilas e de carotenoides nos níveis encontrados nas plantas não irradiadas com UV-B.

As maiores concentrações de compostos absorventes de UV-B (antocianinas, flavonoides e fenóis) encontradas nas folhas de cacau expostas à UV-B é uma resposta comum observada em diferentes espécies, nessa condição (Jansen et al., 1998; Kakani et al., 2003b). Essas substâncias são consideradas como a primeira barreira à radiação UV-B, funcionando como telas de proteção, impedindo os danos aos cloroplastos e a outras organelas sensíveis à UV-B (Shen et al., 2010a; Yao et al., 2011). Tal fato foi corroborado pelo presente trabalho, uma vez que foi observado aumento na concentração de clorofilas e preservação dos fotossistemas, o que refletiu em maiores taxas de fotossíntese.

Na condição de exposição à UV-B, o efeito do Si em reduzir a concentração dos compostos absorventes de UV-B, também foi observada para *Glycine max* e *Triticum aestivum* (Shen et al., 2010a; Yao et al., 2011), e poderia indicar um estado de alívio das plantas a esse tipo de estresse, gerando uma economia energética.

A similaridade do comportamento fotoquímico das plantas sob UV-B com aquelas não expostas à UV-B, sugere que as alterações fotossintéticas observadas nessas plantas poderiam estar relacionadas à fase bioquímica da fotossíntese. Além disso, os maiores valores de g_s nas plantas sob UV-B indicam que este parâmetro é o responsável pela maior absorção de CO_2 nessas plantas. Esse tipo de efeito positivo da radiação UV-B sobre a assimilação de CO_2 não foi encontrado na literatura, sendo comuns os relatos de redução na fotossíntese devido aos efeitos danosos da UV-B aos fotossistemas (Jansen et al., 1998; Kataria e Guruprasad, 2014).

A redução da assimilação do CO_2 provocada pelo Si, nas plantas irradiadas com UV-B, parece também ser efeito da redução da condutância estomática, que reduziu a transpiração. Esses efeitos da interação do Si com a UV-B sobre a assimilação de CO_2

diferem dos encontrados para *Glycine max* e *Triticum aestivum* (Shen et al., 2010a; Yao et al., 2011). As maiores taxas de respiração no escuro observadas nas plantas sob UV-B são uma resposta comum para esse estresse (Martínez-Lüscher et al., 2015; Prasad et al., 2016). A capacidade do Si em amenizar a respiração nessa condição é um indicativo de redução de gastos dos fotoassimilados para o reparo dos danos aos componentes celulares e para a produção de substâncias relacionadas à defesa à UV-B.

As concentrações elevadas de carboidratos observadas nas folhas de cacau adubadas com Si ou sob UV-B, condiz com as maiores taxas de fotossíntese apresentadas por essas plantas. Além disso, essas concentrações elevadas de açúcares solúveis poderiam sugerir um melhor ajuste osmótico para o cacau (Kang et al., 2016), confirmando a maior eficiência no uso de água observada nesses tratamentos. O efeito isolado desses fatores em aumentar os teores de açúcares não tem sido observado na literatura. Outro ponto importante a se destacar é o efeito do Si em proporcionar maiores concentrações de sacarose, que tem sido considerada como sinalizador para a expressão gênica e adaptação fisiológica (Wind et al., 2010).

As maiores concentrações de lignina observadas nas plantas sob UV-B já representam uma resposta de defesa estabelecida pelas plantas de cacau a esse tipo de radiação, uma vez que esse composto funciona como uma barreira à radiação, especialmente quando acumulado sobre a epiderme das folhas (Hilal et al., 2004).

Os menores teores de mucilagem das folhas de cacau, na condição de UV-B sem Si, poderiam indicar uma perda do mecanismo de defesa inicial dessas folhas, já que a epiderme mucilagínosa pode atuar como um filtro ao excesso de radiação, protegendo assim, as estruturas internas da folha (Rocha et al., 2011; Zanetti et al., 2016). A interação do Si com a UV-B foi benéfica, uma vez que, proporcionou um incremento da concentração de mucilagem nas folhas dos cacaus sob UV-B.

A radiação UV-B promoveu uma maior atividade das enzimas SOD e CAT que se mostrou como um mecanismo de defesa enzimático ativo e eficiente contra os radicais livres, confirmado pela manutenção dos teores de H_2O_2 e de MDA nas plantas estudadas. A ativação desse mecanismo de defesa estimulado pela radiação UV-B é uma resposta frequentemente observada em outras espécies (Hideg et al., 2013; Kataria et al., 2014; Shen et al., 2010a). A maior concentração de H_2O_2 observada nas folhas das plantas adubadas com Si na ausência da UV-B, pode indicar o papel desse elemento como um agente estimulador de defesa das plantas de cacau. O H_2O_2 tem sido relatado como uma importante molécula de sinalização nos vegetais, mediando diversos processos fisiológicos e bioquímicos nas células vegetais (Li et al., 2009; Sewelam et al., 2014).

Em conclusão, a adubação silicatada amenizou os danos provocados pela radiação UV-B pela redução dos gastos energéticos para reparo dos danos e para manutenção dos processos fisiológicos e bioquímicos. O Si atuou de forma regulada com a radiação UV-B proporcionando economia energética pela redução do consumo de carbono pela respiração e da produção de pigmentos fotossintéticos e de substâncias absorventes de UV-B, levando a um discreto acúmulo de biomassa das plantas.

Referências

- Aebi, H., 1984. [13] Catalase in vitro, in: *Methods in Enzymology*. pp. 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell Environ.* 24, 1337–1344. doi:10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x
- Almeida, A.-A.F. de, Valle, R.R., 2007. Ecophysiology of the cacao tree. *Brazilian J. Plant Physiol.* 19, 425–448. doi:10.1590/S1677-04202007000400011
- Beggs, C.J., Wellmann, E., 1994. Photocontrol of flavonoid biosynthesis, in: *Photomorphogenesis in Plants*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 733–751. doi:10.1007/978-94-011-1884-2_26
- Boeger, M.R.T., Poulson, M., 2006. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). *Acta Bot. Brasilica* 20, 329–338. doi:10.1590/S0102-33062006000200008
- Bonino, R., 2013. Joia Rara da Bahia - Conheça o cacau catongo, preciosa variedade de amêndoa albina que promete valorizar a produção de chocolate fino brasileiro. *Menu* 175, 36–39.
- Butler, W.L., 1978. Energy Distribution in the Photochemical Apparatus of Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29, 345–378. doi:10.1146/annurev.pp.29.060178.002021
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310. doi:10.1016/S0076-6879(78)52032-6
- Chaves Filho, J.T., Stacciarini-Seraphin, E., 2001. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.-Hil.) em resposta ao estresse hídrico. *Rev. Bras. Botânica* 24, 199–204. doi:10.1590/S0100-84042001000200010
- Dos Santos, W.D., Ferrarese, M.L.L., Nakamura, C. V., Mourão, K.S.M., Mangolin, C.A., Ferrarese-Filho, O., 2008. Soybean (*Glycine max*) Root Lignification Induced by Ferulic Acid. The Possible Mode of Action. *J. Chem. Ecol.* 34, 1230–1241. doi:10.1007/s10886-008-9522-3
- Du, Z., Bramlage, W.J., 1992. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1566–1570. doi:10.1021/jf00021a018
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. doi:10.1021/ac60111a017
- Edmond Ghanem, M., Han, R.-M., Classen, B., Quetin-Leclerq, J., Mahy, G., Ruan, C.-J., Qin, P., Pérez-Alfocea, F., Lutts, S., 2010. Mucilage and polysaccharides in the halophyte plant species *Kosteletzkya virginica*: Localization and composition in relation to salt stress. *J. Plant Physiol.* 167, 382–392. doi:10.1016/j.jplph.2009.10.012

- Epstein, E., 1994. The anomaly of silicon in plant biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 11–17. doi:10.1073/pnas.91.1.11
- Epstein, E., Bloom, A.J., 2006. *Nutrição mineral de plantas : princípios e perspectivas*, 2nd ed. Planta, Londrina.
- Exley, C., 2015. A possible mechanism of biological silicification in plants. *Front. Plant Sci.* 6, 853. doi:10.3389/fpls.2015.00853
- Feng, J., Shi, Q., Wang, X., Wei, M., Yang, F., Xu, H., 2010. Silicon supplementation ameliorated the inhibition of photosynthesis and nitrate metabolism by cadmium (Cd) toxicity in *Cucumis sativus* L. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 123, 521–530. doi:10.1016/j.scienta.2009.10.013
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide Dismutases: II. Purification and Quantitative Relationship with Water-soluble Protein in Seedlings. *Plant Physiol.* 59, 315–318. doi:10.1104/pp.59.2.315
- Gitz, D.C., Liu-Gitz, L., Britz, S.J., Sullivan, J.H., 2005. Ultraviolet-B effects on stomatal density, water-use efficiency, and stable carbon isotope discrimination in four glasshouse-grown soybean (*Glycine max*) cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 53, 343–355. doi:10.1016/j.envexpbot.2004.04.005
- Hideg, E., Jansen, M.A.K., Strid, A., 2013. UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends Plant Sci.* 18, 107–115. doi:10.1016/j.tplants.2012.09.003
- Hilal, M., Parrado, M.F., Rosa, M., Gallardo, M., Orce, L., Massa, E.M., González, J.A., Prado, F.E., 2004. Epidermal lignin deposition in quinoa cotyledons in response to UV-B radiations. *Photochem. Photobiol.* 79, 205–210. doi:10.1562/0031-8655(2004)079<0205:ELDIQC>2.0.CO;2
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Circ. Calif. Agric. Exp. Stn.* 347.
- Hofmann, R.W., Campbell, B.D., 2012. Leaf-level responses to ultraviolet-B radiation in *Trifolium repens* populations under defoliation pressure. *Environ. Exp. Bot.* 78, 64–69. doi:10.1016/j.envexpbot.2011.12.019
- Hunt, R., 1982. *Plant growth curves. The functional approach to plant growth analysis.* Plant growth curves. *Funct. approach to plant growth Anal.*
- Jansen, M. a K., Gaba, V., Greenberg, B.M., 1998. Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci.* 3, 131–135. doi:10.1016/S1360-1385(98)01215-1
- Johansen, D., 1940. *Plant Microtechnique.* New York, 530.
- Kakani, V.G., Reddy, K.R., Zhao, D., Mohammed, A.R., 2003a. Effects of ultraviolet-B radiation on cotton (*Gossypium hirsutum* L.) morphology and anatomy. *Ann. Bot.* 91, 817–826. doi:10.1093/aob/mcg086
- Kakani, V.G., Reddy, K.R., Zhao, D., Sailaja, K., 2003b. Field crop responses to ultraviolet-B radiation: A review. *Agric. For. Meteorol.* 120, 191–218.

doi:10.1016/j.agrformet.2003.08.015

- Kang, J., Zhao, W., Zhu, X., 2016. Silicon improves photosynthesis and strengthens enzyme activities in the C3 succulent xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* under drought stress. *J. Plant Physiol.* 199, 76–86. doi:10.1016/j.jplph.2016.05.009
- Kataria, S., Guruprasad, K.N., 2014. Exclusion of solar UV components improves growth and performance of *Amaranthus tricolor* varieties. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 174, 36–45. doi:10.1016/j.scienta.2014.05.003
- Kataria, S., Jajoo, A., Guruprasad, K.N., 2014. Impact of increasing Ultraviolet-B (UV-B) radiation on photosynthetic processes. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 137, 55–66. doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.02.004
- Korndörfer, G.H., Pereira, H.S., Nolla, A., 2004. Análise de silício: solo, planta e fertilizante. *Uberlândia GPSi-ICIAG-UFU (Boletim técnico, 2)* 34.
- Li, S.-W.W., Xue, L., Xu, S., Feng, H., An, L., 2009. Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 65, 63–71. doi:10.1016/j.envexpbot.2008.06.004
- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy, in: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi:10.1002/0471142913.faf0403s01
- Ma, J.F., Yamaji, N., Tamai, K., Mitani, N., 2007. Genotypic difference in silicon uptake and expression of silicon transporter genes in rice. *Plant Physiol.* 145, 919–24. doi:10.1104/pp.107.107599
- Martínez-Lüscher, J., Morales, F., Delrot, S., Sánchez-Díaz, M., Gomès, E., Aguirreolea, J., Pascual, I., 2015. Characterization of the adaptive response of grapevine (cv. Tempranillo) to UV-B radiation under water deficit conditions. *Plant Sci.* 232, 13–22. doi:10.1016/j.plantsci.2014.12.013
- Ming, D.F., Pei, Z.F., Naeem, M.S., Gong, H.J., Zhou, W.J., 2012. Silicon alleviates PEG-induced water-deficit stress in upland rice seedlings by enhancing osmotic adjustment. *J. Agron. Crop Sci.* 198, 14–26. doi:10.1111/j.1439-037X.2011.00486.x
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867–880.
- Nakayama, L.H., Soares, M.K., Appezzato da Glória, B., 1996. Contribuição ao estudo anatômico da folha e do caule do cacauieiro (*Theobroma cacao* L.). *Sci. Agric.* 53, 73–73. doi:10.1590/S0103-90161996000100010
- Park, Y.K., Ikegaki, M., Abreu, J.A. da S., Alcici, N.M.F., 1998. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 18, 313–318. doi:10.1590/S0101-20611998000300011
- Prasad, S.M., Kumar, S., Parihar, P., Singh, A., Singh, R., 2016. Evaluating the combined effects of pretilachlor and UV-B on two *Azolla* species. *Pestic. Biochem. Physiol.* 128, 45–56. doi:10.1016/j.pestbp.2015.10.006

- Riazi, A., Matsuda, K., Arslan, A., 1985. Water-stress induced changes in concentrations of proline and other solutes in growing regions of young barley leaves. *J. Exp. Bot.* 36, 1716–1725. doi:10.1093/jxb/36.11.1716
- Rocha, J.F., Pimentel, R.R., Machado, S.R., 2011. Estruturas secretoras de mucilagem em *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae): distribuição, caracterização morfoanatômica e histoquímica. *Acta Bot. Brasilica* 25, 751–763. doi:10.1590/S0102-33062011000400003
- Sangtarash, M.H.H., Qaderi, M.M.M., Chinnappa, C.C.C., Reid, D.M.M., 2009. Differential sensitivity of canola (*Brassica napus*) seedlings to ultraviolet-B radiation, water stress and abscisic acid. *Environ. Exp. Bot.* 66, 212–219. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.03.004
- Sewelam, N., Jaspert, N., Van Der Kelen, K., Tognetti, V.B., Schmitz, J., Frerigmann, H., Stahl, E., Zeier, J., Van Breusegem, F., Maurino, V.G., 2014. Spatial H₂O₂ signaling specificity: H₂O₂ from chloroplasts and peroxisomes modulates the plant transcriptome differentially. *Mol. Plant* 7, 1191–1210. doi:10.1093/mp/ssu070
- Shen, X., Li, X., Li, Z., Li, J., Duan, L., Eneji, A.E., 2010a. Growth, physiological attributes and antioxidant enzyme activities in soybean seedlings treated with or without silicon under UV-B radiation stress. *J. Agron. Crop Sci.* 196, 431–439. doi:10.1111/j.1439-037X.2010.00428.x
- Shen, X., Zhou, Y., Duan, L., Li, Z., Eneji, a. E., Li, J., 2010b. Silicon effects on photosynthesis and antioxidant parameters of soybean seedlings under drought and ultraviolet-B radiation. *J. Plant Physiol.* 167, 1248–1252. doi:10.1016/j.jplph.2010.04.011
- Singh, V.P., Kumar, J., Singh, S., Prasad, S.M., 2014. Dimethoate modifies enhanced UV-B effects on growth, photosynthesis and oxidative stress in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings: Implication of salicylic acid. *Pestic. Biochem. Physiol.* 116, 13–23. doi:10.1016/j.pestbp.2014.09.007
- Singleton, V.L., Rossi, J.A.J., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, V.P., Prasad, S.M., Dubey, N.K., Chauhan, D.K., 2016. Silicon nanoparticles more effectively alleviated UV-B stress than silicon in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 1–12. doi:10.1016/j.plaphy.2016.06.026
- Verdaguer, D., Llorens, L., Bernal, M., Badosa, J., 2012. Photomorphogenic effects of UVB and UVA radiation on leaves of six Mediterranean sclerophyllous woody species subjected to two different watering regimes at the seedling stage. *Environ. Exp. Bot.* 79, 66–75. doi:10.1016/j.envexpbot.2012.01.008
- Wind, J., Smeekens, S., Hanson, J., 2010. Sucrose: Metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry* 71, 1610–1614. doi:10.1016/j.phytochem.2010.07.007
- Yaghubi, K., Ghaderi, N., Vafae, Y., Javadi, T., 2016. Potassium silicate alleviates deleterious effects of salinity on two strawberry cultivars grown under soilless pot culture. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 213, 87–95. doi:10.1016/j.scienta.2016.10.012

- Yao, X., Chu, J., Cai, K., Liu, L., Shi, J., Geng, W., 2011. Silicon improves the tolerance of wheat seedlings to ultraviolet-B stress. *Biol. Trace Elem. Res.* 143, 507–517. doi:10.1007/s12011-010-8859-y
- Yao, X., Liu, Q., 2006. Changes in morphological, photosynthetic and physiological responses of Mono Maple seedlings to enhanced UV-B and to nitrogen addition. *Plant Growth Regul.* 50, 165–177. doi:10.1007/s10725-006-9116-4
- Zanetti, L.V., Rozindo, C., Milanez, D., Gama, V.N., Milanez, C.R.D., Gama, V.N., Aguilar, M.A.G., Souza, C.A.S., Campostrini, E., Ferraz, T.M., Figueiredo, F.A.M.M. de A., 2016. Leaf application of silicon in young cacao plants subjected to water deficit. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 51, 215–223. doi:10.1590/S0100-204X2016000300003
- Zhu, P., Yang, L., 2015. Ambient UV-B radiation inhibits the growth and physiology of *Brassica napus* L. on the Qinghai-Tibetan plateau. *F. Crop. Res.* 171, 79–85. doi:10.1016/j.fcr.2014.11.006

CAPÍTULO 3

Caracterização morfoquímica de cristais em folhas de *Theobroma cacao* L. (Malvaceae): registros inéditos de morfotipos e de sílica

Resumo

O acúmulo de silício comumente encontrado nas folhas de *Theobroma cacao* L., pode estar relacionado com a elevada quantidade de cristais encontrada nas folhas desta espécie. No presente trabalho investigou-se a morfologia, composição química e localização dos cristais foliares encontrados no genótipo Catongo de *T. cacao*, verificando a sua possível composição silicatada. Secções foliares e cristais isolados foram analisados por microscopia de luz transmissível e polarizada e por microscopia eletrônica de varredura. A composição química foi determinada por meio de testes histoquímicos, microanálise de raio X e espectroscopia Raman. Identificaram-se quinze morfotipos de cristais, com localização restrita ao redor das nervuras, com exceção, das drusas e cristais esféricos. A análise histoquímica evidenciou que os cristais eram de oxalato e de sílica. Para alguns cristais prismáticos foi determinada a composição de oxalato de cálcio mono-hidratado por meio da análise Raman. A microanálise de raio-X mostrou que o cálcio foi o elemento comum a todos os tipos de cristais e que os cristais lamelares mostraram picos elevados de silício, enquanto, cristais esféricos picos pequenos desse elemento. Os dados evidenciaram a diversidade morfológica e química de cristais em *T. cacao* sendo de oxalato de cálcio, sílica ou mistos de oxalato e sílica.

Palavras chave: biominerais, cacau, oxalato de cálcio, MEV-EDS, Raman, wewelita.

1 Introdução

A formação de cristais pelos tecidos vegetais é um processo comum observado em todos os níveis taxonômicos (Franceschi e Nakata, 2005), sendo este processo conhecido como biomineralização (Weiner e Dove, 2003).

De forma geral, os cristais inorgânicos ocorrem em todos os órgãos das plantas e em quase todos os tipos de tecidos, podendo representar de 3 a 80% da massa seca de uma planta (Franceschi e Nakata, 2005). Os cristais geralmente se formam em células chamadas de idioblastos, embora, cristais extracelulares sejam também relatados (Franceschi e Horner, 1980; Lersten e Horner, 2011).

Cristais de oxalato e carbonato de cálcio e de sílica estão entre os biominerais mais abundantes nos vegetais (Weiner e Dove, 2003), enquanto cristais de sulfato de cálcio e oxalato de magnésio são raros (He et al., 2012). Dentre os minerais, o cálcio é predominante na biomineralização vegetal, estando presente em cerca de 50% dos biominerais conhecidos (Weiner e Dove, 2003). Acredita-se que cerca de 75% das Angiospermas apresentam cristais de oxalato de cálcio (Franceschi e Horner, 1980). Estes podem apresentar-se solitários ou em formas agregadas, sendo comumente, descritas cinco formas principais: drusas, ráfides, estilóides, prismáticos e areia cristalina (Haberlandt, 1914). Outros formatos são variações desses morfotipos (Franceschi e Horner, 1980).

A predominância de alguns tipos morfológicos de cristais de oxalato de cálcio dentro de algumas espécies e a sua relação com o crescimento e expansão celular indicam que os processos de biomineralização não são processos aleatórios e simples, mas coordenados por uma forte regulação genética (Franceschi e Nakata, 2005). Vários estudos em uma variedade de grupos de plantas têm demonstrado que os tipos de cristais e sua localização nas folhas podem ser específicos de gêneros e espécies, e ter um importante significado para a sistemática e filogenética, bem como para a fisiologia e a biologia celular (Horner e Wanke, 2012; Lersten e Horner, 2011; Silva et al., 2014).

Tem sido proposto que uma das principais funções dos cristais de oxalato de cálcio é a regulação dos níveis citoplasmáticos de cálcio, tornando esse elemento em uma forma osmoticamente inativa (Franceschi e Nakata, 2005; He et al., 2014). Outras hipóteses incluem desintoxicação de ácido oxálico e de metais pesados em níveis tóxicos, proteção contra herbivoria, suporte estrutural, reflexão da luz para a fotossíntese e dissipação de calor, além de atuar no controle estomático nas trocas gasosas (Franceschi e Horner, 1980; He et al., 2014; Horner, 2012; Lersten e Horner, 2011; Ruiz e Mansfield, 1994). O processo de formação de cristais pode ser rápido e reversível (Franceschi, 1989; He et al., 2014) e os

fatores que influenciam a sua formação muitas vezes estão relacionados com as funções desempenhadas pelos cristais (He et al., 2014).

Cristais de sílica, comumente chamados de fitólitos, são mais comuns em monocotiledôneas, especialmente em gramíneas (He et al., 2014). A função dos fitólitos nas plantas ainda é incerta, não existindo um consenso entre os pesquisadores (Massey et al., 2006; Tsutsui et al., 2016). Entretanto, alguns estudos mostram a relação dessas estruturas com a defesa do vegetal à herbivoria (Epstein, 2009; Hunt et al., 2008; Reynolds et al., 2012) e na detoxificação de alumínio e metais pesados (da Cunha e do Nascimento, 2009; Hodson e Sangster, 1993).

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.), Malvaceae (Alverson et al., 1999), tem seu centro de origem na América do Sul, ocorrendo em florestas quentes e úmidas das bacias do Rio Amazonas e Orinoco, sendo introduzido e cultivado a mais de 2000 anos nas terras baixas do México e da América Central (Cheesman, 1944; Motamayor et al., 2002; Thomas et al., 2012). É considerada uma das culturas perenes mais importantes, com uma produção mundial estimada de 4,45 milhões de toneladas em 2014 (FAO, 2014). A principal importância econômica do cacau provém de suas sementes que são utilizadas principalmente para a produção de chocolate. Além disso, seus derivados e subprodutos também são utilizados nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (Almeida e Valle, 2007).

São escassas as informações disponíveis na literatura referente às formas e composição química dos cristais presentes nessa espécie, sendo descritos, de forma geral, cristais prismáticos e drusas (Nakayama et al., 1996). Metcalfe e Chalk, (1950) fazem menção para a presença de cristais de oxalato de cálcio solitários e agregados no limbo dos representantes de Sterculiaceae e Malvaceae, sendo as formas agregadas as mais comuns. Os mesmos autores relatam a presença de sílica nos gêneros *Heritiera*, *Scaphium* e *Tarrietia*, também pertencentes à Malvaceae. Para *Theobroma*, há relatos de cristais prismáticos e drusas no caule (Cuatrecasas, 1964) e folha (Garcia et al., 2014).

Considerando que *T. cacao* é uma espécie acumuladora de silício apresentando concentração elevada desse elemento em suas folhas (Zanetti et al., 2016) e baseado em observações prévias da elevada quantidade de cristais nas folhas do cacauieiro, o presente trabalho objetivou investigar a localização, morfologia e composição química dos cristais foliares do genótipo Catongo de *Theobroma cacao*, verificando-se a possível composição silicatada dos cristais.

2 Material e métodos

2.1 Material vegetal

Mudas seminais de cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.), genótipo Catongo, com 3 meses de idade, foram utilizadas no presente estudo. As mudas foram cultivadas em tubetes de 290 mL, contendo substrato comercial Forth® e adubadas a cada 15 dias com solução nutritiva de Hogland (pH 6,2) (Hoagland e Arnon, 1950). As plantas foram mantidas em câmara de crescimento (Shellab Modelo LI15, Oregon, EUA) com fotoperíodo de 12 horas, radiação fotossinteticamente ativa de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por meio de quatro lâmpadas de luz branca de 32W (GE - F32T8/SP41/ECO), temperatura constante de 27 °C e umidade relativa de 60%. Segmentos da porção mediana de folhas completamente expandidas e localizadas no 2º nó a partir do ápice do eixo ortotrópico e em bom estado fitossanitário foram lavados com água deionizada e em seguida preservados em etanol 70% (Johansen, 1940).

Fragmentos foliares (1,5 x 1,0 cm) previamente preservados em álcool 70% foram diafanizados em hipoclorito de sódio (5%) por 24 h até clareamento total para a visualização paradérmica dos cristais. As secções transversais foliares foram realizadas em micrótomo de mesa. As amostras foram montadas entre lâmina e lamínula de vidro com água e observadas ao microscópio. As amostras de cristais isoladas foram obtidas através da raspagem das nervuras foliares com auxílio de uma lâmina de barbear.

2.2 Testes histoquímicos

Para a identificação da natureza aniônica dos cristais, foi realizado teste histoquímico de solubilidade ácida com ácido acético glacial para identificação de carbonatos, e com ácido sulfúrico 10%, para identificação de oxalatos (Chamberlain, 1932).

2.3 Microscopia de luz

As lâminas obtidas a partir das secções transversais e paradérmicas e de cristais isolados foram analisadas por luz transmissível e polarizada em microscópio de luz (Nikon Eclipse 50i, Nikon Tec. Corporation, Tokyo, Japan). As fotomicrografias foram obtidas por meio de câmera fotográfica digital (Nikon digital DS-Ri1, unidade digital DS-U3, Nikon Tec. Corporation, Tokyo, Japan) acoplada ao microscópio e a um microcomputador com software

de captura e análises de imagem (Nikon NIS-Elements, Nikon Tec. Corporation, Tokyo, Japan).

2.4 Microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raio X

Os cristais isolados foram aderidos sobre fita de carbono em um “stub”. Todas as amostras foram previamente metalizadas com ouro utilizando um metalizador da marca Shimadzu, modelo IC-50. Como parâmetros de metalização utilizou-se tensão de 1,4 kV durante 5 minutos. A análise da microestrutura dos cristais foi realizada por meio de microscópio eletrônico de varredura (MEV), marca Shimadzu, modelo SSX-550, acoplado com sistema de EDS (Energy Dispersive System), o qual possibilitou a determinação da composição qualitativa e semiquantitativa das amostras, a partir da emissão de raios X característicos. A varredura das amostras foi realizada com feixe de elétrons gerado pela emissão termiônica de um filamento de tungstênio, sendo acelerado por uma diferença de potencial de 15 kV. A distância de trabalho (wd) utilizada variou de 16 a 17 mm.

2.5 Espectroscopia Raman

Os cristais isolados foram dispostos sobre uma lâmina de vidro e analisados ao microscópio confocal Raman (Alpha 300 X, WITEC). As medidas dos espectros Raman dos cristais foram adquiridas no mesmo microscópio equipado com um scanner piezo (P-500, Physik Instrumente) e uma objetiva de microscópio da Nikon (100X/ 0,9). Os espectros dos cristais estudados foram determinados por meio de um laser polarizado linear (laser verde bombeado por diodo, $\lambda = 532$ nm, CrystaLaser) focado com um tamanho de ponto limitado e a luz Raman foi detectada por um CCD espectroscópico retroiluminado com ar (ANDOR) por trás de um espectrógrafo de rede (600 g mm^{-1}) (ACTON) com uma resolução de 6 cm^{-1} . A potência do laser na amostra foi de aproximadamente 4,5 mW. Também foram realizadas medidas na lâmina de vidro, com o intuito de eliminar qualquer dúvida sobre a leitura da amostra. O software ScanCtrlSpectroscopyPlus (WITEC) foi utilizado para a configuração da medição e processamento de imagem, e o software Origin Pro 8.5 para a confecção e análise dos espectros.

2.6 Caracterização dos cristais

A tipificação morfológica dos cristais foi realizada segundo o Código Internacional para a Nomenclatura de fitólitos (Madella et al., 2005) e trabalhos de He et al., (2012) e Silva et al., (2014).

3 Resultados

Folhas de *T. cacao* apresentam cristais com formas e tamanhos variados, sendo os cristais prismáticos e as drusas os dois morfotipos principais observados. As drusas são mais abundantes que os cristais prismáticos na totalidade do limbo. Entretanto, em algumas porções do limbo e, de maneira aleatória, os cristais prismáticos se mostraram mais abundantes que as drusas (Figura 1 A-B). Quanto à localização, os cristais prismáticos estão restritos ao redor das nervuras e, em maior número, nas nervuras terciárias. As drusas possuem distribuição ampla ao longo de todo o mesofilo (Figura 1 A-B).

As secções transversais possibilitaram a identificação de alguns morfotipos de cristais e sua localização nos tecidos do limbo (Figura 1 C-N). No mesofilo, as diversas formas de cristais, com exceção das drusas e cristais esféricos, apresentaram localização na primeira camada externa à bainha esclerenquimática do feixe vascular, em idioblastos (Figura 1 C-D, I-J e M-N). As drusas foram encontradas em todo o mesofilo, sendo mais frequentes no parênquima paliçádico (Figura 1 C-D, K-L), já os cristais esféricos, além do mesofilo, foram vistos na epiderme (Figura 1 I-J), principalmente, na face adaxial. A presença de cristais na nervura central foi menos frequente que nas demais regiões do limbo, sendo encontrados no parênquima cortical, onde os cristais, com exceção das drusas, também ocuparam a primeira camada de células externas à bainha esclerenquimática (Figura 1 E-H).

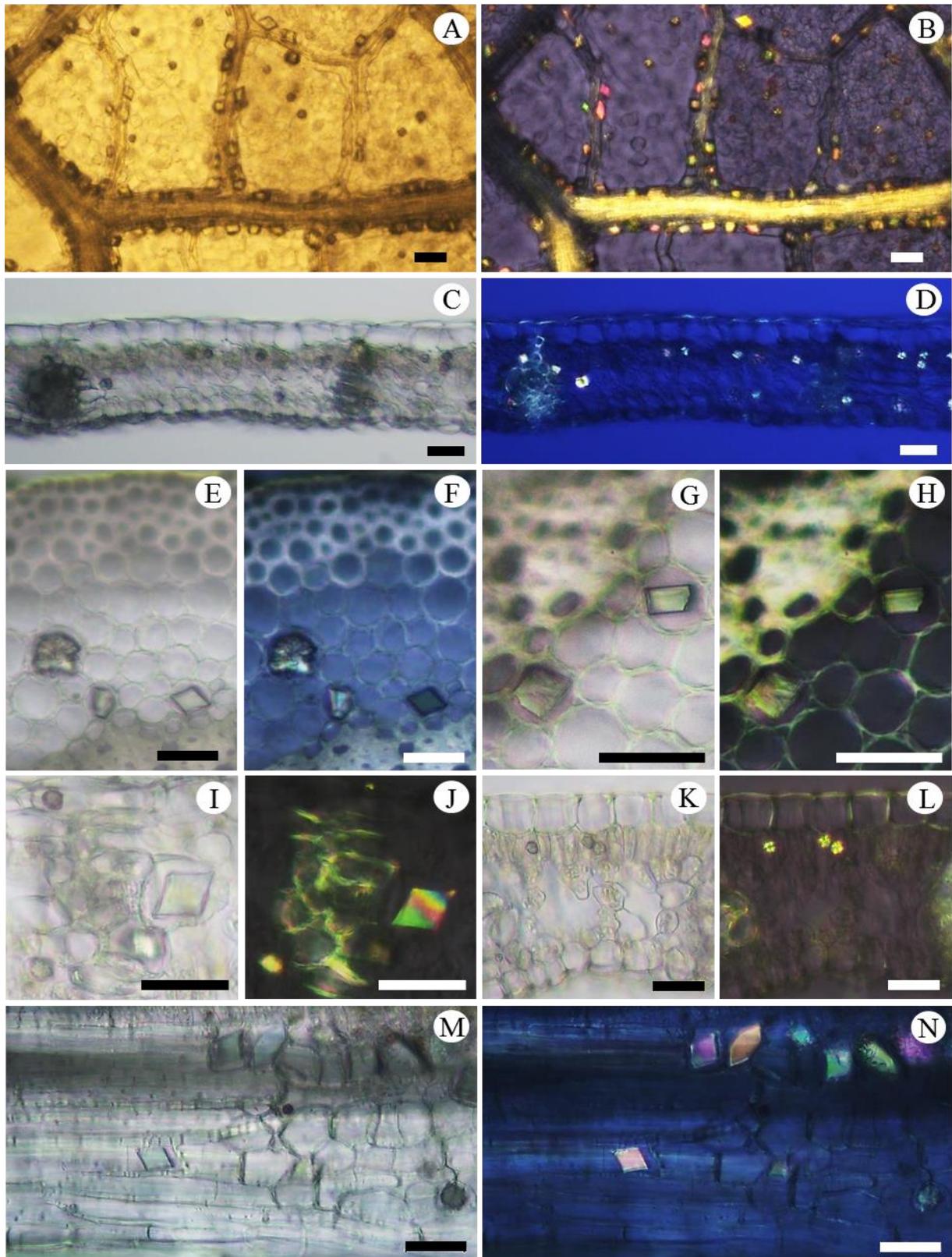


Figura 1 – Fotomicrografias de amostras foliares clarificadas de *T. cacao*, evidenciando diferentes tipos de cristais e sua localização, em luz transmissível (A, C, E, G, I, K) e polarizada (B, D, F, H, J, L). (A e B) Visão paradérmica da face abaxial foliar evidenciando cristais prismáticos ao longo de nervuras de 3^a a 5^a ordem e drusas no mesofilo. (C e D) Secção transversal do limbo evidenciando cristais prismáticos em torno dos feixes vasculares e drusas dispersas no mesofilo. (E e F) Secção transversal da nervura central mostrando drusa e cristais prismáticos tabular losangular e piramidal no parênquima fundamental. (G e H) Secção transversal da nervura central mostrando cristal lamelar losangular e cristal prismático tabular retangular, no parênquima fundamental. (I e J) Detalhe de cristal

tabular losangular e drusa junto à bainha do feixe, e cristal esférico na epiderme, em secção transversal. (K e L) Secção transversal mostrando drusas no parênquima paliçádico. (M e N) Visão ampliada de cristais prismáticos de diferentes formatos próximos a um feixe vascular. Barras iguais a 25 µm.

A maioria dos cristais quando analisados com luz polarizada apresentou birrefringência com diferentes cores de interferência ao giro de 360° do polarizador (Figuras 1 e 2), o que permitiu a melhor distinção das formas cristalinas nos tecidos vegetais. Os cristais prismáticos e as drusas apresentaram elevada birrefringência; cristais lamelares mostraram baixa birrefringência e, os cristais esféricos, ausência de birrefringência. Cores uniformes à polarização cruzada foram observadas para a maioria dos cristais prismáticos e para algumas drusas (figura 1 L e N), enquanto que, cores variadas foram vistas para outras drusas, cristais lamelares e cristais prismáticos (Figura 1 F, H e J).

Tabela 1 – Morfotipos, localização e caracterização histoquímica de cristais observados no limbo de *T. cacao* quanto à solubilidade ao ácido acético PA (C₂H₄O₂) e ao ácido sulfúrico (H₂SO₄) 10% V/V. BF (bainha do feixe vascular), CP (cristal prismático), EP (epiderme), PC (parênquima clorofiliano), PF (parênquima fundamental). Ânion presente (+) ou ausente (-).

Morfotipo	Localização	Teste histoquímico		Natureza aniônica		
		C ₂ H ₄ O ₂	H ₂ SO ₄	Carbonato	Oxalato	Sílica
Drusa	PC; PF	Insolúvel	Solúvel	-	+	-
Cristal esférico	EP; PC; PF	Insolúvel	Solúvel	-	+	-
CP tabular losangular	Junto à BF	Insolúvel	Solúvel	-	+	-
CP tabular hexagonal	Junto à BF	Insolúvel	Solúvel	-	+	-
CP tabular piramidal	Junto à BF	Insolúvel	Solúvel	-	+	-
CP tabular retangular	Junto à BF	Insolúvel	Solúvel	-	+	-
CP cúbico	Junto à BF	Insolúvel	Solúvel	-	+	-
CP paralelepipedal	Junto à BF	Insolúvel	Solúvel	-	+	-
CP trapeziforme	Junto à BF	Insolúvel	Solúvel	-	+	-
Cristal cuneiforme	Junto à BF	Insolúvel	Solúvel	-	+	-
Cristal quilhiforme	Junto à BF	Insolúvel	Solúvel	-	+	-
Estilóide	Junto à BF	Insolúvel	Solúvel	-	+	-
Bloco pseudoprismático	Junto à BF	Insolúvel	Insolúvel	-	-	+
Cristal lamelar amorfo	Junto à BF	Insolúvel	Insolúvel	-	-	+
Cristal lamelar losangular	Junto à BF	Insolúvel	Insolúvel	-	-	+

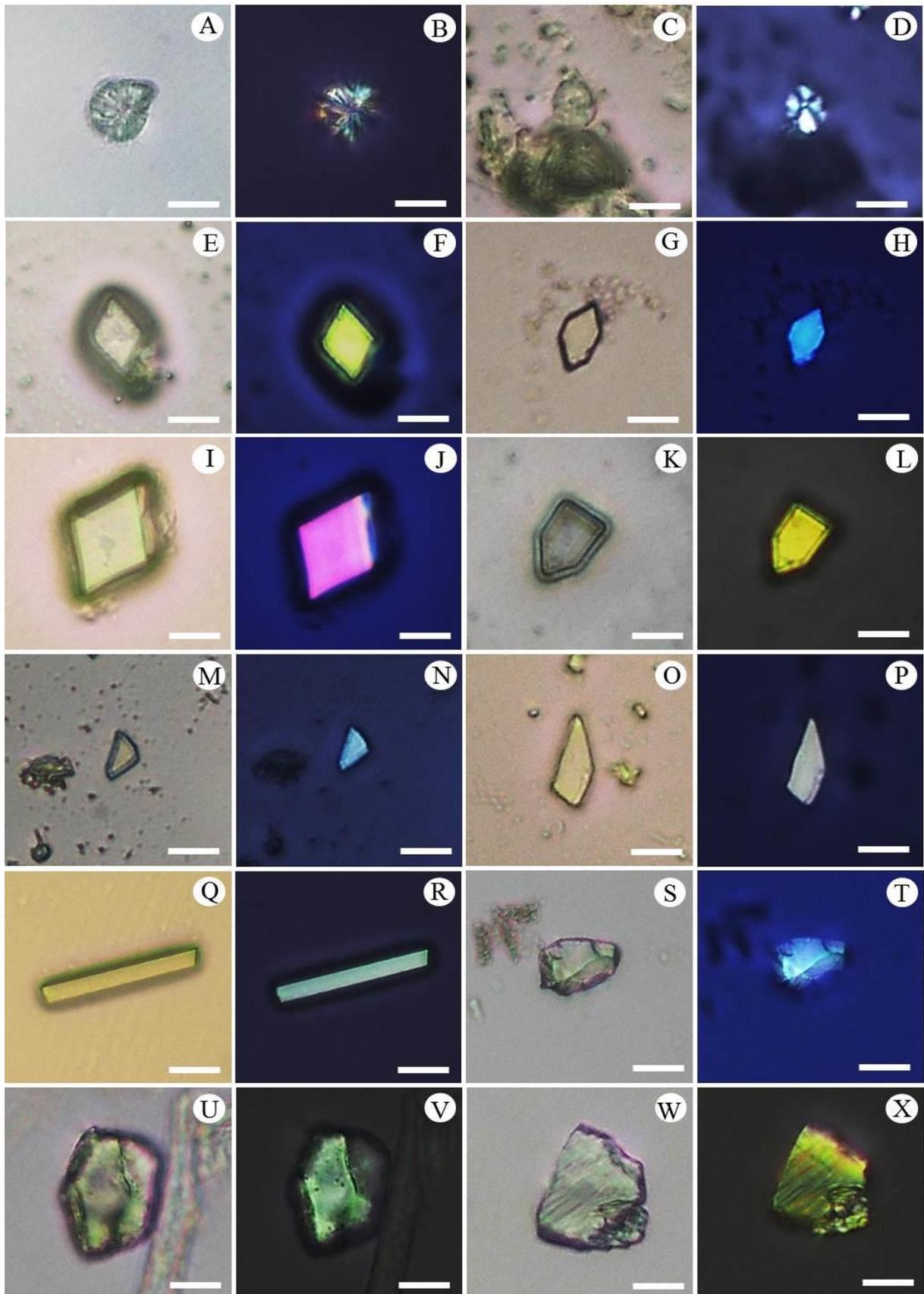


Figura 2 – Fotomicrografias de diferentes cristais foliares de *T. cacao* vistos isolados sob luz transmissível (A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S, U, W) e polarizada (B, D, F, H, J, L, N, P, R, T, V, X). Drusas (A-D). Cristais prismáticos (E-R). Tabular losangular (E e F). Tabular hexagonal (G e H). Cúbico (I e J). Trapeziforme (K e L). Cuneiforme (M e N). Quilhiforme (O e P). Estilóde (Q e R). Blocos pseudoprismáticos (S-V). Cristal lamelar amorfo (W e X). Barra equivale a 10 μm .

A visualização dos cristais isolados extraídos do limbo de *T. cacao* possibilitou a observação de outras formas cristalinas (Figura 2), além daquelas anteriormente descritas. Foram observados os seguintes morfotipos de cristal: drusa (Figuras 2 A-B), esférico (Figuras 2 C-D), tabular losangular (Figuras 2 E-F), tabular hexagonal (Figuras 2 G-H), cúbico (Figuras 2 I-J), trapeziforme (Figuras 2 K-L), cuneiforme (Figuras 2 M-N), quilhiforme (Figuras 2 O-P), estilóde (Figuras 2 Q-R), blocos pseudoprismáticos (Figuras 2 S-V) e lamelar amorfo (Figuras 2 W-X).

Os testes histoquímicos indicaram as naturezas aniônicas para oxalato e sílica (Tabela 1) dos cristais, descartando a natureza para carbonatos, uma vez que os cristais analisados não dissolveram em ácido acético. A dissolução das drusas, cristais esféricos e prismáticos ao ácido sulfúrico indicou a natureza de oxalato, enquanto que os blocos pseudoprismáticos e os cristais lamelares apresentaram natureza sílica, por não se dissolverem.

Os espectros Raman dos cristais prismáticos cúbico, trapeziforme e tabular foram semelhantes com bandas em 506, 592, 896, 1463, 1492 e 1632 cm^{-1} , sendo características para oxalato de cálcio na forma mono-hidratada (Figura 3).

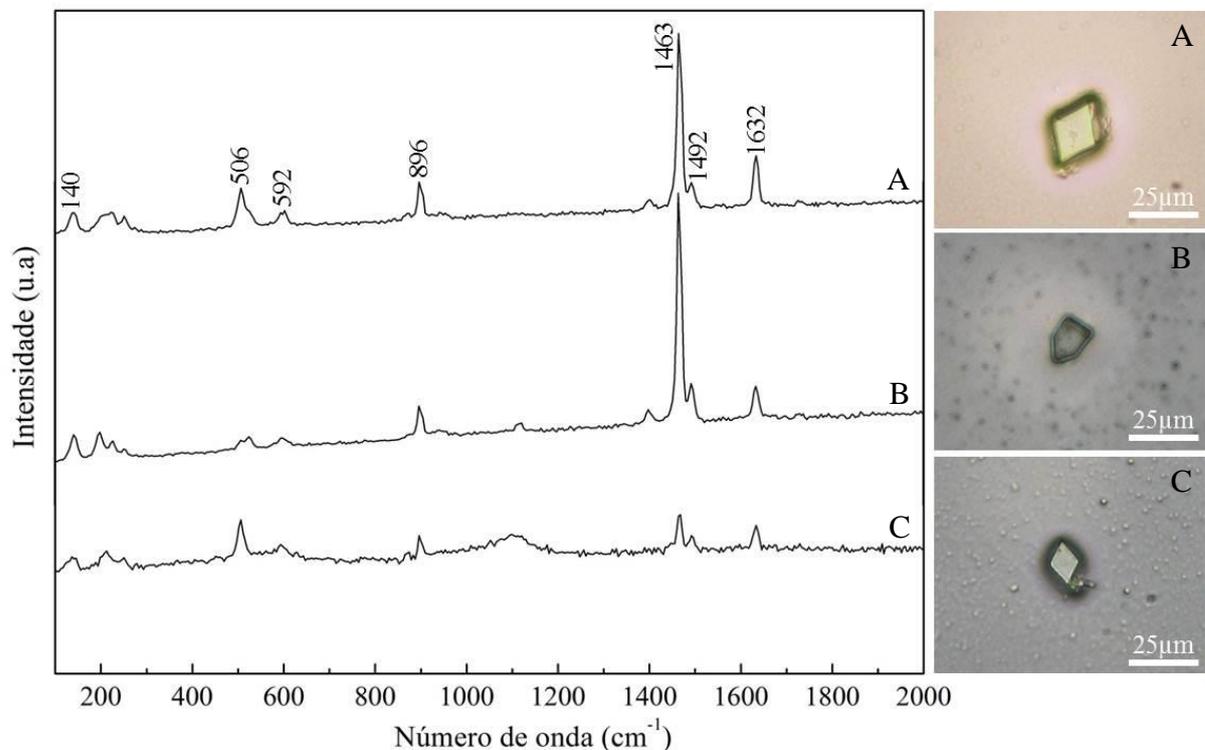


Figura 3 – Espectro Raman de três cristais prismáticos extraídos de folhas de *Theobroma cacao* L. (A) Cristal prismático cúbico. (B) Cristal prismático trapeziforme. (C) Cristal prismático tabular losangular.

A MEV mostrou a morfologia cristalina detalhada de alguns cristais, sendo observada a formação sólida e única para os cristais prismáticos (Figura 4 A-C) e de várias camadas de lâminas delgadas para os cristais lamelares (Figura 4 E-F). O morfotipo cristal esférico também foi confirmado por esta análise (Figura 4D).

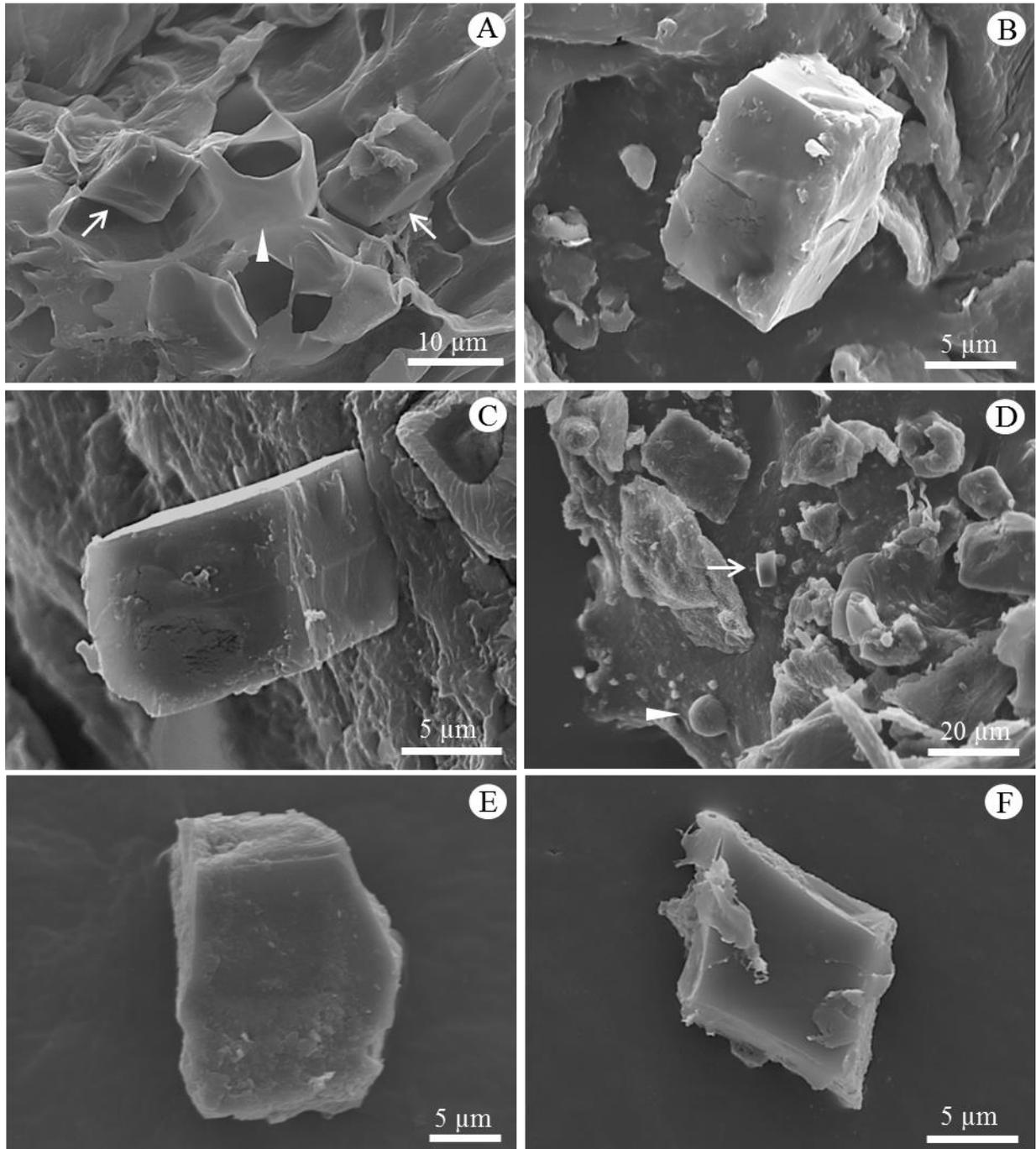


Figura 4 – Eletromicrografias de varredura de alguns morfotipos de cristais encontrados em folhas de *Theobroma cacao* L. (A) Parede de idioblastos rompidos (ponta de seta) mostrando cristais prismáticos (setas). (B) Cristal prismático paralelepipedal. (C) Cristal prismático cúbico. (D) Cristal esférico (ponta de seta) e cristal lamelar amorfo (seta). (E) Cristal lamelar amorfo. (F) Cristal lamelar losangular.

As microanálises por EDS revelaram quatro composições elementares para os cristais analisados, além da composição da parede de um idioblasto (Figura 5, Tabela 2). A parede do idioblasto apresentou picos elevados de C e O, e traços de Ca e Na (Figura 5A). A primeira composição elementar foi identificada para os cristais prismáticos paralelepipedal e cúbico, sendo composta por picos elevados de Ca, picos intermediários de O e C e, pico baixo de Al (Figura 5B). A segunda composição característica dos cristais esféricos apresentou pico elevado para o Ca, picos médios para O e C e, picos baixos para Ti, Si e Na (Figura 5C). A terceira composição foi identificada para um tipo de cristal lamelar amorfo composto por um pico elevado de Si e picos pequenos de C, K, Ca, O, Fe, Al e Na, na sequência decrescente de intensidade (Figura 5D). Uma última composição elementar foi identificada para outros dois cristais lamelares, um amorfo e outro losangular, sendo caracterizada pela variação na intensidade dos picos de C, O, Na, Al, Si e Ca. O morfotipo amorfo apresentou pico elevado de Si, picos médios de Al e o O e, picos pequenos para os demais elementos (Figura 5E), enquanto que o morfotipo losangular mostrou um pico elevado de Si e pequenos picos de O, Na, Ca, C e o Al, na sequência decrescente de intensidade (Figura 5F).

Tabela 2 – Composição elementar química, tamanho e localização de alguns morfotipos de cristais encontrados em folhas de *Theobroma cacao* L. BF (bainha do feixe vascular), CP (cristal prismático), EP (epiderme), PC (parênquima clorofiliano), PF (parênquima fundamental).

Composição elementar	Morfotipo	Tamanho (μm)	Localização
C, O, Al, Ca	CP paralelepipedal (Fig. 4B)	Dimensão da maior face 7 x 11	Junto à BF
C, O, Al, Ca	CP cúbico (Fig. 4C)	Dimensão da face 10 x 10	Junto à BF
C, O, Na, Si, Ca, Ti	Cristal esférico (Fig. D)	Diâmetro 9	EP; PC; PF
C, O, Na, Al, Si, K, Ca, Fe	Cristal lamelar amorfo (Fig. D)	Comprimento 6 x 2,5	Junto à BF
C, O, Na, Al, Si, Ca	Cristal lamelar amorfo (Fig. E)	Comprimento 21 x 16	Junto à BF
C, O, Na, Al, Si, Ca	Cristal lamelar losangular (Fig. F)	Comprimento 10 x 10	Junto à BF

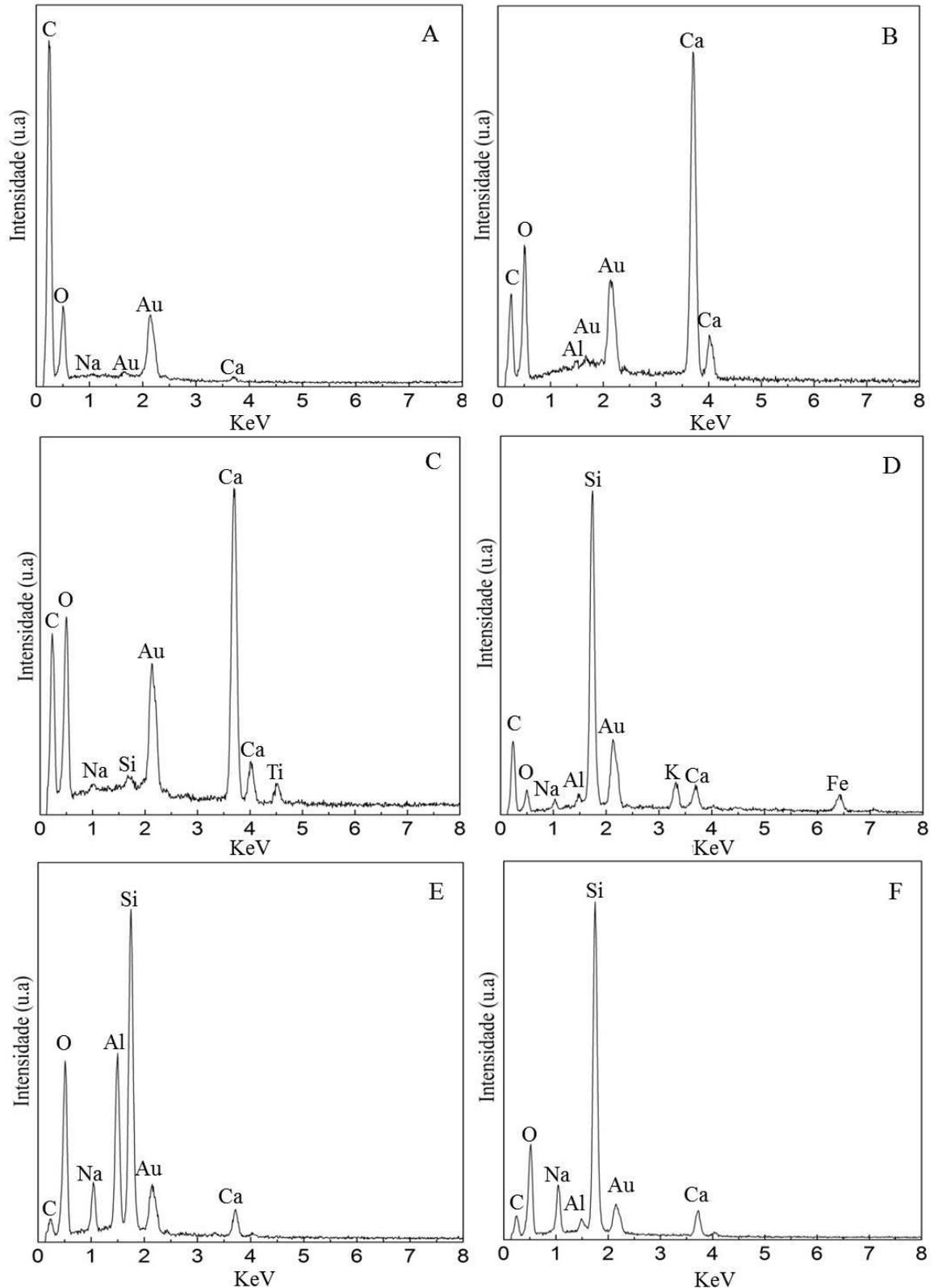


Figura 5 – Espectros de raio-X por dispersão em energia mostrando os padrões de composição química elemental da parede do idioblasto e dos cristais encontrados no limbo de *T. cacao*. A. Parede do idioblasto (Figura 4A). B. Cristal prismático paralelepipedal e cúbico (Figura 4 B-C). C. Cristal esférico (Figura 4D). D-E. Cristais lamelares amorfos (Figura 4 D-E). F. Cristal lamelar losangular (Figura 4F). Os picos de absorvância de ouro (Au) são resultantes da metalização das amostras. Carbono (C). Oxigênio (O). Sódio (Na). Alumínio (Al). Silício (Si). Potássio (K). Cálcio (Ca). Titânio (Ti). Ferro (Fe).

4 Discussão

A diversidade de morfotipos e composição de cristais encontrados nas folhas de *T. cacao* no presente estudo é inédita, sendo até mesmo escassos os trabalhos com outras espécies que evidenciam tamanha diversidade em um único órgão. Para o cacauzeiro, são relatados de forma geral drusas e cristais prismáticos e, suas composições são descritas unicamente como sendo de oxalato de cálcio.

A presença de cristais prismáticos e drusas em folhas de *T. cacao* está de acordo com relatado por outros autores para a família e gênero do cacauzeiro (Cuatrecasas, 1964; Metcalfe e Chalk, 1950; Nakayama et al., 1996). Entretanto esses autores apenas descreveram a presença dessas estruturas na porção da nervura central e do pecíolo, sendo as drusas também a forma de cristal predominante. Outro estudo em plantas do mesmo gênero, a presença de cristais prismáticos foi observada entre as células do parênquima paliçádico e nas margens das folhas, sendo também relatadas as drusas como cristais mais abundantes (Garcia et al., 2014).

Apesar da observação da exclusividade dos cristais prismáticos com os feixes vasculares não ser mencionada por Garcia et al. (2014) trabalhando com plantas do mesmo gênero, pode se perceber nas micrografias apresentadas em seu trabalho a mesma relação dos cristais prismáticos com feixes vasculares, podendo indicar uma característica taxonômica desse grupo. Acredita-se que morfologias e locais precisos dos cristais no vegetal estejam sob rigoroso controle genético (Franceschi e Nakata, 2005), sendo bastante utilizadas como caracteres taxonômicos para agrupamento de diferentes espécies vegetais (Ekeke e Agbagwa, 2014; Horner e Wanke, 2012; Lersten e Horner, 2011). Os diferentes tamanhos de cristais observados para um mesmo morfotipo, possivelmente, seja devido à expansão dos idioblastos durante a formação do cristal (Franceschi, 1989).

Devido ao caráter birrefringente de muitos cristais que aparecem como estruturas brilhantes contrastantes, os microscópios com filtros polarizantes tem sido amplamente utilizados para estudar a presença e padrões distributivos dos cristais em plantas (He et al., 2012; Lersten e Horner, 2011). A elevada birrefringência apresentada pelos cristais prismáticos e pelas drusas são características de cristais puros de oxalato de cálcio (He et al., 2012; Silva et al., 2014). A baixa ou ausência de birrefringência observada nos cristais lamelares e esféricos, respectivamente, são característica de cristais mistos de oxalato ou de outra composição (He et al., 2012). Silva et al. (2014) relataram que a presença de sílica na composição química de concreções cristalinas seria o motivo da ausência de birrefringência apresentada por esta estrutura. As cores de interferência apresentadas pelos cristais à luz

polarizada podem fornecer explicações sobre a composição dos cristais, em que cristais de composição mista tendem a apresentar diferentes cores de interferência (Silva et al., 2014).

Os testes histoquímicos para identificação dos cristais possibilitaram a separação dos morfotipos em oxalato e sílica. Na busca de uma melhor compreensão da composição química dos diferentes morfotipos de cristais, outras técnicas de identificação mais apuradas foram realizadas como a técnica Raman e EDS, que corroboraram umas às outras.

A análise Raman possibilitou a identificação de apenas três dos morfotipos de cristais com precisão: os cristais prismáticos cúbico, trapeziforme e tabular, identificados como sendo oxalato de cálcio na forma mono-hidratada, chamado de wewelita. O aparecimento das bandas em 1463 e 1492 cm^{-1} caracterizam as vibrações de estiramento dos grupos CO_2 do íon oxalato em wewelita ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) que o diferencia da forma di-hidratada (wedelita) que mostra apenas uma banda em 1480 cm^{-1} (De Faria et al., 2011). Outras bandas que identificam esse composto situam-se em 896 cm^{-1} , atribuída à vibração de estiramento da ligação carbono-carbono e em 506 cm^{-1} , atribuída à deformação angular do grupo CO_2 (Daudon et al., 1983; De Faria et al., 2011).

A partir da composição elementar e da intensidade dos picos apresentados pelos elementos na microanálise de raio-X, foi possível confirmar a composição dos cristais analisados como sendo de oxalato e sílica. A análise da parede do idioblasto, utilizado como padrão, confirmou que os elementos encontrados nos cristais são de sua própria constituição química.

Os cristais prismáticos paralelepipedal e cúbico apresentaram elevados picos de Ca, C e O, confirmando que estes cristais são de oxalato de cálcio conforme espectros elementares característicos para essa composição relatados em outros trabalhos (He et al., 2012; Pylro et al., 2013; Silva et al., 2014). O espectro apresentado para os cristais esféricos mostram-se como sendo uma possível mistura de oxalato de cálcio e sílica (He et al., 2012; Silva et al., 2014). Os cristais lamelares, por apresentarem um proeminente pico de Si, sugere-se que sejam sílica, característica de fitólitos (He et al., 2014; Tsutsui et al., 2016).

Dentre os elementos químicos observados na composição dos cristais, o cálcio é o elemento mais comum, constituindo o principal cátion nos processos de biomineralização, sendo o oxalato de cálcio o mineral mais abundante com importante função na regulação dos níveis citoplasmáticos de cálcio e desintoxicação do ácido oxálico (He et al., 2014; Silva et al., 2014).

A presença de cristais de sílica em *T. cacao* é inédita, bem como as formas cristalinas com esta composição. Este achado corrobora a elevada concentração de Si encontrada nas

folhas de *T. cacao*, que a tem levado ser considerada uma planta acumuladora de silício (Zanetti et al., 2016).

Com base na presença de alguns metais encontrados na composição dos cristais de oxalato e de sílica nas folhas de *T. cacao*, sugerem-se para estes cristais as funções de desintoxicação e de balanço iônico. A incorporação de Al, Ti e Fe em cristais de oxalato com a possível função de desintoxicação também foi relatada para as espécies *Acacia roborum*, *Corchorus olitorius* e *Piper arboreum* (He et al., 2012; Mazen, 2004; Silva et al., 2014). A coprecipitação de alumínio e metais pesados com sílica foi relacionada à redução no transporte apoplástico desses metais, reduzindo os efeitos tóxicos desses metais nas plantas (He et al., 2014). Já a presença do Na e do K estariam relacionada à regulação do balanço iônico (Franceschi e Horner, 1980; He et al., 2014). Para as drusas observadas com maior frequência no parênquima paliçádico, a função de dispersão de luz para o interior do mesofilo otimizando a captação da luz em ambientes de baixa luminosidade, poderia ser plausível (Horner, 2012).

Os resultados do presente estudo fornecem um forte apoio de que mais de um hábito cristalino, com base na composição química, pode ocorrer nas folhas das plantas de *T. cacao* e que os cristais não são necessariamente de oxalato de cálcio, mas também de sílica ou uma mistura destes dois primeiros.

Referências

- Almeida, A.-A.F. de, Valle, R.R., 2007. Ecophysiology of the cacao tree. *Brazilian J. Plant Physiol.* 19, 425–448. doi:10.1590/S1677-04202007000400011
- Alverson, W.S., Whitlock, B. a., Nyffeler, R., Bayer, C., Baum, D. a., 1999. Phylogeny of the core Malvales: Evidence from ndhF sequence data. *Am. J. Bot.* 86, 1474–1486. doi:10.2307/2656928
- Chamberlain, C.J., 1932. *Methods in plant histology*, 5th ed. The University of Chicago Press, Chicago.
- Cheesman, E.E., 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. *Trop. Agric.* 21, 144–159.
- Cuatrecasas, J., 1964. Cacao and its Allies A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Natl. Herb.* 35, 379–607.
- Da Cunha, K.P. V, Do Nascimento, C.W.A., 2009. Silicon effects on metal tolerance and structural changes in Maize (*Zea mays* L.) grown on a cadmium and zinc enriched soil. *Water. Air. Soil Pollut.* 197, 323–330. doi:10.1007/s11270-008-9814-9
- Daudon, M., Protat, M.F., Reveillaud, R.J., Jaeschke-Boyer, H., 1983. Infrared spectrometry and Raman microprobe in the analysis of urinary calculi. *Kidney Int.* 23, 842–850. doi:10.1038/ki.1983.104
- De Faria, D.L.A., Lopes, F.N., Souza, L.A.C., Branco, H.D. de O.C., 2011. Análise de pinturas rupestres do Abrigo do Janelão (Minas Gerais) por microscopia raman. *Quim. Nova* 34, 1358–1364. doi:10.1590/S0100-40422011000800012
- Ekeke, C., Agbagwa, I.O., 2014. Ergastic Substances (Calcium Oxalate Crystals) in the Leaf of *Combretum* Loefl . (Combretaceae) Species in Nigeria. *Am. J. Plant Sci.* 5, 2389–2401. doi:10.4236/ajps.2014.515252
- Epstein, E., 2009. Silicon: Its manifold roles in plants. *Ann. Appl. Biol.* 155, 155–160. doi:10.1111/j.1744-7348.2009.00343.x
- FAO, 2014. Food and agriculture organization of the united Nations, Production quantities of Cocoa. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (accessed 3.11.17).
- Franceschi, V.R., 1989. Calcium oxalate formation is a rapid and reversible process in *Lemna minor* L. *Protoplasma* 148, 130–137. doi:10.1007/BF02079332
- Franceschi, V.R., Horner, H.T., 1980. Calcium oxalate crystals in plants. *Bot. Rev.* 46, 361–427. doi:10.1007/BF02860532
- Franceschi, V.R., Nakata, P.A., 2005. Calcium oxalate in plants: Formation and Function. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 41–71. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106
- Garcia, T.B., Potiguara, R.C. de V., Kikuchi, T.Y.S., Demarco, D., Aguiar-Dias, A.C.A. de, 2014. Leaf anatomical features of three *Theobroma* species (Malvaceae s.l.) native to the Brazilian Amazon. *Acta Amaz.* 44, 291–300. doi:10.1590/1809-4392201300653

- Haberlandt, G., 1914. Physiological plant anatomy, tr. by Montagu Drummond., 4th ed. MacMillan, London. doi:10.5962/bhl.title.28492
- He, H., Bleby, T.M., Veneklaas, E.J., Lambers, H., Kuo, J., 2012. Morphologies and elemental compositions of calcium crystals in phyllodes and branchlets of *Acacia robeorum* (Leguminosae: Mimosoideae). *Ann. Bot.* 109, 887–896. doi:10.1093/aob/mcs004
- He, H., Veneklaas, E.J., Kuo, J., Lambers, H., 2014. Physiological and ecological significance of biomineralization in plants. *Trends Plant Sci.* 19, 166–174. doi:10.1016/j.tplants.2013.11.002
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Circ. Calif. Agric. Exp. Stn.* 347.
- Hodson, M., Sangster, A.G., 1993. The Interaction Between Silicon and Aluminium in *Sorghum bicolor* (L.) Moench: Growth Analysis and X-ray Microanalysis. *Ann. Bot.* 72, 389–400. doi:10.1006/anbo.1993.1124
- Horner, H.T., 2012. *Peperomia* leaf cell wall interface between the multiple hypodermis and crystal-containing photosynthetic layer displays unusual pit fields. *Ann. Bot.* 109, 1307–16. doi:10.1093/aob/mcs074
- Horner, H.T., Wanke, S., 2012. A comparison of leaf crystal macropatterns in the two sister genera *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). doi:10.3732/ajb.1200007
- Hunt, J.W., Dean, A.P., Webster, R.E., Johnson, G.N., Ennos, A.R., 2008. A Novel Mechanism by which Silica Defends Grasses Against Herbivory. *Ann. Bot.* 102, 653–656. doi:10.1093/aob/mcn130
- Johansen, D., 1940. *Plant Microtechnique*. New York, 530.
- Lersten, N.R., Horner, H.T., 2011. Unique calcium oxalate “duplex” and “concretion” idioblasts in leaves of tribe Naucleaeae (Rubiaceae). *Am. J. Bot.* 98, 1–11. doi:10.3732/ajb.1000247
- Madella, M., Alexandre, A., Ball, T., 2005. International Code for Phytolith Nomenclature 1.0. *Ann. Bot.* 96, 253–260. doi:10.1093/aob/mci172
- Massey, F.P., Ennos, A.R., Hartley, S.E., 2006. Silica in grasses as a defence against insect herbivores: Contrasting effects on folivores and a phloem feeder. *J. Anim. Ecol.* 75, 595–603. doi:10.1111/j.1365-2656.2006.01082.x
- Mazen, A.M.A., 2004. Calcium oxalate deposits in leaves of *Corchorus olitorius* as related to accumulation of toxic metals. *Russ. J. Plant Physiol.* 51, 281–285. doi:10.1023/B:RUPP.0000019226.03536.21
- Metcalf, C., Chalk, L., 1950. *Anatomy of the dicotyledons leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*, 1st ed. Clarendon Press, Oxford.
- Motamayor, J.C., Risterucci, A.M., Lopez, P.A., Ortiz, C.F., Moreno, A., Lanaud, C., 2002. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* (Edinb). 89, 380–386. doi:10.1038/sj.hdy.6800156

- Nakayama, L.H., Soares, M.K., Appezzato da Glória, B., 1996. Contribuição ao estudo anatômico da folha e do caule do cacauero (*Theobroma cacao* L.). *Sci. Agric.* 53, 73–73. doi:10.1590/S0103-90161996000100010
- Pylro, V.S., Freitas, A.L.M. de, Otoni, W.C., Silva, I.R. da, Borges, A.C., Costa, M.D., 2013. Calcium oxalate crystals in eucalypt ectomycorrhizae: morphochemical characterization. *PLoS One* 8, e67685. doi:10.1371/journal.pone.0067685
- Reynolds, J.J.H., Lambin, X., Massey, F.P., Reidinger, S., Sherratt, J.A., Smith, M.J., White, A., Hartley, S.E., 2012. Delayed induced silica defences in grasses and their potential for destabilising herbivore population dynamics. *Oecologia* 170, 445–456. doi:10.1007/s00442-012-2326-8
- Ruiz, L.P., Mansfield, T.A., 1994. A postulated role for calcium-oxalate in the regulation of calcium-ions in the vicinity of stomatal guard-cells. *New Phytol.* 127, 473–481. doi:10.2307/2558176
- Silva, R.J.F., Aguiar-Dias, A.C.A. de, Mendonça, M.S. de, 2014. Rosetas e concreções cristalinas silicificadas em *Piper* (Piperaceae): registros inéditos de macropadrões. *Acta Amaz.* 44, 435–446. doi:10.1590/1809-4392201305553
- Thomas, E., van Zonneveld, M., Loo, J., Hodgkin, T., Galluzzi, G., van Etten, J., 2012. Present spatial diversity patterns of *Theobroma cacao* L. in the neotropics reflect genetic differentiation in pleistocene refugia followed by human-influenced dispersal. *PLoS One* 7, e47676. doi:10.1371/journal.pone.0047676
- Tsutsui, O., Sakamoto, R., Obayashi, M., Yamakawa, S., Handa, T., Nishio-hamane, D., 2016. Light and SEM observation of opal phytoliths in the mulberry leaf. *Flora* 218, 44–50. doi:10.1016/j.flora.2015.11.006
- Weiner, S., Dove, P.M., 2003. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Rev. Mineral. Geochemistry* 54, 1–29. doi:10.2113/0540001
- Zanetti, L.V., Rozindo, C., Milanez, D., Gama, V.N., Milanez, C.R.D., Gama, V.N., Aguilar, M.A.G., Souza, C.A.S., Campostrini, E., Ferraz, T.M., Figueiredo, F.A.M.M. de A., 2016. Leaf application of silicon in young cacao plants subjected to water deficit. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 51, 215–223. doi:10.1590/S0100-204X2016000300003