

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

LEONARDO VALANDRO ZANETTI

EFEITOS DA PULVERIZAÇÃO FOLIAR COM
SILÍCIO NA TOLERÂNCIA DE *Theobroma cacao* L.
(MALVACEAE) AO DÉFICE HÍDRICO

VITÓRIA

2013

LEONARDO VALANDRO ZANETTI

EFEITOS DA PULVERIZAÇÃO FOLIAR COM
SILÍCIO NA TOLERÂNCIA DE *Theobroma cacao* L.
(MALVACEAE) AO DÉFICE HÍDRICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Vegetal.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Galeas Aguilar

VITÓRIA

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

- Z28e Zanetti, Leonardo Valandro, 1985-
 Efeitos da pulverização foliar com silício na tolerância de
Theobroma cacao L. (Malvaceae) ao déficit hídrico / Leonardo
Valandro Zanetti. – 2013.
 60 f. : il.
- Orientador: Camilla Rozindo Dias Milanez.
 Coorientador: Marco Antonio Galeas Aguilar.
 Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e
Naturais.
1. Anatomia vegetal. 2. Cacau. 3. Irrigação com déficit
hídrico. 4. Enzimas. 5. Fotossíntese. 6. Silício. I. Milanez,
Camilla Rozindo Dias. II. Aguilar, Marco Antonio Galeas, 1960-
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

LEONARDO VALANDRO ZANETTI

"EFEITOS DA PULVERIZAÇÃO FOLIAR COM SILÍCIO NA TOLERÂNCIA DE *Theobroma cacao L. (Malvaceae)* AO DÉFICIT HÍDRICO"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 28 de Fevereiro de 2013.

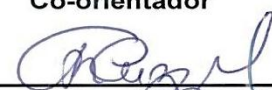
COMISSÃO EXAMINADORA



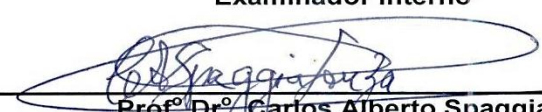
Profª Drª Camilla Rozindo Dias Milanez
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal-UFES
Orientadora



Profº Drº Marco Antônio Gáelas Aguilar
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - CEPLAC
Co-orientador



Profº Drº Geraldo Rogério Faustini Cuzzol
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - UFES
Examinador Interno



Profº Drº Carlos Alberto Spaggiari
CEPLAC-ES
Examinador Externo

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

Aos meus amigos pelo tempo que deixamos de estar juntos...

Aos meus pais, Antonio e Marlene, a eles todos os créditos...

Dedico

AGRADECIMENTOS

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

A CEPLAC de Linhares pelo fornecimento das mudas.

À Prof.^a Dr.^a Camilla Rozindo Dias Milanez, pela orientação, por ter me acolhido dando apoio, incentivo, confiança e ensinamentos que me levaram à execução e conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Galeas Aguilar pela coorientação.

Ao Prof. Dr. Eliemar Campostrini pelo empréstimo dos equipamentos IRGA e PEA, e aos seus alunos Fábio A. A. Figueiredo e Tiago M. Ferraz pelo auxílio na realização das medidas.

Ao Prof. Dr. Fabio Murilo DaMatta pelos conselhos e empréstimo da Bomba de Scholander.

Ao Prof. Dr. Antelmo Ralph Falqueto pelos conselhos e apoio.

Aos Professores doutores Geraldo Rogerio Faustini Cuzzuol e Carlos Alberto Spaggiari Souza, por terem aceitado o convite para a banca e pelas valiosas considerações.

Ao secretário do PPGBV Ricardo Celestino pela competência e disponibilidade.

Ao colega Diego Guimarães Pinto, pelo apoio nas análises estatísticas.

Aos colegas de mestrado, Felipe, Larissa, Vitor, pela convivência e amizade, e em especial à Joilton, Thiele e Vinícius pelo companheirismo na execução dos experimentos.

Aos meus pais Antonio Zanetti e Marlene Valandro, irmão Jeremias, minha esposa maravilhosa Lorenza, a quem muito devo, e a todos meus familiares que mesmo distantes sempre me motivaram.

A todos meus amigos e aqueles que, direta ou indiretamente, acreditam e me incentivam a correr atrás dos meus ideais.

A todos, muito obrigado!

Nesta batalha não tereis que pelear, parai, estai em pé, e vede a salvação do SENHOR para convosco... Não temais, nem vos assusteis; amanhã saí-lhes ao encontro, porque o SENHOR será convosco.

(II Crônicas 20:17)

RESUMO

EFEITOS DA PULVERIZAÇÃO FOLIAR COM SILÍCIO NA TOLERÂNCIA DE *Theobroma cacao* L. (MALVACEAE) AO DÉFICE HÍDRICO

Assim como em várias regiões do Brasil, o norte do estado do Espírito Santo, pólo produtor de cacau, apresenta intensos períodos de estiagem que provocam queda na produção agrícola. É anseio de qualquer agricultor o desenvolvimento de tecnologias de qualidade a baixo custo que permitam aumentar a produção agrícola, e é nesse contexto que surge a adubação com silício (Si), uma tecnologia pouco explorada no Brasil e que já se mostra promissora na manutenção ou aumento da produtividade em situações de estresse hídrico. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho verificar as respostas fisiológicas e anatômicas de um clone de cacau (PH 16) submetido a um ciclo de déficit hídrico após pulverização foliar com Si, visando a determinar se o Si confere tolerância à seca. O experimento foi instalado em casa de vegetação, no delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições, em arranjo fatorial 2 x 3, constituído de dois regimes hídricos, irrigado ou não irrigado, e três doses de Si, 0,0, 1,5 e 3,0 mg/mL, com pó molhável de SiO₂. Após vinte dias de suspensão da irrigação, avaliações foram realizadas na 2^a ou 3^a folha completamente expandida a partir do ápice do eixo ortotrópico. Os resultados mostraram que o teor de fenóis foi elevado com a aplicação de SiO₂ independente da dose. O uso do SiO₂ melhorou a estabilidade das membranas celulares das plantas sob déficit hídrico, e a atividade de algumas enzimas antioxidantes: catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase do guaiacol (POD) e polifenoloxidase (PPO), sendo a dose de 1,5 mg/mL a melhor. A aplicação dessa dose favoreceu as reações fotoquímicas, a taxa fotossintética, a eficiência do uso da água e a taxa de carboxilação das plantas de cacau sob déficit. A densidade estomática foi reduzida nas plantas não irrigadas sob maior dose de Si. Contudo, a aplicação de Si não interferiu no conteúdo de água das folhas sob déficit, apesar de reduzir o potencial hídrico foliar. Presume-se que a mucilagem tenha um papel importante na manutenção do conteúdo hídrico das folhas de *T. cacao*. As espessuras dos tecidos foliares (epiderme, parênquima paliçádico e esponjoso), bem como o teor de pigmentos fotossintetizantes e o conteúdo de Si nas folhas, não sofreram influência das doses de Si. Desse modo, sugere-se que o acúmulo de Si sobre as folhas foi benéfica, sendo a dose de 1,5 mg/mL, a mais eficiente para a tolerância das plantas de cacau ao déficit hídrico.

Palavras-chave: Anatomia, cacau, déficit hídrico, enzimas antioxidantes, fotossíntese, silício.

ABSTRACT

EFFECTS OF LEAF SPRAY WITH SILICON IN TOLERANCE *Theobroma cacao* L. (MALVACEAE) TO WATER DEFICIT

As in many Brazilian regions, the northern of Espírito Santo, a polo cocoa producer, has intense periods of drought that causes decline in agricultural production. Every farmer longs for the development of good quality and low cost technologies for increasing production, and it is in this context that arise the fertilization with silicon (Si), a technology little explored in Brazil and already shows promise in maintaining or increasing productivity in situations of drought stress. Therefore, the aim of this work was to check anatomic and physiological responses of a clone of cocoa (PH 16) subjected to water deficits cycle, after foliar feeding with silicon, to determine whether Si confers drought tolerance. The experiment was conducted in a greenhouse in a randomized block design with four replications in a 2 x 3 factorial, with two levels of irrigation, irrigated or non-irrigated, and three silicon doses: 0.0, 1.5 and 3.0 mg/mL, with a wettable powder of SiO₂. After twenty days without irrigation, evaluations were performed in the 2nd or 3rd fully expanded leaf from the apex of the orthotropic axis. The results showed that the phenol content was higher with SiO₂ application independent of dose. The use of SiO₂ improved cell membranes stability in plants under water deficits and the antioxidant activity of some enzymes including catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO), and the use of 1.5 mg/ml was the best dose. The application of this dose favored the photochemical reactions, photosynthetic rate, water-use efficiency and carboxylation rate of the cocoa plants under water deficits. Stomatal density was not reduced in plants irrigated with the higher dose of Si. However, the application of Si did not affect the water content of the leaves under deficit, despite reducing leaf water potential. It is supposed that the mucilage has an important role in maintaining the water content of *T. cacao* leaves. The thickness of leaf tissues (epidermis, palisade and spongy parenchyma), as well as the photosynthetic pigment content and the content of silicon in the leaves also were not influenced by the different doses of silicon. Thus, it is suggested that the accumulation of Si on the leaves was beneficial, with the dose of 1.5 mg / mL being the most efficient for the cocoa plant tolerance to water deficit.

Keywords: Anatomy, antioxidant enzymes, cacao, photosynthesis, silicon, water deficits.

SUMÁRIO

| | | |
|--------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 13 |
| 2.1 | CULTURA DO CACAU..... | 13 |
| 2.2 | DÉFICE HÍDRICO..... | 14 |
| 2.2.1 | SILÍCIO..... | 17 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 20 |
| 3.1 | ÁREA DE ESTUDO..... | 20 |
| 3.2 | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... | 20 |
| 3.3 | MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO..... | 20 |
| 3.4 | TEOR RELATIVO DE ÁGUA NAS FOLHAS (TRA)..... | 21 |
| 3.5 | POTENCIAL DA ÁGUA NA FOLHA NA ANTEMANHÃ (Ψ_w)..... | 22 |
| 3.6 | TEOR FOLIAR DE SILÍCIO..... | 22 |
| 3.7 | EXTRAVASAMENTO DE ELETRÓLITOS..... | 23 |
| 3.8 | TEOR DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS..... | 23 |
| 3.9 | CINÉTICA DE EMISSÃO DA FLUORESCÊNCIA TRANSIENTE (OJIP)..... | 24 |
| 3.10 | TROCAS GASOSAS E ASSIMILAÇÃO LÍQUIDA DE CO ₂ | 25 |
| 3.11 | DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E TEOR DE FENÓIS TOTAIS..... | 25 |
| 3.11.1 | Obtenção do Extrato..... | 25 |
| 3.11.2 | Catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6)..... | 26 |
| 3.11.3 | Peroxidade do Ascorbato (APX; EC 1.11.1.11)..... | 26 |
| 3.11.4 | Peroxidase do Guaiacol (POD; EC 1.11.1.7)..... | 26 |
| 3.11.5 | Polifenoloxidase (PPO; EC 1.30.3.1)..... | 27 |
| 3.11.6 | Teor de Fenóis Totais..... | 27 |
| 3.12 | ANATOMIA FOLIAR E TESTES HISTOQUÍMICOS..... | 27 |
| 3.13 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 28 |
| 4 | RESULTADOS..... | 29 |
| 4.1 | CONCENTRAÇÃO DE SILÍCIO..... | 29 |
| 4.2 | CARACTERÍSTICAS HÍDRICAS..... | 29 |
| 4.3 | TOLERÂNCIA PROTOPLASMÁTICA..... | 30 |
| 4.4 | CONTEÚDO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS E FENÓIS..... | 31 |
| 4.5 | FOTOQUÍMICA E TROCAS GASOSAS..... | 32 |
| 4.6 | ENZIMAS ANTIOXIDANTES..... | 35 |
| 4.7 | ANATOMIA E TESTES HISTOQUÍMICOS..... | 36 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 39 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 47 |
| | REFERÊNCIAS..... | 48 |

1 INTRODUÇÃO

As plantas são submetidas a vários estresses ambientais que afetam negativamente o seu crescimento e metabolismo, e dentre esses estresses, a seca é um fator limitante da produção agrícola (LAWLOR, 2002). O déficit hídrico ocorre quando o abastecimento de água para as raízes torna-se difícil ou quando a taxa de transpiração torna-se muito elevada (REDDY et al., 2004). Estas duas condições muitas vezes coincidem em climas áridos e semiáridos. A amplitude de tolerância das plantas à seca varia de espécie para espécie, uma vez que estas podem possuir diferentes mecanismos de tolerância, sejam eles estruturais ou fisiológicos (REDDY et al., 2004).

A seca reduz a biomassa, devido ao aumento da resistência estomática com diminuição da taxa fotossintética líquida, a mudanças no teor de clorofila e à inibição da atividade fotoquímica (ENGELBRECHT et al., 2007; SUSILUOTO e BERNINGER, 2007). Além disso, o déficit hídrico causa ruptura do equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da defesa antioxidante, levando ao acúmulo de EROs que induz o estresse oxidativo de proteínas, lipídios de membrana e de outros componentes celulares (ITURBE et al., 1998; FU e HUANG, 2001). Alterações nas características anatômicas foliares são conhecidas por alterarem os componentes de condutância de difusão do CO₂ das cavidades subestomáticas para os sítios de carboxilação e, assim, contribuir para a manutenção de taxas fotossintéticas apesar da baixa condutância estomática (EVANS et al., 1994). Em algumas espécies, mucilagens e glucanos na folha podem funcionar como condensadores hidráulicos e remobilizadores de solutos para o ajuste osmótico, permitindo assim a absorção mais eficiente de água. Podem ainda formar um filtro de densidade leve, protegendo as células do parênquima clorofiliano da radiação luminosa excessiva (CLIFFORD et al., 2002).

Na busca de tecnologias para manter ou aumentar a produtividade das culturas sob condições de seca, a adubação com silício tem se mostrado promissora. No Brasil, este tipo de adubação não é amplamente utilizado por agricultores, ao contrário do que se nota em outros países como Japão e China. Este fato acontece devido a poucos dados experimentais obtidos no país, porém, os poucos resultados já demonstram o potencial desse elemento para a agricultura brasileira, refletindo na estabilidade produtiva e, em muitas situações, no aumento de produtividade (CRUSCIOL et al., 2009). Os trabalhos relacionando silício e déficit hídrico na literatura tratam principalmente da adubação via solo e em gramíneas, sendo poucos os estudos relacionando o efeito da adubação foliar com silício na tolerância das plantas à seca.

Além disso, é comum o uso da adubação silicatada, ou seja, utilizando o silício associado a outros nutrientes, tais como potássio e sódio, o que dificulta determinar se o efeito benéfico sobre o vegetal é unicamente do silício.

O silício (Si) é o segundo elemento mais abundante na crosta terrestre (EPSTEIN 1999). Em gramíneas, ocorre em quantidades equivalentes às dos macronutrientes tais como magnésio, cálcio, e fósforo (EPSTEIN 1999). Embora não tenha sido demonstrada a essencialidade do Si (EPSTEIN e BLOOM, 2006), este influencia a absorção e translocação de vários macro e micronutrientes, e frequentemente diminui ou elimina os efeitos adversos do excesso de metais no meio sobre as plantas, quando aplicado como adubo no solo (EPSTEIN, 1994).

Estudos têm demonstrado o efeito positivo do Si em plantas sob estresse hídrico. No milho, por exemplo, a adição de Si aumentou a eficiência do uso da água, reduzindo a transpiração da folha e a taxa de fluxo de água no vaso do xilema (GAO et al., 2006). Hattori et al. (2008) sugeriram que o Si poderia facilitar a absorção e transporte de água em sorgo em condições de seca. Em experimentos com trigo, o Si aliviou o estresse oxidativo, regulando as atividades de enzimas antioxidantes, em condição de seca (GONG et al. 2005), e em soja elevou o conteúdo de água foliar, bem como a fotossíntese (SHEN et al., 2010).

Outro efeito benéfico do Si na redução do estresse hídrico é atribuído a deposição desse elemento na parede celular, especialmente na parede externa (AGARIE et al., 1998; EPSTEIN, 1999). Essa deposição aumenta a resistência e rigidez das paredes celulares e reduz a transpiração cuticular e estomática, aumentando a resistência à seca (MA e YAMAJI, 2006). Também favorece a fotossíntese, por interferir na arquitetura das folhas deixando-as mais eretas, melhorando a interceptação de luz (DEREN et al., 1994).

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta perene arbórea, pertencente a família Malvaceae (SOUZA e LORENZI, 2005), de clima tipicamente tropical, originário da região do alto Amazonas (ALMEIDA e VALLE, 2007). A principal importância econômica do cacau provém das sementes de seus frutos, que são utilizadas para a produção de chocolate e também nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, inclusive internacionais (MENEZES e CARMO-NETO, 1993).

No Brasil, o cacauieiro adaptou-se perfeitamente ao clima e solos do sul da Bahia, e até hoje esse estado se destaca como maior produtor do país (CUENCA e NAZARIO, 2004). Já no Espírito Santo, o município de Linhares se destaca como o maior produtor, com cerca de 20 mil hectares plantados, representando 95% da área plantada no Estado (INCAPER, 2011), ocupando a 4ª posição entre os maiores produtores nacionais (MENDES, 2011). Por

apresentar períodos consideráveis de estiagem, o município de Linhares tem prejuízos na produção agrícola não irrigada, incluindo a do cacau (MAPA, 2011).

Dado que os modelos atuais de alterações climáticas prevêm que a falta de água irá aumentar em frequência e gravidade em várias regiões do mundo (IPCC, 2007), há uma necessidade cada vez mais urgente de entender melhor o impacto da seca sobre o funcionamento das plantas e, particularmente, os mecanismos fisiológicos de respostas das plantas durante e na recuperação do déficit hídrico (SHEN et al., 2010). Para uma compreensão abrangente de mecanismos de tolerância ao déficit de água em plantas superiores, aspectos da fisiologia e bioquímica celular devem ser investigados em combinação com características morfoanatômicas, a fim de descobrir as ligações sutis que levam a uma melhor tolerância à seca, permitindo o melhoramento de seu desempenho agrônômico (GUHA et al., 2010).

Com base nessas considerações o presente trabalho teve como objetivo avaliar as respostas fisiológicas e anatômicas de um clone de cacau (PH 16) resistente à vassoura de bruxa, submetido ao déficit hídrico após pulverização foliar com silício, visando determinar se o silício confere ao cacaueiro tolerância à seca.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CULTURA DO CACAU

O cacauieiro (*Theobroma cacao*, L.) é uma espécie nativa das florestas quentes e úmidas das terras baixas do México e da América Central e das bacias do Rio Amazonas e Orinoco (METCALFE e CHALK, 1979). É um arbusto de sub-bosque, com altura variável, que quando reproduzido por semente pode apresentar altura de 5 a 15 metros, havendo registros de cacauieiros com altura de 50 a 75 metros nas florestas de Belize (MOOLEEDHAR e MAHARAJ, 1995). 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).

A principal importância econômica do cacau provém das sementes de seus frutos, que são utilizadas para a produção de chocolate e também nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos. A polpa do fruto também é bastante apreciada para o consumo *in natura*, conquistando mercados, inclusive internacionais. Já o mel do cacau, extraído da polpa de suas sementes, pode ser utilizado na fabricação de vinho, vinagre, licores e geléias (MENEZES e CARMO-NETO, 1993).

Recentemente, a espécie *T. cacao*, que pertencia anteriormente à família Sterculiaceae, foi reclassificada e inserida na família Malvaceae (SOUNIGO et al., 2003). A família Malvaceae Juss., contém cerca de 75 gêneros, e aproximadamente, 1.500 espécies, possui distribuição cosmopolita, predominando nos trópicos (CRONQUIST, 1981). Compreende plantas herbáceas ou lenhosas, com as flores, em sua maioria, hermafroditas, actinomorfas com tendência ao zigomorfismo e pentâmeras (PIO CORREA, 1926). A presença de canais secretores de mucilagem é uma característica típica dos representantes de Malvaceae (FAHN, 1982).

Do seu provável centro de origem, na região do alto Amazonas (MOTAMAYOR, 2002) a espécie *T. cacao*, espalhou-se em duas principais direções, resultando nos dois principais grupos raciais: o Crioulo, cultivado na América Central e no norte da América do Sul; e o Forasteiro, no norte do Brasil, Guianas e na Venezuela (DIAS, 2001; SOUNIGO et al., 2003). Um terceiro grupo denominado Trinitário, também é apresentado por outros autores, como originário do cruzamento natural entre Forasteiro e Crioulo (DIAS, 2001).

O Brasil, que historicamente sempre foi um dos dois maiores produtores mundiais de cacau, tendo seu auge na safra de 1984/85, correspondendo a 403 mil toneladas de cacau por

ano, teve sua produção reduzida expressivamente nos anos subsequentes, destacando o surgimento da doença vassoura-de-bruxa em 1989, que devastou áreas intensas de cacauais (DIAS, 2001). Atualmente, segundo a Faostat (2011), o Brasil ocupa a quinta posição com a produção em 248,5 mil toneladas de amêndoas, a qual tem a seguinte distribuição nos Estados produtores: Bahia 154.634t (62,3%), Pará 63.739t (25,7%), Rondônia 17.486t (7,1%) e Espírito Santo 8.099t (3,3%) (MENDES, 2011).

No Espírito Santo, o cacauero foi introduzido pela primeira vez no município de Linhares em 1895, no qual, se estabeleceu principalmente na região do baixo Rio Doce (COSTA, 1989). Atualmente, cerca de 20 mil hectares das terras do município de Linhares estão cultivados com *T. cacao*, o que representa aproximadamente 95% da área plantada com essa espécie no estado (INCAPER, 2011). Assim como em outras regiões do país, a cultura do cacau no município tem sido ameaçada principalmente por dois fatores: a doença vassoura-de-bruxa (INCAPER, 2007) e a seca, que é um dos fatores limitantes da produção. Na região norte do estado do Espírito Santo a seca se mostra bem pronunciada nos períodos de estiagem, o que gera prejuízos na produção agrícola não irrigada, incluindo a do cacau (MAPA, 2011).

2.2 DÉFICE HÍDRICO

A deficiência hídrica ocorre quando a taxa de transpiração excede a taxa de absorção de água e esta deficiência pode ser consequência da baixa disponibilidade de água no solo, bem como da presença de solos salinos e da ocorrência de temperaturas muito baixas (BRAY, 1997). A baixa disponibilidade de água tem sido o principal fator ambiental limitante do crescimento e da produtividade das plantas, ocorrendo em grandes extensões de áreas cultivadas em todo o mundo (NOGUEIRA et al., 2001), e as expectativas de mudanças climáticas globais provavelmente contribuirão para que a falta de água se torne um fator de restrição ainda maior da produção agrícola em diversas áreas (HAMDY et al., 2003).

Na natureza, as plantas podem estar sujeitas a dois tipos de estresse hídrico: de longo prazo, quando a sua duração varia de semanas a meses; de curto prazo, quando a duração do estresse varia de horas a poucos dias (CHAVES et al., 2003). As respostas das plantas à escassez de água são complexas, envolvendo alterações adaptativas e/ou efeitos deletérios. Em condições naturais, estas respostas podem ser sinérgica ou antagonística, podendo ser potencializadas quando há mais de um agente envolvido (XIONG et al., 2002). O estresse hídrico por falta de água altera o crescimento e o desenvolvimento (JONES e CORLETT, 1992) por afetar as funções fisiológicas e bioquímicas das plantas (ZOBAYED et al., 2007).

Desse modo, a sobrevivência das plantas sob tal condição estressante depende em grande extensão da habilidade que as mesmas têm em “perceber” o estímulo, gerar, transmitir o sinal e iniciar várias alterações fisiológicas e bioquímicas (BOHNERT e JENSEN, 1996; SHINOZAKI e YAMAGUCHI, 1997). Algumas espécies de plantas desenvolveram mecanismos para lidar com o estresse, incluindo evitar a seca ou tolerância a desidratação, e tais mecanismos adaptativos são os resultados de um grande número de alterações moleculares, bioquímicas, fisiológicas e morfoanatômicas (ASHRAF et al., 2011).

Um dos efeitos mais comumente relatados na literatura em plantas sujeitas ao déficit hídrico é a diminuição da taxa fotossintética foliar. Esta diminuição está relacionada à redução do teor relativo de água e do potencial hídrico (LAWLOR e CORNIC, 2002; CHAVES et al., 2003). A contribuição do fechamento estomático e do comprometimento metabólico na redução da fotossíntese ainda não está totalmente esclarecida (TEZARA et al., 1999; LAWSON et al., 2003). De modo geral, os trabalhos têm atribuído a limitação estomática como o fator principal e determinante da fotossíntese em plantas sujeitas ao estresse hídrico (CORNIC, 2000). Vários efeitos não-estomáticos podem levar ao fechamento dos estômatos durante a seca. Estes incluem fotofosforilação (MEYER e GENTY, 1999), regeneração (LAWLOR, 2002) e atividade (MEDRANO et al., 1997) da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP), e síntese de ATP (TEZARA et al., 1999). Especialmente no que se refere ao metabolismo do cloroplasto, as respostas são complexas, uma vez que, envolvem além da perda drástica de pigmentos, a desorganização das membranas dos tilacóides (LADJAL et al., 2000).

Estresse hídrico é conhecido por inibir a atividade fotossintética em tecidos devido ao desequilíbrio entre a captura e utilização de luz (FOYER e NOCTOR, 2000). A regulação da atividade do Fotossistema II resulta em um desequilíbrio entre a geração e utilização de elétrons, aparentemente resultando em alterações no rendimento quântico. Estas mudanças na fotoquímica dos cloroplastos de plantas sob seca é resultado da dissipação de energia da luz excedente no núcleo do PSII e antena, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) (O_2^- , 1O_2 , H_2O_2 , OH^\cdot) que são potencialmente perigosos em condições de estresse de seca (PELTZER et al., 2002). Além disso, as alterações no transporte fotossintético de elétrons sob seca inevitavelmente levam à formação de radicais superóxido (O_2^-), uma vez que o oxigênio molecular compete com NADP para redução no lado acceptor do Fotossistema I.

As EROs são potencialmente capazes de provocar danos fotoinibitórios e fotooxidativos (SMIRNOFF, 1993; ASADA, 1999), incluindo a peroxidação de lipídios (LIMA et al., 2002) e a desnaturação de proteínas (ASADA, 1999). Além disso, a

peroxidação de lipídios de membrana pode resultar na perda de compartimentalização celular (ASADA, 1999; LIMA et al., 2002). Sabe-se hoje que as maiorias das lesões causadas por exposição a vários estresses estão associadas a danos oxidativos ao nível celular (ALLEN, 1995). Por serem tóxico para as células, as EROs são eficientemente eliminadas por mecanismos antioxidantes não-enzimáticos (α -tocoferol, β -caroteno, compostos fenólicos, ascorbato, glutatona) e enzimáticos (SMIRNOFF, 1993; NOCTOR e FOYER, 1998). O sistema enzimático antioxidante inclui a superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) que catalisa a reação de O_2^- a H_2O_2 , a catalase (CAT; EC 1.11.1.6), a peroxidase de ascorbato (APX; EC 1.11.1.11) e peroxidase do guaiacol (POD; EC 1.11.1.7) que são capazes de desintoxicar o H_2O_2 produzido (FOYER et al., 1994).

Todas as enzimas acima mencionadas existem em tecidos de plantas em múltiplas formas. Os três tipos conhecidos de SOD são classificados pelo seu co-factor de metal e estão principalmente localizadas nos cloroplastos, mitocôndrias e citosol (ALSCHER et al., 2002). APX isoenzimas são geralmente localizadas nos cloroplastos, mas as formas microsomal, peroxissomal e ligada à membrana, bem como isoenzimas citosólicas solúveis e apoplástico, também existem (NOCTOR e FOYER, 1998). Isoformas de CAT são particularmente abundantes nos glioxissomos e nos peroxissomos (HAVIR e MCHALE, 1987). A POD tem formas vacuolares e apoplástica que podem usar uma ampla gama de substratos (MEHLHORN et al., 1996). A Polifenoloxidase (PPO; 1.30.3.1 CE), uma enzima contendo o cobre no sítio ativo, localizada nos plastídios, atua sobre fenóis, em presença de oxigênio, catalisando a oxidação de o-difenóis em o-quinonas (KUWABARA e KATOH, 1999).

Quando a acumulação de EROs, sob condições de estresse de água excede a capacidade de remoção do sistema antioxidante, os efeitos do dano oxidativo surgem, incluindo a peroxidação de lipídios da membrana, a destruição dos pigmentos fotossintéticos e inativação de enzimas fotossintéticas (SMIRNOFF, 1993). O nível em que as atividades de enzimas antioxidantes e da quantidade de aumento antioxidantes sob estresse hídrico é extremamente variável entre várias espécies de plantas e até mesmo entre duas cultivares da mesma espécie. O nível de resposta depende da espécie, do desenvolvimento e do estado metabólico da planta, assim como a duração e intensidade do estresse. Muitas situações de estresse causam um aumento da atividade antioxidante total foliar (PASTORI et al., 2000), mas pouco se conhece sobre o controle da atividade de coordenação e de expressão das diferentes enzimas antioxidantes nas células de plantas que são submetidos à déficit.

Muitas adaptações para aumentar a tolerância à seca podem ser observadas nos diferentes órgãos dos vegetais superiores. Em uma variedade de espécies de plantas, as

espessuras dos tecidos foliares, assim como o tamanho e número de estômatos sofrem influência da deficiência hídrica (KARABA et al., 2007; LUKOVIĆ et al., 2009). Nas folhas, ocorre a diminuição da emissão de novas folhas, redução da área foliar e do tamanho e número de estômatos por área, e desenvolvimento do parênquima paliçádico.

2.3 SILÍCIO

O Si é o segundo elemento em abundância na crosta terrestre, estando logo 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. 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 (BARBOSA FILHO 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., 1997). As plantas absorvem o Si da solução do solo na forma de ácido de monossilícico (H_4SiO_4) (MITAMI e MA, 2005). O processo de absorção do ácido monossilícico, que possui carga neutra, ocorre pela dissolução através da membrana, podendo ocorrer por apoplasto ou por simplasto. O mecanismo de absorção radicular de Si pelas plantas foi considerado por muito tempo como sendo, exclusivamente, passivo, sendo feito por difusão ou fluxo de massa (JONES e HANDRECK, 1965). Porém, atualmente são bem detalhados os mecanismos de absorção ativa de Si, o qual é feito por proteínas de membranas específicas, codificadas por genes específicos, como constatados nas culturas do arroz, milho e cevada (MA et al., 2006; CHIBA et al., 2009; MITANI et al., 2009). Após ser absorvido e transportado até parte aérea, o ácido monossilícico deposita-se na forma de sílica amorfa hidratada, inicialmente nos tecidos mais jovens e posteriormente vai acumulando-se rapidamente nas células senescentes, sob a forma de sílica polimerizada (SiO_2), também chamada de opala biogênica, fitólitos (DAYANANDAM et al., 1983). Yoshida et al. (1962) e Agarie et al. (1998) observaram que a maior parte do Si absorvido pela planta é depositada na folha, nos tecidos da epiderme, mais precisamente nas paredes celulares mais externas. Sangster et al. (2001), complementa, que o acúmulo de Si é governado pelo desenvolvimento celular e maturação dos tecidos e, portanto, pode ser influenciado por vários fatores, como idade, tipo de tecido ou órgão, taxa de transpiração e absorção radicular.

O Si não é um elemento essencial para as plantas, porém Epstein e Bloom (2006) descrevem que plantas crescendo em ambiente rico em Si devem diferir daquelas presentes

em ambientes deficientes desse elemento. A deposição de Si na folha aumenta a resistência e rigidez das paredes celulares e reduz a transpiração cuticular e estomática, culminado no aumento da resistência à seca (MA e YAMAJI, 2006). Também, favorece a fotossíntese por interferir na arquitetura das folhas deixando-as mais eretas, melhorando a interceptação de luz (DEREN et al., 1994) e pode aumentar a capacidade de defesa antioxidante em várias espécies vegetais (LIANG et al., 2003; ZHU et al., 2004; GONG et al., 2005).

O acúmulo de Si em plantas difere significativamente, devido à capacidade das raízes absorverem Si (MA et al., 2006). Em geral, as plantas mostram concentrações de Si na sua matéria seca, de 1 a 100 gramas de Si por kilo de massa seca (EPSTEIN, 1999). A forma como o Si é absorvido e depositado difere entre as espécies, as quais podem ser classificadas em três grupos. As acumuladoras de Si, em geral as monocotiledôneas (gramíneas), que tem processo ativo de absorção de Si possuindo teor foliar acima de $10,0 \text{ g kg}^{-1}$. As não acumuladoras, em geral leguminosas, que absorvem Si a favor de um fluxo de transpiração de forma mais lenta que a absorção de água e discriminam o Si na absorção por simplasto. Estas são exclusoras na absorção de Si, ou seja, à medida que as raízes absorvem Si, elas também o eliminam para a solução do solo. Possuem teor foliar menor que $5,0 \text{ g kg}^{-1}$ de Si na matéria seca. Existem ainda as intermediárias na acumulação de Si que absorvem o Si pela via simplasto na mesma velocidade que a absorção de água, possuindo teor menor que 10 g kg^{-1} (TAKAHASHI et al., 1990).

O Si é de importância agrônômica como fertilizante por ser um estimulante do crescimento vegetal e construtor de tolerância para superar estresses abióticos e bióticos (LIANG et al., 2005). Esse elemento segue o caminho da evapotranspiração e é depositado como sílica hidratado ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) em caules e folhas (SANGSTER et al., 2001).

A água é o fator limitante para o crescimento das culturas e a tecnologia de irrigação convencional não é capaz de evitar perdas elevadas de água disponível da cultura devido à evapotranspiração e a lixiviação dos nutrientes do solo. Portanto, a rega com Si permite reduzir a evapotranspiração e a lixiviação (GAO et al., 2006). Da mesma forma, a fertilização com Si pode elevar o volume e massa das raízes em 20-200%, o que, em última análise melhora, significativamente a resistência à seca em plantas cultivadas (AHMED et al., 2011). A fertilidade do solo e a textura têm correlação considerável com compostos ricos em Si, pois o Si altera o pH da rizosfera das plantas (KORNDÖRFER E GASCHO, 1999), influenciando, dessa forma, na absorção de nutrientes essenciais.

A aplicação de Si como adubo para as plantas de milho reduziu a transpiração foliar sob déficit de água e, assim, resultando em melhor teor de água em suas folhas (GAO et al.,

2006). Já em sorgo, a aplicação de Si aumentou a condutância estomática e aliviou os danos na fotossíntese por estresse hídrico (HATTORI et al., 2005). Da mesma forma, os processos antioxidantes em outras culturas foram ativados por Si sob estresse hídrico (GONG et al., 2008). Assim, a aplicação de Si pode afetar características fisiológicas para aumentar a tolerância de culturas sob déficit hídrico. Hattori et al. (2005) relataram a manutenção de características fisiológicas, como a fotossíntese, transpiração e condutância estomática com a aplicação de Si. Em geral, a absorção de água pelas plantas é regulada pelo sistema radicular. A adubação com Si melhora a absorção de água e, conseqüentemente, melhora a tolerância da cultura ao déficit hídrico (SONOBE et al., 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação modelo Van der Hoeven, com umidade relativa de 80% e temperatura média de 28 °C mantida por sistema de refrigeração com água corrente por parede de argila expandida e exaustor, no Setor de Botânica localizado no Campus Universitário de Goiabeiras da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, ES (20°18'52''S e 40°19'06''W).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos Casualizados (DBC), com quatro repetições, em arranjo fatorial 2 x 3, constituído de dois regimes hídricos (irrigado e não irrigado) e três doses de Si (0,0, 1,5, e 3,0 mg/mL), na forma de óxido de Si 98%, resultando num total de 24 parcelas com 10 plantas cada.

3.3 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foram utilizadas mudas clonais com 8 meses de idade e altura média de 60cm, do genótipo PH 16 de *T. cacao*, tolerante a vassoura-de-bruxa e recomendado pela CEPLAC para o plantio. As mudas foram produzidas pela CEPLAC e obtidas por estaquia, sendo transplantadas para vasos de polietileno de 8 litros, contendo solo peneirado e misturado, classificado por análise como sendo Franco Argilo-Arenoso. Antes da instalação do experimento amostras do solo foram coletadas para a caracterização física e química, conforme apresentado nas tabelas 1 e 2 respectivamente. As análises foram realizadas no laboratório de análise agrônômica e ambiental Fullin Linhares-ES, seguindo a metodologia descrita pela Embrapa (1997).

Antes da aplicação dos tratamentos as mudas receberam irrigação a cada dia e os tratos culturais preconizados por Marques et al., (2006). Completados 120 dias, foi realizada a aplicação do tratamento de Si, constituído de uma dose com apenas água, e outras duas com 1,5 e 3,0 mg/mL de Si. As aplicações foram realizadas com um borrifador manual aspergindo-se sobre ambas as faces foliares, correspondendo aproximadamente 25 mL da solução por planta. A fonte de Si utilizada foi SiO₂ 98% pó molhável, marca Agri Sil[®].

O tratamento de déficit hídrico foi realizado por meio da suspensão total da irrigação, após 15 dias da aplicação do Si, perdurando por 20 dias. No tratamento irrigado, apenas o substrato foi molhado, recebendo água a cada dois dias para reposição da capacidade máxima de campo do substrato.

Tabela 1 – Características físicas do solo utilizado como substrato do experimento.

| Areia grossa | Areia fina | Silte | Argila | Classificação Textural ⁽¹⁾ |
|------------------|------------|-------|--------|---------------------------------------|
| ----- g/Kg ----- | | | | |
| 476 | 94 | 190 | 240 | Franco Argilo-Arenoso |

⁽¹⁾ Classificação textural de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.

Tabela 2 – Características químicas do solo utilizado como substrato no experimento.

| Parâmetro analisado | Unidade | Valor | Classificação ⁽¹⁾ |
|---------------------|------------------------------------|-------|------------------------------|
| Fósforo | mg/dm ³ | 192 | Alto |
| Potássio | mg/dm ³ | 450 | Alto |
| Enxofre | mg/dm ³ | 35 | Alto |
| Cálcio | cmol _c /dm ³ | 3,6 | Médio |
| Magnésio | cmol _c /dm ³ | 2,2 | Alto |
| Alumínio | cmol _c /dm ³ | 0,0 | – |
| H +Al | cmol _c /dm ³ | 1,6 | Baixo |
| pH | – | 6,1 | Acidez Fraca |
| Matéria Orgânica | dag/kg | 5,4 | Alto |
| Ferro | mg/dm ³ | 163 | Médio |
| Zinco | mg/dm ³ | 11,4 | Médio |
| Cobre | mg/dm ³ | 0,8 | Baixo |
| Manganês | mg/dm ³ | 31 | Médio |
| Boro | mg/dm ³ | 0,62 | Alto |
| Sódio | mg/dm ³ | 180 | Alto |
| Silício | mg/dm ³ | 12 | < 8mg/dm ³ baixo |
| Saturação de bases | (%) | 78,5 | Alto |

⁽¹⁾ Classificação baseada nos manuais de recomendação de adubação do Estado do Espírito Santo (DADALTO e FULLIN, 2001; PREZOTTI et al., 2007).

3.4 TEOR RELATIVO DE ÁGUA NAS FOLHAS (TRA)

O TRA foi obtido a partir das mesmas folhas empregadas nas avaliações do potencial hídrico foliar. As amostras compostas de dois discos foliares com 1 cm de diâmetro foram retiradas do centro do limbo foliar, evitando as nervuras, e imediatamente pesadas utilizando-se uma balança de precisão de miligramas, obtendo-se a massa da matéria fresca (MF). Em seguida, os discos foram acomodados em recipientes escuros e submersos em água destilada para atingirem saturação hídrica, sendo mantidos em geladeira à aproximadamente 4°C durante o período de 24 horas. Posteriormente, os discos foram retirados da água, eliminando-se o excesso de água com papel absorvente e pesados imediatamente para a determinação da massa túrgida (MT). Em seguida, obteve-se a massa seca (MS) por meio da secagem dos discos em estufa (65 °C) até atingirem massa constante. O TRA foi calculado conforme Klar (1984), através da equação: $TRA = [(MF - MS) / (MT - MS)] 100$.

3.5 POTENCIAL DA ÁGUA NA FOLHA NA ANTEMANHÃ (Ψ_w)

O potencial hídrico foliar (Ψ_w) foi determinado na antemanhã, entre quatro e cinco horas, utilizando uma bomba de pressão tipo Scholander (SCHOLANDER et al., 1965) PMS Instrument, modelo 600, USA. A determinação consistiu na coleta de amostras da 2ª ou 3ª folha completamente expandida a partir do ápice do eixo ortotrópico com bom estado fitossanitário, sendo retirada e imediatamente colocada na câmara da bomba de pressão, e em seguida aplicada a pressão até a exsudação de líquido pelo pecíolo da folha, momento esse da leitura da pressão aplicada (TURNER, 1981).

3.6 TEOR FOLIAR DE SILÍCIO

Para determinação do teor de Si, utilizaram-se folhas do 2º ou 3º nó a partir do ápice do eixo ortotrópico, submetidas a uma lavagem rápida com água destilada e colocadas para secagem em estufa a 70 °C, por 72 horas, sendo em seguida moídas. Utilizou-se a metodologia descrita por Korndörfer et al. (2004), na qual amostras de 0,1 g da parte aérea foram colocadas em tubos plásticos, seguido do acréscimo de 2 mL de H₂O₂ p.a (30%) e 3 mL de NaOH (1:1) para digestão. Os tubos foram agitados e postos em banho-maria a 90°C por uma hora. Durante esse período os tubos foram agitados, para evitar o extravasamento do conteúdo devido à intensa oxidação gerada pela NaOH. Após esse procedimento, os tubos foram levados para autoclave por um período de 1 hora a 123°C e 1,5 atm de pressão. Após retirar os tubos da autoclave, adicionaram-se 45 mL de água destilada, deixando-os em

repouso por um dia. Então, uma alíquota de 2 mL da matéria digerida foi retirada e colocada em copos plásticos de 50 mL. Logo após, acrescentaram-se 18 mL de água destilada, 1 mL de HCl (1:1) e 2 mL de molibdato de amônio, seguido de uma leve agitação. O Si presente no material transforma-se em H_4SiO_4 que desenvolve a cor amarela na presença do agente complexante, que é o molibdato de amônio em meio ácido. Depois de 5 a 10 minutos, adicionaram-se 2 mL de ácido oxálico, procedendo-se novamente uma leve agitação. Após dois minutos a leitura em espectrofotômetro (ThermoScientific®, Genesys 10S, EUA) foi feita no comprimento de onda de 410 nm. Para a quantificação, foi realizada uma curva padrão a partir de uma solução padrão 1000 ppm de Si.

3.7 EXTRAVASAMENTO DE ELETRÓLITOS

Para acessar a estabilidade das membranas foi utilizada a técnica do extravasamento de eletrólitos, conforme a metodologia descrita por Bajji et al. (2001). Utilizando-se folhas do 2º ou 3º nó a partir do ápice do eixo ortotrópico, discos foliares de 1cm de diâmetro foram retirados com o auxílio de um furador e lavados por três vezes em água destilada para a retirada do conteúdo das células rompidas durante o corte e de outros eletrólitos aderidos às folhas. Após a lavagem, os discos foliares foram secos em papel absorvente e então, 5 discos foram colocados em tubos contendo 20 mL de água ultrapura a 25°C por 6h sob agitação constante. Posteriormente a esse período, a condutividade elétrica (C1) foi medida com o auxílio de um condutivímetro portátil (Sanxin, modelo SX723, China). Depois desse procedimento, os tubos com os discos foram colocados a 90°C por 2h. Frascos semelhantes aos das amostras contendo apenas água foram utilizados como branco (B1) antes da fervura e (B2) após a fervura. Após o equilíbrio da temperatura, a condutividade elétrica máxima foi medida (C2) e o extravasamento de eletrólitos calculado através da fórmula: $[(C1-B1) / (C2-B2)] \cdot 100$.

3.8 TEOR DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

A extração dos pigmentos fotossintetizantes foi realizada com base em WELLBURN (1994). As mesmas folhas utilizadas para leitura da fluorescência e trocas gasosas foram coletadas de cada tratamento e imediatamente acondicionadas em sacos plásticos pretos e posto em banho de gelo em uma caixa de isopor. Utilizando um furador metálico de 0,5 cm de diâmetro, foram retirados os discos foliares, desprezando-se a nervura central. Um total de 5

discos foliares foram transferidos para tubo de ensaio, contendo 7mL de dimetilsulfóxido (DMSO), e mantidos no escuro a temperatura de 25°C por um período de 72 horas. As leituras de absorvâncias dos extratos foram feitas em espectrofotômetro (ThermoScientific®, Genesys 10S, EUA), a 470 nm, 663 nm e 645 nm. A partir das leituras espectrofotométricas, foram calculados os teores de clorofilas e carotenóides usando as equações de Arnon (1949) e Lichtenthaler (1987), respectivamente:

$$\text{Clor. } a = [(12,7.A663) - (2,69.A645)].V/(1000.MS)$$

$$\text{Clor. } b = [(22,9.A645) - (4,68.A663)].V/(1000.MS)$$

$$\text{Clor. total} = [(20,2.A663) - (2,69.A645)].V/(1000.MS)$$

$$\text{Carot.} = [(1000.A470) - (1,82.Clor.a - 85,02.Clor.b)].V/(198.1000.MS)$$

Onde:

$A470$ = absorvância a 470 nm;

$A663$ = absorvância a 663 nm;

$A645$ = absorvância a 645 nm;

V = volume da amostra (mL);

MS = massa seca da amostra (g);

$Clor.a$ = clorofila a ;

$Clor.b$ = clorofila b ;

$Carot.$ = carotenóides.

Para a obtenção da massa seca, os discos foliares foram, após a extração dos pigmentos, secos em estufa a 70°C, até obtenção de massa constante. Os valores foram obtidos como total de pigmentos em miligramas por grama de massa seca (mg.gMS^{-1}).

3.9 CINÉTICA DE EMISSÃO DA FLUORESCÊNCIA TRANSIENTE (OJIP)

As medições da fluorescência da clorofila a foram feitas entre 8 e 10 horas da manhã em folhas jovens totalmente expandidas do 2º ou 3º nó a partir do ápice do eixo ortotrópico, ainda ligadas às plantas e adaptadas ao escuro por 30 minutos por intermédio de um clipe. A emissão da fluorescência transiente OJIP (10 μs a 1 s) foi medida com um fluorômetro portátil (Pocket PEA, Hanstech, King's Lynn, Norkfolk, UK), conforme metodologia sugerida por Tsimili-Michael e Strasser (2008). A fluorescência nas folhas foi induzida por pulso saturante de luz vermelha de $3.500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e analisada por meio do teste JIP. As definições e equações do teste JIP utilizadas seguiram a proposta de Strasser et al. (2004), sendo escolhidos os seguintes par\u00e2metros:

- ABS/RC: Fluxo de absorção (de clorofilas da antena) por RC;
- TR_0/RC : Fluxo de energia capturada (levando à redução Q_A) por RC;
- DI_0/RC : Fluxo de dissipação de energia por centro de reação;
- ET_0/RC : Fluxo do transporte de elétrons (além de Q_A -) por RC;
- RE_0/RC : Fluxo de elétrons reduzindo aceptores finais de elétrons no lado acceptor do PSI, por RC;
- RC/ABS: Densidade de centros de reação ativos do FSII;
- $\phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$: termo conformação para fotoquímica primária;
- $\Psi_0/(1-\Psi_0)$: termo de conformação para reações não dependentes da luz (além de Q_A -);
- $\delta_{R0}/(1-\delta_{R0})$: termo de conformação para as reações do intersistema reduzido até a redução do acceptor final de elétrons do FSI;
- PI_{TOTAL} : Índice de desempenho (potencial) para conservação de energia a partir de um exciton até a redução do acceptor final do FSI, sendo resultado da multiplicação $(RC/ABS) \cdot [\phi_{P0}/(1-\phi_{P0})] \cdot [\Psi_{E0}/(1-\Psi_{E0})] \cdot [\delta_{R0}/(1-\delta_{R0})]$.

3.10 TROCAS GASOSAS E ASSIMILAÇÃO LÍQUIDA DE CO₂

As medições de trocas gasosas foram efetuadas nas mesmas folhas utilizadas na análise da fluorescência, no horário entre 8 e 10 horas da manhã, utilizando um analisador de gases infravermelho portátil (IRGA), modelo *LI 6400* (LI-COR, USA), em irradiância de 1000 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foram avaliadas as variáveis: assimilação de CO₂ (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração (E , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração intercelular de CO₂ (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol ar}^{-1}$). A partir destas variáveis foram calculadas a eficiência instantânea de carboxilação (A/C_i , $\text{mol ar m}^{-2} \text{ s}^{-2}$) e as eficiências de uso da água A/E ($\text{mmol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) e A/g_s ($\text{mmol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$), sendo, esta última, denominada eficiência intrínseca do uso da água por considerar o mecanismo estomático (MACHADO et al., 2005).

3.11 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E TEOR DE FENÓIS TOTAIS

3.11.1 Obtenção do Extrato

Para a extração da enzima, foram utilizadas as mesmas folhas da análise de fluorescência e de trocas gasosas. O tecido das folhas (0,2 g) foi homogeneizado em 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), EDTA-Na₂ 0,1 mM, ácido ascórbico 10 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v). Todo processo foi realizado em almofariz e pistilo a frio. O homogeneizado foi centrifugado a 12000 x g durante 15 min a 4 °C (PARIDA et al., 2004). O sobrenadante resultante foi utilizado para os ensaios das atividades da CAT, APX, POD e PPO, e quantificação de fenóis.

3.11.2 Catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6)

A atividade da enzima foi determinada conforme metodologia descrita por Havir e Mchale (1989) com modificações. A mistura de reação para a CAT, em um volume total de 2,15 ml continha 2000µL de tampão fosfato-Na (pH 7,0) 100 mM e 100 µL H₂O₂ 20 mM (incubados a 28°C). A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de extrato de enzima e a atividade foi determinada por monitoramento da velocidade inicial de desaparecimento H₂O₂ a 240 nm durante 30 segundos usando um espectrofotômetro (ThermoScientific®, Genesys 10S, EUA). O coeficiente de extinção de H₂O₂ considerado foi de 36 mM⁻¹ cm⁻¹ (NAKANO e ASADA, 1981).

3.11.3 Peroxidase do Ascorbato (APX; EC 1.11.1.11)

A atividade da enzima foi definida de acordo com a metodologia descrita por Nakano e Asada (1981) com modificações. A mistura de reação para a APX, em um volume total de 2,5 ml continha 2,22 mL de tampão fosfato-Na (pH 7,0) 100 mM, 125 µL de ácido ascórbico 10 mM, 125 µL H₂O₂ 2 mM (incubados a 28°C). A reação foi iniciada pela adição de 30 µL de extrato de enzima e a oxidação de H₂O₂ dependente de ácido ascórbico foi medida seguindo o decréscimo na absorbância a 285 nm durante três minutos usando um espectrofotômetro ThermoScientific®, Genesys 10S. O coeficiente de extinção de H₂O₂ considerado foi de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ (NAKANO e ASADA, 1981).

3.11.4 Peroxidase do Guaiacol (POD; EC 1.11.1.7)

A atividade da enzima foi estipulada segundo a metodologia descrita por Cakmak et al. (1993) com modificações. Foi medida em um meio de reação constituído de 50 µL de

extrato e 2 mL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0) com guaiacol 20 mM e 100 µL de peróxido de hidrogênio 20 mM. O aumento da absorbância devido à oxidação do guaiacol foi registrado a 470 nm depois de dois minutos de reação usando um espectrofotômetro ThermoScientific®, Genesys 10S. O coeficiente de extinção de H₂O₂ considerado 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹.

3.11.5 Polifenoloxidase (PPO; EC 1.30.3.1)

A atividade da PPO foi ensaiada de acordo com Cañal et al. (1988), com algumas modificações. A mistura de reação (2,2 mL de volume final) consistiu em 1 mL de catecol 0,2 M, 1 mL de tampão fosfato-Na (0,2 M, pH 6,8) e 20 µL de extracto de enzima. O aumento da absorbância foi registrado a 420 nm depois de dois minutos de reação usando um espectrofotômetro ThermoScientific®, Genesys 10S. A atividade total para esta enzima foi expressa como o aumento na absorbância por minuto.

3.11.6 Teor de Fenóis Totais

A determinação de compostos fenólicos nos extratos foi feita usando reagente de Folin-Ciocalteu e calibração com ácido gálico segundo metodologia proposta por Singleton e Rossi (1965) com modificações. Adicionou-se a 50 µL de extrato, 1250 µL de água ultrapura, 200 µL de reagente de Folin-Ciocalteu em agitação. Depois de 4 min, 1 mL de Na₂CO₃ 15% foi adicionado e a mistura permaneceu por 2 h na temperatura ambiente (± 25°C). A absorbância foi medida a 760 nm usando um espectrofotômetro ThermoScientific®, Genesys 10S. Uma curva de calibração foi feita utilizando-se ácido gálico como padrão e os resultados expressos em µg de ácido gálico por g de massa fresca foliar.

3.12 ANATOMIA FOLIAR E TESTES HISTOQUÍMICOS

Amostras de folhas completamente expandidas localizadas no 2º ou 3º nó a partir do ápice do eixo ortotrópico com bom estado fitossanitário foram fixadas em etanol 70%. Para as análises foliares foram utilizados segmentos da porção mediana da lamina foliar, os quais foram desidratados em série etílica crescente e incluídos em resina glicol-metacrilato (Leica HistoResin®), segundo recomendações do fabricante. Os blocos foram cortados transversalmente (10 µm de espessura) em micrótomo rotativo e corados com Azul de

Toluidina (O'BRIEN et al., 1964). As análises anatômicas quantitativas foram realizadas por meio de medições da espessura total do limbo, da epiderme de ambas as faces da folha, e dos parênquimas paliçádico e lacunoso. Foi determinada também, a densidade estomática (n°/mm^2) a partir da impressão epidérmica da face abaxial da folha em lâminas de vidro com uso de adesivo instantâneo.

Os testes histoquímicos foram realizados em secções transversais de material fresco e fixado, em conformidade com metodologias descritas por Johansen (1940). A detecção de mucilagem foi feita por meio do emprego de solução aquosa de vermelho de Rutênio, cuja reação positiva é indicada pela coloração rósea. Para a detecção de amido foi utilizado o reagente lugol, sendo considerada positiva a presença de coloração azul escura a preta.

As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em fotomicroscópio Nikon Eclipse 50i e as análises quantitativas foram feitas utilizando-se software de análise de imagens Nikon NIS-Elements.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%, e, quando houve efeito significativo da interação irrigação x dose de Si, foi realizado o seu desdobramento. Quando necessário os dados foram normalizados pela transformação \sqrt{x} , sendo todas as análises executadas pelo programa Assistat 7.6 beta (2012), UAEG-CTRN-UFCG, Campina Grande – PB.

4 RESULTADOS

4.1 CONCENTRAÇÃO DE SILÍCIO

O teor foliar de Si nas plantas sob déficit hídrico foi 62% menor do que nas plantas irrigadas (Figura 1A). Para as diferentes doses de SiO₂ aplicadas não foram observadas diferenças estatísticas (Figura 1B), nem interação estatística entre os fatores irrigação e doses de SiO₂.

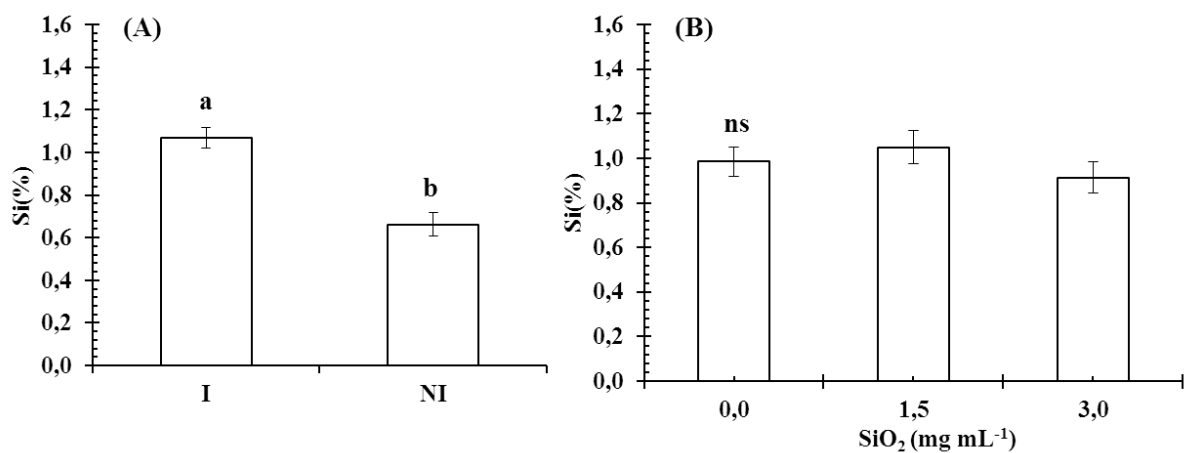


Figura 1 – Teor foliar de Si em folhas de *T. cacao*. (A) Plantas irrigadas e não irrigadas com 20 dias de suspensão total da irrigação. (B) Plantas submetidas a diferentes doses de SiO₂. As barras indicam o erro padrão da média, regimes hídricos (n=12), doses de Si (n=8). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. ns – não significativo a 5% de probabilidade.

4.2 CARACTERÍSTICAS HÍDRICAS

O teor relativo de água em folhas não diferiu entre os tratamentos de irrigação (Figura 2A) e de doses de SiO₂ (Figura 2B), não sendo também observado interação entre estes fatores.

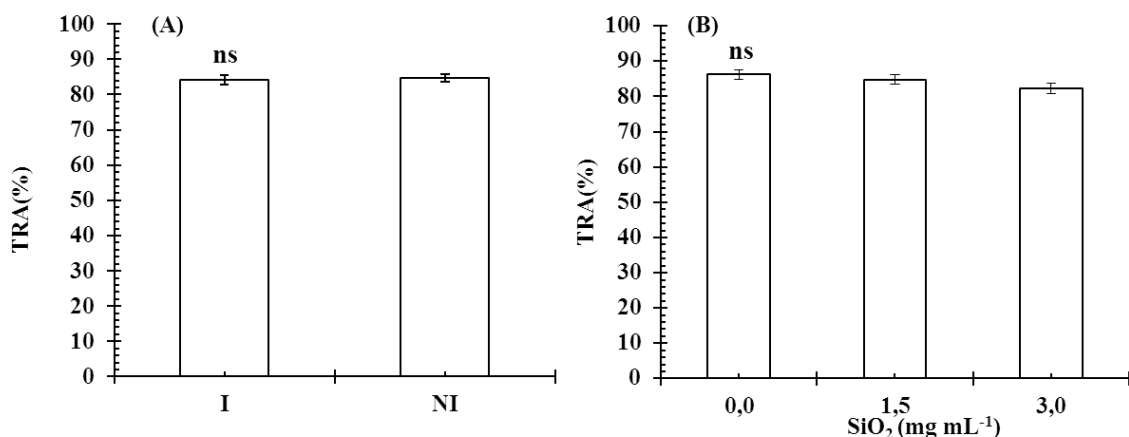


Figura 2 – Teor relativo de água (TRA) em folhas de *T. cacao*. (A) Plantas irrigadas e não irrigadas com 20 dias

de suspensão total da irrigação. (B) Plantas submetidas a diferentes doses de SiO_2 . As barras indicam o erro padrão da média, regimes hídricos ($n=12$), doses de silício ($n=8$). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. ns – não significativo a 5% de probabilidade.

Após vinte dias de suspensão total da irrigação as plantas mostraram potencial hídrico foliar menor em relação às irrigadas (Figura 3A), sendo que os menores valores foram observados nas plantas submetidas à aplicação de Si na dose de 3,0 mg/mL de SiO_2 (Figura 3B). Não foi notada interação estatística entre os fatores.

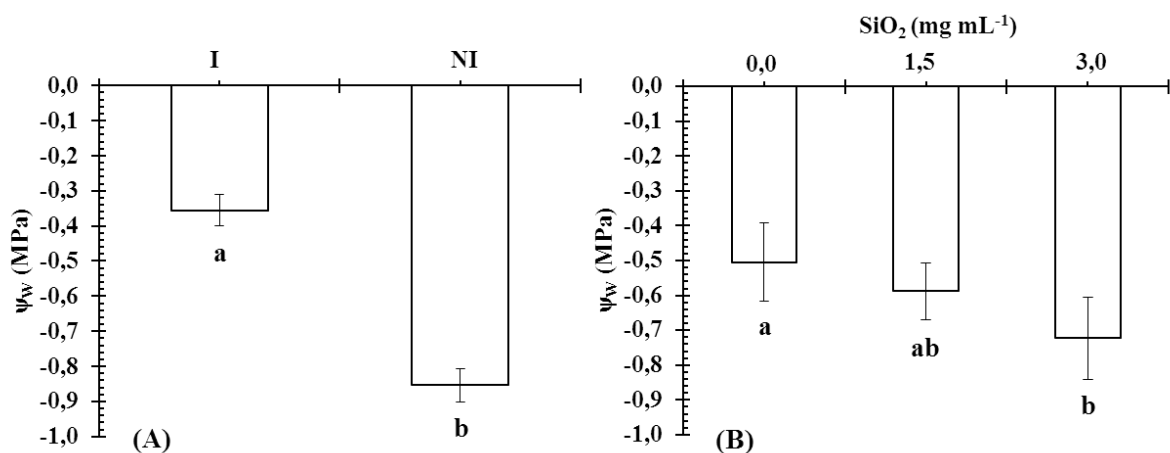


Figura 3 – Potencial hídrico foliar (Ψ_w) em folhas de *T. cacao*. (A) Plantas irrigadas e não irrigadas com 20 dias de suspensão total da irrigação. (B) Plantas submetidas a diferentes doses de SiO_2 . As barras indicam o erro padrão da média, regimes hídricos ($n=12$), doses de Si ($n=8$). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

4.3 TOLERÂNCIA PROTOPLASMÁTICA

A análise de interação regime hídrico e doses de SiO_2 demonstra que as doses afetaram o extravasamento de eletrólitos apenas nas plantas não irrigadas, sendo o valor maior desse parâmetro observado para as plantas sob déficit hídrico com 0,0 mg/mL de SiO_2 (tabela 3).

A adição de Si nas folhas dessas plantas provocou redução significativa do extravasamento de eletrólitos, atingindo valores semelhantes aos das plantas irrigadas, não sendo observada diferença nas doses com Si (Tabela 3).

Tabela 3 – Extravasamento de eletrólitos de folhas de *T. cacao* sob influência do regime hídrico e doses de SiO₂.

| Irrigação | SiO ₂ (mg mL ⁻¹) | | |
|-----------|---|---------|----------|
| | 0,0 | 1,5 | 3,0 |
| | Extravasamento de eletrólitos (%) | | |
| I | 10,63 bA | 9,60 aA | 10,54 aA |
| NI | 19,52 aA | 9,59 aB | 11,06 aB |

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade (n=4). I: irrigado; NI: 20 dias de suspensão total da irrigação; Si0: 0,0 mg/mL de Si; Si1,5: 1,5 mg/mL de Si; Si3: 3,0 mg/mL de Si.

4.4 CONTEÚDO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS E FENÓIS

Os teores de pigmentos fotossintéticos nas plantas de cacau não sofreram alteração com a aplicação dos tratamentos de irrigação e de doses de Si (Tabela 4).

Tabela 4 – Teores de pigmentos fotossintéticos nas folhas de *T. cacao* em função do suprimento de água e das doses de Si.

| Tratamento | Pigmentos cloroplastídicos (mg g ⁻¹ MS) | | | |
|---|--|---------------|------------|---------|
| | Clor <i>a</i> | Clor <i>b</i> | Clor total | Carot |
| Irrigação | | | | |
| I | 4,94 ns | 1,01 ns | 8,06 ns | 2,93 ns |
| NI | 5,45 | 1,07 | 8,90 | 3,21 |
| SiO ₂ (mg mL ⁻¹) | | | | |
| 0,0 | 5,00 ns | 1,03 ns | 8,16 ns | 3,07 ns |
| 1,5 | 5,18 | 1,03 | 8,45 | 3,03 |
| 3,0 | 5,41 | 1,06 | 8,83 | 3,10 |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade, regimes hídricos (n=12), dose de Si (n=8). I: irrigado; NI: 20 dias de suspensão total da irrigação; Clor *a*: clorofila *a*; Clor *b*: clorofila *b*; Clor total: clorofila total; Carot: carotenóides; Clor *a/b*: razão clorofila *a* e *b*. ns – não significativo a 5% de probabilidade.

O teor foliar de fenóis totais foi maior nas plantas não irrigadas (Figura 4A). A aplicação de Si elevou o conteúdo de fenóis nas folhas de *T. cacao*, não diferindo entre as duas doses com Si (Figura 4B). Não foi observada interação entre irrigação e doses de Si para o conteúdo total de fenóis.

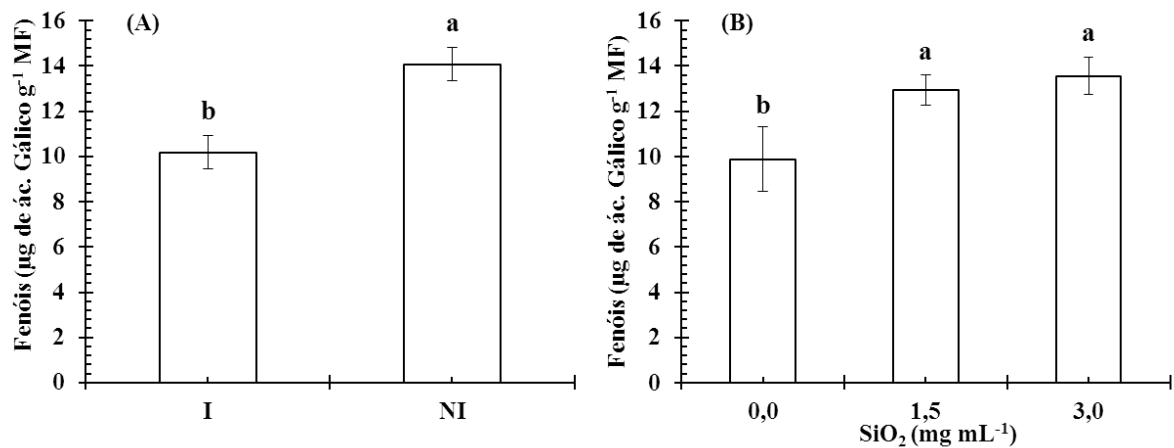


Figura 4 – Fenóis totais em folhas de *T. cacao*. (A) Plantas irrigadas e não irrigadas com 20 dias de suspensão total da irrigação. (B) Plantas submetidas a diferentes doses de Si. As barras indicam o erro padrão da média, regimes hídricos (n=12), doses de Si (n=8). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

4.5 FOTOQUÍMICA E TROCAS GASOSAS

A fluorescência da clorofila *a* nas plantas irrigadas não sofreu alteração com a aplicação de Si. Entretanto, as plantas não irrigadas foram significativamente influenciadas pelas doses de Si aplicadas (Tabela 5).

Os fluxos de absorção, captura e dissipação de energia foram maiores para as plantas não irrigadas sem Si. A aplicação de Si nas plantas que não receberam água promoveu redução nesses parâmetros, igualando-os as plantas irrigadas para a absorção e captura. Os valores de dissipação foram menores nessas plantas com dose de 1,5 mg/mL de Si, sendo também essa dose a que promoveu redução mais expressiva para a absorção e dissipação nas plantas sob déficit hídrico. A densidade de centros de reação ativos foi menor nas plantas não irrigadas sem Si. A aplicação de Si promoveu aumento deste parâmetro, sendo que as plantas com a dose de 1,5 mg/mL de Si apresentaram os valores maiores, chegando a superar as plantas irrigadas no mesmo tratamento.

Os parâmetros $\phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$ e PI_{TOTAL} não diferiram entre os tratamentos sem Si, porém a aplicação de Si nas plantas não irrigadas promoveu incremento nestes parâmetros, sendo que a dose de 1,5 mg/mL de Si resultou em valores maiores, inclusive em relação às plantas irrigadas com a mesma dose. Os parâmetros ET_0/RC , RE_0/RC , $\Psi_0/(1-\Psi_0)$ e $\delta_{R0}/(1-\delta_{R0})$ não foram alterados pelos tratamentos.

Tabela 5 – Parâmetros fotoquímicos deduzidos da análise da fluorescência transiente da clorofila *a* pelo teste JIP em folhas de *T. cacao* sob influência do suprimento de água e doses de Si.

| Parâmetro | Irrigação | SiO ₂ (mg mL ⁻¹) | | |
|---------------------------------------|-----------|---|---------|----------|
| | | 0,0 | 1,5 | 3,0 |
| ABS/RC | I | 0,52 bA | 0,55 aA | 0,51 aA |
| | NI | 0,64 aA | 0,48 aB | 0,55 aAB |
| TR ₀ /RC | I | 0,40 bA | 0,42 aA | 0,39 aA |
| | NI | 0,49 aA | 0,38 aB | 0,42 aB |
| DI ₀ /RC | I | 0,12 bA | 0,13 aA | 0,11 aA |
| | NI | 0,15 aA | 0,10 bB | 0,13 aAB |
| ET ₀ /RC | I | 0,11 ns | 0,10 | 0,11 |
| | NI | 0,10 | 0,11 | 0,11 |
| RE ₀ /RC | I | 0,045 ns | 0,051 | 0,045 |
| | NI | 0,048 | 0,053 | 0,047 |
| RC/ABS | I | 1,99 aA | 1,84 bA | 1,98 aA |
| | NI | 1,61 bB | 2,15 aA | 1,86 aAB |
| φ _{P0} /(1-φ _{P0}) | I | 3,42 aA | 3,32 bA | 3,48 aA |
| | NI | 3,34 aB | 3,96 aA | 3,42 aAB |
| Ψ ₀ /(1-Ψ ₀) | I | 0,42 ns | 0,32 | 0,39 |
| | NI | 0,30 | 0,45 | 0,39 |
| δ _{R0} /(1-δ _{R0}) | I | 0,90 ns | 0,91 | 0,93 |
| | NI | 1,20 | 0,93 | 1,10 |
| PI _{TOTAL} | I | 2,30 aA | 1,62 bA | 2,30 aA |
| | NI | 1,74 aB | 3,21 aA | 2,72 aAB |

ABS/RC: Fluxo de absorção (de clorofilas da antena) por RC; TR₀/RC: Fluxo de energia capturada (levando à redução Q_A) por RC; DI₀/RC: Fluxo de dissipação de energia por centro de reação; ET₀/RC: Fluxo do transporte de elétrons (além de Q_A^-) por RC; RE₀/RC: Fluxo de elétrons reduzindo aceptores finais de elétrons no lado receptor do PSI, por RC.; RC/ABS: Densidade de centros de reação ativos do FSII; φ_{P0}/(1-φ_{P0}): termo conformação para fotoquímica primária; Ψ₀/(1-Ψ₀): termo de conformação para as reações não dependentes da luz (além de Q_A^-); δ_{R0}/(1-δ_{R0}): termo de conformação para as reações do intersistema reduzido até a redução do receptor final de elétrons do FSI; PI_{TOTAL}: Índice de desempenho (potencial) para conservação de energia a partir de um exciton até a redução do receptor final do FSI; I: irrigado; NI: 20 dias de suspensão total da irrigação. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade (n=4). ns – não significativo a 5% de probabilidade.

Plantas não irrigadas mostraram menores valores de fotossíntese, condutância estomática e transpiração em relação às plantas irrigadas (Tabela 6). A concentração de carbono interno foi maior nas plantas não irrigadas. As doses de Si influenciaram a fotossíntese, condutância estomática e a transpiração, sendo que a dose de 1,5 mg/ml de Si

resultou em valores maiores (Tabela 6). O carbono interno não foi alterado com as doses de Si.

Tabela 6 – Parâmetros de trocas gasosas em folhas de *T. cacao* sob influência do suprimento de água e das doses de Si.

| Tratamento | A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | g_s ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | E ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | C_i ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol ar}^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| Irrigação | | | | |
| I | 4,22 a | 0,047 a | 1,68 a | 238,54 b |
| NI | 1,73 b | 0,013 b | 0,46 b | 244,57 a |
| SiO ₂ (mg mL ⁻¹) | | | | |
| 0,0 | 2,95 ab | 0,029 ab | 1,06 ab | 242,14 ns |
| 1,5 | 3,36 a | 0,034 a | 1,23 a | 239,25 |
| 3,0 | 2,62 b | 0,025 b | 0,93 b | 243,28 |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade, irrigação (n=12), dose de Si (n=8). I: irrigado; NI: 20 dias de suspensão total da irrigação; A: fotossíntese; g_s : condutância estomática; E: transpiração; C_i : concentração interna de CO₂; A/E: eficiência no uso da água.). ns – não significativo a 5% de probabilidade.

O resultado da interação irrigação x doses de Si revelou que a aplicação de Si teve efeito apenas em plantas não irrigadas (Tabela 7).

Tabela 7 – Fotossíntese (A), Eficiência intrínseca do uso de água (A/g_s), eficiência no uso da água (A/E) e eficiência instantânea de carboxilação (A/C_i) de folhas de *T. cacao* sob influência do suprimento de água e doses de Si.

| Irrigação | SiO ₂ (mg mL ⁻¹) | | |
|---|---|----------|----------|
| | 0,0 | 1,5 | 3,0 |
| A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | | | |
| I | 4,28 aA | 4,28 aA | 4,10 aA |
| NI | 1,62 bB | 2,44 bA | 1,13 bB |
| A/g_s ($\text{mmol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) | | | |
| I | 70,29 aA | 62,41 aA | 70,32 aA |
| NI | 49,77 aAB | 79,52 aA | 32,43 bB |
| A/E ($\text{mmol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) | | | |
| I | 3,25 aA | 2,91 aA | 3,18 aA |
| NI | 1,93 bAB | 3,16 aA | 1,32 bB |
| A/C_i ($\text{mol ar m}^{-2} \text{ s}^{-2}$) | | | |
| I | 0,14 aA | 0,14 aA | 0,13 aA |
| NI | 0,05 bB | 0,08 bA | 0,03 bB |

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade (n=4). I: irrigado; NI: 20 dias de suspensão total da irrigação.

As plantas não irrigadas sem Si apresentaram menores taxas de fotossíntese, eficiências no uso da água e eficiência de carboxilação. As plantas com a dose de 1,5 mg/mL de Si mostraram os maiores valores para os parâmetros analisados (Tabela 7). Já as plantas com dose de 3,0 mg/mL exibiram valores reduzidos para esses parâmetros (Tabela 7).

4.6 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A maior atividade da CAT foi observada nas plantas não irrigadas com 0,0 mg/mL e 3,0 mg/mL de Si, ao passo que plantas sujeitas a aplicação da dose de 1,5 mg/mL de Si mostraram valores menores para atividade desta enzima. Nas plantas irrigadas, a dose de 3,0 mg/mL de Si reduziu a atividade da CAT (Tabela 8).

Tabela 8 – Atividade das enzimas Catalase (CAT), Peroxidase do ascorbato (APX), Peroxidase do guaiacol (POD) e Polifenoloxidase (PPO) em folhas de *T. cacao* sob influência do suprimento de água e doses de Si.

| Irrigação | SiO ₂ (mg mL ⁻¹) | | |
|---|---|----------|----------|
| | 0,0 | 1,5 | 3,0 |
| CAT (μmol min ⁻¹ g ⁻¹ MF) | | | |
| I | 0,67 bA | 0,72 aA | 0,20 bB |
| NI | 1,00 aA | 0,38 bB | 0,94 aA |
| APX (μmol min ⁻¹ g ⁻¹ MF) | | | |
| I | 2,11 aA | 1,40 bB | 0,98 bB |
| NI | 0,66 bC | 2,02 aA | 1,42 aB |
| POD (μmol min ⁻¹ g ⁻¹ MF) | | | |
| I | 0,72 bB | 1,09 aA | 0,39 bC |
| NI | 1,07 aA | 0,19 bC | 0,65 aB |
| PPO (UA min ⁻¹ g ⁻¹ MF) | | | |
| I | 9,59 aA | 8,90 aA | 10,52 aA |
| NI | 5,90 bB | 10,45 aA | 7,20 bB |

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade (n=4). I: irrigado; NI: 20 dias de suspensão total da irrigação; Si0: 0,0 mg/mL de Si; Si1,5: 1,5 mg/mL de Si; Si3: 3,0 mg/mL de Si.

A atividade da APX foi menor nas plantas não irrigadas com 0,0 mg/mL de Si. Com a adição de Si houve um aumento na atividade da APX para as plantas não irrigadas, sendo observado valores maiores para a dose de 1,5 mg/mL de Si. Em contrapartida, a adição de Si

levou à redução da atividade dessa enzima para as plantas irrigadas, chegando a níveis inferiores ao das plantas não irrigadas (Tabela 8).

Plantas não irrigadas com 0,0 mg/mL de Si tiveram maior atividade da POD. A adição de Si promoveu redução da atividade dessa enzima, sendo observada a menor atividade nas plantas sujeitas a dose de 1,5 mg/mL de Si. Nas plantas irrigadas a dose de 1,5 mg/mL de Si promoveu aumento da atividade da POD, já a dose de 3,0 mg/mL redução (Tabela 8).

A aplicação de Si teve efeito apenas em plantas não irrigadas para a atividade da enzima PPO. Plantas não irrigadas sem Si apresentaram menor atividade da enzima, e apenas a dose de 1,5 mg/mL de Si teve efeito significativo no aumento da atividade enzimática (Tabela 8).

4.7 ANATOMIA E TESTES HISTOQUÍMICOS

A folha de *T. cacao* genótipo PH16 é dorsiventral e hipoestomática, com epiderme unisseriada e mucilaginosa (Figura 5A). Na nervura central, observa-se canal de mucilagem amplo na região da medula e canais de mucilagem menores na região do córtex (Figura 5B). Grãos de amido são abundantes nas plantas não irrigadas (Figura 5D), e ocorrem em menor quantidade nas plantas irrigadas (figura 5C).

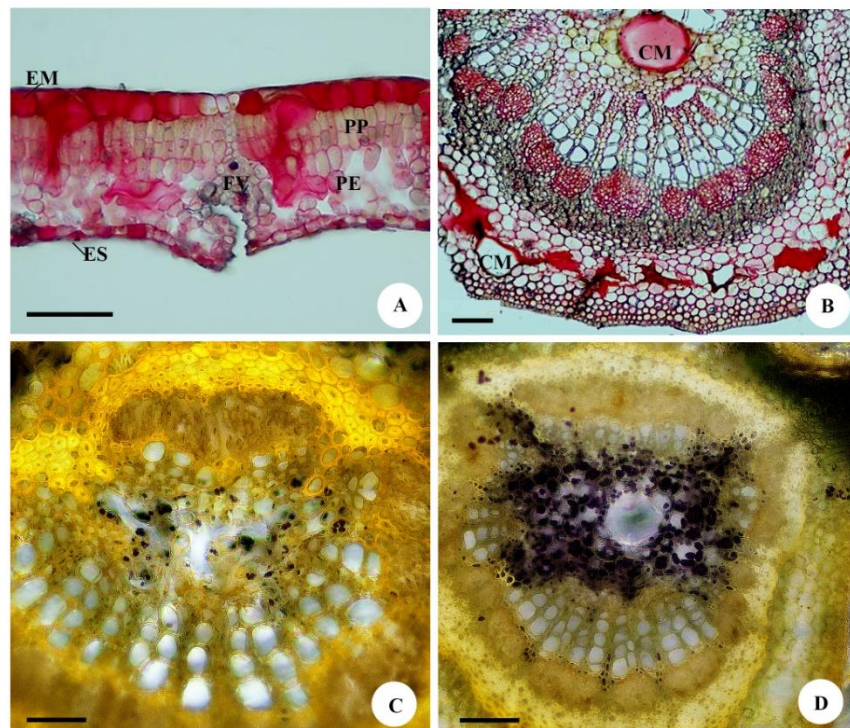


Figura 5 – Secções transversais do limbo de *T. cacao* submetidas a testes histoquímicos. A-B: Teste com reagente Vermelho de Rutênio, evidenciando acúmulo de mucilagem em células epidérmicas (A) e no interior de

canais secretores da nervura central (B). C-D: Teste com solução de Lugol mostrando a presença de grãos de amido (coloração preta) em plantas irrigadas (C) e plantas não irrigadas (D). (CM = canal de mucilagem; EM = epiderme mucilagínosa; ES = estômato; FV= feixe vascular; PE = parênquima esponjoso; PP = parênquima paliçádico). Barras = 100µm.

As variáveis anatômicas foliares analisadas não sofreram influência do suprimento de água e das doses de Si (Tabela 9), com exceção da densidade estomática (Tabela 10). Essa variável foi maior nas plantas não irrigadas, entretanto, a aplicação de 3,0 mg/mL de Si nesses indivíduos reduziu de forma significativa a densidade estomática, não diferindo dos indivíduos irrigados (Tabela 10 e Figura 6). Não foram observadas diferenças visuais no tamanho dos estômatos entre os tratamentos (Figura 6B-D).

Tabela 9 – Variáveis anatômicas em folhas de *T. cacao* sob influência do suprimento de água e das doses de Si.

| Tratamento | Espessura (µm) | | | | |
|---|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|--------------|
| | Epiderme face adaxial | Parênquima paliçádico | Parênquima esponjoso | Epiderme face abaxial | Limbo foliar |
| Irrigação | | | | | |
| I | 19,4 ns | 35,6 ns | 64,6 ns | 9,4 ns | 128,8 ns |
| NI | 18,8 | 34,6 | 59,0 | 9,7 | 122,5 |
| SiO₂ (mg mL⁻¹) | | | | | |
| 0,0 | 18,2 ns | 33,0 ns | 58,3 ns | 9,1 ns | 119,0 ns |
| 1,5 | 20,0 | 35,9 | 62,0 | 9,7 | 128,0 |
| 3,0 | 19,1 | 36,3 | 65,1 | 9,7 | 130,0 |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade, regimes hídricos (n=12), dose de Si (n=8). I: irrigado; NI: 20 dias de suspensão total da irrigação. ns – não significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 10 – Valores médios da densidade estomática em folhas de *T. cacao* sob influência do suprimento de água e doses de Si.

| Irrigação | SiO ₂ (mg mL ⁻¹) | | |
|--|---|-----------|-----------|
| | 0,0 | 1,5 | 3,0 |
| n° de estômatos (mm⁻²) | | | |
| I | 889,85 bA | 881,20 bA | 890,00 aA |
| NI | 975,91 aA | 948,03 aA | 857,95 aB |

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade (n=4). I: irrigado; NI: 20 dias de suspensão total da irrigação; Si0: 0,0 mg/mL de Si; Si1,5: 1,5 mg/mL de Si; Si3: 3,0 mg/mL de Si.

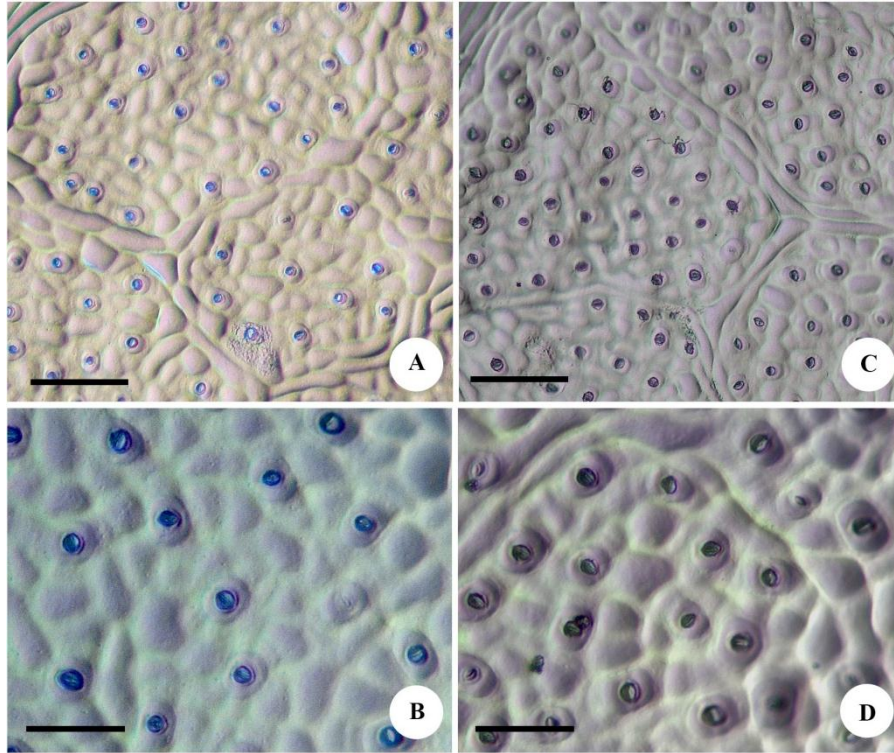


Figura 6 – Impressões epidérmicas da face abaxial da folha de *T. cacao*. A-B: Plantas irrigadas com dose 3,0 mg/mL de Si. C-D: Plantas não irrigadas, sem adição de Si. Barras = 100μm (A e C); 50 μm (B-D).

5 DISCUSSÃO

Em geral, são consideradas plantas acumuladoras de Si aquelas que possuem teor foliar acima de 1%, e não acumuladoras as plantas com teor de Si menor que 0,5% (Ma, et al., 2001). No presente estudo, as plantas irrigadas e sem aplicação foliar de Si apresentaram teor foliar de Si acima de 1%, sugerindo serem acumuladoras de Si, confirmando o resultado encontrado, também, por Pinto (2011) que verificou valores superiores a 1% de Si em três genótipos de cacau.

O menor conteúdo de Si encontrado nas plantas sob déficit hídrico pode ser explicado pelo fato deste elemento ser absorvido do solo e translocado no vegetal juntamente com o fluxo de água (KORNDÖRFER, 2009). Contudo, os mecanismos de absorção de Si pelas plantas ainda não foram totalmente esclarecidos, uma vez que há limitações nas metodologias de análise de Si em tecidos vegetais, sendo que pequenas diferenças podem não ser detectadas (BUCK et al., 2008). Além disso, doses aplicadas via foliar são muito baixas quando comparadas a adubação do Si via solo (PINTO, 2011). Os resultados obtidos no presente estudo corroboram o observado por outros autores que não encontraram diferenças no teor foliar de Si após sua aplicação via foliar, por exemplo, em plantas de café (BOTELHO et al., 2005), arroz (ZANÃO JÚNIOR et al., 2009) e cacau (PINTO, 2011), o que sugere o acúmulo desse elemento na superfície das folhas.

Quanto ao teor relativo de água nas folhas, chamou à atenção o fato das plantas não mostrarem diferença estatística, mantendo o teor de água em torno de 85%, uma vez que era esperado que as plantas irrigadas apresentassem maiores teores de água em relação àquelas submetidas à suspensão hídrica. Esses resultados corroboram àqueles encontrados por Almeida et al, (2002) que, da mesma maneira, não verificaram diferença no teor relativo de água foliar nos diferentes clones de cacau após imposição de déficit hídrico. Segundo os mesmos autores, o ajuste osmótico foi responsável pela manutenção dos teores relativos de água foliar elevados (cerca de 90%), numa condição de potencial hídrico de -1,0 MPa, valor este semelhante ao encontrado no presente trabalho.

Um dos fatores amplamente relatados na literatura e relacionados à tolerância das plantas a seca é o ajuste osmótico que consiste no acúmulo de solutos orgânicos de baixo peso molecular (BAJJI et al., 2001), especialmente, carboidratos (CHAVES et al., 2002). Os carboidratos podem ser armazenados tanto na forma de polissacarídeos com baixa atividade osmótica, como o amido, quanto na forma de açúcares altamente solúveis e higroscópicos como a sacarose e hexoses (BUCKERIDGE et al., 2000; WHITTAKER et al., 2007). Neste

sentido, espécies acumuladoras de carboidratos podem, durante o seu crescimento, ter a síntese e o acúmulo desses carboidratos afetados pelo déficit hídrico, bem como utilizá-los na geração de compostos osmoticamente ativos através da degradação em resposta a esse estresse do ambiente. Ainda que os grãos de amido apresentem uma capacidade de ajuste osmótico menor em relação aos outros carboidratos solúveis, entendemos que o maior acúmulo de amido em folhas de plantas de *T. cacao* já é uma resposta para a manutenção do teor de água da planta que, sob uma condição de déficit hídrico mais prolongado, poderia utilizar essa reserva e aumentar a produção de açúcares osmoticamente mais ativos. Pesquisas sobre as respostas ao déficit hídrico em espécies nativas tropicais perenes e que acumulam amido como carboidratos de reserva ainda são escassas.

Outra estratégia de adaptação utilizada pelas plantas para manter o conteúdo de água nas suas folhas é a acumulação de mucilagens, devido a sua característica altamente higroscópica (JORDAAN e KRUGER, 1992). No presente trabalho, a análise anatômica mostrou grande quantidade de mucilagem nas folhas de *T. cacao* estudadas, proporcionando a essas folhas, elevado potencial de retenção de água, permitindo a manutenção do turgor celular (CHAVES et al., 2003) e da estrutura anatômica da folha mesmo sob condições de déficit hídrico.

Em *T. cacao*, a presença de células mucilaginosas na epiderme, foi descrita anteriormente por Nakayama et al. (1996), sendo uma característica de grande importância taxonômica e ecológica para os representantes de Malvaceae (ROCHA et al., 2011), porém, pouca atenção tem sido dada a sua função. As mucilagens são descritas como sendo de natureza mista constituída principalmente por heteropolissacarídeos ácidos e/ou neutros, proteínas e substâncias fenólicas, apresentando ampla distribuição nos vegetais, formando soluções coloidais que em contato com a água tornam-se viscosas (GREGORY e BAAS 1989). Desempenham diferentes funções nas plantas, entre elas, a proteção de estruturas ou órgãos em desenvolvimento, retenção de água, reserva de carboidratos, redução da transpiração, proteção contra radiação dispersando ou refletindo a luz incidente, ou até mesmo funcionando como um leve filtro a radiação protegendo as células em paliçada de luz excessiva (MARTINI et al. 2003; PIMENTEL et al. 2011).

De modo geral, é observada redução do teor relativo de água de plantas sujeitas a déficit hídrico tais como, sorgo (HATTORI et al. 2007), trigo (PEI et al. 2010), soja (SHEN et al. 2010) e arroz (MING et al. 2012). Entretanto, as plantas de *T. cacao* estudadas não apresentaram esse padrão de resposta. Fato que está associado aos diferentes mecanismos de respostas que a planta apresenta, incluindo o acúmulo de amido e mucilagem.

Em *T. cacao*, o Ψ_w foi influenciado pela irrigação e pelas doses de Si aplicadas. Considerando plantas irrigadas e não irrigadas o potencial hídrico apresentou-se menor naquelas sob déficit hídrico, fato amplamente relatado na literatura (ALMEIDA et al. 2002; BAE et al., 2008). Levando-se em consideração a aplicação das doses crescentes de Si, o potencial hídrico também reduziu. Esta resposta difere das encontradas na literatura com outras espécies, em que o Si aumentou ou manteve o potencial hídrico foliar (GONG et al. 2005; SONOBE et al. 2009; MING et al. 2012). O possível acréscimo na concentração interna de solutos, juntamente com o enrijecimento da parede celular, promovido pela aplicação foliar do Si, pode ter contribuído para a redução do potencial hídrico foliar nas plantas de cacau, principalmente na maior dose. No entanto, deve-se considerar que as diferenças observadas podem estar relacionadas às doses de Si empregadas em cada trabalho.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram uma influencia positiva do Si na manutenção da estrutura das membranas em plantas não irrigadas, o que foi confirmado pela redução do extravasamento de eletrólitos nesse tratamento. Segundo Ming et al. (2012), o Si pode ajudar a estabilizar a estrutura da membrana plasmática e reduzir a perda de sólidos solúveis, contribuindo para o ajuste osmótico.

Nas plantas de *T. cacao* estudadas, a aplicação do déficit hídrico e das doses de Si não afetaram os teores de pigmentos fotossintéticos. Na literatura não há um consenso sobre a influência do Si nos teores de pigmentos fotossintéticos, o que pode estar relacionado às diferentes condições experimentais entre os trabalhos. Shen et al. (2010) verificaram que a aplicação de Si em folhas de soja sob déficit hídrico aumentou os teores de clorofilas nas plantas irrigadas, contudo, esse tratamento não alterou os teores de clorofilas nas plantas não irrigadas. Todavia, Pei et al. (2010) observaram que a aplicação de Si em folhas de trigo promoveu aumento no teor de clorofilas somente nas plantas sob déficit hídrico, não diferindo entre plantas irrigadas. Pinto (2011) avaliando a relação inseto-praga e doses de Si, não encontrou diferenças nos teores de clorofilas com aplicação foliar de silicato em dois genótipos de cacau estudados. Resultados semelhantes foram encontrados por Amaral et al. (2008) e Botelho et al. (2009), em plantas de cafeeiro inoculadas com patógenos e adubadas com Si. Em plantas de morango (BRAGA et al., 2009) e arroz (ÁVILA et al., 2010), a suplementação do meio de cultura com Si proporcionou maior teor de clorofila.

No presente trabalho, a avaliação do teor de fenóis totais nas folhas de *T. cacao* mostrou que plantas sob déficit hídrico ou aquelas supridas com Si apresentaram maior conteúdo dessa substância. Esses resultados corroboram os resultados encontrados por Pinto et al. (2012) que, também, observaram aumento no teor de fenóis nas folhas de duas cultivares

de cacau após adubação silicatada. Em condições de déficit hídrico, igualmente foram observados aumento no teor de fenóis nas folhas de plantas de soja (SHEN et al., 2010) e ervilha (ALEXIEVA et al., 2001). Estes autores sugerem que o fenol é um composto absorvente da luz ultravioleta (UV), funcionando como um filtro para esse tipo de luz que é altamente prejudicial aos cloroplastos. Assim, maiores quantidades de fenóis proporcionam redução na formação de EROs e danos às clorofilas. No presente trabalho, o acúmulo de fenóis, associado à manutenção do conteúdo de água nas folhas pelo acúmulo de mucilagem, que também pode funcionar como um filtro de densidade leve contribui para a proteção das células do parênquima clorofiliano contra a irradiância excessiva. Além disso, as atividades das enzimas antioxidantes se mostraram ativas reduzindo o estresse oxidativo que levaria a desorganização celular e de membranas cloroplastídicas, bem como degradação de clorofila e proteínas (PASTORI e TRIPPI, 1992).

Embora a adubação foliar com Si não tenha influenciado no conteúdo de pigmentos fotossintéticos em *T. cacao*, a fotoquímica foi significativamente alterada. Segundo Strasser et al. (2004), a fluorescência da clorofila *a* pode ser afetada por muitos tipos de estresses, como a seca, mesmo que nenhuma mudança significativa no conteúdo de pigmentos fotossintéticos tenha sido observada.

As análises dos parâmetros derivados do teste JIP mostram que o RC/ABS foi o principal parâmetro para determinação dos fluxos de energia, ABS/RC, TR_0/RC e DI_0/RC , visto que esses parâmetros são inversamente proporcionais àquele. O tratamento com suspensão da irrigação e ausência de Si apresentou menores valores para o RC/ABS, e assim maiores fluxos de absorção, captura e dissipação. Já a aplicação de Si inibiu o efeito do estresse hídrico proporcionando elevação do RC/ABS, sendo mais significativa na dose de 1,5 mg/mL de Si. Mas, as diferenças no número de centros de reação observadas nos tratamentos não explicam o comportamento do ET_0/RC e RE_0/RC que não apresentaram diferenças entre os tratamentos, demonstrando que o fluxo de elétrons além de Q_A^- até os aceptores finais de elétrons do FSI não foi prejudicado, sendo comprovado pelo $\Psi_0/(1-\Psi_0)$ e $\delta_{R0}/(1-\delta_{R0})$ que também não apresentaram diferença estatística. Estes parâmetros contribuíram para que as plantas não irrigadas com a dose de 1,5 mg/mL de Si tivessem um maior $\phi_{P0}/(1-\phi_{P0})$ e, logo, um maior PI_{TOTAL} , sendo este último parâmetro considerado por Zubek et al. (2009) e Mehta et al. (2010) o mais sensível do teste JIP, por incorporar parâmetros relacionados com cada parte do complexo fotossintético, logo, demonstra o estado funcional deste complexo como um todo. Vale ressaltar que as plantas sob déficit hídrico sem Si não diferiram estatisticamente das irrigadas na mesma dose de Si para PI_{TOTAL} , demonstrando que as plantas de cacau

mesmo em condição de estresse possuem um ganho elevado de energia (ATP e NADPH). Em outros trabalhos também foram observados uma melhor eficiência das reações fotoquímicas com a aplicação de Si para as plantas em situações geradoras de déficit hídrico, tais como em tomateiro (AL-AGHABARY et al., 2004), jujubeira (XIANG E ZENG, 2005) e plantas de arroz (CHEN et al., 2011).

A resistência estomática foi o fator determinante para as alterações das trocas gasosas quando analisado o efeito isolado do tratamento hídrico. A redução da abertura estomática nas plantas sob déficit hídrico reduziu a transpiração e a fotossíntese líquida, sendo esse comportamento também observado por Egilla et al. (2005) em plantas de hibisco, e Ming et al. (2012) em plantas de arroz. A redução da abertura estomática contribuiu ainda, para a elevação da concentração interna de carbono, possivelmente gerado pela atividade fotorrespiratória das plantas na condição de estresse hídrico. Um aumento similar na concentração de C_i com baixa g_s foi observado em outros trabalhos (ROUHI et al. 2007; SINGH et al. 2011).

Independentemente da irrigação, a aplicação de Si mostrou que a dose de 1,5 mg/ml foi a mais satisfatória, interferindo em todos os parâmetros, exceto, no C_i , que não foi influenciado. A maior abertura estomática indica claramente que as plantas com essa dose transpiraram mais, porém, com maior ganho na taxa fotossintética. Outros autores também observaram incremento na fotossíntese com a aplicação do Si, em tomate (ROMERO-ARANDA et al., 2006), cana de açúcar (MADEIROS et al., 2009), e em cacau (PINTO et al., 2012). Já a dose de 3,0 mg/mL reduziu a condutância estomática, que em consequência reduziu a transpiração e a fotossíntese, sugerindo que essa dose de Si pode ter criado uma camada muito espessa sobre os estômatos dificultando o processo difusivo da troca gasosa. Na literatura também tem sido descrito que maiores doses de Si promovem aumento da camada de cera epicuticular, como foi observado em trabalhos com café (AMARAL, 2005; BOTELHO et al., 2009) e soja (LIMA, 2006). De acordo com Botelho et al. (2009), essa camada espessa de cera cobre os estômatos, influenciando negativamente a fotossíntese, por dificultar as trocas gasosas.

Como observado, a análise separada da dose de 1,5 mg/mL conferiu as plantas maiores taxas de fotossíntese, condutância e transpiração, porém, sua análise interativa com a irrigação, mostrou que o seu efeito só foi observado nas plantas não irrigadas, sendo que a dose de 1,5 mg/ml de Si proporcionou às plantas sob déficit hídrico alívio dos danos da seca, apresentando melhores taxas para a fotossíntese, as eficiências do uso de água e de carboxilação. Outros autores do mesmo modo relataram o efeito benéfico sobre os parâmetros

fotossintéticos com a aplicação de Si em plantas sob condições de déficit hídrico, tais como, trigo (GONG et al., 2005), soja (SHEN et al., 2010), sorgo (AHMED et al., 2011) e arroz (MING et al., 2012). O efeito benéfico dessa dose de Si foi tamanho que proporcionou taxas de eficiência do uso da água igual a das plantas irrigadas nas mesmas condições.

O aumento na taxa de carboxilação parece ter sido efeito da elevação da taxa fotossintética, uma vez que as doses de Si analisadas separadamente não influenciaram na concentração interna de carbono das folhas de cacau. Esse aumento na taxa de carboxilação demonstra que a dose de 1,5 mg/mL de Si também contribuiu para a redução da fotorrespiração nessas plantas. Segundo Gong et al. (2005), nas folhas, a maior parte do Si permanece nas paredes exteriores das células epidérmicas em ambas as superfícies, contribuindo, assim, na redução da perda de água por transpiração estomática das folhas (AGARIE et al., 1998; SAVANT et al., 1999). No presente estudo, verifica-se que aplicação de 1,5 mg/mL de Si nas folhas promoveu uma suplementação externa de Si em suas superfícies e, com isso, maior eficiência das trocas gasosas. Entretanto, a dose de 3,0 mg/ml se mostrou excessiva, sendo prejudicial pelo aumento demasiado da resistência estomática das folhas, o que prejudica as trocas gasosas das plantas que estavam sob déficit hídrico.

A análise das trocas gasosas mostrou que as plantas não irrigadas apresentaram menor abertura estomática, o que era esperado uma menor concentração de carbono interno, porém, foi observado elevação da concentração de carbono interno, sugerindo que as plantas estavam fotorrespirando. Sabe-se que o processo fotorrespiratório é um importante removedor do excesso de energia, ATP e NADPH (GOVINDJEE, 1999), para proteger as folhas de fotoinibição (SINGH et al. 2011), e esse processo gera peróxido de hidrogênio que é prejudicial para as células (LUNA et al., 2005).

O produto final do fluxo de elétrons é o NADPH, que é consumido em uma das etapas do ciclo de Calvin-Benson, assim como o CO₂ absorvido. Como o suprimento de CO₂ foi prejudicado pela redução da abertura estomática o consumo de NADPH é reduzido, proporcionando, então, um acúmulo de NADPH e ferredoxina reduzida (Fdx-) no estroma e a faltar o receptor final de elétrons, que é o NADP⁺. Como as plantas continuam a receber luz, e o fluxo de elétrons continua a produzir Fdx-, esse elétron pode ser doado para o O₂ formando então o radical O₂- (KERBAUY, 2004), que é destruído pela enzima Superóxido Dismutase (SOD), e gerando peróxido de hidrogênio, que é o substrato das enzimas CAT, POD e APX, que possuem locais distintos de atuação.

A localização da CAT é quase restringida aos peroxissomos o que limita a sua capacidade para manter os teores de H₂O₂ baixos o suficiente em outros compartimentos

celulares, como nos cloroplastos (ASADA, 1992). Sendo assim, a maior atividade da CAT nas plantas sob déficit hídrico sem e com 3,0 mg/mL de Si demonstrou o teor elevado de substrato H_2O_2 nos peroxissomos, local de atividade desta enzima (NOCTOR et al., 2002). Isso corroborou a suposição de fotorrespiração, que promove a produção do peróxido de hidrogênio nos peroxissomos. A aplicação da dose de 1,5 mg/mL de Si nas plantas não irrigadas reduziu a atividade desta enzima, mostrando ser benéfico para as plantas, sugerindo ser capaz de amenizar a atividade fotorrespiratória da planta. Outros autores também observaram redução da atividade da CAT com a aplicação de Si em condições de estresse hídrico, tais como, Gong et al. (2005) em plantas de trigo e Shen et al. (2010) em plantas de soja. Nas plantas irrigadas, a dose de 3,0 mg/mL mostrou ser benéfica reduzindo a atividade da CAT, possivelmente devido à redução do substrato da enzima.

A APX é responsável pela eliminação do poder tóxico do H_2O_2 , no cloroplasto e citosol (ASADA, 1992), enquanto as peroxidases (POD) encontram-se presentes em quase todos os compartimentos dos vegetais (BAPTISTA, 2009). Análise das enzimas APX e POD mostra que suas atividades estão altamente relacionadas, suas respostas são antagônicas, demonstrando que quando atividade de uma está alta em determinado tratamento a da outra está baixa, ou vice-versa. Nas plantas não irrigadas sem Si, a enzima POD parece ser o principal meio de defesa, enquanto que nas plantas irrigadas seria a APX. Com a aplicação de 1,5 mg/mL de Si esses papéis se invertem, sendo a APX a principal enzima de defesa contra o peróxido das plantas sob déficit hídrico, e a POD das plantas irrigadas. Já a dose de 3,0 mg/mL de Si também se mostrou benéfica para as plantas sob déficit hídrico estimulando a APX, porém, de modo inferior a dose de 1,5 mg/mL de Si, ainda nas plantas irrigadas a dose de 3,0 mg/mL de Si reduziu a atividade da POD, enquanto que para a APX não diferiu estatisticamente da dose de 1,5 mg/mL de Si.

A enzima PPO tem sido apresentada como um dissipador da energia de luz adicional não utilizada na fotoquímica (BIEHLER e FOCK, 1996). Assim, é esperado que níveis elevados de PPO possam aumentar a tolerância ao estresse, reduzindo os danos fotooxidativos. No presente estudo, plantas sob déficit hídrico apresentaram baixa atividade da PPO nas folhas, corroborando o encontrado em outros trabalhos, tais como, feijão (DASH e PANDA, 2001) e manjerição (BARBIERI et al. 2012). Contudo, a aplicação de Si na dose de 1,5 mg/mL elevou a atividade da PPO nas plantas sob seca, favorecendo a tolerância dessas plantas em condições de déficit hídrico, fato reforçado pelo melhor comportamento fotoquímico e atividade fotossintética.

Os dados encontrados na literatura para estas enzimas, pelo efeito dos diferentes tratamentos aqui impostos, são grandemente variados entre espécies e até mesmo entre cultivares da mesma espécie. Segundo Reddy et al. (2004), o nível de resposta depende da espécie, do desenvolvimento e estado metabólico da planta, assim como a duração e intensidade do estresse hídrico. Muitas situações de estresse causam um aumento da atividade total antioxidante foliar (PASTORI et al., 2000), mas, pouco se conhece sobre o controle da atividade de coordenação e de expressão das diferentes enzimas antioxidantes nas células de plantas que são submetidos a estresse de seca.

Os resultados mostraram que o Si interferiu na densidade estomática de folhas totalmente expandidas de *T. cacao*, emitidas após os tratamentos, uma vez que, o número de estômatos por mm^2 foi maior nas plantas sob déficit hídrico, com as doses de 0,0 e 1,5 mg/mL de Si e menor naquelas tratadas com dose de Si de 3,0 mg/mL, nesse último caso, igualando-se com as plantas irrigadas. Nessas plantas, a redução da densidade estomática interferiu na eficiência de regulação do transporte de água, resultando em menor eficiência das trocas gasosas, com menor taxa fotossintética e eficiência intrínseca do uso da água. Maior densidade de estômatos é uma forma de adaptação à seca, porque permite que as plantas regulem o transporte de água e transpiração de forma mais eficaz (LUKOVIĆ et al., 2009), o que indica maior adaptação das plantas não irrigadas com 0 e 1,5 mg/mL de Si.

A formação dos estômatos ocorre ao longo do desenvolvimento foliar, de modo que várias gerações de estômatos podem desenvolver até completa expansão da folha (NADEAU, 2002), por meio de informações detectadas por folhas maduras e retransmitidas para as folhas em desenvolvimento (BROWNLEE, 2001; LAKE et al., 2001). Estudos têm mostrado que fatores ambientais como a luz regulam o desenvolvimento de estômatos em folhas jovens através de um mecanismo de detecção dos níveis destes fatores em folhas maduras de uma mesma planta (NADEAU, 2002). Os espectros de refletância e transmitância da luz são influenciados não apenas pelas superfícies lisas ou rugosas das folhas, mas também, pela composição química da cutícula e parede celular externa, bem como, dos seus graus de espessamento (DA LUZ, 2007). Segundo Da Luz (2006), a presença de uma camada de sílica sobre as superfícies foliares é capaz de alterar o espectro de emissividade da luz. Assim, doses mais elevadas de Si (3,0 mg/mL) sugerem a presença de uma camada mais espessa sobre as superfícies foliares, o que pode afetar a transmitância da luz e conseqüentemente a formação de estômatos e sua densidade nas folhas. Plantas com folhas maduras sob luz incidente reduzida tendem a diminuir sua densidade estomática (BROWNLEE, 2001; LAKE et al., 2001).

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

– A dose de 1,5 mg/mL de SiO₂ aplicada sobre as folhas de *T. cacao* cultivados em vaso e em condição de déficit hídrico foi capaz de amenizar os efeitos negativos provocados pela suspensão total da rega por vinte dias às plantas, apresentando grande potencial para o uso agrônômico.

– A aplicação foliar da dose 3 mg/mL de SiO₂ se mostrou excessiva, interferindo de forma menos expressiva em relação a dose de 1,5 mg/mL de Si, revelando-se, por vezes, prejudicial às plantas na condição de déficit hídrico.

REFERÊNCIAS

- AGARIE, S.; HANAOKA, N.; UENO, O.; MIYAZAKI, A.; KUBOTA, F.; AGTA, W.; KAUFMAN, P. B. Effects of silicon on tolerance to water déficit and heat stress in Rice plants (*Oryza sativa* L.), monitored by electrolyte leakage. **Plant production Science**, v.1, p. 96-103. 1998.
- AHMED M.; HASSEN F.; KHURSHID Y. Does silicon and irrigation have impact on drought tolerance mechanism of sorghum? **Agricultural Water Management**, v.98, n.12, p. 1808-1812, 2011.
- AL-AGHABARY, K.; ZHU, Z.; SHI, Q. H. Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress. **J. Plant Nutr**, v.27, n.12, p. 2101-2115, 2004.
- ALEXIEVA V.; SERGIEV I.; MAPELLI S.; KARANOV E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stresses markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v.24, n.12, p. 1337-1344, 2001.
- ALLEN R. D. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. **Plant Physiology**, v.107, p. 1049-1054, 1995.
- ALMEIDA A. A. F.; VALLE R. R. Ecophysiology of the cacao tree. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, p. 425-448. 2007.
- ALMEIDA A. A. F.; BRITO R. C. T.; AGUILAR M. A. G.; VALLE R. R. Water relations aspects of *Theobroma cacao* L. clones. **Agrotrópica**, v.14, p. 35-44, 2002.
- ALSCHER R. G.; ERTURK N.; HEATH L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Jornal of Experimental Botany**, v.53, n.372, p. 1331-1341, 2002.
- AMARAL, D. R. **Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por eliciadores abióticos e extratos vegetais**. 2005. 96 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- AMARAL, D. R.; RESENDE, M. L. V.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; BOREL, J. C.; MACLEOD, R. E. O.; PÁDUA, M. A. Silicato de potássio na proteção do cafeeiro contra *Cercospora coffeicola*. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.6, p. 425-431, 2008.
- ARNON, D. I. Copper enzimas in isolated cloroplasts Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**. v.24, n.1, p. 1-15, 1949.
- ASADA K. The water-water cycle in chloroplasts scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, n.50, p. 601-639, 1999.
- ASADA, K. Ascorbato peroxidase – a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, n.85, p. 235-241, 1992.

ASHRAF M.; AKRAM N.A.; AL-QURAINY F.; FOOLAD M. R. Drought Tolerance: Roles of Organic Osmolytes, Growth Regulators, and Mineral Nutrients, In: **Donald L. Sparks, Advances in Agronomy**, Burlington: Academic Press, 2011, v.111, p. 249-296. cap. 5.

ÁVILA, F. W.; BALIZA, D. P.; FAQUIN, V.; ARAÚJO, J. L.; RAMOS, S. J. Interação entre silício e nitrogênio em arroz cultivado sob solução nutritiva. **Revista Ciência Agronômica**, v.41, p.184-190, 2010.

BAE, H.; KIM S-H.; KIM M. S.; SICHER R. C.; LARY D.; STREM M. D.; NATARAJAN S.; BAILEY B. A. The drought response of *Theobroma cacao* (cacao) and the regulation of genes involved in polyamine biosynthesis by drought and other stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.46, n.2, p. 174-188, 2008.

BAJJI, M.; KINET, J-M.; LUTTS, S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell embrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. **Plant Growth Regulation**, p. 1-10, 2001.

BAPTISTA, S. M. P. **Avaliação da resposta ao estresse oxidativo induzido por cádmio e cobre em plantas de tabaco transformadas e não transformadas**. 2009. 53 f. Dissertação (Mestre) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

BARBIERI G.; VALLONE S.; ORSINI F.; PARADISO R.; PASCALE S.; ZAKHAROV F. N.; MAGGIO A. Stomatal density and metabolic determinants mediate salt stress adaptation and water use efficiency in basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Plant Physiology**, v.169, n.17, p. 1737-1746, 2012.

BARBOSA FILHO, M. P.; SNYDER, G. H.; FAGERA, N. K.; DANNOFF, L. E.; SILVA, O. F. Silicato de cálcio como fonte de silício para o arroz de sequeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 325-330, 2001.

BIEHLER K.; FOCK H. Evidence for the contribution of the Mehlerperoxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. **Plant Physiology**, v.112, p. 265-272, 1996.

BLAKE, G. R. Bulk density. In: BLACK, C. A.; EVANS, D. D.; WHITE, J. L.; ENSMINGER, L. E.; CLARK, F. E. **Methods of soil analysis**. Madison: SSSA, 1965. p. 374-390.

BOHNERT, H. J.; JENSEN, R. G. Strategies for engineering water stress tolerance in plants. **Trends in Biotechnology**, v. 14, p. 89-97, 1996.

BOTELHO SANTOS, D. M.; POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A.; CARVALHO, J.G.; BOTELHO, C. E.; SOUZA, P. E. Intensidade da cercosporiose em mudas de cafeeiro em função de fontes e doses de silício. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.582-588. 2005.

BOTELHO D. M. S.; POZZA E. A.; ALVES E.; NETO F. A.; BARBOSA J. B.; CASTRO D. M. Aspectos anatômicos e fisiológicos de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) com cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cook.) adubadas com ácido silícico. **Coffee Science**, v.4, p. 93-99, 2009.

- BRAGA, F. T.; NUNES, C. F.; FAVERO, A. C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. G.; CASTRO, E. M. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.128-132, 2009.
- BRAY, E. A Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**, v.2, n.2, p. 48-54, 1997.
- BROWNLEE, C. The long and the short of stomatal density signals. **Trends Plant Science**, v.6, p. 441-442, 2001.
- BUCK, G. B.; KORNDÖRFER, G. H.; NOLLA, A.; COELHO, L. Potassium Silicate as Foliar Spray and Rice Blast Control. **Journal of Plant Nutrition**, v.31, p.231-237. 2008.
- BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; SANTOS, H.P.; LIMA, D.U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes: estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 137-162, 2000.
- CAKMAK I.; STRBOE D.; MARSCHNER H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, v.44, p. 127-132, 1993.
- CAÑAL M. J.; TAMÉS R. S.; FERNÁNDEZ B. Peroxidase and polyphenoloxidase activities in *Cyperus esculentus* leaves following glyphosate applications. **Plant Physiology**, v.74, p. 125-130, 1988.
- CHAVES, M. M.; PEREIRA, J.S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M.L.; RICARDO, C.P.P.; OSORIO, M.L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. **Annals of Botany**, v. 89, p. 907–916, 2002.
- CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v.30, p. 239-264, 2003.
- CHEN W.; YAO X.; CAI K.; CHEN J. Silicon alleviates drought stress of rice plants by improving plant water status, photosynthesis and mineral nutrient absorption. **Biological Trace Element Research**, v.142, n.1, p 67-76, 2011.
- CHIBA, Y.; MITANI, N.; YAMAJI, N.; MA, J. F. HvLsi1 is a silicon influx transporter in barley. **The Plant Journal**, v.57, p. 810-818, 2009.
- CLIFFORD, S. C.; ARNDT, S. K.; POPP, M.; JONES, H. G. Mucilages and polysaccharides in *Ziziphus* species (Rhamnaceae): localization, composition and physiological roles during drought-stress. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p. 131-138, 2002.
- CORNIC G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture not by affecting ATP synthesis. **Trends in Plant Science**, v.5, p. 187-188, 2000.
- COSTA, L. C. B.; ALMEIDA, A. A. F.; VALLE, R. R. Crescimento, teor de clorofila e estrutura anatômica em plântulas de *Theobroma cacao* submetidas a diferentes irradiâncias e doses de nitrogênio. **Agrotrópica**, v.10, n.1, p.21-30, 1998.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. N. York, Columbia Univ. Press., 1981, 1262 p.

CRUSCIOL, C. A. C.; PULZ, A. L.; LEMOS, L. B.; SORATTO, R. P.; LIMA, G. P. P. Effects of silicon and drought stress on tuber yield and leaf biochemical characteristics in potato. **Crop Science**, v.49, p.949-954, 2009.

CUENCA, M. A. G.; NAZÁRIO, C. C. **Importância Econômica e Evolução da Cultura do Cacao no Brasil e na Região dos Tabuleiros Costeiros da Bahia entre 1990 e 2002**. 25p. Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros. n.72. 2004.

DADALTO, G.G. & FULLIN, E.A. **Manual de recomendação de calagem e adubação pra o estado do Espírito Santo**. 4ª aproximação. Vitória, SEEA/INCAPER, 2001. 266p.

DA LUZ, B. R. Attenuated total reflectance spectroscopy of plant leaves: A tool for ecological and botanical studies. **New Phytologist**. v. 172, p. 305-318, 2006.

DA LUZ, B. R., 13., 2007, Florianópolis. **Interpretação das características espectrais de emissividade de minerais e plantas no infravermelho termal (2,5 a 14 µm) por comparação com refletância total atenuada**: Simpósio brasileiro de sensoriamento remoto. Florianópolis: Inpe, 2007. 7 p. Disponível em: <<http://marte.dpi.inpe.br/col/dpi.inpe.br/sbsr@80/2006/11.15.20.30/doc/6465-6472.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

DASH M.; PANDA S. K. Salt stress induced changes in growth and enzyme activities in germinating Phaseolus mungo seeds. **Biologia Plantarum**, n.44, v.4, p. 587-589, 2001.

DAYANANDAM, P.; KAUFMAN, P. B.; FRAKIN, C. I. Detection of silica in plants. **American Journal of Botany**, v. 70, p.1079-1084. 1983.

DEREN, C. W.; DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. H.; MARTIN, F. G. Silicon concentration, disease response, and yield components of rice genotypes grown on flooded organic histosols. **Crop Science**, v.34, n.2, p.733-737, 1994.

DIAS, L.A.S. **Melhoramento genético do cacauero**. Viçosa: Funape, 2001. 578p.

EGILLA, J. N.; DAVIES F. T.; AND BOUTTON T. W. Drought estresse influences leaf water content, photosynthesis, and water-use efficiency of *Hibiscus rosa-sinensis* at three potassium concentrations. **Photosynthetica**, v.43, p. 135–140, 2005.

EMBRAPA. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS. Documentos 1, 1997. 212 p.

ENGELBRECHT B. M. J.; COMITA L. S.; CONDIT R.; KURSAR T. A.; TYREE M. T.; TURNER B. L.; et al. Drought sensitivity shapes species distribution patterns in tropical forests. **Nature**, v.447, p. 80-2, 2007.

EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v.50, p. 641-664, 1999.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Editora Planta, 2006. 403p

EPSTEIN E. The anomaly of silicon in plant biology. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.91, n.1, p. 11-17, 1994.

EVANS J. R.; VON CAEMMERER S.; SETCHELL B. A.; HUDSON G. S. The relationship between CO₂ transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of Rubisco. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.21, n.4, p. 475-495, 1994.

FAHN, A. **Plant Anatomy**. 3^a ed. Pergamon Press. 544p, 1982.

FAOSTAT. Food and agriculture organization of the united nations. **Statistical Databases**. Agriculture. 2011. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/index.html#VISUALIZE>>. Acesso em: 04 fev. 2013.

FOYER C. H.; NOCTOR G. Oxygen processing in photosynthesis regulation and signaling. **New Phytologist**, v.146, p. 359–388, 2000.

FOYER C.H; LELANDAIS M.; KUNERT K. J. Photooxidative estresse in plants. **Plant Physiology**, v.92, p. 696–717, 1994.

FU J., HUANG B. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.45, n.2, p. 105-114, 2001.

GAO X.; ZOU C.; WANG L.; ZHANG F. Silicon decreases transpiration rate and conductance from stomata of maize plants. **Journal of Plant Nutrition**, v.29, p.1637–1647, 2006.

GONG H. J.; CHEN K. M.; ZHAO Z. G.; CHEN G. C.; ZHOU W. J. Effects of silicon on defense of wheat against oxidative stress under drought at different developmental stages. **Plant Biology**, v.52, p. 592–596, 2008.

GONG, H.; ZHU, X.; CHEN, K.; WANG, S. & ZHANG, C. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. **Plant Science**, v.169, p.313-321, 2005.

GOVINDJEE. On the requirement of minimum number of four versus eight quanta of light for the evolution of one molecule of oxygen in photosynthesis: a historical note. **Photosynthesis Research**, v.59, p. 249–254, 1999.

GREGORY, M. e BAAS, P. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. **Israel Journal of Botany**, v.38, p. 125-174. 1989.

GUHA A.; SENGUPTA D.; RASINENI G. K.; REDDY A. R. An integrated diagnostic approach to understand drought tolerance in mulberry (*Morus indica* L.). **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v.205, n.2, p. 144-151, 2010.

HAMDY, A.; RAGAB, R.; SCARASCIA-MUGNOZZA, E. Coping with water scarcity: water saving and increasing water productivity. **Irrigation and Drainage**, v.52, p. 3–20, 2003.

HATTORI T.; INANAGA S.; TANIMOTO E.; LUX A.; LUXOVA M.; SUGIMOTO Y. Silicon-induced changes in viscoelastic properties of sorghum root cell walls. **Plant and Cell Physiology**, v.44, p. 743–749, 2005.

HATTORI, T.; SONOBE K.; INANAGA S.; AN P.; TSUJI W.; ARAKI H.; ENEJI E. E.; MORITA S. Short term stomatal responses to light intensity changes and osmotic stress in sorghum seedlings raised with and without silicon. **Environmental and Experimental Botany**, v.60, p. 177–182, 2007.

HATTORI, T.; SONOBE, K.; ARAKI, H.; INANAGA, S.; AN, P.; MORITA, S. Silicon application by sorghum through the alleviation of estresse-induced increase in hydraulic resistance. **Journal of Plant Nutrition**, v.31, n.8, p. 1482-1495, 2008.

HAVIR E. A.; MCHALE N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v.84, p. 450–455, 1987.

HAVIR, E.; MCHALE, N. A. A regulation of catalase activity in leaves of *Nicotiana sylvestris* by High CO₂. **Plant Physiology**, v.89, n.3, p.952-957, 1989.

INCAPER. Governo do Estado do Espírito Santo. **Programa de assistência técnica e extensão rural - PROATER 2011 / 2013** - Linhares: planejamento e programação de ações. Disponível em: <<http://www.incaper.es.gov.br/proater/municipios/Nordeste/Linhares.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2013.

INCAPER (Vitória- Es). Dcm-incaper (Ed.). **A vassoura-de-bruxa no estado do Espírito Santo**: Uma ameaça para a cacauicultura. ISSN: 1519-2059. Disponível em: <http://www.incaper.es.gov.br/servicos/images/Vassoura_de_brujadoCacaueiro.pdf>. Acesso em: 21 set. 2007.

IPCC. **Climate change 2007: the physical science basis, vol. 1009**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2007.

ITURBE-ORMAETXE I.; ESCUREDO P. R.; ARRESE-IGOR C.; BECANA M. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. **Plant Physiology**, v.116, n.1, p. 173-181, 1998.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Co.,1940.

JONES, L.H.P. & HANDRECK, K.A. Studies of silica in the oat plants. III - Uptake of silica from soils by the plant. **Plant and Soil**, 23:79-96, 1965.

JONES, H. G.; CORLETT, J. E. Current topics in drought physiology. **Journal of Agricultural Science**, v. 119, p. 291–296, 1992.

JORDAAN, A.; KRUGER, H. Structure of xerophytic plants from Southern Africa leaf anatomy of *Antizoma miersiana* and *Diospyros ramulosa*. **Israel Journal of Botany**, v.41, n.2, p.57-65, 1992.

KARABA A.; DIXIT S.; GRECO R.; AHARONI A.; TRIJATMIKO K. R.; MARSCH-MARTINEZ N.; KRISHNAN A.; NATARAJA K. N.; UDAYAKUMAR M.; PEREIRA A. Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an Arabidopsis drought and salt tolerance gene. **PNAS**, v.104, p. 15270–15275, 2007.

KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 452p.

KLAR, A.E. **A água no sistema solo-planta-atmosfera**. São Paulo: Nobel, 1984. 408p.

KORNDÖRFER, G. H. **Uso do silício na agricultura**. Disponível em: <<http://www.dpv24.iciag.ufu.br/Silicio/Efeitos/Efeitos.htm>>. Acesso em: 24 jun. 2009.

KORNDÖRFER, G. H.; GASHO, G. J. Avaliação de fontes de silício para o arroz. In: Congresso nacional de arroz irrigado, 1999, Pelotas. **Anais...** Pelotas, 1999. p. 313-316.

KORNDÖRFER, G. H.; PEREIRA, H. S.; NOLLA, A. **Análise de Silício: solo, planta e fertilizante**. Uberlândia, (Boletim Técnico n. 2), 2004.

KUWABARA T.; KATOH Y. Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. **Plant Cell Physiology**, v.40, n.10, p. 1029–1035, 1999.

LADJAL M.; EPRON D.; DUCREY M. Effects of drought preconditioning on thermo tolerance of photosystem II and susceptibility of photosynthesis to heat stress in cedar seedlings. **Tree Physiology**, v.20, p. 1235–1241, 2000.

LAKE, J. A.; QUICK, W. P.; BEERLING, D. J.; WOODWARD, F. I. Plant development: Signals from mature to new leaves. **Nature**, v.411, p. 154, 2001.

LAWLOR D. W. Limitation to photosynthesis in water stressed leaves: stomata versus metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany**, v.89, p 1-15, 2002.

LAWLOR D.W.; CORNIC G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell e Environment**, v.25, p. 275–294, 2002.

LAWSON T.; OXBOROUGH K.; MORISON J. I. L.; BAKER N. R. The responses of guard and mesophyll cell photosynthesis to CO₂, O₂, light, and water stress in a range of species are similar. **Journal of Experimental Botany**, v.54, p. 1743–1752, 2003.

LIANG, Y. C.; CHEN, Q.; LIU, Q.; ZHANG, W. H.; DING, R. X. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Plant Physiology**, v.160, p. 1157-1164, 2003.

LIANG Y. C.; SUN W. C.; ROMHELD V. Effects of foliar- and root-applied silicon on the enhancement of induced resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus*. **Plant Pathology**, v.54, p. 678–685, 2005.

LICHTENTHALER H.K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v.148, p. 350-382, 1987.

LIMA A. L. S.; DAMATTA F. M.; PINHEIRO H. A.; TOTOLA M. R.; LOUREIRO M. E. Respostas fotoquímicas e estresse oxidativo em dois clones de *Coffea canephora* sob condições de déficit hídrico. **Environmental and Experimental Botany**, v.47, p. 239-247, 2002.

LIMA, L. M. de. **Manejo da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow) com fungicidas e silício**. 2006. 81 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, p. 528, 2002.

LUKOVIĆ, J., MAKSIMOVIĆ, I., ZORIC, L., NAGL, N., PERČIĆ, M., POLIC, D., PUTNIK-DELIĆ, M. Histological characteristics of sugar beet leaves potentially linked to drought tolerance. **Industrial Crops and Products**, v.30, n.2, p 281-286, 2009.

LUNA C., PASTORI G.; DRISCOLL S.; GROTEN K.; BERNARD S.; FOYER C. Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. **Journal of Experimental Botany**, v.56, p. 417-423, 2005.

MA, J. F.; MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Silicon as a beneficial element for crop plants. In: Silicon in Agriculture. In: Datnoff, L.E.; Snyder, G. H.; Korndorfer, G. H. (eds). **Silicon in agriculture**, Amsterdam, Elsevier, p. 17-39, 2001.

MA J. F.; TAMAI K.; YAMAJI N.; MITANI N.; KONISHI S.; KATSUHARA M.; ISHIGURO M.; MURATA Y.; YANO M. A silicon transporter in rice. **Nature**, v.440, p. 688–691, 2006.

MA, J. F.; YAMAJI N. Silicon uptake and accumulation in higher plants. **Trends in Plant Science**. v.11, p. 392–397, 2006.

MACHADO, E. C.; SCHMIDT, P. T., MEDINA, C. L.. Photosynthetic responses of three citrus species to environmental factors. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 1161-1170, 2005.

MADEIROS L. B., VIEIRA A. O., AQUINO B. F. Influência da escória siderúrgica sobre trocas gasosas e produção de biomassa da cana-de-açúcar. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, v. 6, p.121-129, 2009.

MAPA. Secretaria de Política Agrícola. **Portaria 433/2011 (D.O.U. 21/11/2011)**. Disponível em:<<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAt oPortalMapa&chave=73082341>>. Acesso em: 25 jan. 2013.

- MARQUES, S.C. et al. **Cultivo do Cacauero**. CEPEC/CEPLAC: NEPLI, 48p. 2006.
- MARTINI, M. H., LENCI, C. G. & TAVARES, D. Q. Mucilage pockets in cotyledon tissue of *Theobroma speciosum*. **Acta Microscopica**, v.12, p. 65-69, 2003.
- MEDRANO H.; PARRY M. A.; SOCIAS X.; LAWLOR D. W. Long term water estresse inactivates Rubisco in subterranean clover. **Annals of Applied Biology**, v.131, p. 491–501, 1997.
- MEHLHORN H.; LELANDAIS M.; KORTH H. G.; FOYER C. H. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. **FEBS Letter**, v.378, p. 203–206, 1996.
- MEHTA, P.; JAJOO, A.; MATHUR, S.; BHARTI, S. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt estresse on Photosystem II in wheat leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p.16-20, 2010.
- MENDES F. A. T. CEPLAC. **O estado do Pará e a produção brasileira de cacau**. 2011. Disponível em: <<http://www.ceplacpa.gov.br/site/?p=3009>>. Acesso em: 04 fev. 2013.
- MENEZES, J. A. S.; CARMO-NETO, D. **A modernização do agribusiness cacau**. 2ed. Campinas, Fundação Cargil, 1993. 180p.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. Clarendon Press, Oxford, 2ª edição, v.1, p. 724, 1979.
- MEYER S.; GENTY B. Heterogenous inhibition of photosynthesis over the leaf surface of *Rosa rubinosa* L. during water stress and abscisic acid treatment induction of a metabolic component by limitation of CO₂ diffusion. **Planta**, v.210, p. 126–131, 1999.
- MING, D. F., PEI, Z. F., NAEEM, M. S., GONG, H. J. AND ZHOU, W. J. Silicon alleviates PEG-induced water-deficit stresses in upland rice seedlings by enhancing osmotic adjustment. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 198, p. 14–26, 2012.
- MITANI N.; MA J. F. Uptake system of silicon in different plant species. **Journal of Experimental Botany**, v.56, p. 1255-1261, 2005.
- MITANI, N.; YAMAJI, N.; MA, J. F. Identification of maize silicon influx transporters. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 01, p. 5-12, 2009.
- MOOLEEGHAR, V.; MAHARAJ, W. Mayan cacao for the ICGT. **CRU Newsletter**, v.2, p. 4-5, 1995.
- MOTAMAYOR JC, RISTERUCCI AM, LOPEZ PA, ORTIZ CF, MORENO A, LANAUD C. Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the mayas. **Heredity**, v.89, n.5, p. 380-6, 2002.
- NADEAU, Jeanette A.; SACK, Fred D. **Stomatal Development in Arabidopsis: The Arabidopsis Book**. Rockville: The American Society of Plant Biologists, 2002. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0066>>. Acesso em: 05 fev. 2013.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant Cell Physiology**, v.22, p. 867-880, 1981.

NAKAYAMA, L. H. I.; SOARES, M. K. M.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B. Contribuição ao estudo anatômico da folha e do caule do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.). **Scientia Agricola**. [online], vol.53, n.1, p. 73-73, 1996.

NOCTOR G, FOYER C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.49, p. 249–279, 1998.

NOCTOR G.; VELJOVIC-JOVANOVIC S.; FOYER C. Drought and oxidative load in wheat leaves. A predominant role for photorespiration? **Annals of Botany**, v.89, p. 841-850, 2002.

NOGUEIRA, R.J.M.C.; MORAES, J.A.P.V.; BURITY, H.A.; NETO, E.B. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relação hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p.66-74, 2001.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, v.59, n.2, p. 368-373, 1964.

PARIDA A. K.; DAS A.; MOHANTY B. P. Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p. 531–542, 2004.

PASTORI G.; MULLINEAUX P.; FOYER C. H. Post transcriptional regulation prevents accumulation of glutathione reductase protein and activity in the bundle sheath cells of maize. Implication on the sensitivity of maize to low temperatures. **Plant Physiology**, v.122, p. 667–675, 2000.

PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. S. Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought-resistant maize strain. **Plant Cell Physiology**, v.33, n.7, p.957-961, 1992.

PEI, Z. F.; MING D. F.; LIU D.; WAN G. L.; GENG X. X.; GONG H. J.; ZHOU W. J.. Silicon improves the tolerance to water deficit stress induced by polyethylene glycol in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. **Journal of Plant Growth Regulation**. v.29, p. 106–115, 2010.

PELTZER D., DREYER E., POLLE A.. Temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p. 141–150, 2002.

PIMENTEL, R. R.; MACHADO, S. R. & ROCHA, J. F. Estruturas secretoras de *Pavonia alnifolia* (Malvaceae), uma espécie ameaçada de extinção. **Rodriguésia**, v.62, n2, p. 253-262, 2011.

PINTO D. G., AGUILAR M. A G., SOUZA C. A. S., SILVA D. M. SIQUEIRA P. R., CAO J. R., ZANETTI L. V. Alterações fisiológicas após aplicação de silício em cacau e sua influência na preferência por pulgões. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 3, June 2012 .

PINTO, Diego Guimarães. **Fotossíntese, crescimento e composição química em plantas de *Theobroma cacao* L. submetidas a diferentes concentrações de silicato de potássio e sua interação com insetos-praga.** 2011. 84 f. Dissertação (Mestrado Biologia Vegetal) - Curso de Biologia Vegetal, Ufes, Vitória - Es, 2011.

PIO CORREA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Imprensa Nacional. Rio de Janeiro. 1926.

PREZOTTI L. C., GOMES J. A., DADALTO GG & OLIVEIRA J. A. **Manual de Recomendação de calagem e adubação para o Estado do Espírito Santo.** 5º aproximação. Vitória, SEEA/Incaper/Cedagro, 2007. 305p.

REDDY A. R., CHAITANYA K. V., VIVEKANANDAN M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v.161, n.11, p. 1189-120, 2004.

ROCHA, J. F.; PIMENTEL, R. R.; MACHADO, S. R. Estruturas secretoras de mucilagem em *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae): distribuição, caracterização morfoanatômica e histoquímica. **Acta Botanica Brasilica**, v.25, n.4, 2011.

ROMERO-ARANDA M. R., JURADO O., CUARTERO J. Silicon alleviates the deleterious salt effect on tomato plant growth by improving plant water status. **Journal Plant Physiology**, 163:847–855, 2006.

ROUHI V.; SAMSON R.; LEMEUR R.; DAMME P. V.; Photosynthetic gas exchange characteristics in three different almond species during drought stress and subsequent recovery. **Environmental and Experimental Botany**, v.59, n.2, p.117-29, 2007.

SACK L., HOLBROOK N.M.. Leaf hydraulics. **Annual Review of Plant Biology**, v.57, p. 361–381, 2006.

SANGSTER A. G., HODSON M. J., TUBB H. J. Silicon deposition in higher plants. L.E. Datnoff, G.H. Snyder, G.H. Korndörfer (Eds.), **Silicon in Agriculture**, Elsevier, Amsterdam, p. 85–113, 2001.

SANGSTER, A. G.; HODSON, M. J.; PARRY, D.W. Silicon deposition and anatomical studies in the inflorescence bracts of four *Phalaris* species with their possible relevance to carcinogenesis. **New Phytologist**, v. 93, p. 105 – 122, 2001.

SAVANT N. K.; KORNDÖRFER G. H.; DATNOFF L. E.; SNYDER G. H. Silicon nutrition and sugarcane production: a review. **Journal of Plant Nutrition**, v.22, p 1853-1903, 1999.

SAVANT, N. K.; SNYDER, G. H.; DATNOFF, L. E. Silicon Management and sustainable rice production. **Advances in Agronomy**, v. 58, p. 151-199, 1997.

SCHOLLANDER, R. F.; HAMELL, H. T.; BRADSTREET, E. D.; HEMMINGSEN, E. A. Sap pressure in vascular plants. **Science**, v.148, p.339-346, 1965.

SHEN X.; ZHOU Y.; DUAN L.; LI Z.; ENEJI A. E.; LI J. Silicon effects on photosynthesis and antioxidant parameters of soybean seedlings under drought and ultraviolet-B radiation. **Journal of Plant Physiology**, v.167, n.15, p. 1248-1252, 2010.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water estresse response. **Plant Physiology**, v. 115, p. 327-334, 1997.

SINGH S. K.; RAJA REDDY K.; Regulation of photosynthesis, fluorescence, stomatal conductance and water-use efficiency of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] walp.) under drought. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.105, n.1, p. 40-50, 2011.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144–158, 1965.

SMIRNOFF N. O papel do oxigênio ativo na resposta ao déficit hídrico e dessecação. **New Phytology**, v.125, p 27-58, 1993.

SONOBE K.; HATTORI T.; AN P.; TSUJI W.; ENEJI A. E.; KOBAYASHI S.; KAWAMURA Y.; TANAKA K.; INANAGA S. Effect of silicon application on sorghum root responses to water stress. **Journal of Plant Nutrition**, v.34, p. 71–82, 2011.

SONOBE, K.; HATTORI T.; AN P.; TSUJI W.; ENEJI E.; TANAKA K.; INANAGA S. Diurnal variations in photosynthesis, stomatal conductance and leaf water relation in sorghum grown with or without silicon under water stress. **Journal of Plant Nutrition**. v. 32, p. 433–442, 2009.

SOUNIGO, O., LACHENAUD, P., BASTIDE, P., CILAS, C., N'GORAN, J., LANAUD, C. Assessment of the value of doubled haploids as progenitors in cocoa (*Theobroma cacao* L.) breeding. **Journal of applied genetics**, v. 44, n. 3, 2003.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

STRASSER, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A.. Analysis of the fluorescence transient In: Papageorgiou, G. C.; Govindjee (eds.), Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis. **Advances in Photosynthesis and Respiration Series**. Springer: Dordrecht, p. 321-362, 2004.

SUSILUOTO, S., BERNINGER, F. Interactions between morphological and physiological drought responses in *Eucalyptus microtheca*. **Silva Fennica**, v.41, p. 221–233, 2007.

TAKAHASHI, E.; MA, J. F.; MIYAKE, Y. The possibility of silicon as an essential element for higher plants. **Comments on Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, p. 2-122. 1990.

TEZARA W.; MITCHELL V. J.; DRISCOLL S. D.; LAWLOR D. W. Water estresse inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. **Nature**, v.401, p. 914–917, 1999.

TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. **In Vivo Assessment of Estresse Impact on Plants' Vitality: Applications in Detecting and Evaluating the Beneficial Role of Mycorrhization on Host Plants.** In: Varma A (ed). *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*, 3rd edition, Springer, p. 679-703, 2008.

TURNER, N.C. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. **Plant and Soil**, v.58, p.339-366, 1981.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v.144, p. 307–313, 1994.

WHITTAKER, A.; MARTINELLI, T.; FARRANT, J.M.; BOCHICCHIO, A.; VAZZANA, C. Sucrose phosphate synthase activity and the co-ordination of carbon partitioning during sucrose and amino acid accumulation in desiccation-tolerant leaf material of the C4 resurrection plant *Sporobolus stapfianus* during dehydration. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 3775-3787, 2007.

XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J. K. Cell signaling during cold, drought and salt estresse. **The Plant Cell**, v. 14, p. 165-183, 2002.

XIANG X. C.; ZENG X. X. Effects of Silicon on Chlorophyll Fluorescence and Gas Exchange of *Zizyphus jujuba* cv.Jinsi-xiaozao Under Salt Stress. **Journal of Nanjing Forestry University**. v.29, n.1, p. 25-28, 2005.

YOSHIDA, S.; OHNISHI, Y.; KITAGISHI, K. Chemical forms, mobility and deposition of silicon in rice plant. **Soil Science Plant Nutrition**, v. 8, p. 15-21, 1962.

ZANÃO JÚNIOR, L. A.; FONTES, R. L. F.; ÁVILA, V. T. Aplicação do silício para aumentar a resistência do arroz à mancha-parda. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p. 203-206, 2009.

ZHU, X., GONG, H., CHEN, G., WANG, S., ZHANG. Silicon alleviates salt estresse and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, 167 (3), p. 527-533, 2004.

ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Phytochemical and physiological changes in the leaves of St John's wort plants under a water stress condition. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 109-116, 2007.

ZUBEK, S.; TURNAU, K.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. Response of endangered plant species to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. **Mycorrhiza**, v. 19, p. 113–123, 2009.