

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

PRISCILA DA CONCEIÇÃO DE SOUZA BRAGA

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *Theobroma cacao* L.
A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FERRO SOB
ALAGAMENTO**

**VITÓRIA-ES
2015**

PRISCILA DA CONCEIÇÃO DE SOUZA BRAGA

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *Theobroma cacao* L.
A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FERRO SOB
ALAGAMENTO**

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. DSc. Marco Antonio Galeas Aguilar (CEPLAC/UFES)

Co-orientador: Adriano Alves Fernandes (CEUNES/UFES)

**VITÓRIA-ES
2015**

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

B813r Braga, Priscila da Conceição de Souza, 1987-
Respostas fisiológicas de Theobroma cacao L. a diferentes
concentrações de ferro sob alagamento / Priscila da Conceição
de Souza Braga. 2015.
128 f.: il.

Orientador: Marco Antonio Galeas Aguilár.
Coorientador: Adriano Alves Fernandes.
Dissertação (Mestrado em Biología Vegetal) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e naturais

1. Cacau. 2. Ferro. 3. Enzimas. 4. Hipóxia. 5. Trocas
gasosas. I. Aguilár, Marco Antonio Galeas, 1960-. II. Fernandes,
Adriano Alves. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57


PRISCILA DA CONCEIÇÃO DE SOUZA BRAGA

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *Theobroma cacao* L. A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FERRO SOB ALAGAMENTO


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 10 de Março de 2015.


COMISSÃO EXAMINADORA




Prof. Dr. Marco Antônio Galeas Aguilar
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal-UFES
Orientador



Prof. Dr. Adriano Alves Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Co-orientador



Prof. Dr. Fábio Luiz Partelli
Ceunes- UFES
Examinador Interno



Prof. Dr. Carlos Alberto Spaggiari Souza
Ceplac - ES
Examinador Externo

A Trindade Santa, por me proporcionar mais esse sonho realizado.
Ao meu esposo Wilkerson, pelo amor, paciência, dedicação e incentivo.
Aos meus pais Cloves e Rose, pelas orações e encorajamento.
A minha irmã Pricislayne e sobrinha Beatriz.
Ao meu sogro Daniel e sogra Ester.
Ao meu orientador Marco Antonio, por acreditar que seria possível, e por sua inteira
dedicação.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela oportunidade de realizar mais esse sonho, por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho me ajudando em mais essa trajetória profissional.

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador, D. Sc. Marco Antonio Galeas Aguilar, pelo incentivo, confiança e dedicação, que desde minha graduação tem contribuído para meu crescimento profissional.

Ao meu co-orientador D. Sc. Adriano Alves Fernandes, pelo apoio e contribuições, durante e após o período experimental.

Ao D. Sc. Carlos Alberto Spaggiari de Souza, pelo apoio e disposição em contribuir neste trabalho.

A CEPLAC/ES, pela disponibilidade das sementes de cacau para a realização deste trabalho.

Ao prof. D. Sc. Fábio Luiz Partelli, pelo empréstimo de equipamento e financiamento das análises de macro e micronutrientes.

Ao prof. D. Sc. Antelmo Ralph Falqueto, pelo empréstimo de equipamentos.

Ao prof. D. Sc. Geraldo Rogério Faustine Cuzzuol e a prof. D. Sc. Maria do Carmo Pimentel Batitucci, pela contribuição de reagentes para a realização dessa pesquisa.

Ao Prof. D. Sc. Rodrigo S. Alexandre, pela disponibilidade enquanto ainda estava no CEUNES.

Ao D. Sc. Marcos Góes de Oliveira, pelo auxílio nas medições de trocas gasosas.

À M. Sc. Thais Silva Costa, pelo auxílio nas medições de Clorofila e área foliar.

Ao Sc. Helder Ivo Pandolfi Marques, por toda colaboração e disposição durante o período experimental.

À colega Weslaine Pinheiro Martins, pela ajuda durante e depois do período experimental.

À colega Luciene Lurett, pela ajuda durante o período experimental.

Aos colegas M. Sc. Leonardo Valandro Zanetti, M. Sc Vinícius Novo Gama e M. Sc. Tatiane Aparecida Zorzal, pelo auxílio com a atividade enzimática e fenóis solúveis.

Aos técnicos do Laboratório de análises de solo e folha, Francisco de Assis Ferreira e Joel Cardoso Filho, pelo auxílio durante o período experimental.

Ao técnico da Fazenda experimental Alex Campanharo, pelo auxílio e disposição.

Aos colegas do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, M. Sc. Thais Silva Costa, M. Sc Verônica D'Addazio Pinheiro, Rodrigo Fantin, André Felipe e Jadson Zampirolo, pelo acolhimento e incentivo.

E agora, as pessoas mais especiais na minha vida, sem vocês não teria chegado até aqui.

Ao meu querido e amado esposo Wilkerson Mcalister Coelho Braga, por seu amor, compreensão e incentivo em todos os momentos.

Aos meus pais Cloves de Souza e Rosicler da Conceição de Souza, irmã Pricislayne da Conceição de Souza e sobrinha Beatriz de Souza Braga, pelas orações e compreensão quando não pude estar perto.

Ao meu sogro Daniel Braga e sogra Ester Maria Coelho Braga, pelas orações e incentivo.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

Braga, Priscila Conceição Souza. M. Sc. Universidade Federal do Espírito Santo. Março de 2015. **Respostas fisiológicas de *Theobroma cacao* L. a diferentes concentrações de ferro sob alagamento.** Marco Antonio Galeas Aguilar (Orientador); Adriano Alves Fernandes (Co-orientador).

O alagamento é uma barreira limitante para o crescimento inicial e estabelecimento de cacau em locais sujeitos a inundação periódica, haja vista que pode causar alterações nas trocas gasosas foliares, na nutrição e nas condições ótimas de crescimento das plantas. Além disso, têm sido encontradas grandes quantidades de Fe na água de irrigação da cultura de cacau, sendo que, em condições de alagamento, aumenta-se a disponibilidade desse elemento para as plantas, gerando uma condição de duplo estresse. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de ferro na presença e ausência de aeração em diferentes genótipos de cacau. Avaliou-se dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, com e sem aeração e excesso do ferro, num experimento instalado no delineamento de blocos casualizados com três repetições e os tratamentos distribuídos em arranjo fatorial (2x2x3) constituído de dois genótipos, com e sem aeração e três concentrações de Fe: 44,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (dose recomendada); 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (dose elevada) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (muito elevada). Foram realizadas avaliações da atividade de enzimas oxidativas e do teor fenóis solúveis totais, índices de clorofilas *a*, *b* e *total* e trocas gasosas em nível foliar, composição mineral das folhas e crescimento. A atividade enzimática e os teores de fenóis solúveis totais aumentaram na dose mais elevada de Fe sem aeração para o genótipo TSH 1188 (36,2% Peroxidase do guaiacol e 205,1% para fenóis). No genótipo SIAL 70 as doses acima da dose recomendada promoveram maior atividade enzimática da Peroxidase do guaiacol com aeração e Polifenoloxidase sem aeração. Os teores de clorofila *a*, *b* e *total*, foram afetados em maior grau pelo estresse de ferro para ambos os genótipos, contudo, o genótipo TSH 1188, apresentou maior índice de clorofilas. As trocas gasosas foram alteradas negativamente em virtude do excesso de ferro e falta de aeração, sendo que a taxa fotossintética para o genótipo TSH 1188 sem aeração na dose mais elevada de ferro apresentou redução de 45,0% aos

18,1 dias, no entanto, ao final do 35^o dia recuperou 94,1% da taxa fotossintética inicial. Já no genótipo SIAL 70, essa redução foi observada em virtude do excesso de ferro independente da interferência do arejamento. A condutância estomática e transpiração foram reduzidas pelo excesso de Fe independente da condição ambiental (arejamento) para os dois genótipos, sendo que para a concentração interna de CO₂ esse resultado foi observado apenas no genótipo TSH 1188. A absorção de nutrientes também foi alterada pelo excesso de ferro e arejamento. O genótipo TSH 1188 apresentou maior crescimento quando comparado ao genótipo SIAL 70, sendo que na concentração mais elevada de Fe (400,5 μmol L⁻¹), independente da condição ambiental, verificou-se aumento das massas secas em relação à dose recomendada de ferro. Em função dos resultados obtidos, os dois genótipos de cacau apresentaram tolerância à ausência de aeração e excesso de ferro, contudo, verificou-se diferentes mecanismos de lidar com cada tipo de estresse.

Palavras chave: cacau, excesso de ferro, hipóxia, trocas gasosas, enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

Braga, Priscila Conceição Souza. M.Sc. Universidade Federal do Espírito Santo. Março de 2015. **Physiological responses of *Theobroma cacao* L. to different iron concentrations in flooding.** Marco Antonio Galeas Aguiar (Supervisor); Adriano Alves Fernandes (Co-advisor).

Flooding is a limiting barrier for the initial growth and cocoa establishment in places subject to periodic flooding, given that it can cause changes in leaf gas exchange, nutrition and in optimum conditions of plant growth. Furthermore, they have been found large amounts of Fe in the irrigation water cocoa culture, and, under flooding conditions, the availability of this element in the plant is increased, generating a double stress condition. In this context, the aim of this study was to evaluate the effects of different concentrations of iron in the presence and absence of aeration in different cacao genotypes. We evaluated two cacao genotypes, TSH 1188 and SIAL 70, with and without aeration and excess iron, an experiment installed in a randomized block design with three replications and treatments distributed in a factorial arrangement (2x2x3) consisting of two genotypes, with and without aeration and three Fe concentrations: 44.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (recommended dose); 133.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (high dose) and 400.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (very high). Were evaluations of oxidative enzyme activity and the content of total soluble phenols, chlorophyll indices *a*, *b* and *total* and gas exchange at leaf level, mineral composition of leaves and growth. The enzymatic activity and total soluble phenolic content increased at the highest dose of Fe without aeration for TSH 1188 genotype (36.2% of guaiacol peroxidase and 205.1% for phenols). In SIAL 70 genotype the above the recommended doses promoted higher enzymatic activity of the peroxidase guaiacol with aeration and Polyphenoloxidase without aeration. The contents of chlorophyll *a*, *b* and *total*, were affected to a greater extent by iron stress for both genotypes, however, the TSH 1188 genotype had higher chlorophyll content. The gas exchange were altered adversely due to the excess iron and lack of aeration, and the photosynthetic rate for TSH 1188 genotype without aeration at the highest dose of iron decreased from 45.0% to 18.1 days, however at the end of 35th day recovered 94.1% of the initial photosynthetic rate. SIAL 70 genotype, this reduction was observed due to the excess iron independent of interference from aeration. The stomatal conductance and transpiration were reduced by the independent Fe excess of environmental conditions (aeration) for the two genotypes, and for the internal concentration of CO₂ that result was observed only in TSH 1188 genotype. The nutrient absorption was also amended by excess iron and aeration. TSH 1188 genotype showed the highest growth when compared to SIAL 70 genotype, with the highest concentration of Fe (400.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$), independent of environmental conditions, there was an increase in dry mass in relation to the recommended dose iron. Depending on the results, the two cocoa genotypes

tolerance absence of aeration and iron overload, however, it was found different mechanisms to handle each type of stress.

Keywords: cocoa, excess iron, hypoxia, gas exchange, antioxidant enzymes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Vista parcial do experimento instalado em casa de vegetação em solução nutritiva.....34
- Figura 2 - Medição do teor de clorofila total.37
- Figura 3 – Medições de trocas gasosas realizadas em casa de vegetação com medidor portátil de fotossíntese.37
- Figura 4 - Influência da presença e ausência da aeração sobre a atividade das enzimas peroxidase do guaiacol (POD; A e B), polifenoloxidase (PPO; C e D) e concentração de fenóis solúveis totais (E e F) nos genótipos de cacau TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a diferentes concentrações de ferro em solução nutritiva. Colunas seguidas da mesma letra dentro de cada concentração de ferro não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Valores médios de três repetições ($\pm EP$).....41
- Figura 5 - Atividade das enzimas peroxidase do guaiacol (POD; A e B), polifenoloxidase (PPO; C e D) e concentração de fenóis solúveis totais (E e F) em dois genótipos de cacau, submetidos a diferentes concentrações de ferro com e sem aeração em solução nutritiva. Colunas seguidas da mesma letra dentro de cada concentração de ferro não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Valores médios de três repetições ($\pm EP$).....44
- Figura 6 - Influência de três níveis de ferro sobre a atividade das enzimas peroxidase do guaiacol (POD; A e B), polifenoloxidase (PPO; C e D) e concentração de fenóis solúveis totais (E e F) em dois genótipos de cacau com e sem aeração em solução nutritiva. Colunas seguidas da mesma letra dentro de cada genótipo não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Valores médios de três repetições ($\pm EP$).....46
- Figura 7 - Influência de diferentes concentrações de Fe (44,5; 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a evolução do índice de clorofila a em função do tempo em dois genótipos

de cacau, TSH 1188 (A e B) e SIAL 70 (C e D), com e sem aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições (\pm EP).....50

Figura 8 – Influência de diferentes concentrações de ferro (44,5; 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a evolução do índice de clorofila *b* em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 (A e B) e SIAL 70 (C e D), com e sem aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições (\pm EP).....50

Figura 9 – Influência de diferentes concentrações de ferro (44,5; 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a evolução do índice de clorofila *total* em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 (A e B) e SIAL 70 (C e D), com e sem aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições (\pm EP).51

Figura 10 – Influência da presença e ausência da aeração sobre a evolução do índice de clorofila *a* em função do tempo, em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F) em solução nutritiva. Valores médios de três repetições (\pm EP)54

Figura 11 – Influência da presença e ausência da aeração sobre a evolução do índice de clorofila *b* em função do tempo, em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F) em solução nutritiva. Valores médios de três repetições (\pm EP)..55

Figura 12 – Influência da presença e ausência da aeração sobre a evolução do índice de clorofila *total* em função do tempo, em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F) em solução nutritiva. Valores médios de três repetições (\pm EP)56

Figura 13 – Evolução do índice de clorofila *a* em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e

B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F), com e sem aeração em solução nutritiva
Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).58

Figura 14 – Evolução do índice de clorofila *b* em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F), com e sem aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).59

Figura 15 – Evolução do índice de clorofila *total* em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F), com e sem aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).60

Figura 16 – Influência de diferentes concentrações de ferro (44,5, 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a taxa fotossintética (A) em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 (A e B) e SIAL 70 (C e D), com e sem aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).62

Figura 17 – Influência da presença e ausência da aeração sobre a evolução da taxa fotossintética (A) em função do tempo, em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F) em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).
.....65

Figura 18 – Evolução taxa fotossintética (A) em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F), com e sem aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).68

Figura 19 – Influência de diferentes concentrações de ferro (44,5, 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a condutância estomática (*gs*) em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 (A e B) e SIAL 70 (C e D), com e sem aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).70

Figura 20 – Influência da presença e ausência da aeração sobre a condutância estomática (*gs*) em função do tempo, em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F) em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).....73

Figura 21 – Evolução da condutância estomática (*gs*) em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F), com e sem aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).....74

Figura 22 – Influência de diferentes concentrações de ferro (44,5, 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a taxa transpiratória (*E*) em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 (A e B) e SIAL 70 (C e D), com e sem aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).....76

Figura 23 – Influência da presença e ausência da aeração sobre a taxa transpiratória (*E*) em função do tempo, em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F) em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).78

Figura 24 – Evolução da taxa transpiratória (*E*) em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F), com e sem aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).....79

Figura 25 – Influência de diferentes concentrações de ferro (44,5, 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a concentração interna de CO_2 (C_i) em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 (A e B) e SIAL 70 (C e D), com e sem aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).81

Figura 26 – Influência da presença e ausência da aeração sobre a concentração interna de CO_2 (C_i) em função do tempo, em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F) em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

.....82

Figura 27 – Evolução da concentração interna de CO₂ (Ci) em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 μmol L⁻¹ (E e F), com e sem aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições (±EP).84

Figura 28 – Influência da presença e ausência da aeração sobre o diâmetro do caule (A e B), altura do caule (C e D), área foliar (E e F) e número de folhas (G e H) dos genótipos de cacau TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a diferentes concentrações de ferro em solução nutritiva. Valores médios de três repetições (±EP).97

Figura 29 – Diâmetro do caule (A e B), altura do caule (C e D), área foliar (E e F) e número de folhas (G e H) dos genótipos de cacau TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a diferentes concentrações de ferro, na presença e ausência da aeração em solução nutritiva. Colunas seguidas da mesma letra dentro de cada concentração de ferro não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott (p < 0,05). Valores médios de três repetições (±EP).100

Figura 30 – Influência de doses de ferro sobre o diâmetro do caule (A e B), altura do caule (C e D), área foliar (E e F) e número de folhas (G e H) de dois genótipos de cacau cultivados na ausência e presença de aeração em solução nutritiva. Colunas seguidas da mesma letra dentro de cada genótipo não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (p<0,05). Valores médios de três repetições (±EP).....101

Figura 31 – Influência da presença e ausência da aeração sobre as massas secas das raízes (A e B), caule (C e D) e folhas (E e F) dos genótipos de cacau TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a diferentes concentrações de ferro em solução nutritiva. Colunas seguidas da mesma letra dentro de cada dose de ferro não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott (p < 0,05). Valores médios de três repetições (±EP).....103

Figura 32 – Massa seca das raízes (A e B), caule (C e D) e folhas (E e F) de dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a diferentes concentrações de ferro na ausência e presença de aeração em solução nutritiva. Colunas seguidas da mesma letra dentro de cada dose de ferro não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Valores médios de três repetições ($\pm EP$).....105

Figura 33 - Influência de doses de ferro sobre a massa seca das raízes (A e B), caule (C e D) e folhas (E e F) de dois genótipos de cacau cultivados na ausência e presença de aeração em solução nutritiva. Colunas seguidas da mesma letra dentro de cada genótipo não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Valores médios de três repetições ($\pm EP$).....106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Influência de diferentes doses de ferro e ausência de aeração sobre a concentração de nutrientes em folhas de *Theobroma cacao* L. genótipo TSH 1188 e SIAL 70, cultivado em solução nutritiva.....86

Tabela 2 - Concentração de nutrientes das folhas de *Theobroma cacao* L., genótipos TSH 1188 e SIAL 70, sob diferentes concentrações de Fe, com e sem aeração em solução nutritiva95

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 O CACAUEIRO	24
2.2 ABSORÇÃO DE FERRO PELAS PLANTAS	30
2.3 RESPOSTAS DAS PLANTAS AO ESTRESSE POR ALAGAMENTO	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO	33
3.2 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÃO DE CULTIVO	33
3.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA E FENÓIS SOLÚVEIS TOTAIS	35
3.3.1 Obtenção do extrato	35
3.3.2 Proteínas totais	35
3.3.3 Peroxidase do guaiacol (EC 1.11.1.7)	35
3.3.4 Polifenoloxidase (EC 1.30.3.1)	36
3.3.5 Teor de fenóis solúveis totais	36
3.4 ÍNDICE DE CLOROFILA	36
3.5 TROCAS GASOSAS	37
3.6 COMPOSIÇÃO MINERAL	38
3.7 VARIÁVEIS DE CRESCIMENTO	38
3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA E FENÓIS SOLÚVEIS TOTAIS	40
4.2 ÍNDICE DE CLOROFILA	48
4.3 TROCAS GASOSAS	61
4.4 COMPOSIÇÃO MINERAL	85
4.5 CRESCIMENTO	96
5 CONCLUSÕES	108

6 REFERÊNCIAS	110
----------------------------	------------

1. INTRODUÇÃO

O cacaueteiro (*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 (DIAS, 2001). Foi implantado no sul da Bahia e norte do Espírito Santo, onde se adaptou bem ao clima e solo local. Para seu melhor desenvolvimento, o cacaueteiro exige solos profundos, férteis e clima quente e úmido, com temperatura média de 25°C e precipitação anual entre 1.500 e 2.000 mm, sem períodos secos prolongados (CEPLAC, 2014).

O alagamento tem sido uma barreira limitante para o crescimento inicial e estabelecimento de cacau em locais sujeitos a alagamento periódico, como ocorre em algumas regiões produtoras de cacau no Brasil, Gana, Nigéria e Costa do Marfim, onde a precipitação pluvial muitas vezes excede a evapotranspiração, criando condições de hipóxia no solo (SENA GOMES; KOZLOWSKI, 1986). No município de Linhares, norte do Espírito Santo, a maior parte da região cacaueteira é composta de solos aluviais e sujeita ao alagamento, principalmente no verão quando as chuvas são intensas e frequentes (SOUZA et al., 2005). Nessas condições, os microrganismos aeróbicos consomem o oxigênio molecular, e com o tempo são substituídos por microrganismos anaeróbicos, resultando, em um ambiente de redução e acúmulo de CO₂ (PONNAMPERUMA, 1972). Com isso, a disponibilidade de ferro aumenta pela redução de compostos oxidados (BECANA; MORAN; ITURBE-ORMAETXE, 1998).

As águas da região do baixo rio Doce apresentam alto teor de Ferro, e chegam a possuir cerca de 10,0 mg.L⁻¹ de ferro nos períodos mais secos do ano (CAMPOS, 2014), o que ultrapassa o valor máximo recomendado de 5,0 mg.L⁻¹ (AYRES; WESTCOT, 1991). Além disso, as atividades antrópicas, como a mineração, produção agrícola e a produção de resíduos tóxicos, tem resultado em um acúmulo desse nutriente no solo (MENDES et al. 2010), podendo, ao longo do tempo, por seu sistemas de irrigação apresentar excesso de Ferro, originar um aumento progressivo até alcançar um nível capaz de provocar danos às plantas (AYRES; WESTCOT, 1991), e prejuízos econômicos aos cacauicultores.

O ferro é um micronutriente importante para as plantas e pode estar disponível em duas formas: Fe^{2+} e Fe^{3+} . A forma Fe^{2+} é transportado via xilema até a parte aérea, pois é mais solúvel e conseqüentemente pode ser melhor absorvido pelas plantas (SCHMIDT, 2003). De modo direto está envolvido em seu metabolismo, sendo essencial para a fotossíntese, respiração mitocondrial, assimilação do nitrogênio, biossíntese hormonal e na proteção contra patógenos (GRISI, 2010). Porém, em excesso pode causar vários danos às plantas, como alterações anatômicas, ruptura das células radiculares e desestruturação dos componentes celulares (SAHRAWAT, 2005); menor conteúdo de clorofila (CHATTERJEE; GOPAL; DUBE, 2006); instabilidade da membrana (THOMPSON; LEGGE; BARBER, 1987; FANG et al., 2001); estresse oxidativo com produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) (CONNOLLY; GUERINOT, 2002); danos fotossintéticos (SUH et al., 2002); desequilíbrio nutricional; clorose nas folhas velhas (CHATTERJEE; GOPAL; DUBE; 2006), escurecimento das raízes (SAHRAWAT, 2005) e conseqüentemente inibição do crescimento da planta (CHATTERJEE; GOPAL; DUBE, 2006).

As espécies vegetais e os genótipos dentro de cada espécie tendem a ter diferentes respostas, ou sensibilidade diferenciada ao excesso de nutrientes, no entanto, as plantas não conseguem deixar de absorver, mas sim, limitam parte de sua translocação no interior do tecido vegetal (SOARES et al., 2001). Contudo, para a absorção de ferro, há uma regulação para impedir o acúmulo excessivo (KIM; GUERINOT, 2007; YOSHIHARA et al., 2010). As plantas desenvolveram mecanismos de proteção contra a toxidez por ferro que envolve mecanismos enzimáticos (FANG et al., 2001) e não-enzimáticos (KRINSKY; YEUM, 2003; SMIRNOFF, 2005).

Poucas são as informações a cerca dos efeitos da toxicidade por Fe em espécies vegetais tropicais, sendo que pesquisas envolvendo os efeitos do Fe nos aspectos fisiológicos no cacau são escassas na literatura. Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo geral avaliar os efeitos de diferentes concentrações de ferro na presença e ausência de aeração em dois genótipos de cacau, visando indicar posteriormente aos cacauicultores qual deles é mais tolerante a altas concentrações de ferro e ao alagamento; e como objetivos específicos: avaliar a atividade de enzimas e o teor de fenóis solúveis totais, os índices de clorofilas *a*, *b* e *total*, as trocas gasosas em nível foliar, a composição mineral das folhas e o

crescimento dos genótipos de cacau submetidos à ausência de aeração e doses de ferro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O CACAUEIRO

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) é uma cultura milenar, com origem nas regiões tropicais da América Central, estendendo-se da bacia amazônica até o sul do México (DIAS, 2001). Os povos mesoamericanos apreciavam tanto que lhe atribuíam origem divina e sua plantação era, muitas vezes, cercada de cerimônias religiosas. Em referência à origem divina atribuída pelos povos mesoamericanos, Lineu em 1737 denomina o gênero de *Theobroma*, que significa alimento dos deuses (EFRAIM, 2009).

A espécie *T. cacao* L. anteriormente pertencia à família Sterculiaceae, mas foi reclassificada e inserida na família Malvaceae, após estudos filogenéticos que propuseram modificação em sua classificação (ALVERSON et al., 1999). O *T. cacao* L., espalhou-se em duas principais direções, resultando nos dois principais grupos raciais: Criollo e Forasteiro. O grupo Criollo é cultivado na Venezuela, Colômbia, Equador, América Central e México, e o Forasteiro, no norte do Brasil, Guianas e na Venezuela (DIAS, 2001; SOUNIGO et al., 2003), sendo ambos classificados de acordo com características morfológicas, genéticas e sua origem geográfica. Um terceiro grupo denominado Trinitário é considerado por alguns autores, originário de um cruzamento natural entre os grupos Forastero e Criollo (DIAS, 2001; ALMEIDA; VALLE, 2007),

Sua produção começa após dois a três anos de plantio e se prolonga por mais de 30 anos, dependendo das condições edafoclimáticas e da variedade, sendo que as lavouras podem produzir até com 100 anos de idade (PURDY; SMITH, 1996). Para se desenvolver melhor, o cacauieiro exige solos profundos, ricos e clima quente e úmido, com temperatura média de 25°C e precipitação anual entre 1.500 e 2.000 milímetros, sem períodos secos prolongados (CEPLAC, 2014), e segundo Braga e Arpini (2011) a melhor época de germinação de suas sementes ocorre quando as temperaturas e umidade são mais elevadas.

A principal importância econômica do cacauieiro provém das sementes que após beneficiamento são comercializadas como amêndoas de cacau, com uma produção

mundial estimada próxima a 4365 milhões de toneladas de amêndoas na safra 2013-2014 (ICCO, 2014), 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*, como o mel do cacau, a extração da polpa de suas sementes, pode ser utilizado na fabricação de vinho, vinagre, licores e geleias que vem conquistando mercados, inclusive internacionais. (MENEZES; CARMO-NETO, 1993, ALMEIDA; VALLE, 2007).

Segundo a ICCO (International Cocoa Organization), os maiores produtores mundiais de cacau são a Costa do Marfim com 1741 mil toneladas na estimativa da safra 2013/2014, seguida por Gana com 897 mil toneladas, Indonésia 450 mil toneladas, Nigéria 250 mil toneladas, Brasil 280 mil toneladas, Equador e Camarões com 210 mil toneladas e Papua Nova Guiné 42 mil toneladas (ICCO, 2014). Nos estados brasileiros, a Bahia produziu 179.179 mil toneladas, Pará 87.030 mil toneladas, Rondônia 5.230 mil toneladas e Espírito Santo 4.296 mil toneladas na safra de 2013/2014 (IBGE, 2015). Historicamente, a produção máxima de cacau no Brasil foi à safra de 1984/85, equivalente a 403 mil toneladas de cacau anual, mas sua produção reduziu drasticamente nos anos seguintes, destacando o surgimento da doença vassoura-de-bruxa em 1989, que devastou densas áreas de cacauais (DIAS, 2001).

O estado do Espírito Santo iniciou o cultivo do cacau em 1895, no município de Linhares, se estabelecendo principalmente na região do baixo Rio Doce (COSTA, 1989). Este município se destaca no cenário nacional de produção de cacau, ocupando a 3ª posição entre os maiores produtores do país no ano 2010 (IBGE, 2015). Aproximadamente 20 mil hectares das terras do município de Linhares estão cultivados com a espécie, o que representa 95% da área plantada no nesse estado (INCAPER, 2011).

Uma das principais ameaças à cacaucultura é uma doença causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* popularmente conhecida como vassoura-de-bruxa. Recentemente, genótipos mais resistentes estão sendo recomendados pelo Programa de Recuperação da Lavoura Cacaueira do Espírito Santo e CEPLAC. Entre os genótipos indicados estão o PH 16, IPIRANGA 01, PS-1319, CEPEC 2002, SJ-02, CCN-51, TSH 1188, BN-34 e CP-49, ambos resistentes à vassoura-de-bruxa

e de elevada produtividade (INCAPER, 2007; FALEIRO et al., 2004; GERES/CEPLAC¹, 2015).

A seca também tem se mostrado um fator limitante para a cultura do cacau, sendo que na região norte do estado do Espírito Santo esse problema é bem acentuado, especialmente nos meses de abril a setembro quando as precipitações pluviométricas são menores que as requeridas pelo cultivo, o que gera prejuízos em áreas não irrigadas (MAPA, 2011). De maneira contrastante, o cultivo também passa por períodos de alagamento, especialmente nos períodos mais chuvosos do ano, causando também sérios problemas aos cacauicultores.

Embora exigente quanto às condições de clima e solo, o cultivo do cacaueteiro tem vantagens ambientais, como a de repor ao solo parte dos nutrientes que são retirados, de forma a manter o equilíbrio ecológico e constituindo-se num cultivo perene e renovável. Os cacauicultores tem adotado o sistema agroflorestal, que localmente é conhecido como sistema Cabruca, que evoluiu a ponto de se tornar um sistema agrossilvicultural de produção que apresenta vantagens agroambientais sustentáveis quando comparado a outros sistemas agrícolas de produção (LOBÃO et al., 2012). Desta forma, a cacauicultura apresenta não apenas importância econômica como também importância ambiental.

2.2 ABSORÇÃO DO FERRO PELAS PLANTAS

O ferro (Fe) é o quarto mineral mais abundante na crosta terrestre, presente nas rochas, solos, águas, organismos e aerossóis. Tendo cerca de 4,2% da litosfera constituído por esse elemento, sendo hematita, magnetita, goethita e siderita os principais minerais que contêm Fe. Mesmo sendo abundante na crosta terrestre, o Fe está presente no solo, na forma oxidada Fe^{3+} , que em água tem baixa solubilidade (REDDY; DELAUNE, 2008; GURZAU; NEAGU; GURZAU, 2003).

Por ser um nutriente essencial para as plantas, está envolvido em processos fundamentais como fotossíntese, onde alterna o Fe^{+2} e Fe^{+3} , por reação redox reversível pela transferência de elétrons (KIM; GUERINOT, 2007); biossíntese de clorofila e de diversas proteínas (MARSCHNER, 2012); respiração; metabolismo de nitrogênio (GURZAU; NEAGU; GURZAU, 2003); síntese de DNA; hormônios

(BRIAT; LOBRÉAUX, 1997; BECANA; MORAN; ITURBE-ORMAETXE, 1998) e etapas do metabolismo de pigmentos fotossintéticos (BRIAT; CURIE; GAUMARD; 2007). Desse modo, Fe é um micronutriente fundamental para o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Em solo com aeração o Fe apresenta-se em forma oxidada (Fe^{+3}), a qual é pouco disponível para as plantas (PONNAMPERUMA, 1972). Assim, as plantas desenvolveram duas diferentes estratégias para absorção, transporte e armazenamento de Fe quando há escassez em solos bem aerados (BUGHIO et al., 2002; ISHIMARU et al., 2006). A primeira estratégia é comum entre dicotiledôneas, como o cacaueteiro, e a segunda em monocotiledôneas não-gramíneas. No primeiro processo, ocorre uma acidificação da rizosfera pela liberação de prótons pelas plantas, assim os íons férricos (Fe^{3+}) são reduzidos aos íons ferrosos (Fe^{2+}) na membrana plasmática das células da raiz, por uma redutase de Fe^{3+} que é induzida. Posteriormente, o ferro reduzido é, então, transportado através da membrana plasmática por um sistema transportador específico Fe^{+2} (EPSTEIN; BLOOM, 2006).

No segundo processo, a aquisição do Fe consiste na produção e liberação de sideróforo (“carregadores de ferro”) que complexam o Fe na rizosfera, sendo o complexo Fe^{3+} -sideróforo, também chamados de fitossideróforos, (“carregadores de ferro vegetais”) absorvido pelas raízes (HELL; STEPHAN, 2003), não ocorrendo, nesse caso, sua transformação para Fe^{2+} . O complexo Fe^{3+} -sideróforo é transportado para o interior da planta através da membrana plasmática das células radiculares (EPSTEIN; BLOOM, 2006), sua translocação no tecido vegetal tem sido considerada baixa (GHALY et al., 2008) em virtude da baixa remobilização no floema (BAUER; HELL, 2006).

Após absorção pelas raízes o xilema carrega o Fe e o transloca até a parte aérea através do fluxo transpiratório. Uma vez nos vasos do xilema, o Fe apresenta-se oxidado, sendo transportado na forma de complexos com ácidos orgânicos, principalmente citrato, que é o principal quelante de metais no xilema (CURIE; BRIAT, 2003).

Para a absorção do Fe pelas células do mesófilo é necessária uma redução do íon férrico, onde após a liberação pela molécula de citrato, supõe-se que exista um transportador específico de Fe^{2+} na plasmalema das células foliares. O doador de

elétrons para a redução do ferro é o NADPH, e esse procedimento parece ser causado pelo aumento na relação NADPH/NADP⁺ resultante da etapa fotoquímica da fotossíntese (BRUGGEMANN; MAASS-KANTEL; MOOG, 1993). O Fe, uma vez no mesofilo, pode ser armazenado nos vacúolos ou imobilizado pela proteína ferritina (BRIAT et al., 2010), uma proteína que encapsula ferro férrico, a qual ocorre principalmente nos plastídeos (ZANCANI et al., 2004; EPSTEIN; BLOOM, 2006).

No entanto, seu acúmulo excessivo nos tecidos, ocasiona um aumento de estresse oxidativo, com potencialização de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO'S). O Fe²⁺ em nível celular pode reagir com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela reação de Fenton, gerando radicais hidroxilas (GUERINOT; YI, 1994; BECANA; MORAN; ITURBE-ORMAETXE, 1998), proporcionando danos irreversíveis na estrutura das membranas celulares, mudando as atividades enzimáticas e consequentemente levando uma perda na permeabilidade seletiva com vazamento de eletrólitos, levando ao colapso celular e deterioração do tecido (BECANA; MORAN; ITURBE-ORMAETXE, 1998; FANG et al., 2001; PEREIRA et al., 2009). Ao acumular-se nas células pode ainda reagir com o oxigênio e formar radical superóxido (MARSCHNER, 1995).

Alem disso, seu excesso, ainda pode gerar: injúrias nas células da epiderme e do parênquima clorofiliano, com redução na espessura do mesofilo (MÜLLER, 2009); menor conteúdo de clorofila (CHATTERJEE; GOPAL; DUBE, 2006); danos fotossintéticos (SUH et al., 2002); desbalanço catiônico, ocasionando desordem nutricional (SNOWDEN; WHEELER, 1995) que consequentemente reduz o tamanho das folhas; na ramificação radicular; murcha das folhas; escurecimento das raízes (SAHRAWAT, 2005; CHATTERJEE; GOPAL; DUBE, 2006); flacidez e nanismo nas raízes que, em conjunto, reduzem o crescimento das plantas (GENON et al., 1994; THIPIYAPONG et al., 2004), também podem danificar lipídios; proteínas e DNA (CONNOLLY; GUERINOT, 2002).

Esse estresse oxidativo ocasionado pelo ferro pode causar a diminuição dos pigmentos fotossintéticos (SPILLER, TERRY, 1980; TAYLOR; TERRY; HUSTON, 1982; DING et al., 2007), e a desestruturação de pigmentos dos complexos fotossintéticos, pode por sua vez, causar a redução na taxa de assimilação líquida de CO₂, já nas estruturas celulares, como das moléculas da clorofila pela ação das

ERO's, tem capacidade de ocasionar danos nos complexos proteicos da cadeia transportadora de elétrons fotossintética e consequentemente ocasionar perda da capacidade de fixação de carbono nos cloroplastos (SCANDALIOS, 1993; BECANA; MORAN; ITURBE-ORMAETXE, 1998; SUH et al., 2002).

O excesso de Fe, também tem a capacidade de diminuir a absorção de P, K, Ca, Mg e Mn (SILVEIRA et al., 2007; MALAVOLTA, 2006), e a deficiência conjunta de P, Mg, dentre outras consequências, afetam a regeneração da ribulose 1,5 – bifosfato (RuBP) (FARAZDAGHI, 2011) e ativação da Rubisco (carboxilase/oxigenase), que reduz a taxa fotossintética por retroinibição (HELDT; HELDT, 2005).

As plantas para sustentar o crescimento e evitar a toxicidade do Fe celular, necessitam desenvolver a capacidade de armazenar e remobilizar o Fe (BRIAT; CURIE; GAUMARD, 2007), sendo assim, as plantas desenvolveram alguns mecanismos para lidar com esse estresse abiótico. Dentre os mecanismos não enzimáticos, o Fe pode ser armazenado em organelas como vacúolos e plastídios, e também em ferritina, uma proteína especializada (MURGIA; DELLEDONNE; SOAVE, 2002; CURIE; BRIAT, 2003; BRIAT et al., 1995; BRIAT; CURIE; GAUMARD, 2007; BRIAT et al., 2010) que mantém a homeostase do Fe nas células (MAJERUS; BERTIN; LUTTS, 2009). A ferritina atua como mecanismo fortemente envolvido na tolerância a esse metal (MAJERUS et al., 2007) por incorporar o Fe em sua estrutura minimizando, assim, a sua reatividade (BRIAT; LOBRÉAUX, 1997; KIM; GUERINOT, 2007; MAJERUS; BERTIN; LUTTS, 2009; YOSHIHARA et al., 2010), além de proteger contra a possível formação de ERO'S (BRIAT et al., 1995; MURGIA; DELLEDONNE; SOAVE, 2002; ZANCANI et al., 2004).

Os mecanismos enzimáticos das plantas atuam com aumento na atividade das enzimas antioxidantes (dismutase do superóxido, catalase e peroxidase do ascorbato), as quais agem na supressão de ERO'S (BECANA; MORAN; ITURBE-ORMAETXE, 1998; FANG et al., 2001)

No entanto, diferentes cultivares variam amplamente em sua capacidade de enfrentar o excesso de Fe (MÜLLER, 2009) e para uma espécie vegetal sobreviver e tolerar os efeitos tóxicos do Fe dependerá de diversas características como o genótipo, estágio de crescimento, disponibilidade de recursos para seu desenvolvimento e microhabitat (LEVIN, 1998; GRANTZ; GARNERB; JHONSON

2003), que possuem estreita relação com aspectos fisiológicos dos vegetais. Concentrações normais de ferro variam entre 50 e 100 mg kg⁻¹ de massa seca da planta (MARTINEZ; CLEMENTE, 2011), mas isso depende da espécie, do estado fisiológico e das condições de crescimento (ADAMSKI, 2011). No cacau, concentrações acima de 250 mg kg⁻¹ são consideradas excedentes (CHEPOTE et al., 2005; SOUZA JUNIOR et al., 2012).

2.3 RESPOSTAS DAS PLANTAS AO ESTRESSE POR ALAGAMENTO

Regiões produtoras de cacau como Brasil, Gana, Nigéria e Costa do Marfim, têm enfrentado grandes transtornos com o alagamento, pois afeta o crescimento inicial e estabelecimento de cacau em locais sujeitos a inundações periódicas, onde o número total de chuvas, muitas vezes excede a evapotranspiração, criando condições de hipóxia no solo (SENA GOMES; KOZLOWSKI, 1986). No estado de Bahia, bem como no norte do Espírito Santo, a condição de hipóxia é verificada após as pesadas chuvas em locais com solos rasos, bem como em solos hidromórficos e nas margens de rios após inundações (REHEM, 2006). No município de Linhares, norte do Espírito Santo, a maior parte da região cacauzeira é composta de solos aluviais e sujeita ao alagamento, principalmente no verão (SOUZA et al., 2005).

Inundações frequentes podem reduzir a produtividade de muitas culturas, o que torna essencial a identificação de cultivares tolerantes à inundações (SCHAFFER, 1998; ALMEIDA; VALLE, 2007). Plantas tolerantes ao alagamento, no entanto, dependem da espécie, da duração do estresse, do estágio de desenvolvimento da planta, e das condições ambientais.

Os declínios no crescimento, área foliar, condutância estomática, taxas fotossintéticas, bem como a formação de lenticelas e raízes adventícias ajudam a planta a lidar com as condições anaeróbicas (KOZLOWSKI, 1997; REHEM, 2006). No entanto, em alagamento as plantas reduzem as trocas gasosas; a absorção de nutrientes, o volume das raízes, altera o armazenamento e translocação de fotossintetizados, e induz a produção de hormônios endógenos, tais como etileno (KOZLOWSKI, 1997; PEZESHKI, 2001). A assimilação de carbono é um dos principais processos afetados pelo alagamento, que pode ser atribuído ao

fechamento de estômatos ou diminuição da atividade de Rubisco (KOZLOWSKI, 1997; PEZESHKI, 2001).

De maneira geral, o crescimento do cacauzeiro é inibido quando submetido a solos alagados reduzindo à produção dos frutos, pelo fato de aumentar o tempo do período da primeira floração e reduzir o crescimento vegetativo (SENA GOMES; KOZLOWSKI, 1986), segundo Mariano e Monteiro (1982), esse estresse acarretou uma redução de 60% na produção dos cacauzeiros.

O cultivo em solução nutritiva, dependendo da aeração da solução, pode proporcionar uma condição de hipóxia ou anóxia para as raízes. A aeração da solução busca disponibilizar oxigênio, fazendo com que se tenha uma renovação do oxigênio disponibilizado para as raízes, onde a falta da aeração da solução pode simular o cultivo em solo alagado (HOAGLAND; ARNON, 1950; KRATKY, 1993).

Em condições de alagamento, os microrganismos do solo são forçados a reduzir receptores de elétrons diferentes de O_2 , conseqüentemente o potencial redox do solo cai. Primeiro, os microrganismos reduzem nitrato a nitrito, óxido nítrico, óxido nitroso ou gás dinitrogênio. Uma vez esgotado o nitrato do solo, os microrganismos reduzem óxidos de manganês e ferro férrico (Fe^{+3}) para manganês (Mg^{+2}) e ferro ferroso (Fe^{+2}) (EPSTEIN; BLOOM, 2006), aumentando assim a disponibilidade para a planta.

Portanto, em solos ácidos, a hipóxia e redução do pH, decorrentes do alagamento, podem levar a redução e solubilização de grandes quantidades de Fe (PONNAMPERUMA, 1972). A elevação da concentração de ferro a níveis tóxicos para as plantas pode ser observada naturalmente em solos ácidos constantemente inundados (DOBERMANN; FAIRHURST, 2000) ou em eventos antrópicos como a mineração e beneficiamento de minério de ferro (KUKI et al., 2008), comprometendo o equilíbrio fisiológico das plantas.

Além disso, têm sido encontradas grandes quantidades de Fe na água de irrigação da cultura de cacau (AGUILAR; SOUZA², 2013), na qual, segundo Campos (2014), as águas utilizadas para os sistemas de irrigação dessa cultura chegam a possuir cerca de $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de Fe nos períodos mais secos do ano, o que ultrapassa o valor máximo recomendado de $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (AYRES; WESTCOT, 1991). Uma vez que

essas grandes quantidades de Fe são depositadas ao longo de períodos secos no solo pela irrigação e ao começar os períodos de chuvas, conseqüentemente ocorrendo o alagamento potencializa ao longo do tempo o aumento desse elemento no solo até níveis capaz de causar danos as plantas (AGUILAR; SOUZA² 2013).

¹GERES/CEPLAC Pesquisadores da Estação Experimental Filogônio Peixoto – ESFIP/CEPLAC. Comunicação pessoal, 2015.

²AGUILAR, M, A, G; SOUZA, C. A. S. Pesquisadores da Estação Experimental Filogônio Peixoto – ESFIP/CEPLAC. Comunicação pessoal, 2013.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado em casa de vegetação da Fazenda Experimental do Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em São Mateus-ES, pertencente ao Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas, cujas coordenadas geográficas são latitude 18° 43' S, longitude 39° 51' W, altitude de 39 m, no período de 28 de março a 21 de agosto de 2014.

3.2 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O ensaio foi conduzido com dois genótipos de cacau (*T. cacao* L.), TSH 1188 e SIAL 70, provenientes de sementes cedidas pela Estação Experimental Filogônio Peixoto (ESFIP), pertencente a GERES (Gerência Regional do Estado do Espírito Santo), órgão da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC). A mucilagem das sementes foi retirada por meio de fricção com pó de serra seco e esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 0,5%, lavadas em água corrente e água destilada, selecionadas quanto ao tamanho e colocadas para pré-germinar por quatro dias em água destilada sob aeração constante. Após esse período, as sementes pré-germinadas foram colocadas em bandejas contendo areia lavada com HCl 5%, enxaguada com água destilada e esterilizada por autoclavagem (AGUILAR, 1999).

As plântulas foram irrigadas diariamente com água destilada e, decorridos 30 dias, foram selecionadas quanto ao tamanho, lavadas e transferidas, em número de quatro, para vasos de polietileno pintados externamente de alumínio com tampas de isopor revestidas com papel alumínio. Cada tampa continha quatro orifícios para o encaixe de espumas, as quais serviram de suporte e proteção para as plantas. Os vasos continham 7,0 litros de solução nutritiva de Hoagland e Arnon nº2 (1950), com ¼ de força iônica (AGUILAR, 1999). Para a oxigenação das soluções nutritivas foi utilizado um compressor de ar. O pH da solução foi monitorado a cada dois dias e ajustado com NaOH e/ou HCl e mantido na faixa de 5,5 a 6,0.

Durante o experimento, a evapotranspiração de cada vaso foi monitorada pela redução máxima em torno de 30% do volume do vaso, medido com uma marca feita antes da adição da solução, e sua reposição feita com água deionizada. Para reposição dos nutrientes, foi admitida uma depleção de até 20% com base na redução da condutividade elétrica. A solução foi renovada quinzenalmente.

Aos 80 dias após transplante (DAT), a solução nutritiva de Hoagland e Arnon nº2 (1950) foi modificada para conter as seguintes concentrações de Fe (FeSO_4): 44,5 (concentração recomendada); 133,5 (elevada) e 400,5 (muito elevada) $\mu\text{mol/L}^{-1}$. Aos 81 DAT parte do experimento foi submetida a ausência de aeração (alagamento) através da suspensão do arejamento por um período de 21 dias (Figura 1).



Figura 1. Vista parcial do experimento instalado em casa de vegetação em solução nutritiva.

As avaliações fisiológicas, exceto atividade enzimática e fenóis solúveis totais foram realizadas aos 80, 87, 94, 101, 108 e 115 DAT, ou seja, 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a aplicação dos tratamentos com as doses de ferro, sendo que o período do alagamento (suspensão do arejamento) foi realizado dos 81 até 101 DAT, sendo as avaliações subsequentes correspondentes ao período de recuperação das plantas. As análises de crescimento, composição mineral, atividade enzimática e fenóis totais foram realizadas após o período de 116 DAT no final do experimento.

3.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA E FENÓIS SOLÚVEIS TOTAIS

3.3.1 Obtenção do extrato

Aos 116 DAT, folhas completamente maduras a partir do ápice do eixo ortotrópico, foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e transportadas para o Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFES (Vitória) onde foram transferidos para ultrafreezer (-80°C) para posterior determinação da atividade enzimática e do teor de fenóis solúveis totais.

Para as análises, 0,4 g de tecido foliar foi macerado com pistilo em almofariz resfriado e homogeneizado em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,8, EDTA-Na₂ 0,1 mM, ácido ascórbico 10 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12000 x g durante 15 min a 4 °C (PARIDA; DIAS; MITTRA, 2004). O sobrenadante resultante foi utilizado para os ensaios das atividades da peroxidase do guaiacol (POD), polifenoloxidase(PPO) e quantificação de fenóis solúveis totais.

3.3.2 Proteínas totais

O conteúdo de proteínas totais foi quantificado de acordo com Bradford (1976). Para tanto, 40 µL de sobrenadante do extrato foi misturado com 2000 µL de reagente de Bradford, seguido de agitação com auxílio de vortex. Após 5 minutos, a absorbância foi determinada a 595 nm em espectrofotômetro (ThermoScientific®, Genesys 10S) e os resultados foram expressos como µmg de proteína/g tecido fresco (µmg ptn/g MF), tendo a albumina de soro bovino como proteína padrão.

3.3.3 Peroxidase do Guaiacol (POD; EC 1.11.1.7)

A atividade dessa enzima foi determinada segundo a metodologia descrita por Cakmak; Strboe; Marschner, (1993) com modificações. Foi medida em um meio de reação constituído de 10 µL de extrato e 2000 µL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0) com guaiacol 20 mM e 50 µL de peróxido de hidrogênio 20 mM. O aumento da absorbância devido à oxidação do guaiacol foi registrado a 470 nm

depois de um minuto de reação usando um espectrofotômetro ThermoScientific®, Genesys 10S. O coeficiente de extinção do H_2O_2 considerado foi $26,6 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.3.4 Polifenoloxidase (PPO; EC 1.30.3.1)

Foi utilizada a metodologia descrita por Cañal et al. (1988), com algumas modificações. A atividade da PPO foi determinada pela conversão do catecol em quinona, em 1 mL de catecol 0,2 M, 1 mL de tampão fosfato-Na 0,2 M, pH 6,8 e 20 μL de extrato. O aumento da absorbância foi registrado a 420 nm depois de um minuto de reação usando um espectrofotômetro ThermoScientific®, Genesys 10S. A atividade total para esta enzima foi expressa como o aumento na absorbância por minuto. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância/min/mg de proteína ($\text{UA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ proteína).

3.3.5 Teor de Fenóis Solúveis 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 Na_2CO_3 15% foi adicionado e a mistura permaneceu por 2 h na temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$). A absorbância foi medida a 760 nm usando um espectrofotômetro ThermoScientific®, Genesys 10S. A curva de calibração foi feita utilizando-se ácido gálico como padrão e os resultados expressos em μg de ácido gálico por g de proteína.

3.4 ÍNDICE DE CLOROFILA

As medidas da estimativa da clorofila *a*, *b* e *total* foram avaliadas com o medidor eletrônico de teor de clorofila (clorofiLOG CFL 1030, FALKER), pois este equipamento permite medições instantâneas do valor correspondente ao seu teor de clorofila na folha sem destruí-la (ARGENTA et al., 2001) (Figura 2).



Figura 2. Medição do teor de clorofila total.

3.5 TROCAS GASOSAS

As medições de trocas gasosas foram realizadas na mesma folha e no mesmo período em que foi avaliado o teor de clorofila total, com medidor portátil de fotossíntese IRGA open system (CIRAS 2, PP Systems, England), em irradiância saturante de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fótons, avaliou-se a assimilação fotossintética líquida (A) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), taxa de transpiração (E) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e concentração interna de CO_2 (C_i) (mol mol^{-1}) (Figura 3).



Figura 3. Medições de trocas gasosas realizadas em casa de vegetação com medidor portátil de fotossíntese.

3.6 COMPOSIÇÃO MINERAL

Todas as folhas das plantas de cada tratamento e repetição foram colhidas, secas em estufa de circulação forçada de ar a 70°C até massa constante. Posteriormente as folhas foram analisadas no Laboratório de Análises Agronômicas e Ambientais Fullin©. Para análise de N foi utilizada a digestão sulfúrica com determinação titulométrica, para P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Cu e Mn a digestão nitro-perclórica, e B incineração via seca com determinação colorimétrica. Todos os elementos totais foram determinados com base na matéria seca, conforme metodologia preconizada pela ESALQ/USP (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

3.7 VARIÁVEIS DE CRESCIMENTO

As avaliações de crescimento foram realizadas aos 116 DAT, quando foram avaliados o número total das folhas, o diâmetro do caule com auxílio de um paquímetro, a altura da parte aérea utilizando uma régua milimetrada, e a área foliar (cm) das plantas utilizando-se um integrador de área foliar LI COR 3000. As plântulas foram seccionadas em raiz, caule e folha, em seguida foram acondicionadas em sacos de papel, previamente identificados, e levadas à estufa de ventilação forçada, regulada a 70°C, durante 72 horas, até massa constante. Após este período, as diferentes partes das plantas foram retiradas da estufa e pesadas em balança analítica, com precisão de 0,001 g, obtendo-se massa seca da raiz, caule e folha.

3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi instalado no delineamento de blocos casualizados com três repetições e os tratamentos distribuídos num arranjo fatorial (2 x 2 x 3) constituído de dois genótipos, com e sem aeração e três concentrações de Ferro. Os resultados foram submetidos às análises de variância e de regressão. Todas as interações triplas foram desdobradas e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5%, fazendo-se uso do sistema de análise estatística ASSISTAT versão 7.7 beta 2014 (SILVA; AZEVEDO, 2009). Na análise de regressão, a escolha do modelo que melhor se ajustou aos dados foi baseada na significância do efeito da regressão

avaliada pelo teste F a 5% de probabilidade, e no maior coeficiente de determinação (r^2). Os coeficientes das equações de regressão foram testados a 5 e 1% de probabilidade, pelo teste "t".

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA E FENÓIS SOLUVEIS TOTAIS

A atividade da enzima peroxidase do guaiacol (POD) para o genótipo TSH 1188 sem aeração, na concentração $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, aumentou 163% em relação ao ambiente com aeração, enquanto nas outras concentrações não foram observadas diferenças significativas (Figura 4A). De maneira contrastante, para o genótipo SIAL 70, observou-se aumento de 40,6% na concentração $44,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe em ambiente sem aeração, no entanto, nas demais concentrações de Fe ocorreram reduções de 53 e 50%, respectivamente (Figura 4B).

As peroxidases (PODs) existem em muitas isoformas e estão envolvidas em uma série de processos celulares. A expressão pode ser induzida quando as plantas passam por estresses ambientais ou contínuos. No entanto, vários estudos tem mostrado que baixas atividades mostram sintomas de estresse menos graves e as altas, sintomas mais graves. As PODs estão localizadas principalmente na parede celular e no vacúolo e utilizam o H_2O_2 como oxidante e composto de natureza fenólica como doadores de elétrons. Dessa forma, o H_2O_2 tende a ser eliminado por essa enzima (LOCATO et al., 2010).

Yordanova; Christov; Popova, (2004) encontraram um aumento significativo na atividade POD em folhas de *Hordeum vulgare* L. sob alagamento. Bertolde (2011), também observou aumento dessa enzima em folhas de plantas alagadas do clone de cacau suscetível ao alagamento, no entanto no clone tolerante foi observado redução dessa enzima. Entretanto, neste estudo para o genótipo TSH 1188, considerado tolerante ao alagamento (BERTOLDE, 2007), observou-se aumento da atividade somente na concentração mais elevada de Fe, indicando ocorrência de estresse oxidativo. Esse estresse, provavelmente ocorreu devido à combinação do excesso de Fe em meio não aerado.

Em contrapartida, a diminuição na atividade da POD em plantas sem aeração do genótipo SIAL 70, sugere que houve diminuição no transporte de elétrons, redução na formação de peróxido e superóxido e, conseqüentemente, redução na produção e ativação de peroxidases. No entanto, deve-se considerar que para o genótipo SIAL 70, a ativação dessa enzima provavelmente ocorreu pelo estresse por ausência de

aeração e não pelo estresse por Fe, uma vez que, as plantas ainda estavam condicionadas a elevadas concentrações de Fe e em período de recuperação da falta de aeração.

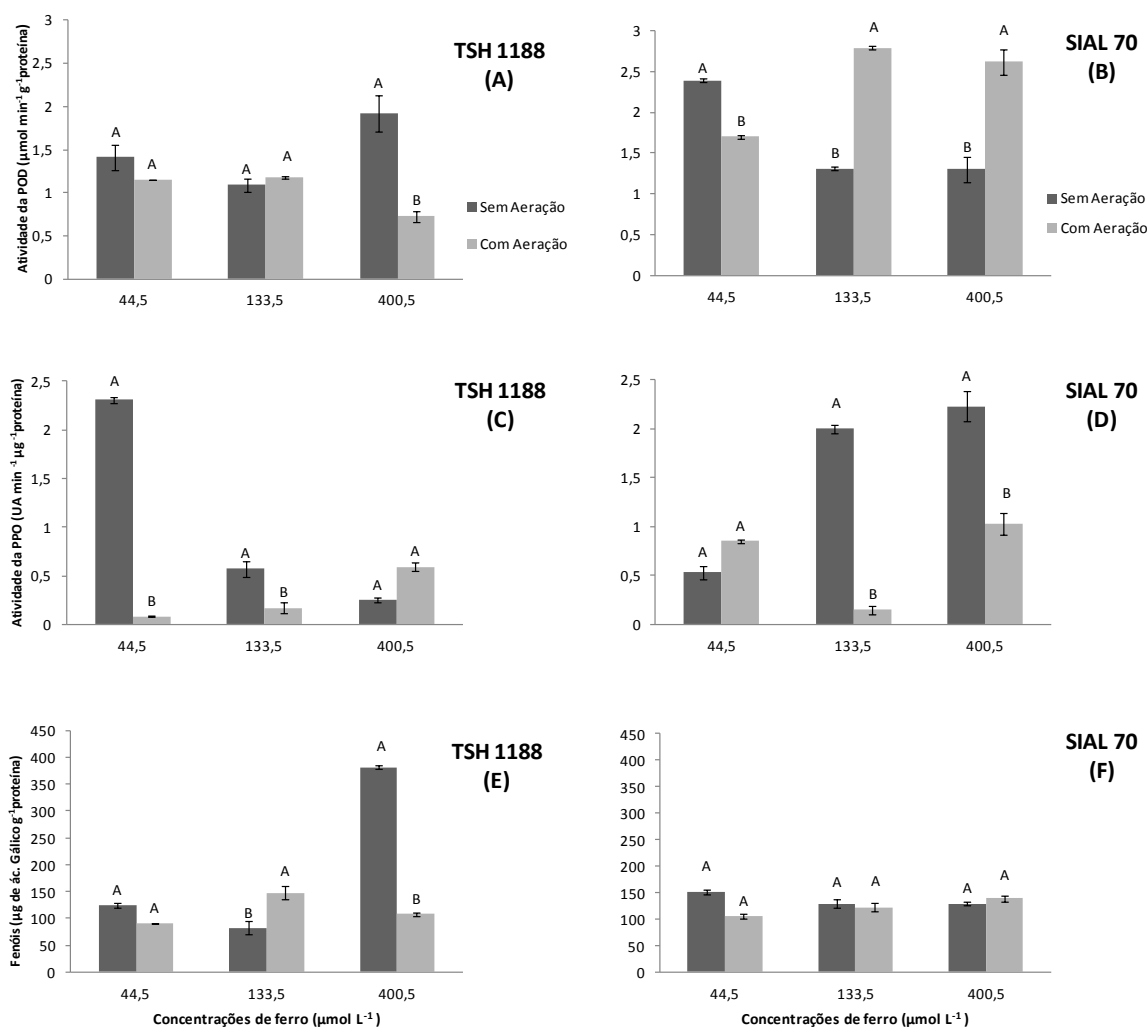


Figura 4. Influência da presença e ausência da aeração sobre a atividade das enzimas peroxidase do guaiacol (POD; A e B), polifenoloxidase (PPO; C e D) e concentração de fenóis solúveis totais (E e F) nos genótipos de cacau TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a diferentes concentrações de ferro em solução nutritiva. Colunas seguidas da mesma letra dentro de cada concentração de ferro não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

Para a atividade da enzima polifenoloxidase (PPO), observou-se aumento de 2787,5 e 235,3% sem aeração nas concentrações 44,5 e 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe para o genótipo TSH 1188, enquanto que com 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe não foram observadas diferenças entre os dois ambientes de cultivo (Figura 4C). No SIAL 70 sem aeração,

a atividade da PPO foi 1233,3 e 116% maior somente nas doses 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ferro, respectivamente (Figura 4D).

Alguns autores têm sugerido que o alagamento pode induzir estresse oxidativo, causando aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's), como superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (YU; RENGEL 1999, YORDANOVA; CHRISTOV; POPOVA, (2004). Estas espécies de oxigênio, cujos níveis são controlados por enzimas antioxidantes tais como peroxidases (FOYER; LELANDAIS; KUNERT, 1994), podem causar graves danos às membranas celulares, DNA e proteínas. A atividade de enzimas antioxidantes, como peroxidases e polifenoloxidasas tem sido muito estudada em plantas como parte dos mecanismos de defesas induzidas, ou em condições de estresse (SIEGEL, 1993; SÁNCHEZ et al.,2000).

A maior atividade da PPO ocorre nos cloroplastos e sua presença em células de tecidos foliares depende do estágio de desenvolvimento, da espécie e da idade, enquanto sua atividade depende de luz (DOGAN; ARSLAN; OZEN, 2005). PPO oxida um amplo grupo de fenóis e a sua atividade pode ser aumentada ou inibida em algumas plantas por estresses bióticos e abióticos (VAUGHN; DUKE, 1984; SÁNCHEZ et al., 2000).

Bertolde (2011), analisando dois clones de cacau tolerante e suscetível ao alagamento, considerou o aumento da atividade da enzima PPO uma estratégia do clone suscetível para adaptar-se ao estresse, o que também deve ter ocorrido no genótipo SIAL 70 utilizado neste estudo que apresentou aumento da atividade dessa enzima. No entanto, os resultados sugerem que a síntese da enzima PPO é reduzida quando os níveis de POD foram aumentados na planta. Desse modo, relacionando a atividade da PPO e POD, provavelmente ocorreu variação na concentração de H_2O_2 nas células das plantas e com isso, variação na atividade dessas enzimas.

Os teores de fenóis solúveis em ambiente sem aeração, na dose 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ferro, reduziram 26,9% para o genótipo TSH 1188, contudo na concentração 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, observou-se aumento de 253,7% em relação ao ambiente com aeração (Figura 4E). Para o genótipo SIAL 70, não foram observadas diferenças nos teores de fenóis solúveis entre ambiente com e sem aeração (Figura 4F).

Os compostos fenólicos são induzidos por vários tipos de estresse (DIXON; PAIVA, 1995), dentre os mecanismos bioquímicos de resistência às doenças estudados em cacau, destacam-se aqueles com participação de compostos fenólicos. Segundo Nojosa et al. (2003), o genótipo TSH 1188, tem elevados níveis de fenóis constitutivos por ser um genótipo considerado resistente a vassoura-de-bruxa, pois os compostos fenólicos fazem parte dos mecanismos estruturais pré-existentes de defesa contra patógenos e insetos (GOMES et al., 2005).

Comparando a atividade da enzima POD entre os genótipos, observou-se que em ambiente sem aeração o genótipo SIAL 70 na concentração $44,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe apresentou atividade 69,5% superior que a do TSH 1188, de maneira contrastante, na maior concentração de Fe o genótipo TSH 1188 apresentou atividade 47,7% maior em relação ao genótipo SIAL 70 (Figuras 5A). Em ambiente com aeração, em todas as concentrações de Fe a atividade de POD foi mais elevada no genótipo SIAL 70, com valores 47,8; 135,5 e 258,9% mais elevados que o TSH 1188, respectivamente (Figura 5B).

O aumento da atividade de POD em ambiente com aeração e PPO em ambiente sem aeração, do genótipo SIAL 70, sugere que essa enzima foi ativada pelo estresse provocado pelo excesso de Fe. Segundo estudos de Nojosa et al. (2003), a atividade de POD para o genótipo TSH 1188, foi considerada pequena em relação a outros 11 genótipos de cacau, no entanto, na mesma pesquisa, analisando o genótipo SIAL 505, apresentou valores elevados mesmo sem nenhuma submissão a estresse. Dessa maneira, em geral a atividade das enzimas antioxidantes esteve maior no genótipo SIAL 70, sugerindo maior estresse oxidativo nesse genótipo, ou seja, maior presença de peróxido e superóxido na planta.

No genótipo TSH 1188 em ambiente sem aeração, foi observada maior atividade (335,8%) da enzima PPO na concentração $44,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe em relação ao genótipo SIAL 70, contudo, nas demais concentrações o comportamento se inverteu, com o SIAL 70 superando o TSH 1188 em 250,9 e 792% nas respectivas concentrações (Figura 5C). Em ambiente com aeração, a atividade de PPO no genótipo SIAL 70 foi 962,5% maior que a do TSH 1188 na menor concentração de Fe, nas demais concentrações não foram observadas diferenças entre os dois genótipos (Figura 5D).

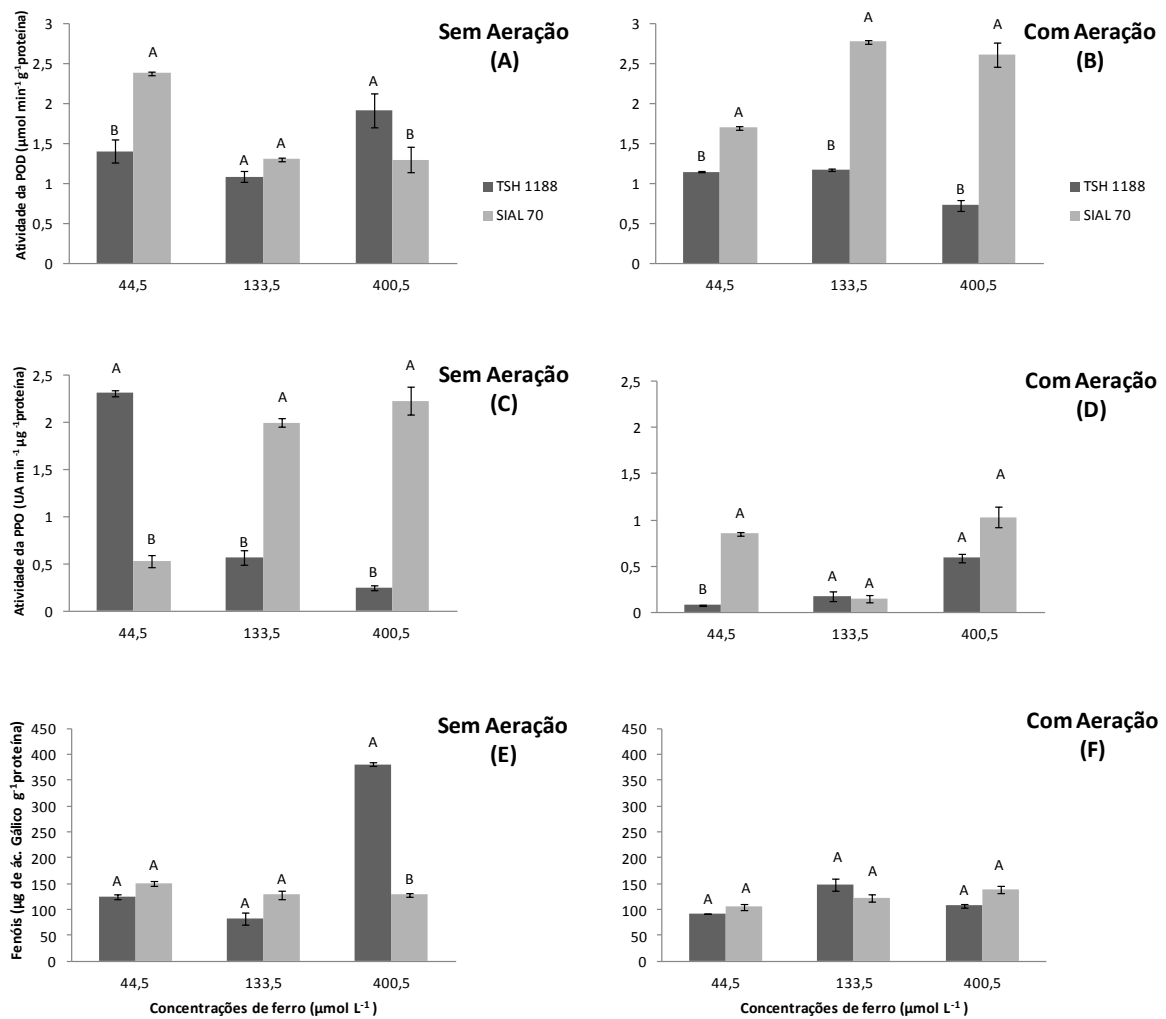


Figura 5. Atividade das enzimas peroxidase do guaiacol (POD; A e B), polifenoloxidase (PPO; C e D) e concentra\u00e7\u00e3o de fen\u00f3is sol\u00faveis totais (E e F) em dois gen\u00f3tipos de cacau, submetidos a diferentes concentra\u00e7\u00f5es de ferro na aus\u00eancia e presen\u00e7a de aera\u00e7\u00e3o em solu\u00e7\u00e3o nutritiva. Colunas seguidas da mesma letra dentro de cada concentra\u00e7\u00e3o de ferro n\u00e3o diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Valores m\u00e9dios de tr\u00eas repeti\u00e7\u00f5es (\pm EP).

Comparando os teores de fen\u00f3is sol\u00faveis totais entre os gen\u00f3tipos nos dois ambientes, observou-se que no gen\u00f3tipo TSH 1188 sem aera\u00e7\u00e3o, na concentra\u00e7\u00e3o $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, esses teores foram 195,2% mais elevados que no SIAL 70 (Figura 5E). Nas demais concentra\u00e7\u00f5es de Fe n\u00e3o foram observadas diferen\u00e7as significativas entre os gen\u00f3tipos, sendo que em ambiente com aera\u00e7\u00e3o os dois gen\u00f3tipos apresentaram teores de fen\u00f3is sol\u00faveis semelhantes (Figuras 5E e F). Apesar do gen\u00f3tipo SIAL 70, ser considerado suscet\u00edvel \u00e0 vassoura-de-bruxa, avalia\u00e7\u00f5es de incid\u00eancia da vassoura-de-bruxa feitas pelo programa de melhoramento do CEPEC/CEPLAC, os clones da s\u00e9rie SIAL apresentaram um n\u00edvel de resist\u00eancia na parte reprodutiva (PIRES et al., 1999), justificando sua semelhan\u00e7a

nos resultados de fenóis com o genótipo TSH 1188, pois segundo Nojosa et al. (2003), altos teores de fenóis constitutivos em cacau estão diretamente ligados à resistência a esse patógeno.

Na concentração 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe sem aeração, observou-se maior atividade de POD para o genótipo TSH 1188, com elevação de 36,2% em relação à concentração recomendada para cacau (44,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$). De maneira contrastante, o genótipo SIAL 70, apresentando redução de 45,2% nas concentrações de 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe em relação à concentração recomendada de Fe (Figura 6A). Em ambiente com aeração, para o genótipo TSH 1188 não foram observadas diferenças na atividade de POD nas diferentes concentrações de Fe, no entanto, o genótipo SIAL 70, apresentou aumento de 63,5 e 54,1% nas concentrações 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente (Figura 6B).

As plantas desenvolvem mecanismos de tolerância nos tecidos foliares a níveis elevados de ferro, um desses mecanismos é a indução do sistema antioxidante que está vinculado à atividade de algumas enzimas que tem papel fundamental em diversas espécies em tolerar altos níveis de Fe, dado que o ferro é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO's), principalmente o radical hidroxila (OH^\cdot) por se ligar a vários pequenos quelantes (STEIN, 2009). No entanto, a ação sincronizada das enzimas antioxidantes é essencial para a remoção das ERO's. Por outro lado, o H_2O_2 que é gerado quando a planta é submetida a certos tipos de estresses, também é tóxico para a célula e a enzima POD tem função desintoxicante (ADAMSKI, 2011).

Com o aumento da atividade da POD no genótipo TSH 1188 em ambiente sem aeração, provavelmente os níveis H_2O_2 produzidos pelo excesso de Fe foram sendo reduzidos por essa enzima, protegendo as células do estresse oxidativo. A adição de altas concentrações de Fe na solução nutritiva estimulou significativamente a atividade de POD em ambiente sem aeração, uma vez que o Fe fica mais disponível para planta em meio com hipóxia. Resultado semelhante também foi encontrado por Adamski (2011), estudando batata-doce em varias concentrações de Fe, verificou que ocorreu redução dos níveis de H_2O_2 quando aumentou a atividade de POD. Em *Ipomoea pes-caprae* também se observou aumento dessa enzima em altas concentrações desse nutriente (CARLI, 2008).

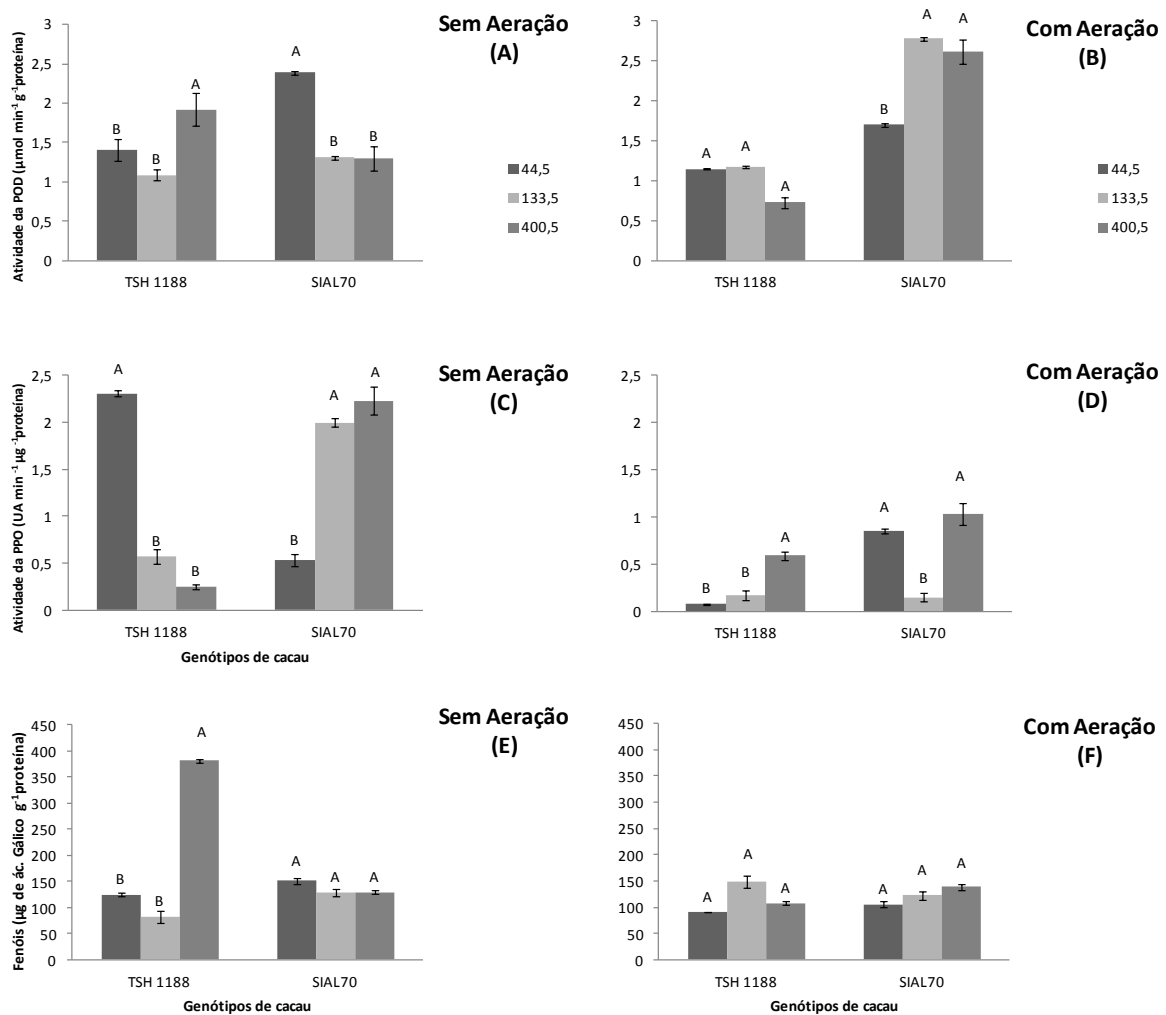


Figura 6. Influência de três concentrações de ferro sobre a atividade das enzimas peroxidase do guaiacol (POD; A e B), polifenoloxidase (PPO; C e D) e concentração de fenóis solúveis totais (E e F) em dois genótipos de cacau na ausência e presença de aeração em solução nutritiva. Colunas seguidas da mesma letra dentro de cada genótipo não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Valores médios de três repetições ($\pm EP$).

Geralmente, a indução da atividade da POD, ocorre em resposta à absorção de níveis tóxicos de metais. Vários estudos têm comprovado que a enzima POD é induzida em raízes e folhas de várias espécies após a aplicação de doses fitotóxicas de Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , e Pb^{2+} (VAN ASSCHE; CLIJSTERS 1990; FANG; KAO, 2000; GALLEG0; BENAVIDES; TOMARO, 1996; SINHA; SAXENA, 2006). Como observado nesse estudo, o aumento da atividade de POD também foi reportado em folhas de *Eugenia uniflora* e *Solanum tuberosum* cultivadas em solução com altas concentrações de Fe (FANG; KAO, 2000; NEVES et al., 2009; CHATTERJEE;

GOPAL; DUBE, 2006). No entanto, o genótipo SIAL 70 apresentou resultado contrário, com redução da atividade dessa enzima à medida que se aumentou as concentrações de Fe em ambiente sem aeração. Essa contrariedade nos resultados da atividade enzimática de POD, também foi encontrada por Kovácik; Klejdus; Hedbavny, (2010), Xu et al. (2012) e Tamás; Huttová; Mistrík, (2002). Kovácik; Klejdus; Hedbavny, (2010), ao estudar *Matricaria chamomilla* verificou aumento da POD nas cultivares tolerantes ao Alumínio (Al), no entanto, Xu et al. (2012) e Tamás; Huttová; Mistrík, (2002) ao estudar *Triticum aestivum* e *Zea mays* encontraram aumentos da POD em genótipos suscetíveis a Al.

Para a atividade enzimática de PPO, no genótipo TSH 1188 em ambiente sem aeração, observou-se reduções de 75,3 e 89,2% nas concentrações mais elevadas de Fe, respectivamente. Já o genótipo SIAL 70 aumentou a atividade dessa enzima 277,3 e 320,7% nas concentrações 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe (Figura 6C). Em ambiente com aeração, no genótipo TSH 1188 observou-se que atividade de PPO foi 637,5% maior na concentração mais elevada de Fe em relação à concentração recomendada. No entanto, o genótipo SIAL 70, reduziu em 82,3% a atividade dessa enzima na concentração 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe (Figura 6D).

Neste estudo observou-se que a atividade das enzimas antioxidantes POD e PPO, apresentaram resultados sincronizados aos estresses submetidos, ou seja, quando uma enzima estava com atividade elevada a outra se apresentava menos ativa, exceto, para o genótipo SIAL 70 com aeração na concentração 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe.

Outra possibilidade seria as próprias ERO'S produzidas com o acúmulo excessivo de Fe nos compartimentos celulares que poderiam ter contribuído para inativação ou até mesmo degradação dessas enzimas (CASANO et al., 1997). A diminuição da atividade da POD e PPO em alguns tratamentos pode indicar que sua atividade foi estimulada pelo aumento do Fe nos tecidos. Porém, o estresse causado pela maior concentração de Fe no genótipo SIAL 70 pode ter potencializado a redução da sua atividade, como verificado por Gallego; Benavides; Tomaro, (1996) em folhas de girassol expostas a altas concentrações de ferro, e Sinha e Saxena (2006), em folhas de *Bacopa monnieri* expostas a concentrações crescentes de Fe.

Neste estudo, observou-se que os dois genótipos se comportam de maneiras distintas aos dois estresses submetidos, e sugerem que a atividade enzimática depende não apenas da espécie vegetal/cultivar e fase de desenvolvimento (SIEGEL, 1993), mas também do grau de toxicidade.

O genótipo TSH 1188 apresentou teores de fenóis solúveis 205,1% maiores na concentração $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe em ambiente sem aeração, em contrapartida, em ambiente com aeração não foram observadas diferenças entre as concentrações de Fe nos dois genótipos (Figura 6 E e F).

O aumento da atividade antioxidante e fenóis podem ter estimulado o crescimento vigoroso do genótipo TSH 1188 na maior dose de Fe (Figura 30), sugerindo que esse genótipo possui características que o levam a ter um sincronismo das respostas ao estresse por Fe, visto que a forma que as plantas lidam com os estresses é um fator que determina o seu sucesso de crescimento e estabelecimento no meio ambiente.

4.2 ÍNDICE DE CLOROFILA

De modo geral a evolução dos índices de clorofila *a*, *b* e *total* dos genótipos TSH 1188 e SIAL 70 em função do tempo, em condições com e sem aeração, diferiu para cada concentração de ferro utilizada (Figuras 7, 8 e 9). No TSH 1188 sem aeração (Figuras 7A, 8A e 9A), embora seus valores fossem mais elevados na concentração $44,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, os três tipos de clorofila não sofreram alterações significativas com o decorrer do tempo, exceto para a clorofila *b* na concentração $44,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, que apresentou aumento linear alcançando valores 13,1% maiores que os iniciais no final do período de recuperação (35º dia). Já em ambiente com aeração (Figuras 7B, 8B e 9B), esse mesmo genótipo apresentou, na maioria das vezes, aumentos lineares nos índices de clorofila *a*, *b* e *total* em função do tempo, exceto na concentração mais baixa para as clorofilas *a* e *total*, cujo aumento foi quadrático. Aos 35 dias, os valores desses índices nas concentrações 44,5; 133,5 e $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, aumentaram 10,0; 7,8 e 13,3% para a clorofila *a*; 26,9; 24,7 e 82,5% para a clorofila *b*; e 12,6; 10,4 e 24,2% para a clorofila *total*, respectivamente.

Para o genótipo SIAL 70, nas concentrações 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, o índice de clorofila *a* diminuiu 23,5 e 11,4% aos 20,9 e 19,5 dias sem aeração, sendo que a partir daí observou-se aumento nesse índice, recuperando 87,1 e 95,8% dos valores iniciais no 35º dia (Figura 7C). Já os índices das clorofilas *b* e *total* (Figuras 8C e 9C), somente apresentaram reduções na concentração 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da ordem de 39,7 e 26,4% aos 21,9 e 21,2 dias, com recuperação parcial de 74,4 e 84,9% dos valores iniciais aos 35 dias, respectivamente. No ambiente com aeração, aos 19,1 dias o índice de clorofila *a* do SIAL 70 na concentração 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe diminuiu 8,9%, ao passo que com 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe a redução aos 18,1 dias foi 19,6% (Figura 7D). Para os índices de clorofilas *b* e *total* do mesmo genótipo, somente ocorreu redução significativa de 53,2 e 25,2% na maior concentração, por volta dos 18,5 dias, quando novamente se verificou aumento desses índices, atingindo, ao final do período experimental, 86,4 e 95,5% dos valores registrados no tempo zero (Figuras 8D e 9D).

As mudanças que ocorrem no ambiente promovem estresses sobre as plantas, podendo causar efeitos negativos no seu desenvolvimento (PELL; ECKART; GLICK, 1994). Alteração na atividade fotossintética tem sido relatada na presença de metais pesados, incluindo o Fe (SOLTI et al., 2008; JIANRONG; QIRAN, 2009; NENOVA, 2009). Apesar de seu excesso causar danos intensos para o tecido vegetal, as plantas necessitam desse nutriente que intracelularmente é um catalisador para a síntese da clorofila (EPSTEIN, 1975). O Fe intracelular encontra-se aproximadamente 40% nas células fotossintetizantes, pois é essencial na biossíntese da molécula Heme dos citocromos e da molécula de clorofila (BRIAT; CURIE; GAUMARD, 2007; JEONG; CONNOLLY, 2009).

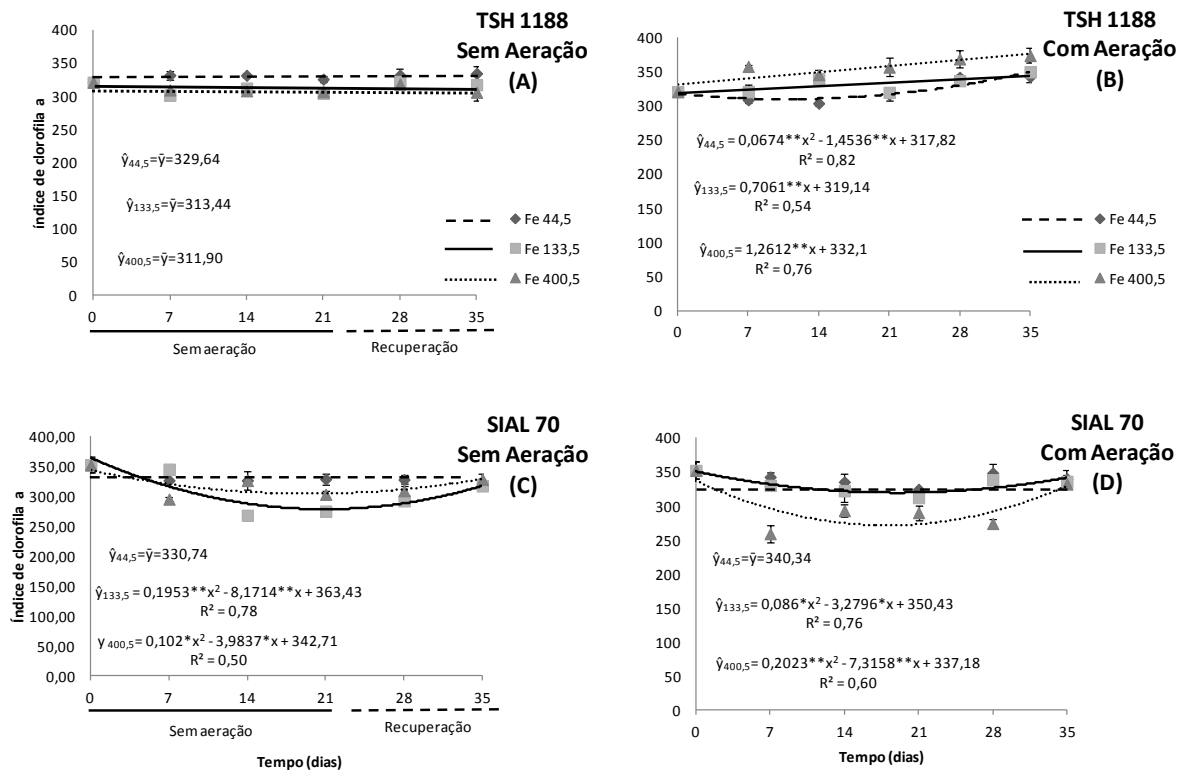


Figura 7 – Influência de diferentes concentrações de Fe (44,5; 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a evolução do índice de clorofila a em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 (A e B) e SIAL 70 (C e D), com e sem aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

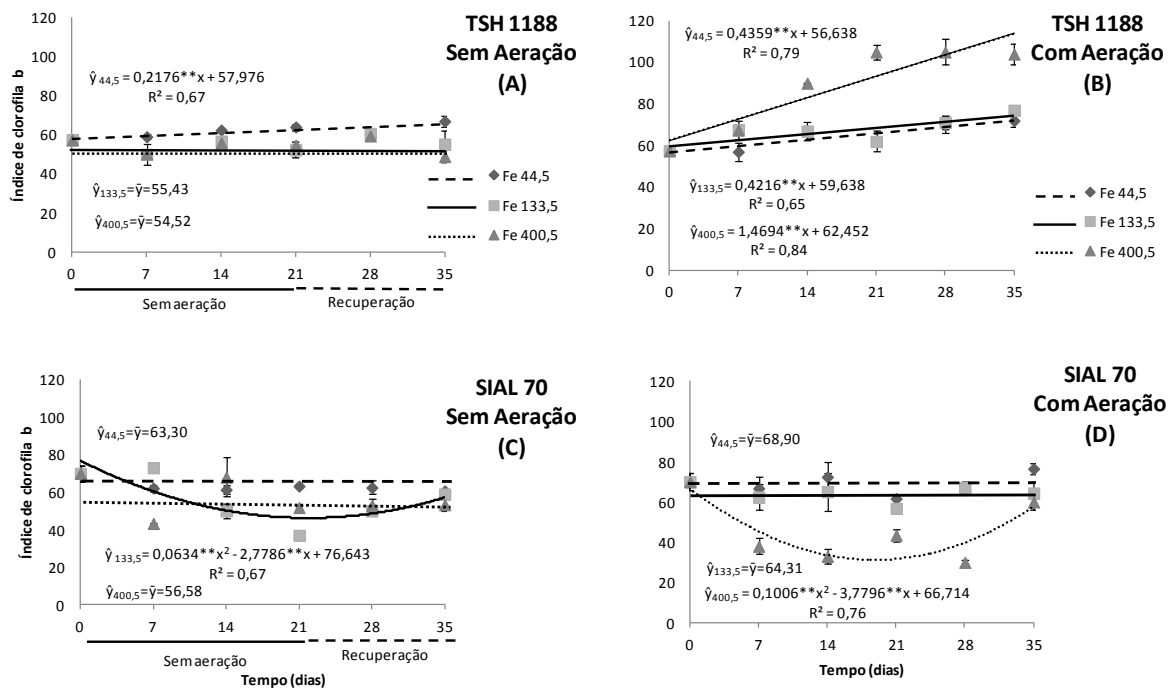


Figura 8 - Influência de diferentes concentrações de ferro (44,5; 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a evolução do índice de clorofila b em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 (A e B) e SIAL 70 (C e D), com e sem aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

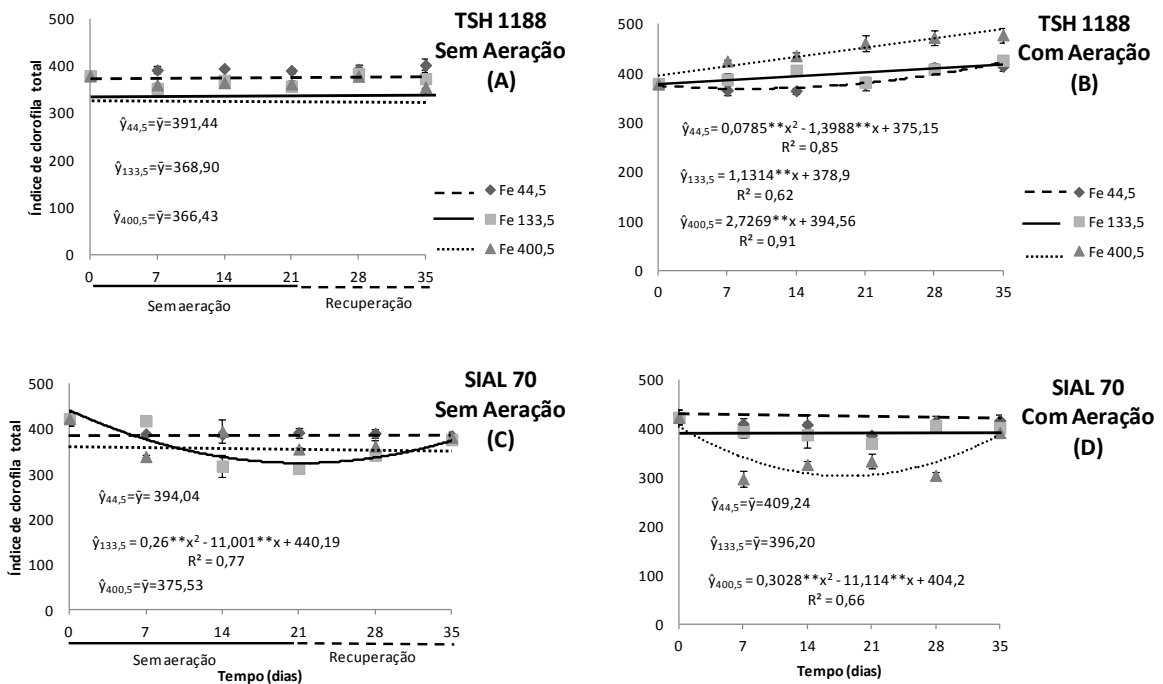


Figura 9 - Influência de diferentes concentrações de ferro (44,5; 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a evolução do índice de clorofila *total* em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 (A e B) e SIAL 70 (C e D), com e sem aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

No entanto, seu excesso como descrito anteriormente, potencializa o estresse oxidativo, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's). As ERO's podem ser altamente destrutivas, levando a severas lesões nos componentes celulares (SMIRNOFF, 1993) e a uma diversidade de alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (FANG et al., 2001), como exemplo as alterações na fotossíntese, a inibição do crescimento e a diminuição da concentração de clorofila (CHATTERJEE; GOPAL; DUBE, 2006).

Contudo, com o tempo o excesso do Fe para o genótipo TSH 1188 sem aeração não apresentou diferenças entre os índices de clorofila, embora tenha apresentado redução em função do incremento do Fe. Resultados semelhantes foram obtidos por Mothé, (2012), analisando dois cultivares de *Ricinus communis* L., não ocorreram diferenças significativas na estimativa do teor de pigmentos de clorofila, quando avaliada pela intensidade de cor verde em função do incremento do Fe. Sinha; Gupta; Chandra, (1997) e Kampfenkel; Montagu; Inzé, (1995), trabalhando com plantas expostas a Fe em solução nutritiva, também não obtiveram aumentos significativos no conteúdo de clorofila das plantas expostas a esse nutriente mineral.

Campos (2014), também não observou diferenças nos pigmentos fotossintéticos nas plantas de *Coffea canephora* quando submetidas a diferentes concentrações de Fe.

Embora estudos relatem que os metais podem modificar os processos funcionais das plantas causando, dentre outros efeitos, a degradação da clorofila (DING et al., 2007), no presente trabalho não foram observadas diferenças significativas para os teores de pigmentos entre os tratamentos para esse genótipo TSH 1188 em ambiente sem aeração. Esses resultados corroboram com de Shainberg et al. (2000), que também não obtiveram diferenças para esses parâmetros entre os indivíduos de *Phaseolus vulgaris* tratados com excesso de ferro.

Não obstante, para o genótipo SIAL 70, observou-se redução do índice de clorofila ao longo do tempo após exposição a elevadas concentrações de Fe. A degradação da clorofila pode ser a consequência de estresse oxidativo produzido pelo excesso de íons férricos livres após a absorção (SINHA; GUPTA; CHANDRA, 1997; BECANA; MORAN; ITURBE-ORMAETXE, 1998), corroborando com a elevada atividade das enzimas antioxidantes encontrada neste estudo (Figuras 4, 5 e 6), confirmando assim o estresse oxidativo, uma vez que os radicais livres podem oxidar a clorofila e reduzir sua concentração na célula (MONTEIRO; WINTERBOURN, 1988).

Carli, (2008), observou que os teores de clorofila *a* e *b* diminuíram gradativamente quando as plantas de *Ipomoea pes-crapae* foram expostas a concentrações crescentes de Fe no período de sete dias. A redução da clorofila também foi reportada em girassol e *Eugenia uniflora* expostas a altas concentrações de Fe (GALLEGO; BENAVIDES; TOMARO, 1996; NEVES et al., 2009).

A produtividade da planta pode ser reduzida com diminuição da clorofila, uma vez que elas estão diretamente envolvidas na captação de energia para a fotossíntese. Chatterjee; Gopal; Dube, (2006) reportaram um decréscimo de clorofila em folhas de plantas expostas a elevadas doses de Fe, tendo como consequência decréscimos na produtividade de biomassa. Esse resultado está de acordo com o presente estudo, sendo que as plantas do genótipo SIAL 70 apresentaram menor crescimento na concentração mais elevada de Fe em ambiente com aeração (Figura 30).

No entanto, o genótipo TSH 1188 com aeração aumentou o índice de clorofila nas concentrações elevadas de Fe. Esse resultado também foi encontrado por Nenova (2009), para ervilha em presença de altas concentrações desse nutriente. De acordo com Briat, Curie e Gaumard (2007), o Fe, dentre outros processos, é essencial na biossíntese da molécula de clorofila, o que poderia justificar o aumento do índice neste trabalho. O aumento do índice de clorofila sugere aproveitamento do Fe disponível na biossíntese da clorofila.

Ao comparar o efeito do arejamento sobre os índices das clorofilas no decorrer do tempo, observa-se que, com exceção da dose $44,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, no genótipo TSH 1188, todas as outras foram menores no ambiente sem aeração do que com aeração (Figuras 10, 11 e 12), sendo que as diferenças foram mais acentuadas na concentração maior de Fe ($400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Nessa concentração de Fe, verificou-se aumento linear, em média de 14,4; 71,1 e 23,3% maiores em plantas com aeração nos índices das clorofilas *a*, *b* e *total* respectivamente (Figuras 10E, 11E e 12E).

Para o SIAL 70, não houve alterações significativas das clorofilas no decorrer do tempo, tanto em ambiente sem aeração como com aeração na menor concentração de Fe (Figuras 10B, 11B e 12B). Na concentração intermediária de Fe, embora não fossem detectadas alterações significativas com o passar do tempo, os índices das clorofilas *b* e *total* foram maiores em condições com aeração na maior parte do período experimental, sendo que para a clorofila *b* decaíram 22,6% aos 21,9 dias, com recuperação de 74,7% dos valores iniciais no 35º dia. Já a clorofila *total* reduziu apenas 8% em relação ao ambiente com aeração aos 21,3 dias, recuperando 84,9% ao final de período de recuperação (35º dia) (Figuras 11D e 12D). No entanto, na maior concentração de Fe, em média as clorofilas *a*, *b* e *total* sem aeração apresentaram-se 7,3; 36,1 e 12,4% superiores ao ambiente com aeração, respectivamente (Figura 10F, 11F e 12F).

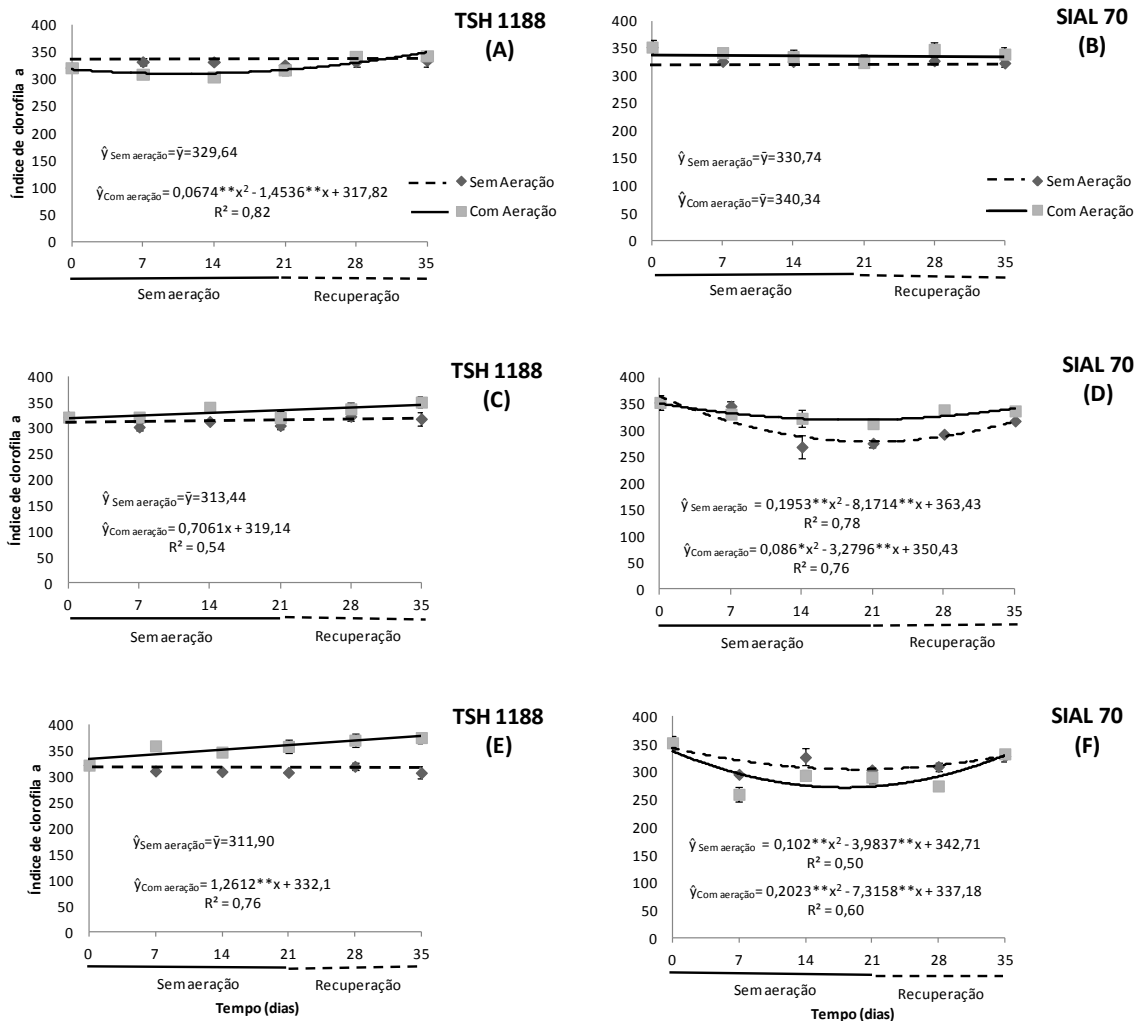


Figura 10 - Influência da presença e ausência da aeração sobre a evolução do índice de clorofila *a* em função do tempo, em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F) em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

A participação do O_2 na respiração aeróbica como acceptor final de elétrons na fosforilação oxidativa, na geração de ATP e regeneração de NAD^+ , e em várias rotas biossintéticas é crucial para a síntese de clorofila, ácidos graxos e esteróis (DENNIS et al., 2000). A determinação dos teores de clorofila em folhas é extremamente importante, pois a atividade fotossintética da planta depende da capacidade da folha para absorver luz (MARENCO; LOPES, 2005).

Segundo Patel et al. (2014), o alagamento ocasiona alterações na síntese de clorofila, embora o alagamento cause essa redução no teor de clorofila, devido a sua

degradação, as plantas sem aeração do genótipo TSH 1188 não apresentaram diferenças ao longo do tempo.

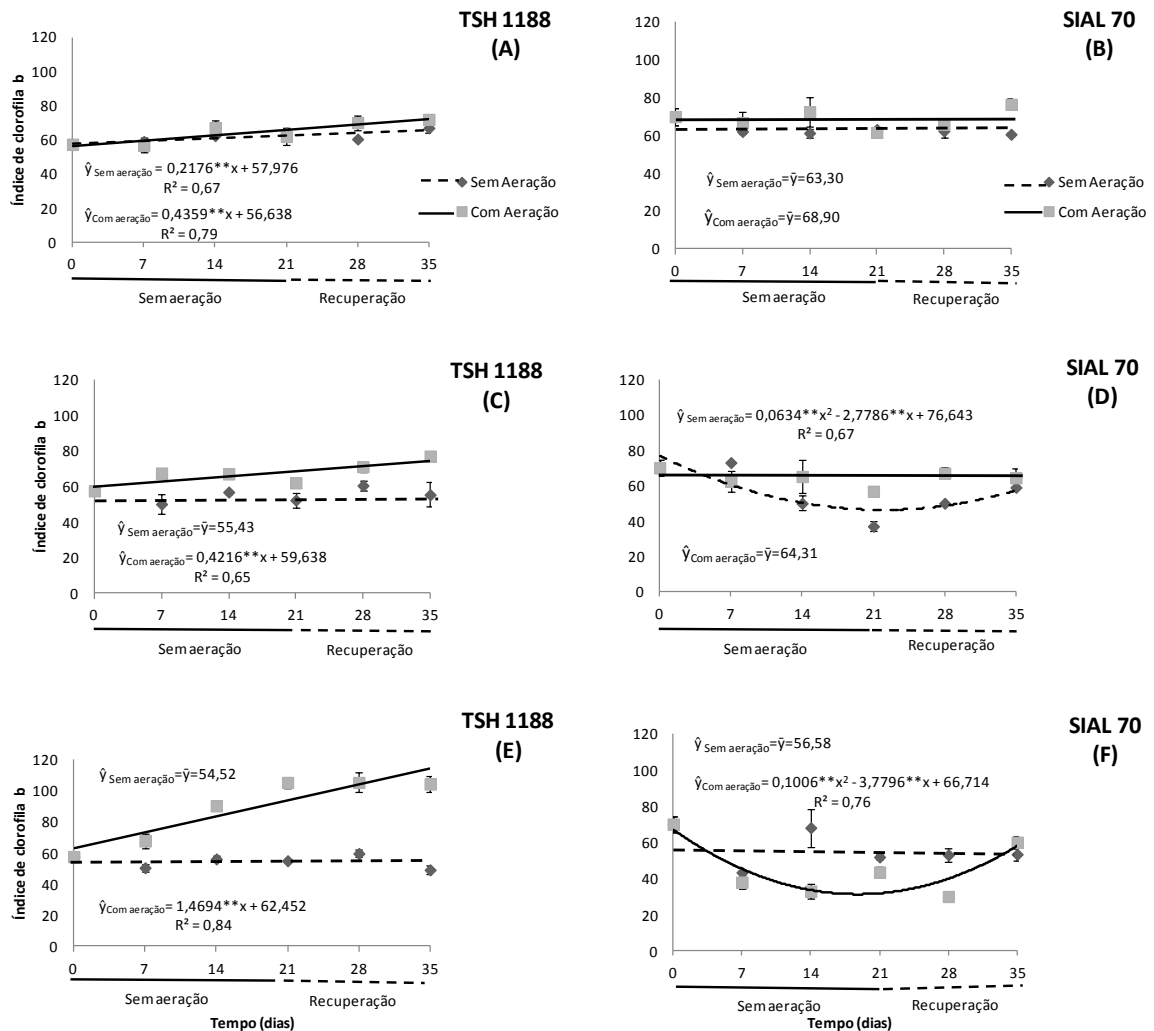


Figura 11 - Influência da presença e ausência da aeração sobre a evolução do índice de clorofila *b* em função do tempo, em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 µmol L⁻¹ (E e F) em solução nutritiva. Valores médios de três repetições (±EP).

Em geral, no presente estudo o índice de clorofila foram maiores no ambiente com aeração. Resultado semelhante foi encontrado por Branco (2010), observou que o alagamento do solo reduziu o teor de clorofila *a* e *b* e *total* nos dois genótipos de cacau estudados. Pezeshki; Pardue; DeLaune, (1996) também observaram resultados semelhantes ao estudarem espécies arbóreas em condição de solo

alagado. Em plântulas de *Erythrina variegata*, a diminuição no conteúdo de clorofilas também foi detectada por Muthuchelian et al. (1995), após 10 dias de inundação.

Os índices de clorofila foram maiores no ambiente com aeração, corroborando com os resultados de Branco (2010), que observou que o alagamento do solo reduziu o teor de clorofila *a* e *b* e *total* em dois genótipos de cacau, TSH-774 e TSA-792.

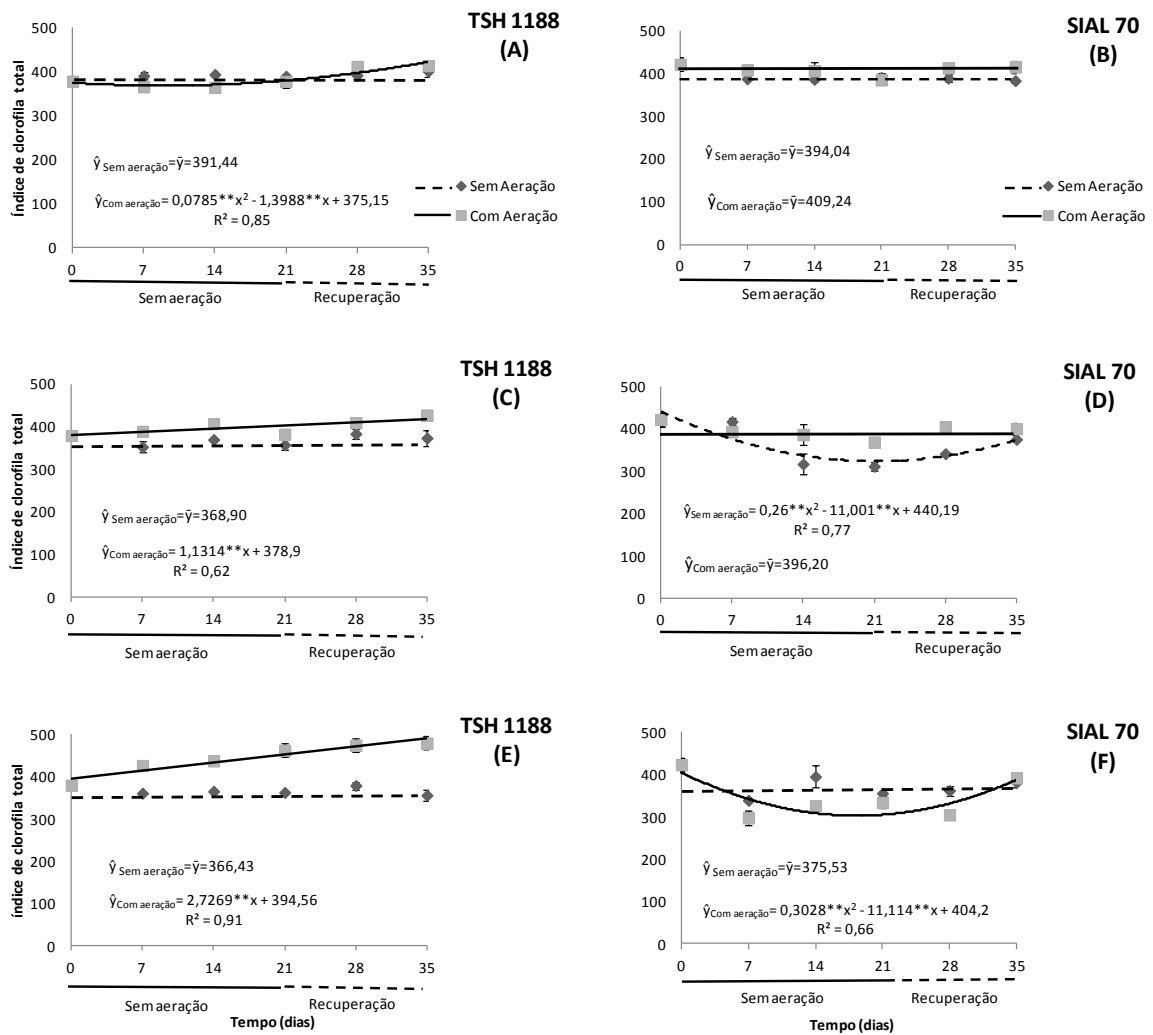


Figura 12 - Influência da presença e ausência da aeração sobre a evolução do índice de clorofila *total* em função do tempo, em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F) em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

Para Bertolde (2011), o início do alagamento não ocasionou prejuízo para os teores de clorofilas, no entanto aos 30 dias após a aplicação do alagamento, ocorreram quedas significativas nas plantas alagadas comparadas com não alagadas. A

diminuição da concentração de pigmentos fotossintéticos tem sido interpretada como uma resposta em longo prazo para alagamento (SMETHURST; SHABALA 2003), uma vez que sua baixa concentração limita o processo fotoquímico, pois a absorção de radiação depende de seu conteúdo (PEZESHKI; PARDUE; DeLAUNE, 1996).

No entanto, para o genótipo SIAL 70 os índices de clorofila *a*, *b* e *total* foram maiores em ambiente sem aeração, contudo essa resposta de acumulação de clorofila provavelmente está correlacionada com o excesso de Fe e a falta de arejamento, uma vez que esse aumento se deu apenas na maior concentração de Fe. Nesse sentido, e considerando que o Fe é essencial para biossíntese dessa molécula, vale ressaltar que em ambiente sem aeração (alagado) sua disponibilidade é potencializada, o que sugere que esse genótipo aproveitou o Fe disponível para a biossíntese dessa molécula (BRIAT; CURIE; GAUMARD, 2007), apesar do estresse oxidativo causado.

As comparações dos índices de clorofila *a*, *b* e *total* entre os genótipos TSH 1188 e SIAL 70 no decorrer do tempo, encontram-se nas Figuras 13, 14 e 15. Em condições de ausência de aeração, praticamente não ocorreram diferenças intergenotípicas nesses três índices para o TSH 1188, contudo, observou-se aumento linear significativo apenas no índice de clorofila *b* na concentração 44,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, que atingiu no 35º dia um aumento de 13,1% com valor similar ao do SIAL 70 (Figura 13A). Já o SIAL 70 nas concentrações 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe apresentou, diminuição da ordem de 23,5 e 11,4% aos 20,9 e 19,5 dias para a clorofila *a*, recuperando a seguir esses índices que alcançaram no final 87,1 e 95,8% dos respectivos valores iniciais, equiparando-se com os do TSH 1188. Nas clorofilas *b* e *total* essa redução somente ocorreu na concentração intermediária de Fe, correspondendo a 39,7% aos 21,9 dias para a clorofila *b* e 26,4% aos 21,2 dias para a clorofila *total*. No entanto, no 35º dia recuperaram 74,4 e 84,9% dos valores das respectivas clorofilas mensurados antes de iniciar o período de sem aeração, igualando-se assim com os do genótipo TSH 1188.

Em ambiente com aeração as maiores diferenças intergenotípicas foram observadas na concentração 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em que o genótipo TSH 1188 apresentou comportamento linear para todos os índices de clorofila e superou, significativamente, o SIAL 70 durante todo o período experimental, especialmente

nos índices de clorofila *b* e *total* (Figuras 13F, 14F e 15F). Aos 35 dias os índices de clorofila *a*, *b* e *total* foram superiores no TSH 1188 em 11,6, 97,5 e 26,9% em relação ao SIAL 70, respectivamente.

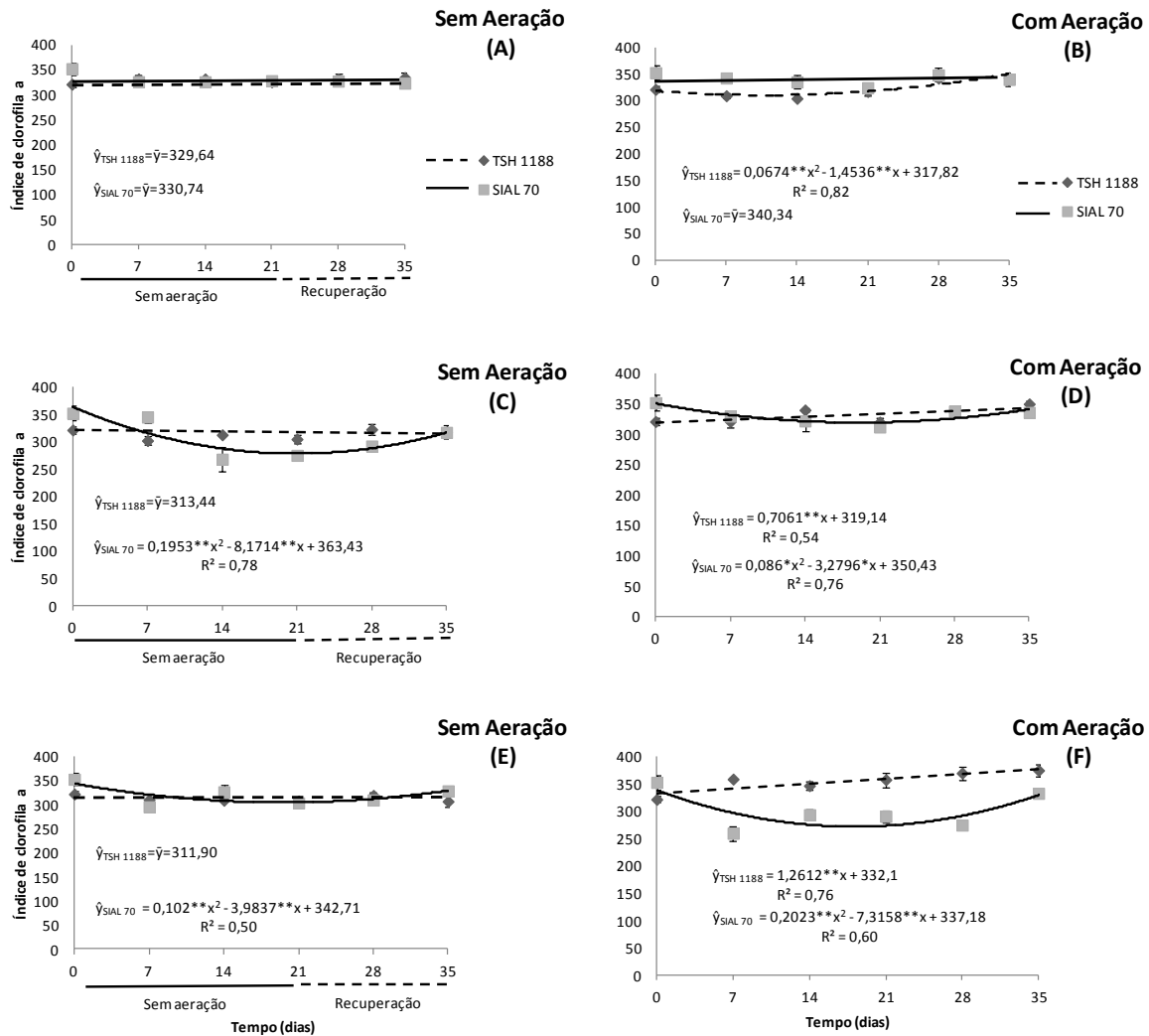


Figura 13 - Evolução do índice de clorofila *a* em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F), na presença e ausência de aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

Neste estudo, os genótipos apresentaram diferenças intergenotípicas na forma de lidar com o estresse de ausência de arejamento e excesso de Fe. Silveira (2011), estudando dois cultivares de *Coffea arábica* L., Mundo Novo IAC 379-19 e Catuaí Vermelho IAC 44, também verificou que os cultivares comportaram-se de forma diferente ao estresse por alagamento, onde o cultivar Mundo Novo apresentou

menores teores de clorofila em ambiente alagado em relação ao cultivar Catuaí. Stein (2009), analisando dois cultivares de arroz, também observou diferenças intergenotípicas nos índices de clorofilas *a*, *b* e *total*, onde o cultivar IRGA 420 apresentou maiores teores de clorofilas que o cultivar BR-IRGA 420 sob excesso de Fe.

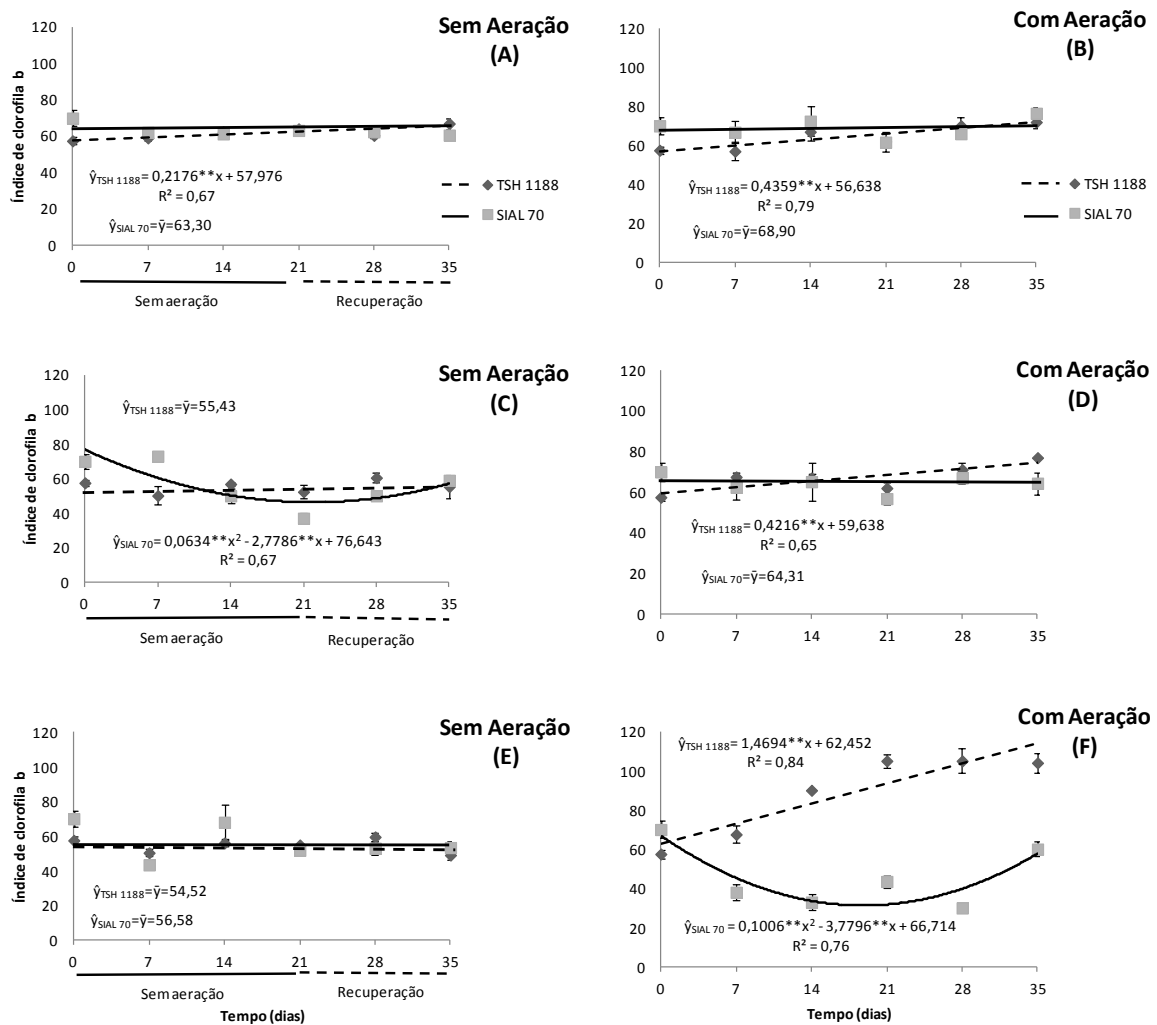


Figura 14 - Evolução do índice de clorofila *b* em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 μmol L⁻¹ (E e F), na presença e ausência de aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições (±EP).

Quando as espécies *Schinus terebinthifolius* e *Sophora tomentosa* foram expostas ao ferro, ambas as espécies responderam, diferentemente, a esses tipos de estresse. Em *S. tomentosa*, houve diminuição na fotossíntese, redução no conteúdo

de clorofila e aumento no teor de Fe no tecido, já *S. terebinthifolius* apresentou aumento no conteúdo de clorofila, não ocorreu aumento no teor de Fe, consequentemente, não se observou estresse oxidativo e máxima eficiência do fotossintema II e no transporte de elétrons (KUKI et al., 2008). Esses resultados estão de acordo com Lee (1988), estudos realizados evidenciaram que o teor de clorofila varia muito entre as espécies, assim como entre genótipos de uma mesma espécie.

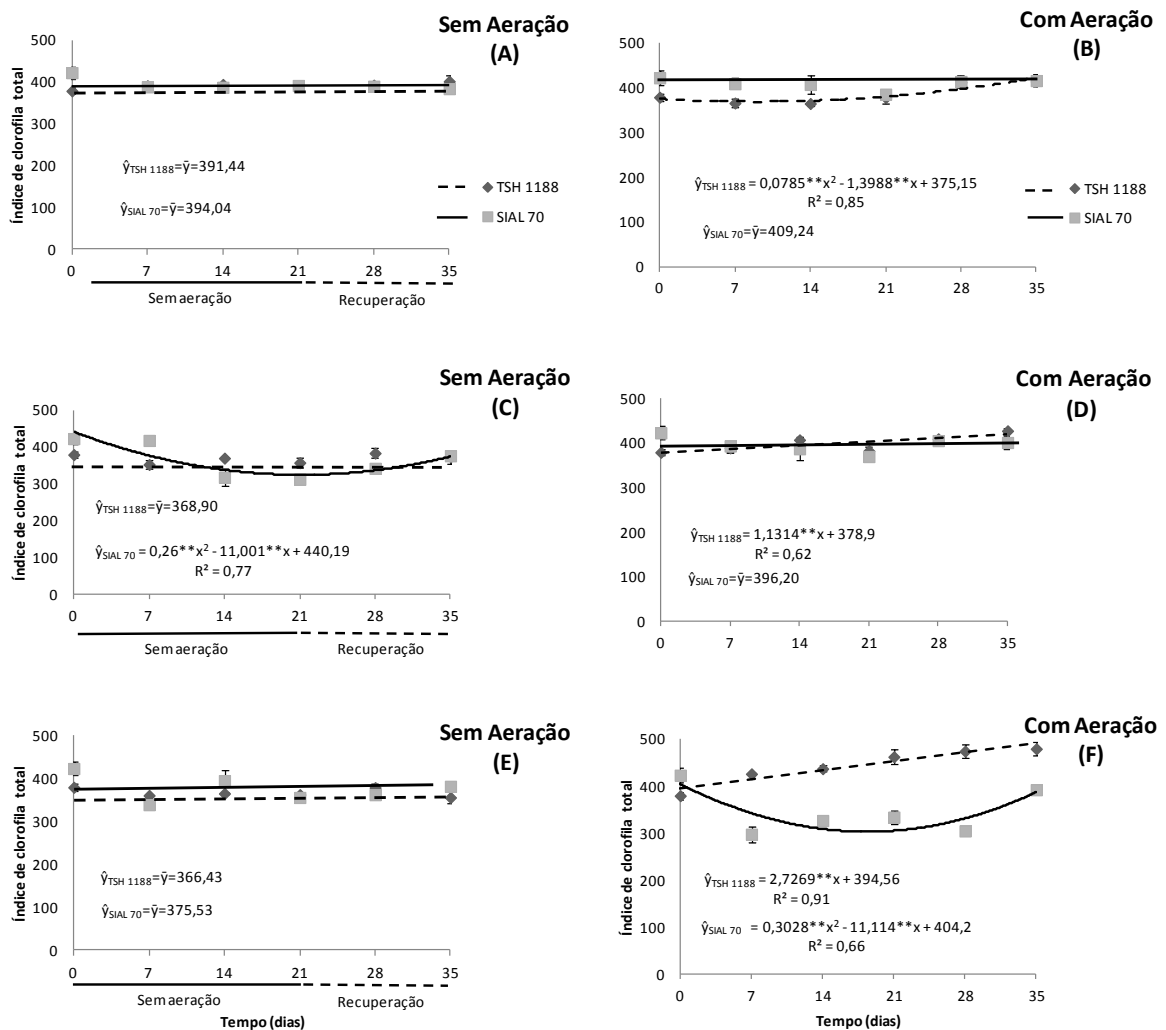


Figura 15 - Evolução do índice de clorofila *total* em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F), na presença e ausência de aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

4.3 TROCAS GASOSAS

As taxas fotossintéticas dos genótipos TSH 1188 e SIAL 70 em função do tempo foram influenciadas pelas concentrações de Fe utilizadas, tanto em ambiente sem e com aeração (Figura 16). Na concentração $44,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, as taxas fotossintéticas de ambos genótipos na ausência e presença de aeração não tiveram alterações significativas no decorrer do tempo. No entanto, nas doses $133,5$ e $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram verificadas reduções de $59,9$ e $45,0\%$ aos $18,8$ e $18,1$ dias no TSH 1188 sem aeração, respectivamente. Posteriormente, ao final do período de recuperação as plantas desse genótipo restauraram 85 e $94,1\%$ das taxas fotossintéticas encontradas antes do desligamento da aeração (Figura 16A). De maneira contrastante, para todas as concentrações de Fe não foram observadas alterações significativas ao longo do tempo no TSH 1188 em ambiente com aeração, embora a taxa fotossintética média fosse $11,2$ a $13,8\%$ mais elevada na dose $44,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe (Figura 16B).

No genótipo SIAL 70 sem aeração, a concentração intermediária de Fe promoveu aumento linear na taxa fotossintética, atingindo um valor $41,3\%$ mais elevado no 35° dia, enquanto que na maior concentração ocorreu decréscimo de $29,4\%$ aos $14,6$ dias, seguido de um aumento que ao final do experimento ultrapassou em $28,2\%$ a taxa fotossintética inicial (Figura 16C). Em ambiente com aeração o SIAL 70 não apresentou alterações significativas na evolução das taxas fotossintéticas nas concentrações $44,5$ e $133,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, em contrapartida, com $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ houve redução de $46,7\%$ aos $17,6$ dias, seguida de um aumento que aos 35 dias restaurou quase totalmente ($98,7\%$) a taxa fotossintética inicial (Figura 16D).

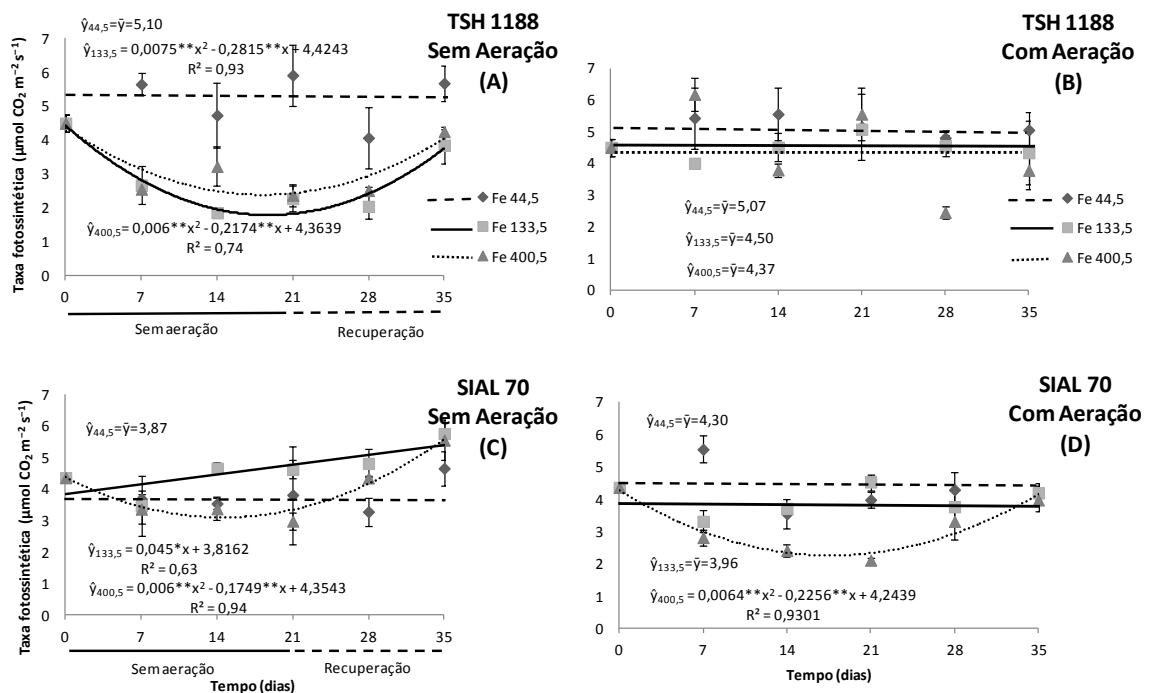


Figura 16 – Influência de diferentes concentrações de ferro (44,5, 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a taxa fotossintética (A) em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 (A e B) e SIAL 70 (C e D), na presença e ausência de aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

A compartimentalização do Fe pode provocar uma variedade de alterações na etapa fotoquímica da fotossíntese. Nas folhas, grande parte do Fe é acumulada no mesofilo, especificamente em tecidos fotossintetizantes, absorvendo cerca de 40% do Fe que é armazenando nos cloroplastos (BRIAT; CURIE; GAUMARD, 2007). Com esse armazenamento, seu acúmulo pode causar danos primeiramente nessa organela promovendo alterações em processos fisiológicos cruciais para o desenvolvimento da planta como a fotossíntese (KIM; JUNG, 1993; SUH et al., 2002). O mecanismo fotossintético é bastante sensível a estresses bióticos e abióticos, sua alteração pode ocorrer mesmo quando a planta não apresente sintomas visuais (MORAES, DELITTI; MORAES, 2000).

Neste estudo, ocorreu concordância nos resultados de taxas fotossintéticas, condutância estomática e transpiração para ambos os genótipos em concentrações diferentes de Fe, exceto para o genótipo TSH 1188 com aeração (Figuras 16, 19 e 22). A redução da taxa fotossintética com aumento das concentrações de Fe pode ser observada nos dois genótipos, exceto o SIAL 70 sem aeração. O decréscimo da

taxa fotossintética também foi observada em *Ipomoea pes-caprae* nas diferentes concentrações de Fe, após sete dias de aplicação dos tratamentos (CARLI, 2008).

Essas reduções na taxa fotossintética podem ser atribuídas a limitações não estomáticas, uma vez que, não foi observado redução da concentração interna de CO₂. A queda da taxa fotossintética ocasionada por limitações não estomáticas, são determinadas pela inativação parcial de Rubisco, bem como pela quantidade desta enzima (RIBEIRO; MACHADO, 2007).

Adamski (2011), estudando os efeitos do Fe em batata-doce observou que nos tratamentos com altas concentrações de Fe (níveis acima do recomendado) ocorreram reduções significativas na taxa fotossintética quando comparado ao tratamento controle. Esse mesmo autor sugeriu que a redução se deu por baixa formação do poder redutor (NADPH₂ e ATP) e, ou, com o comprometimento de algumas reações de carboxilação, pois o mesmo relacionou seus resultados com a captura, absorção e aproveitamento da energia luminosa mais eficiente, e supõe que os elétrons da cadeia de transporte tenham potencializado a formação de ERO's, principalmente na forma de O₂¹ (oxigênio singlete) (BOWLER; MONTAGU; INZÉ, 1992), que segundo Triantaphylides e Havaux (2009), é mais reativo que o O₂^{•-} e o H₂O₂. As ERO's podem ser altamente destrutivas, pois lesionam seriamente vários componentes celulares, dentre eles, lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos, levando a uma diversidade de alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (EATON; QIAN, 2002), comprometendo assim, o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Esse comprometimento no crescimento pode ter ocorrido no genótipo TSH 1188 na concentração 133,5 µmol L⁻¹ de Fe sem aeração, uma vez que sua taxa fotossintética foi baixa.

No entanto, o genótipo SIAL 70 sem aeração, apresentou aumento na taxa fotossintética na dose intermediária de Fe, enquanto na maior dose reduziu após certo período com ausência de aeração e elevou-se posteriormente ultrapassando o valor inicial (tempo zero). Esse aumento pode ser consequência da elevada atividade da enzima polifenoloxidase (PPO) (Figura 4), uma vez que a maior parte da atividade de PPO ocorre nos cloroplastos desintoxicando as ERO's formadas pelo estresse oxidativo que ocasionam lesões nas células das plantas, não alterando assim seu crescimento em relação à concentração controle de Fe (Figura 32).

A falta de aeração afetou as taxas fotossintéticas ao longo do tempo de forma diferente para cada genótipo e dose utilizada (Figura 17). Na presença da aeração, o TSH 1188 não apresentou alterações significativas no decorrer dos 35 dias de tratamento nas três concentrações de Fe utilizadas (Figuras 17A, 17C e 17E), apresentando, inclusive, a mesma taxa fotossintética média ($5,10 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) que a obtida no ambiente sem aeração na concentração $44,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 17A). Por outro lado, nas maiores doses as taxas fotossintéticas do tratamento sem aeração decaíram 59,9 e 45%, aos 18,8 e 18,1 dias, restaurando, ao final de período de recuperação (35º dia), 85 e 94,1% da fotossíntese mensurada antes do desligamento da aeração nas respectivas concentrações (Figuras 17C e 17E). Em média, nas concentrações $133,5$ e $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, o TSH 1188 com aeração apresentou taxas fotossintéticas 57,3 e 44,2% superiores às do tratamento sem aeração, respectivamente.

O genótipo SIAL 70 permaneceu com suas taxas fotossintéticas inalteradas com o passar do tempo na concentração $44,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, tanto em ambiente sem e com aeração, não obstante, a fotossíntese das plantas crescidas com aeração foi 11,1% maior (Figura 17B). De modo contrastante, nas concentrações $133,5$ e $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe (Figuras 17D e 17E), os valores dessa variável foram, em média, 15,9 e 26,7% maiores em plantas sem aeração do que nas com aeração, sendo que na concentração intermediária ($133,5$) verificou-se aumento linear alcançando no 35º dia uma taxa fotossintética 41,3% maior que a verificada antes do desligamento da aeração (Figura 17D). Na concentração $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, a fotossíntese do SIAL 70 sem aeração reduziu 29,4% aos 14,6 dias, e depois subiu ultrapassando em 28,2% a fotossíntese mensurada antes do desligamento da aeração, no final da recuperação (Figura 17F). Já a do com aeração reduziu em 46,7% aos 17,6 dias, aumentando em seguida até atingir 98,7% da fotossíntese inicial.

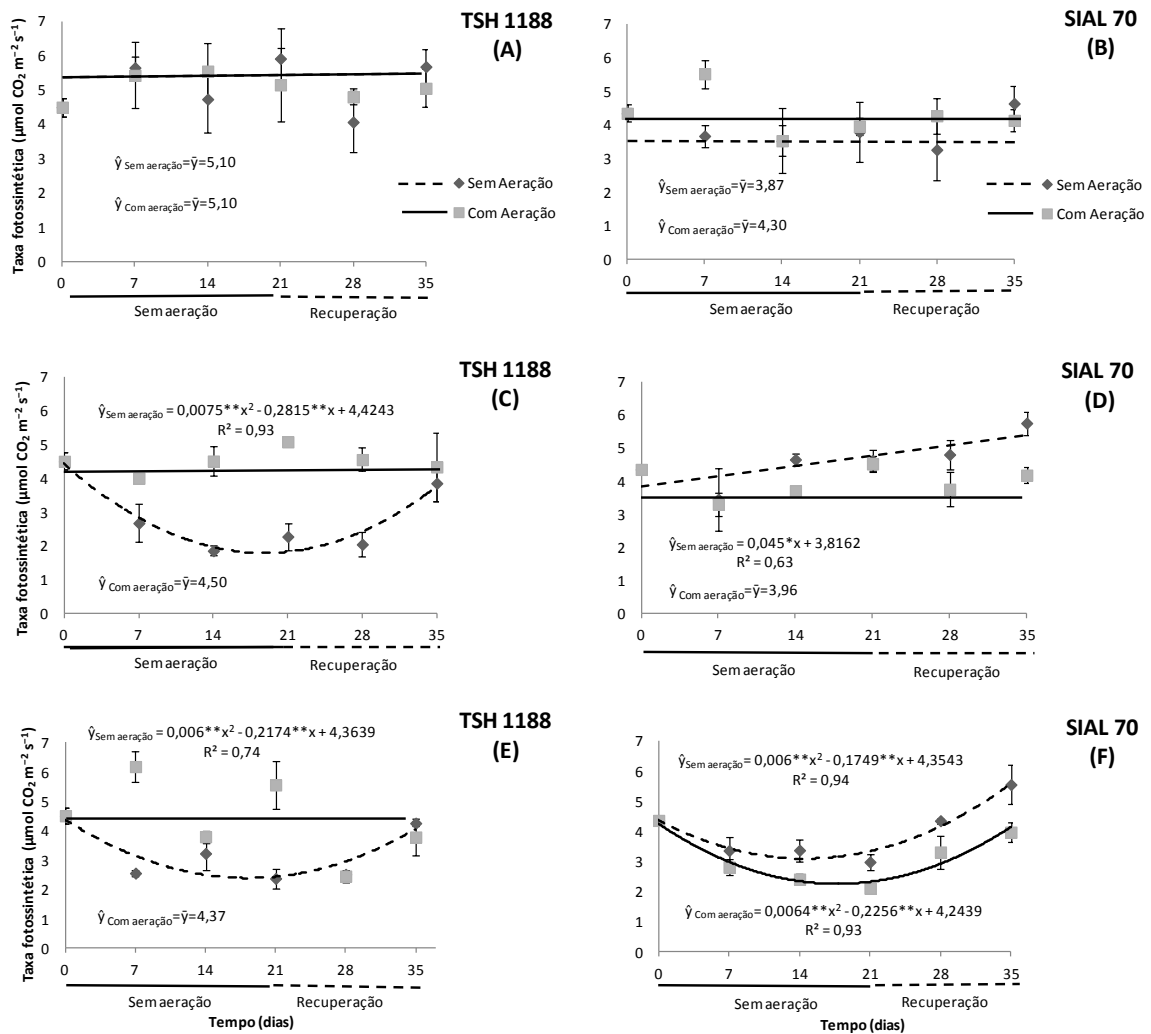


Figura 17 - Influência da presença e ausência da aeração sobre a evolução da taxa fotossintética (A) em função do tempo, em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F) em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

Durante períodos longos de alagamento, geralmente ocorrem diminuições progressivas nos valores da taxa fotossintética por efeitos inibitórios nos processos estomáticos e não estomáticos. As limitações não-estomáticas da fotossíntese estão fortemente associadas as alterações nas enzimas do ciclo de Calvin e na degradação dos pigmentos fotossintéticos. O decréscimo na atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (RUBISCO) constitui um dos sintomas iniciais do estresse por hipóxia, que contribui para perdas na capacidade fotossintética (PEZESHKI, 1994; PEZESHKI, 2001; PATEL et al., 2014).

Ainda que os teores de pigmentos fotossintéticos não sofressem grandes variações, a ausência de aeração provocou alterações nas taxas fotossintéticas dos dois genótipos estudados. Silveira (2011), ao submeter duas cultivares de café observou reduções significativas na taxa fotossintética. Rehem et al. (2010), analisando seis clones de cacau relatou que a taxa fotossintética reduziu com o aumento do tempo em período alagado. Já Bertolde (2007), verificou reduções significativas em taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração em trinta e cinco clones de cacau.

As reduções na taxa fotossintética neste presente estudo foram mais intensas no genótipo TSH 1188 quando submetido a altas concentrações de Fe. Bertolde (2007) estudando esse mesmo genótipo verificou que em média sua taxa fotossintética foi de $6,5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ sem alagamento e $2,3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ com alagamento. Provavelmente a redução da taxa fotossintética neste estudo foi potencializada pelas altas concentrações de Fe na solução nutritiva, uma vez que na concentração recomendada à taxa fotossintética se manteve constante.

Bradford e Hsiao (1982), estudando o efeito do alagamento na troca gasosa de plantas de tomate, sugeriu que a redução da taxa fotossintética em tomateiro sob alagamento afetou principalmente a regeneração da enzima Rubisco. Possivelmente, o alagamento por afetar a atividade da Rubisco pode também provocar danos ao fotossistema II (LIAO; LIN, 1994; DREYER, 1994; KOZLOWSKI, 1997; PEZESHKI, 2001; HERRERA et al., 2008), reduzindo a taxa fotossintética. Mielke et al. (2003) relataram que, em *Genipa americana*, a taxa fotossintética foi limitada por fatores estomáticos e não estomáticos em plantas alagadas. Pezeshki (2001) reforçou que, em longos períodos de alagamento, limitações não estomáticas, como a degradação de pigmentos e alterações em enzimas do Ciclo de Calvin são as causas principais do declínio fotossintético.

O declínio nos valores da taxa fotossintética no genótipo TSH 1188 submetido a ausência de aeração pode ser atribuído à limitação da difusão do CO_2 , promovida pelo fechamento dos estômatos, ou ainda pela diminuição do transporte de fotoassimilados para os drenos ativos (Figura 26) (KOZLOWSKI, KRAMER, PALLARDY, 1991). Segundo Schaffer (1998), reduções na taxa de assimilação de CO_2 de algumas plantas arbóreas frutíferas, resultantes de um estresse hídrico por

excesso de água, também podem ser atribuídas a fatores não estomáticos como mudanças bioquímicas associadas com reações fotossintéticas.

No entanto, a resposta específica de plantas ao alagamento varia muito, e fatores incluindo espécie, genótipo, idade e condição da planta, qualidade da água e duração do período de alagamento devem ser levados em consideração (KRAMER; KOZLOWSKI, 1979). Como observado neste trabalho, o genótipo SIAL 70 apresentou resposta contrária ao do genótipo TSH 1188, aumentando sua taxa fotossintética quando submetido à falta de aeração na concentração 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe. Apesar de esse resultado ser contrário a maioria dos estudos com plantas em alagamento, provavelmente a maior atividade das enzimas antioxidantes pode ter contribuído para o aumento da taxa fotossintética.

Os dois genótipos apresentaram recuperação após o término do período de ausência de aeração e segundo Pezeshki (1993), um indicador da tolerância ao alagamento é a inibição inicial das trocas gasosas seguida por uma recuperação, sugerindo níveis de tolerância para ambos genótipos.

Ao comparar a evolução das taxas fotossintéticas dos dois genótipos em ambiente sem e com aeração, verificam-se diferenças intergenotípicas nas três concentrações de ferro testadas (Figura 18). De modo geral, com aeração as taxas fotossintéticas do TSH 1188 não se alteraram significativamente no decorrer do tempo, mas em média elas foram, respectivamente, 18,6, 13,6 e 38,7% mais altas que as do SIAL 70 nas doses 44,5, 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 18B, 18D e 18F). Nessa última concentração, as taxas fotossintéticas do SIAL 70 reduziram em 46,7% aos 17,6 dias, mas aos 35 dias alcançaram 98,7% das taxas iniciais (Figura 18F).

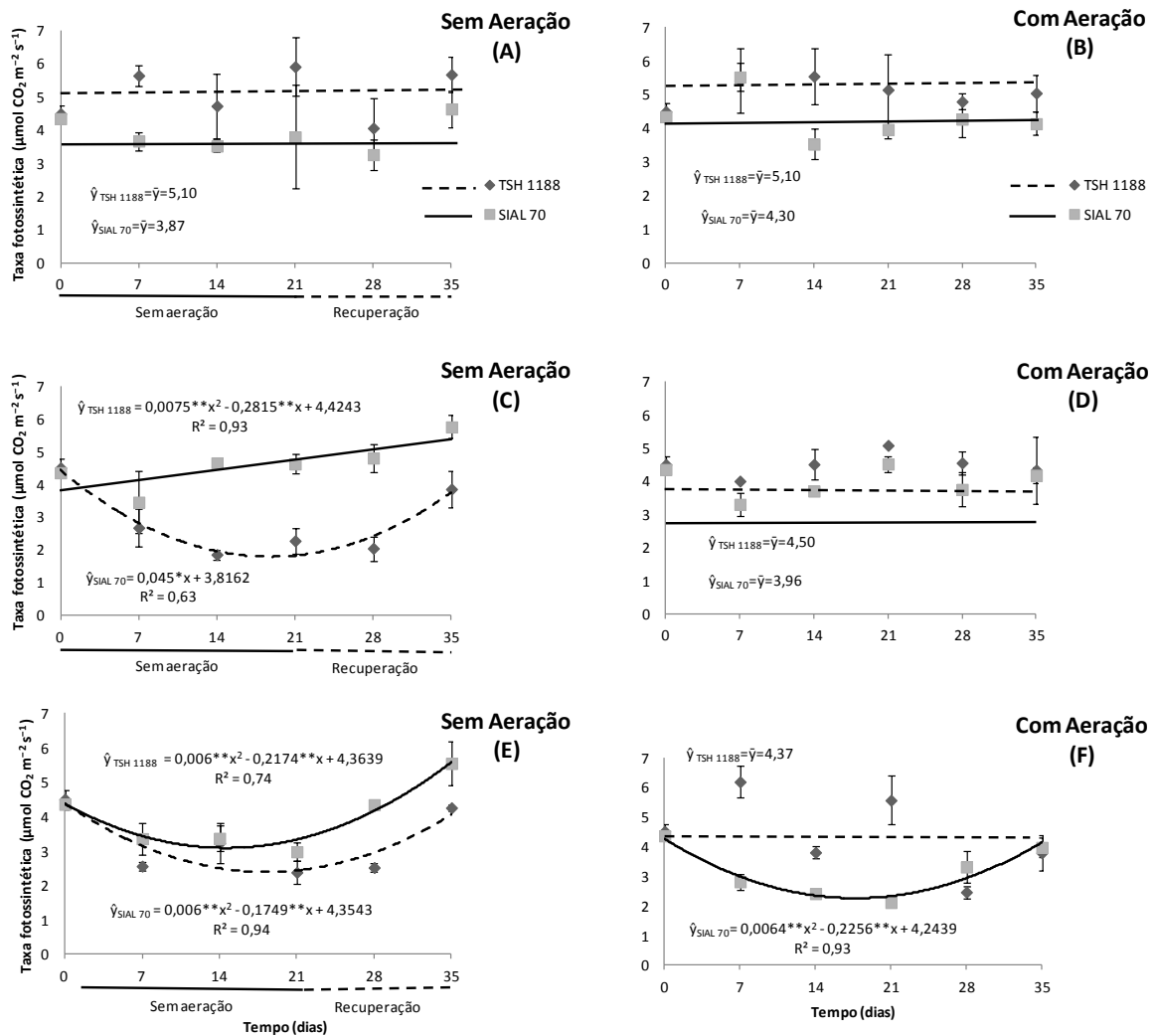


Figura 18 - Evolução taxa fotossintética (A) em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F), na presença e ausência de aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

Em condições de sem aeração na concentração 44,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ também não foram observadas alterações significativas para os dois genótipos em função do tempo, porém as taxas fotossintéticas do TSH 1188 foram 31,8% superiores (Figura 18A). Com 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe o SIAL 70 aumentou linearmente suas taxas fotossintéticas com valores que, em média, superaram às do TSH 1188 em 66,4% (Figura 18C), ao passo que com 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ocorreram reduções de modo mais intenso no TSH 1188 (45,0%) do que no SIAL 70 (29,4%) que, por sua vez, apresentou valores médios 31,7% mais altos (Figura 18E).

Bertolde (2007), ao avaliar trinta e cinco clones de cacau também observou que os clones apresentam diferentes maneiras de responder ao estresse por alagamento.

Rehem et al. (2010), ao avaliar seis clones de cacau verificou que as taxas fotossintéticas foram diferentes em comparação ao ambiente não alagado. Branco (2010) observou diferenças intergenotípicas significativas para as plantas alagadas dos clones de cacau TSH 774 e TSA 792, sendo que em ambos genótipos os valores de taxas fotossintéticas foram reduzidos significativamente com o tempo de alagamento, com uma média de $3,0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ para o clone TSA-792 e de $2,0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ para o clone TSH-774 aos 48 dias após a aplicação do tratamento alagado.

O excesso do Fe também é um fator limitante para a taxa fotossintética, em arroz seu excesso na solução nutritiva causou efeitos severos na taxa de assimilação líquida de CO_2 , função crucial para as plantas e altamente sensível a estresses. O cultivar Canastra apresentou queda fotossintética mais drástica em comparação com o cultivar BR-IRGA 409, expostos ao sulfato ferroso (MÜLLER, 2015).

A condutância estomática dos genótipos TSH 1188 e SIAL 70 em função do tempo foram influenciadas pelas concentrações de Fe utilizadas, tanto em sem e com aeração (Figura 19). A concentração recomendada de Fe sem aeração não influenciou a condutância estomática no genótipo TSH 1188, no entanto nas concentrações $133,5$ e $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, foi verificado reduções significativas no decorrer do tempo. Verificaram-se reduções de 52,6 e 67,7% aos 15,2 e 17 dias. Posteriormente, ao final do período de recuperação as plantas desse genótipo nas concentrações $133,5$ e $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe superaram a condutância estomática em 8,2 e 35,6% do valor inicial antes do desligamento da aeração (Figura 19 A). Em ambiente com aeração, esse mesmo genótipo apresentou reduções significativas nas três concentrações de Fe, sendo 79,8; 55,5 e 51,1% aos 25,5; 25,6 e 22 dias, seguidas por aumento aos 35 dias de 68,8; 48 e 33,5% dos valores encontrados no início da aplicação das doses de Fe nas concentrações $44,5$; $133,5$ e $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe respectivamente (Figura 19B).

O genótipo SIAL 70, não apresentou alterações na condutância estomática em condições de ausência de aeração nas concentrações $44,5$ e $133,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, no entanto na concentração $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ aos 15 dias reduziu 28% e recuperou superando o índice inicial com 21,8% aos 35 dias (Figura 19C). Em ambiente com aeração a concentração recomendada também não apresentou alterações na

condutância estomática ao longo do tempo, entretanto aos 17,7 e 13,7 dias esse mesmo genótipo reduziu 34,0 e 41,1% nas concentrações 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe respectivamente, recuperando a condutância estomática em 97,9% e superando em 57,1% dos valores iniciais aos 35 dias de aplicação dos tratamentos, nas respectivas concentrações (Figura 19D).

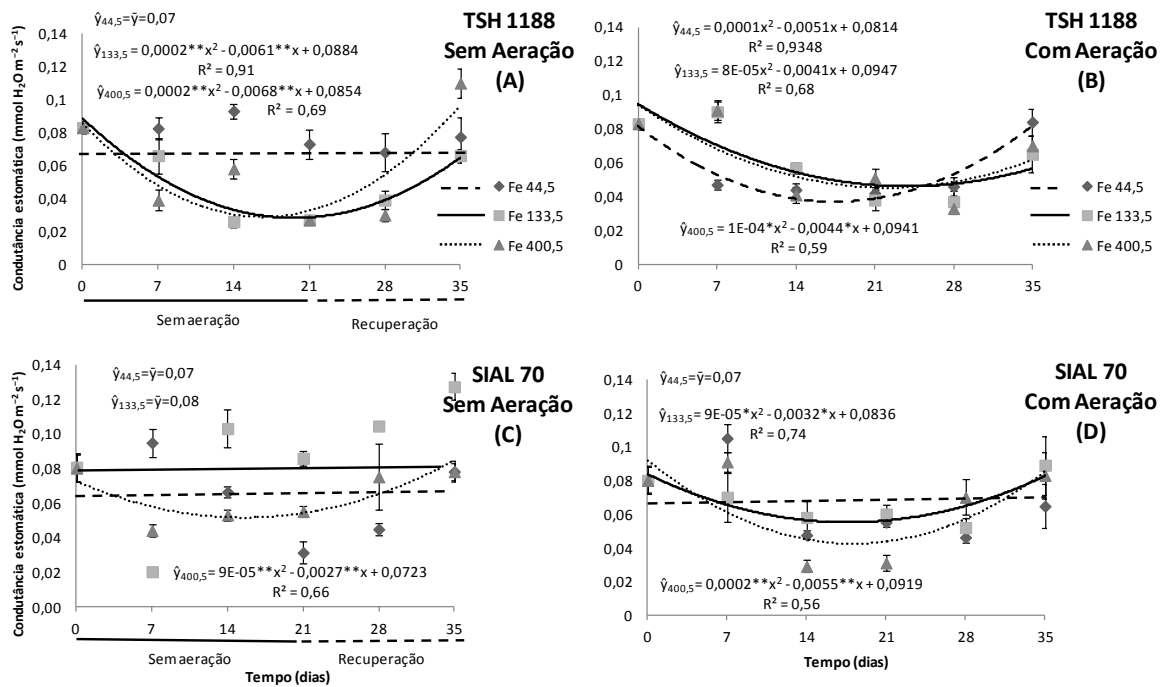


Figura 19. Influência de diferentes concentrações de ferro (44,5, 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a condutância estomática (gs) em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 (A e B) e SIAL 70 (C e D), na presença e ausência de aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

De modo geral, os dados de condutância estomática estão de acordo com os dados de taxa fotossintética e transpiração, sendo mais evidenciado no genótipo TSH 1188. A redução da condutância estomática reduz também a taxa de transpiração, diminuindo a absorção de Fe em excesso o que pode ser esperado como uma estratégia para reduzir a absorção de Fe, já que este é transportado pelo xilema (CURIE; BRIAT, 2003). O mecanismo pelo qual o excesso de Fe afeta o movimento estomático ainda não está muito claro (CARLI, 2008). Provavelmente, a redução da condutância estomática está ligada a atividade de H^+ -ATPase das membranas celulares, pois o excesso de Fe pode potencializar sua despolarização. A atividade

da H⁺-ATPase pode reduzir em 80-90%, ou ainda perder a função da proteína com Fe livre nas células (CASANO et al., 1997; SANTOS-SOUZA et al., 2001). O fechamento dos estômatos também pode, indiretamente, levar ao estresse oxidativo através de redução da cadeia de transporte de elétrons e fotoinibição, contribuindo para os efeitos sobre a fotossíntese. (CURIE; BRIAT, 2003).

Campos (2014), em plantas de café conilon, observou que à medida que aumentava as doses de Fe a condutância estomática foi sendo reduzida. No entanto, os dois genótipos apresentaram uma forma similar de lidar com o estresse por Fe, pois ao longo período do experimento a condutância estomática reduziu, mais com o tempo foi recuperada e às vezes superada em relação aos valores iniciais, sugerindo que esses genótipos apresentam mecanismos de lidar positivamente contra esse estresse, apesar de apresentarem maior abertura de estômatos em alguns tratamentos.

Em geral a ausência de aeração ocasionou reduções significativas na condutância estomática nos dois genótipos estudados, no entanto foram verificadas formas diferentes de responder a esse estresse ao longo do tempo, (Figura 20). Sem aeração, o TSH 1188 não apresentou alterações significativas no decorrer dos 35 dias para a concentração de Fe recomendada, contudo, em condições com aeração ocorreu redução de 79,8% aos 25,5 dias com recuperação de apenas 68,8% aos 35 dias de experimento, o valor dessa variável foi, em média, 125% superior em plantas com aeração do que nas plantas sem aeração (Figuras 20A). Por outro lado, na concentração 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe sem e com aeração ocorreram reduções de 52,6 e 55,5% aos 15,2 e 25,6 dias, respectivamente. Não obstante, nos dois ambientes esse genótipo apresentou recuperação. Em média o ambiente com aeração apresentou valores superiores que o ambiente sem aeração com 31,6% (Figura 20C). Na concentração mais elevada de Fe o genótipo TSH 1188 apresentou redução de 51,1% com aeração e 67,7% sem aeração, conseqüentemente, o ambiente com aeração apresentou valores médios mais elevados (10,3%) que a do ambiente sem aeração (Figura 20E).

O genótipo SIAL 70 na dose recomendada de Fe não apresentou alterações na condutância estomática (Figura 20 B). Da mesma forma, na dose 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe também não apresentou alterações em ambiente sem aeração, entretanto, com

aeração ocorreu redução de 34,0% aos 17,7 dias, e ao final de 35 dias recuperou quase totalmente do valor inicial (97,9%), em média o ambiente sem aeração foi 33,6% superior ao ambiente com aeração na condutância estomática (Figura 20 D). Na concentração $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, a condutância estomática do SIAL 70 reduziu 41,1 e 28% aos 13,7 e 15 dias, e depois subiu ultrapassando em 57,7 e 21,8% no final da recuperação, em média com aeração foi 31,3% superior ao sem aeração (Figura 20 F).

Segundo Kozłowski (1997), a redução da condutância estomática em plantas tolerantes e não tolerantes é considerada uma resposta comum ao alagamento no solo. Geralmente, em poucas semanas após o alagamento, as espécies tolerantes demonstram uma tendência em recuperar os valores de condutância estomática a semelhança das plantas controle (MIELKE et al., 2005). A reabertura dos estômatos geralmente está relacionada com o desenvolvimento de lenticelas hipertróficas ou raízes adventícias (LOPEZ; KURSAR, 1999).

Várias pesquisas vem sugerindo que o fechamento dos estômatos de plantas submetidas ao alagamento está ligado à redução na condutividade hidráulica das raízes (ANDERSEN; LOMBARD; WESTWOOD, 1984, DAVIES; FLORE, 1986). A redução da condutividade hidráulica da raiz pode aumentar o estresse hídrico interno, reduzindo a turgescência da folha e os valores de condutância estomática (DAVIES; FLORE, 1986).

No entanto, os dois ambientes proporcionaram reduções ao longo do tempo sob a condutância estomática, sugerindo que o fechamento e/ou abertura dos estômatos foi intensificado pelo estresse por Fe, sendo mais observado no genótipo TSH 1188, onde com aeração apresentou maior abertura de estômatos nas maiores concentrações de Fe. Bertolde (2007), estudando o clone TSH 1188 em alagamento, também observou maior abertura estomática em ambiente não alagado. Em contrapartida, o genótipo SIAL 70 respondeu diferentemente, na dosagem intermediária, com maiores aberturas estomáticas no ambiente sem aeração, já na concentração mais alta de Fe as maiores aberturas foram em ambiente com aeração, sugerindo que o excesso de Fe aumentou o fechamento dos estômatos.

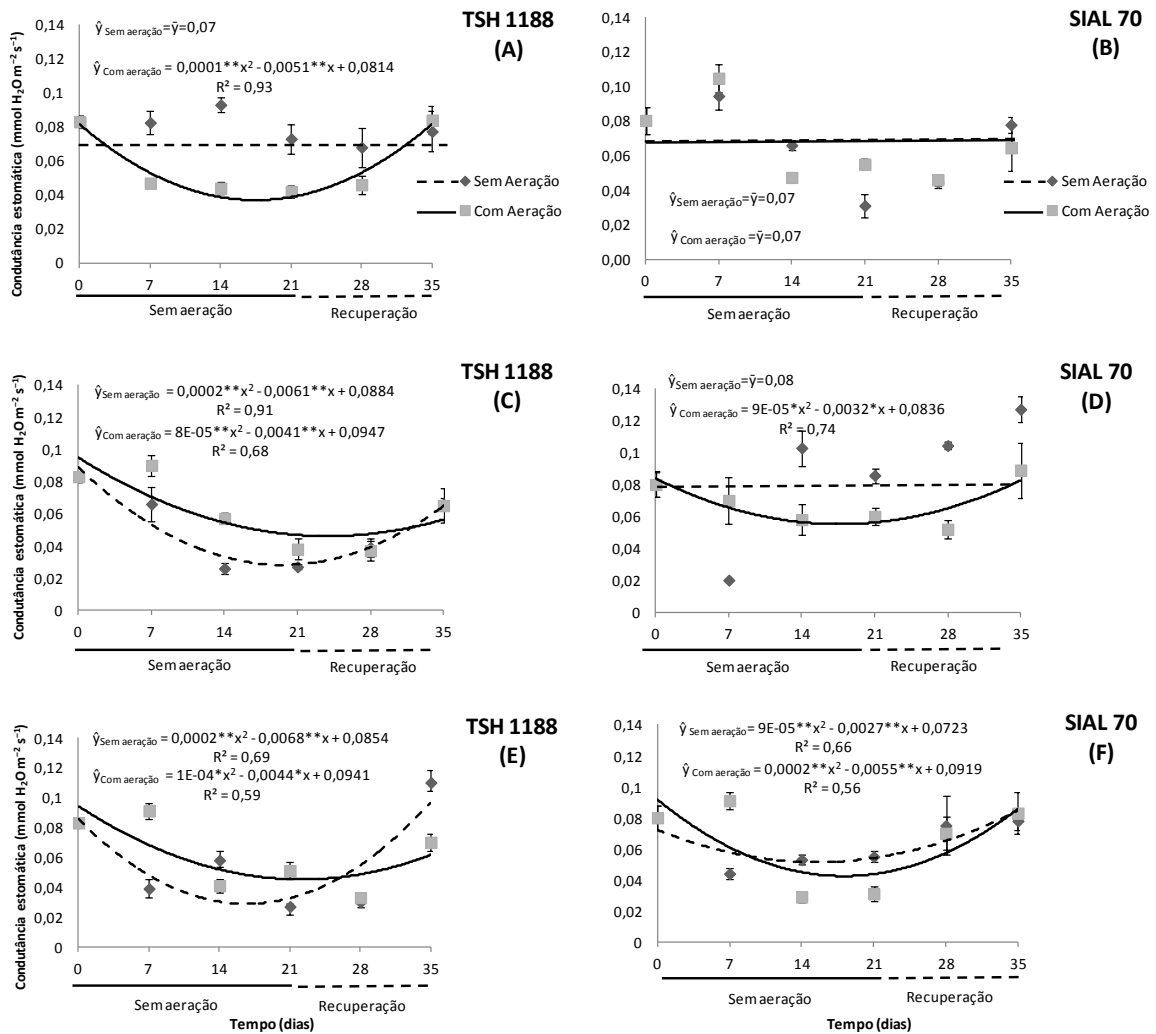


Figura 20 - Influência da ausência de aeração sobre a condutância estomática (gs) em função do tempo, em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F) em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

Ao comparar a condutância estomática dos dois genótipos em ambiente sem e com aeração, verificam-se diferenças intergenotípicas nas três concentrações de Fe testadas (Figura 21). De modo geral, em presença de aeração a condutância estomática do SIAL 70 alterou significativamente no decorrer do tempo, mas em média elas foram, respectivamente, 27,4 e 25,5% mais altas que as do genótipo TSH 1188 nas concentrações 44,5 e 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 21B e 21D). Na concentração 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, não foi observada diferença intergenotípica (Figura 21F).

Em condições de sem aeração na concentração $44,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ não foi observada alteração significativa para os dois genótipos em função do tempo (Figura 21A). Com $133,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe o SIAL 70, em média, superaram 112,8% as do genótipo TSH 1188 (Figura 21 C). Já na concentração $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe a média foi de 7,6% superiores ao do genótipo TSH 1188 (Figura 21E).

O genótipo SIAL 70 apresentou valores superiores na condutância estomática para ambos os tratamentos em relação ao genótipo TSH 1188, sugerindo ser mais tolerante que esse genótipo, pois segundo Pezeshki (1993) reduções maiores na condutância estomática estão associadas a espécies mais sensíveis ao alagamento.

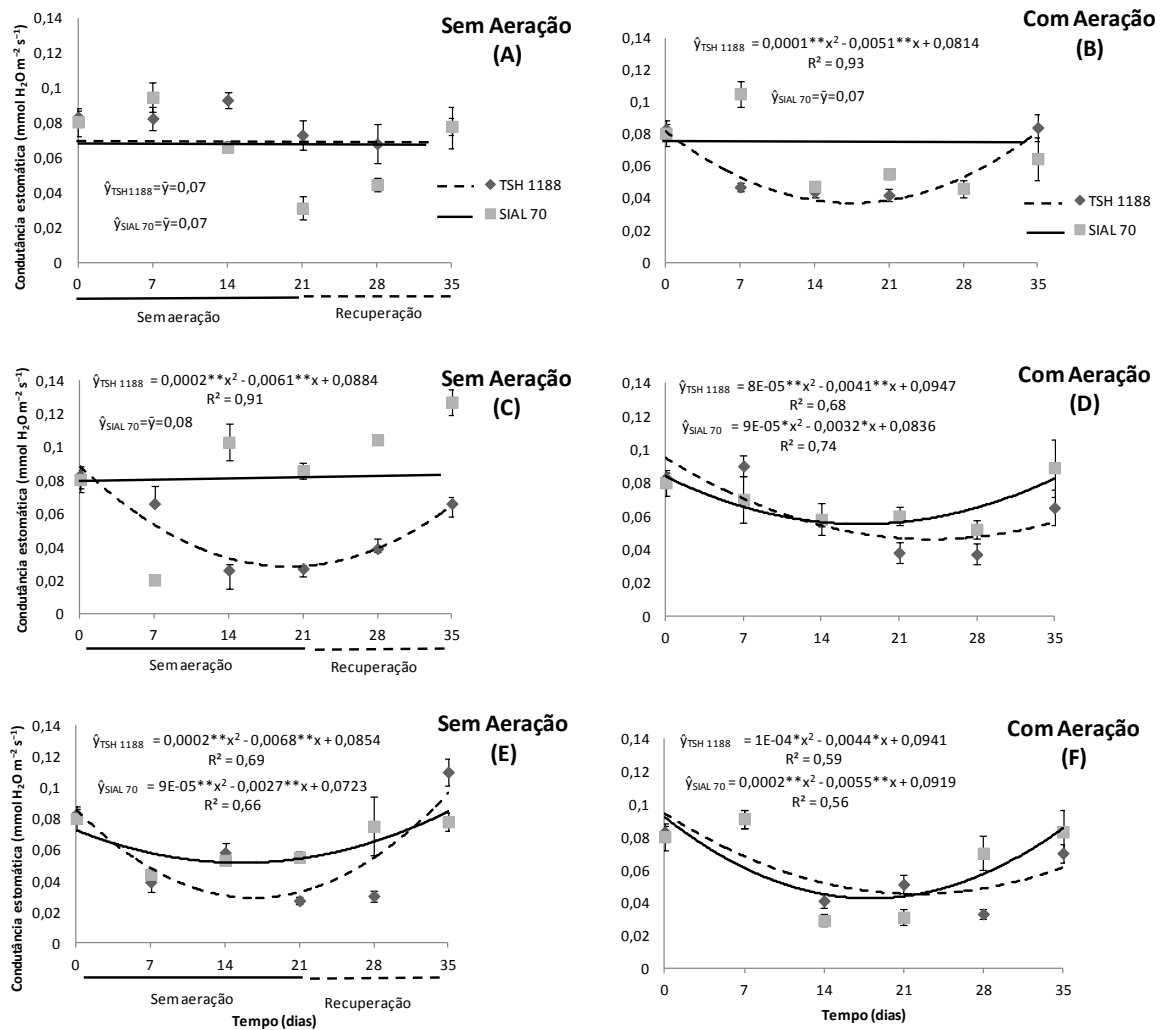


Figura 21 - Evolução da condutância estomática (gs) em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, $44,5$ (A e B), $133,5$ (C e D) e $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F), na presença e ausência de aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

As taxas de transpiratórias dos genótipos TSH 1188 e SIAL 70 ao longo do tempo foram influenciadas pelas diferentes concentrações de Fe utilizadas, tanto em ambiente sem e com aeração (Figura 22). Na concentração $44,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe as taxas de transpiração de ambos os genótipos sem e com aeração não apresentaram alterações significativas no decorrer do tempo (Figura 22A e C). Em contrapartida, nas concentrações $133,5$ e $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram verificadas reduções de 58,4 e 67,0% aos 15,7 e 14,2 dias no TSH 1188 sem aeração, respectivamente. Posteriormente, ao final do período de recuperação as plantas desse genótipo superaram o valor das taxas iniciais em 33 e 74,6% quando comparadas com as verificadas antes do desligamento da aeração (Figura 22A). No TSH 1188 com aeração, a concentração recomendada e intermediária de Fe promoveram diminuição das taxas transpiratórias observadas aos 12,1 e 14,8 dias com reduções de 34,7 e 53,8%, seguida de um aumento que ao final do experimento ultrapassando em 89,6 e 46,2% a taxa de transpiração inicial. Já na concentração mais elevada de Fe o TSH 1188 não apresentou alterações ao longo do tempo (Figura 22B).

No genótipo SIAL 70, nas concentrações $133,5$ e $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, foram verificadas reduções de 15,4 e 44,7% aos 8,5 e 14,1 dias no SIAL 70 sem aeração, respectivamente. Ao final do período de recuperação as plantas, superaram o valor das taxas iniciais com 130,5 e 52,6% superiores às encontradas antes do desligamento da aeração (Figura 22C). Em ambiente com aeração as três concentrações de Fe ocasionaram alterações na taxa de transpiração com redução de 49,0; 42,5 e 69,7% nos dias 13,8; 17,9 e 16,6 respectivamente. Posteriormente, a taxa de transpiração foi restaurada aos 35 dias superando os valores iniciais para as concentrações $44,5$ e $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe em 54,4 e 17,2%, já na concentração $133,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe restaurou quase que totalmente com 96,1% (Figura 22D).

De modo geral, os dados de transpiração estão de acordo com os dados de condutância estomática. As taxas de transpiração estão diretamente ligadas com abertura de estômatos, neste estudo, ao longo do tempo o excesso de Fe reduziu a transpiração dos dois genótipos em função da abertura estomática, uma vez que o Fe é transportado via xilema, as plantas podem ter desenvolvido essa estratégia para evitar a toxidez (CURIE; BRIAT, 2003).

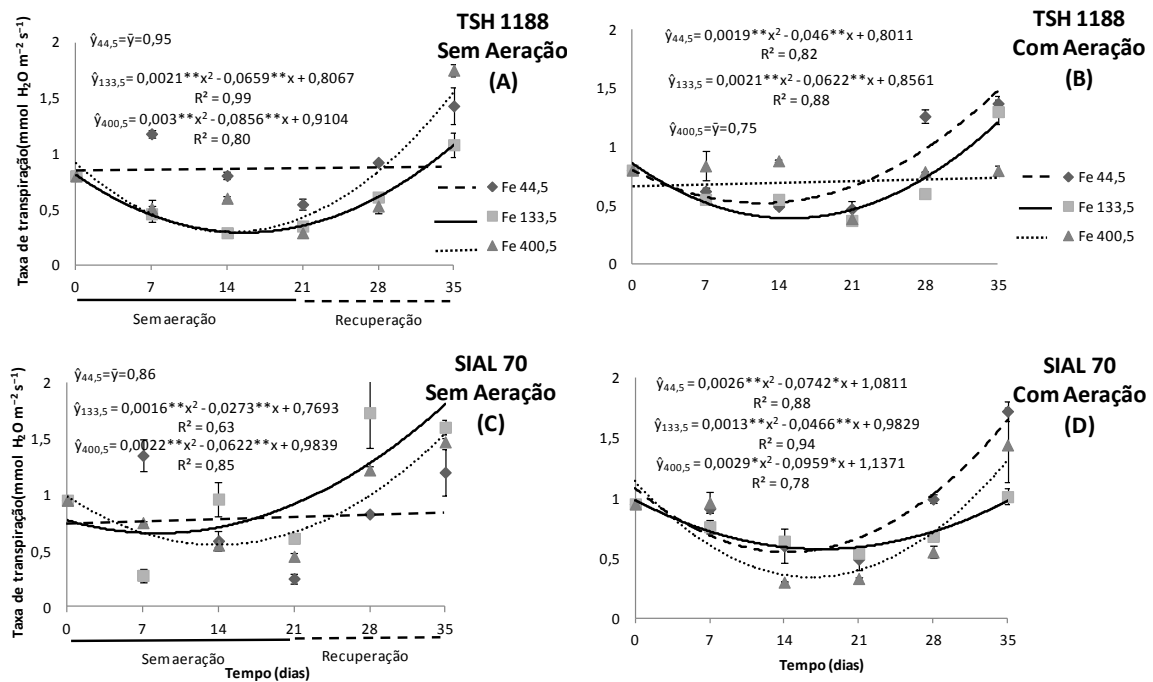


Figura 22. Influência de diferentes concentrações de ferro (44,5, 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a taxa transpiratória (E) em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 (A e B) e SIAL 70 (C e D), na presença e ausência de aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

De maneira geral, a falta de aeração afetou as taxas de transpiração dos dois genótipos e concentrações de Fe utilizadas ao longo do tempo (Figura 23). Sem aeração na concentração recomendada de Fe, o genótipo TSH 1188 não apresentou alterações ao longo do tempo, no entanto com aeração aos 12,1 dias de experimento verificou-se redução de 34,7%, seguido por aumentos, inclusive, superando em 89,6% das taxas iniciais de transpiração. Em média, esse genótipo em ambiente sem aeração obteve as taxas de transpiração superiores em 10,1% do que ambiente com aeração (Figura 23A). Por outro lado, na concentração intermediária de Fe as taxas de transpiração dos tratamentos sem e com aeração decaíram em 58,4 e 53,8%, aos 15,7 e 14,8 dias, restaurando e superando, 33 e 46,2% da taxa de transpiração do início do experimento, respectivamente. Em média, o TSH 1188 com aeração apresentou taxa de transpiração 22,6% superior às do tratamento sem aeração (Figura 23C). Na concentração mais elevada de Fe não ocorreram diferenças significativas entre os dois ambientes (Figura 23E).

O genótipo SIAL 70 permaneceu com as taxas de transpiração inalteradas com o passar do tempo na concentração 44,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe em ambiente sem aeração,

diferentemente, com aeração verificou-se redução de 49,0% aos 13,8 dias, seguido de recuperação com superação da taxa inicial mensurada (54,4%). Em média, o ambiente com aeração apresentou taxa de transpiração 7,4% superior às do tratamento sem aeração (Figura 23B). De modo contrastante, nas concentrações 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figuras 23D e F), os valores dessa variável foram, em média, 46,3 e 25,8% maiores em plantas sem aeração do que nas com aeração. Nas concentrações 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, a taxa de transpiração do SIAL 70 sem aeração reduziram 15,4 e 44,7% aos dias 8,5 e 14,1, depois subiu ultrapassando em 130,5 e 52,6% a transpiração mensurada antes do desligamento da aeração, no final da recuperação. O com aeração, nessas mesmas concentrações, reduziu 42,5 e 69,7% aos 17,9 e 16,5 dias, aumentando em seguida até atingir 96,1% e superar 17,2% da transpiração inicial, respectivamente.

Segundo Kozlowisk (1997) e Pezeshki (1993) a redução nos valores da taxa de transpiração, ocorre inicialmente, devido ao fechamento dos estômatos, resultando no decréscimo na absorção de CO_2 nas folhas. Schaffer; Andersen; Ploetz, (1992), também constataram que o declínio da transpiração em ambiente alagado ocorre devido ao fechamento dos estômatos, pois a deficiência de O_2 não diminui significativamente o potencial hídrico do xilema. Espécies que são sensíveis ao alagamento frequentemente exibem reduções severas em transpiração e condutância estomática (PEZESHKI, 1993; GRAVATT; KIRBY, 1998), sendo estas variáveis úteis na determinação do grau de tolerância das plantas ao alagamento do solo (GRAVATT; KIRBY, 1998).

No entanto, considerando o que esses autores afirmaram provavelmente a redução da taxa de transpiração foi influenciada pelo excesso de Fe na solução nutritiva, que resultou na redução da abertura estomática para diminuir a absorção de Fe, contudo, a resposta também parece ter sido influenciada por outros fatores, pois na concentração recomendada de Fe também ocorreram reduções de condutância estomática e transpiração mesmo com aeração.

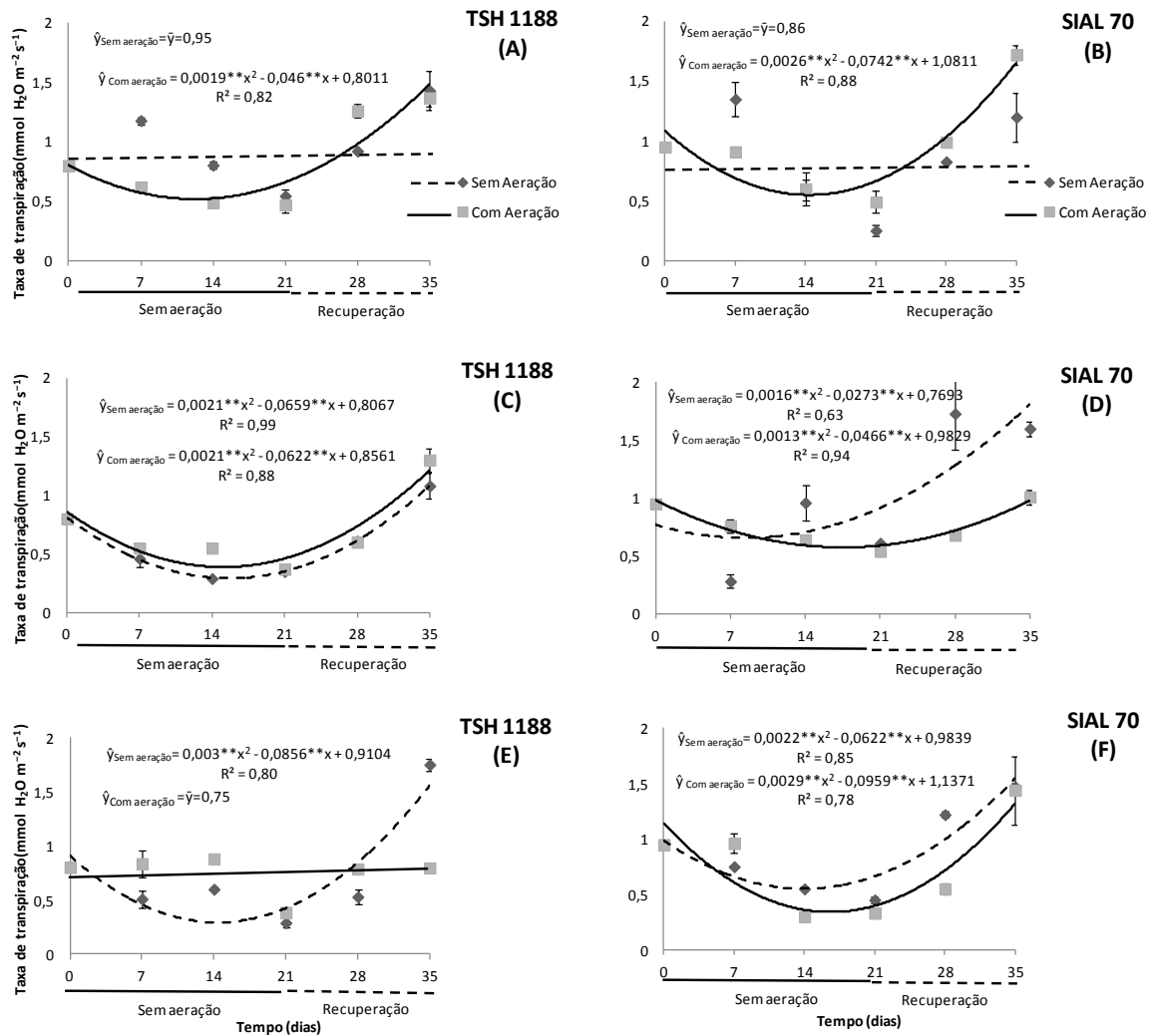


Figura 23 - Influência da presença e ausência da aeração sobre a taxa transpiratória (E) em função do tempo, em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

Ao comparar a evolução das taxas de transpiração dos dois genótipos em ambiente sem e com aeração, em geral, verificam-se diferenças intergenotípicas nas três concentrações de Fe testadas (Figura 24). De modo geral, a ausência da aeração reduziu significativamente no decorrer do tempo a taxa de transpiração, mas em média elas foram, 10,5% mais altas no genótipo TSH 1188 na concentração 44,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, e 90,8 e 18,3% mais altas no genótipo SIAL 70 nas concentrações 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe respectivamente (Figura 24 A, C e E).

Em condições com aeração na concentração 44,5 e 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ não foram observadas alterações significativas para os dois genótipos em função do tempo

(Figura 24B e D). Com $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe o SIAL 70 reduziu 69,7% da taxa de transpiração aos 14,1 dias, recuperando e superando em 52,6% dos valores iniciais, no entanto, o TSH 1188 não apresentou alterações ao longo do tempo, em média os valores da taxa transpiratória foram mais elevados no genótipo TSH 1188 (9,3%) do que a do SIAL 70 (Figura 24 F).

De modo geral, o genótipo SIAL 70 apresentou maior taxa de transpiração do que o TSH 1188, confirmando sua maior absorção de nutrientes em comparação ao genótipo TSH 1188 (Tabela 1), pois segundo Marschner (1995), as taxas transpiratórias podem favorecer a absorção de certos nutrientes.

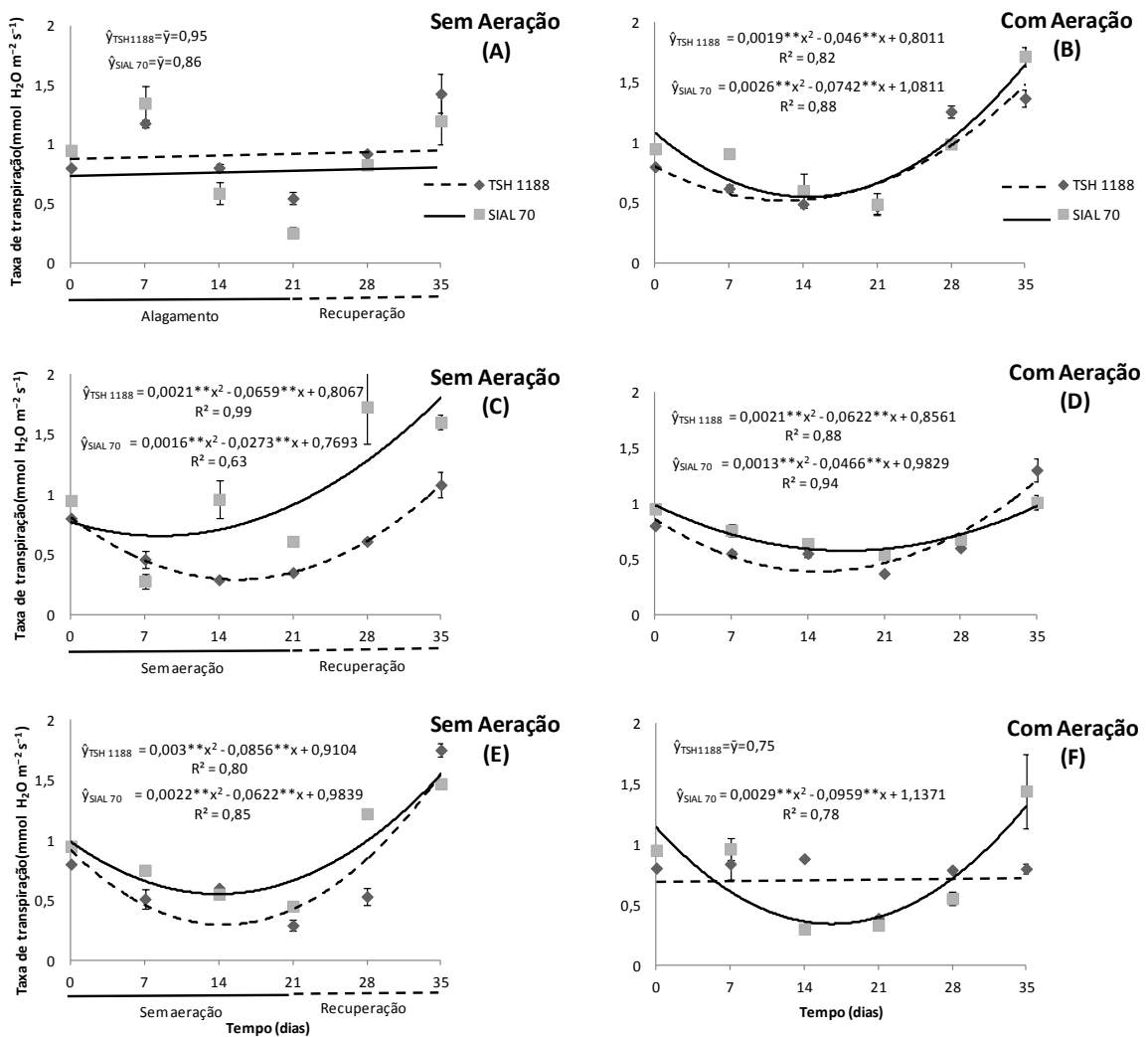


Figura 24 - Evolução da taxa transpiratória (E) em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F), na presença e ausência de aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm EP$).

A concentração interna de CO₂ do genótipo TSH 1188 em função do tempo foi influenciada pelas concentrações de Fe utilizadas, tanto em ambiente sem e com aeração, no entanto, o genótipo SIAL 70 não se observou diferença ao longo do tempo nos dois ambientes (Figura 25).

O genótipo TSH 1188 na concentração 44,5 µmol L⁻¹ de Fe sem aeração, foi verificado redução linear de 14,6% ao 35º dia, enquanto que na concentração intermediária não foi verificada alterações significativas no decorrer do tempo da concentração interna de CO₂. Entretanto, na concentração 400,5 µmol L⁻¹ de Fe, foi verificado redução de 18,3% ao 18,3 dias, com posterior recuperação de 97,0% ao final do período de recuperação das plantas antes do desligamento da aeração (Figura 25A). Em ambiente com aeração, a concentração 44,5 e 400,5 µmol L⁻¹ de Fe promoveu redução de 31,6 e 22,6% aos 19,5 e 17,6 dias da concentração interna de CO₂, respectivamente, seguido de um aumento que ao final do experimento recuperando 88,2 e 99,4% da concentração interna de CO₂ inicial. Já na concentração 133,5 µmol L⁻¹ de Fe, foi verificada redução linear de 28,6% ao 35º dia (Figura 25 B).

De maneira contrastante, para todas as concentrações de Fe não foram observadas alterações significativas ao longo do tempo no SIAL 70 em ambiente sem e com aeração, embora a concentração interna de CO₂ média fosse 11,7% mais elevada na dose 133,5 µmol L⁻¹ de Fe em comparação a dose recomendada em ambiente com aeração, nas demais concentrações não houve diferença significativa entre as concentrações de Fe (Figura 25 C e D).

A adição de crescentes doses de Fe na solução nutritiva acarretou mudanças significativas na concentração interna de CO₂ para o genótipo TSH 1188. Este mecanismo é bastante sensível às condições ambientais adversas (MORAES, DELITTI; MORAES, 2000). Geralmente, a redução da concentração interna de CO₂ nas plantas é acompanhada pela redução da fotossíntese, na qual, em ambiente sem aeração para esse genótipo essa resposta foi encontrada.

Na concentração interna de CO₂ para o genótipo SIAL 70, não se constatou diferença significativa ao longo do tempo nos dois ambientes. Apesar de o fechamento parcial dos estômatos, evidenciado neste trabalho pela diminuição da

condutância estomática, causar redução de C_i , não houve variação significativa desse parâmetro (MACHADO et al., 2010).

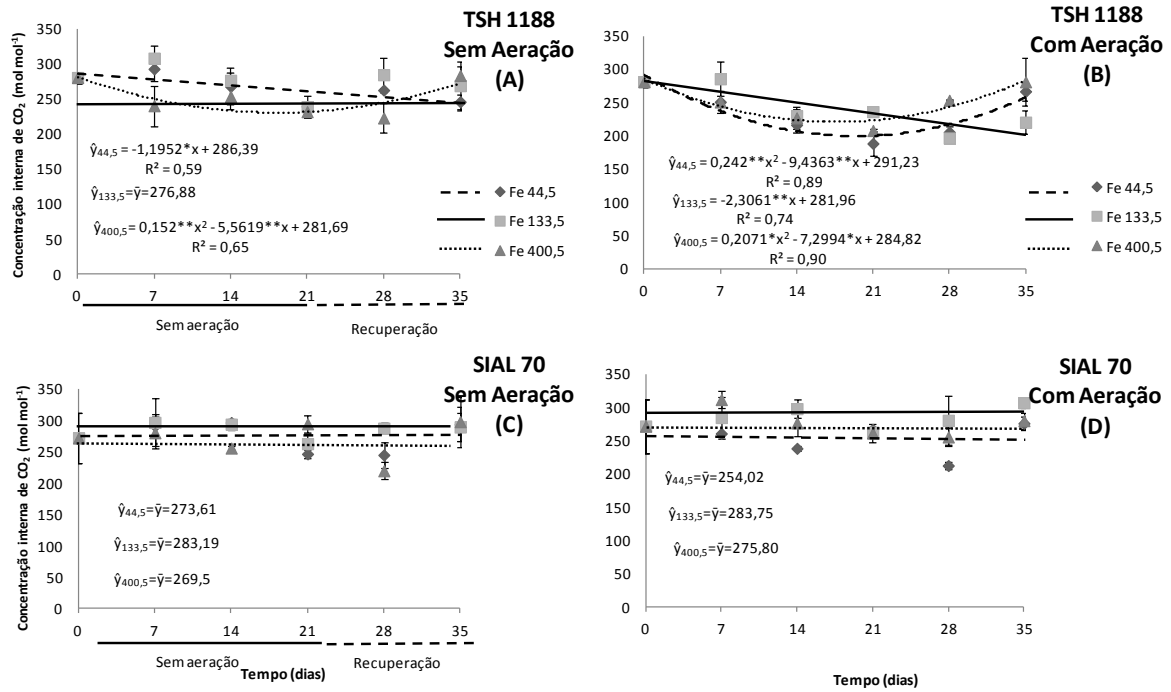


Figura 25. Influência de diferentes concentrações de ferro (44,5, 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a concentração interna de CO₂ (C_i) em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 (A e B) e SIAL 70 (C e D), na presença e ausência de aerção em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

A falta de aerção afetou a concentração interna de CO₂ ao longo do tempo de forma diferente para cada genótipo e dose de Fe utilizada (Figura 26). A concentração interna de CO₂ para o genótipo TSH 1188 sem aerção na dose 44,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe reduziu linearmente 14,6% ao 35º dia, com aerção reduziu 31,6% aos 19,5 dias com recuperação de 88,2% ao final dos 35º dia. Em média o ambiente sem aerção foi 16,9% superior ao ambiente com aerção na concentração interna de CO₂ (Figura 26A). Na dose 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe com aerção ocorreu redução linear de 28,6% ao 35º dia, já sem aerção ao longo dos 35 dias não foi observado diferenças significativas. Em média o ambiente sem aerção foi 18,6% superior nos valores da concentração interna de CO₂ das plantas tratadas em ambiente com aerção (Figura 26C). Na dose 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe houve redução nos ambientes sem e com aerção com 18,3 e 22,6% aos 18,3 e 17,6 dias seguidas de

recuperação de 97 e 99,4% ao 35^o respectivamente, no entanto entre os ambientes estudados não foi observado diferença significativa (Figura 26E).

O genótipo SIAL 70, sem e com aeração não apresentou alterações significativas no decorrer dos 35 dias de tratamento nas três doses de Fe utilizadas (Figuras 26B, 26D e 26F). Em média, na concentração recomendada, o SIAL 70 sem aeração apresentou concentração interna de CO₂ 7,7% superior à do tratamento sem aeração (Figura 26B), nas demais doses de Fe para esse genótipo não foi observada diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 26D e 26F).

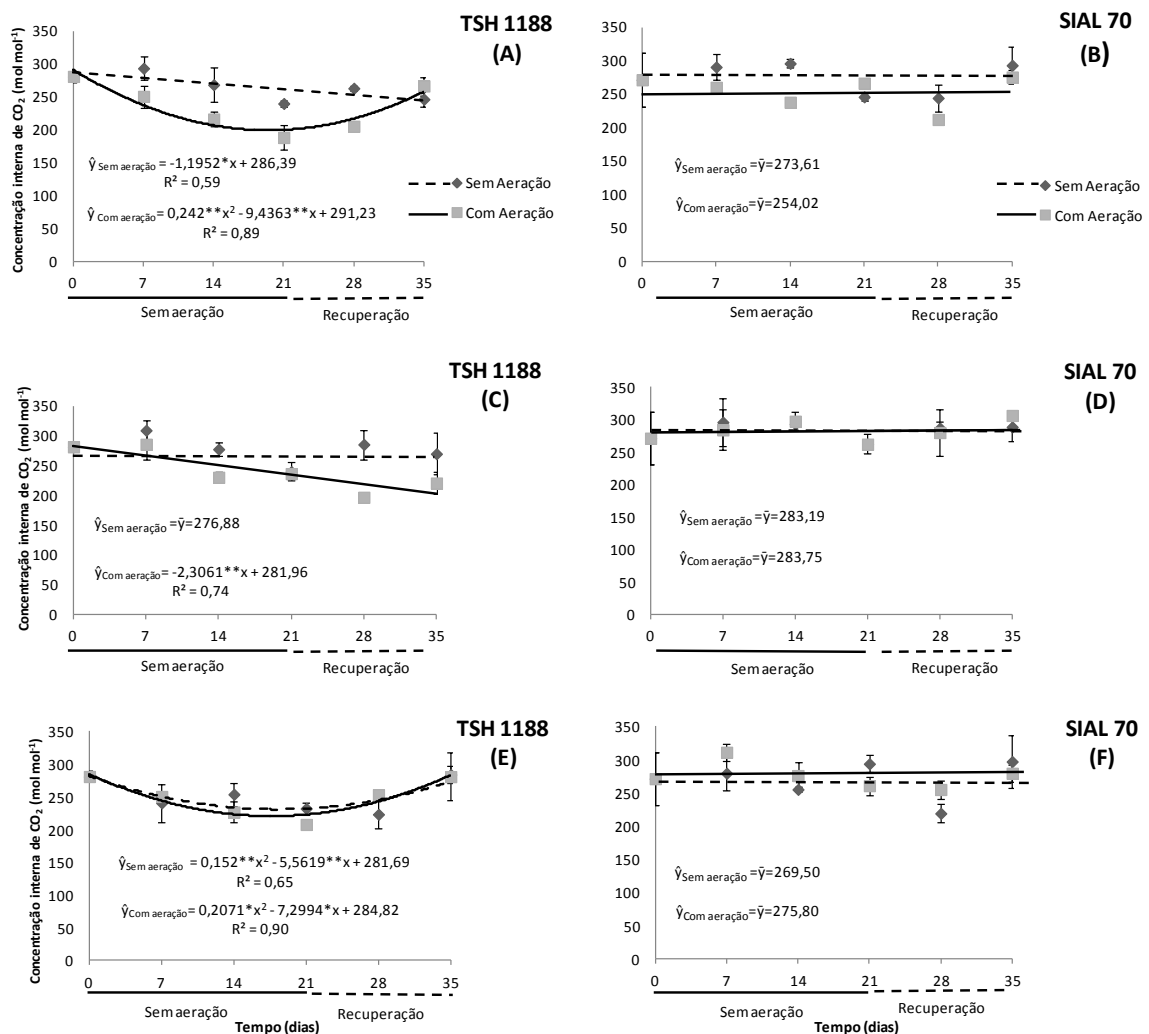


Figura 26 - Influência da presença e ausência da aeração sobre a concentração interna de CO₂ (Ci) em função do tempo, em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 μmol L⁻¹ (E e F) em solução nutritiva. Valores médios de três repetições (±EP).

De modo geral, os valores da concentração interna de CO₂ foram mais elevados nas plantas alagadas. O genótipo TSH 1188 na dose recomendada e intermediária apresentou valores da concentração interna de CO₂ mais elevados em reação ao ambiente com aeração. Bertolde (2007), também encontrou resultados semelhantes quando analisou clones de cacau sob alagamento. Mielke et al. (2005), estudando espécies arbóreas observaram que ao longo do tempo do alagamento ocorreu redução da concentração interna de CO₂ nas plantas. Segundo Ashraf (2003), a redução da concentração interna de CO₂ é considerada normal em plantas arbóreas tolerantes ao estresse por alagamento.

No entanto, geralmente baixos valores na concentração interna de CO₂ são conciliados com limitações estomáticas da fotossíntese e maior conservação da planta em relação ao uso de água, na qual não foi observado no presente estudo, uma vez que, não houve sincronismo com os resultados de fotossíntese e condutância estomática com a concentração interna de CO₂ comparando ambientes sem e com aeração. Segundo Liao e Lin (1994), quando ocorre queda da fotossíntese e aumento ou inalteração de CO₂, sugere-se que o CO₂ que estava chegando às células do mesófilo não estava sendo fixado na fase carboxilativa, ocorrência de limitação bioquímica, possivelmente por danos na estrutura da Rubisco ou redução na regeneração da Ribulose 1,5-bifosfato. Silveira (2011), analisando mudas de café sob alagamento também obteve resultados semelhantes com inalteração de CO₂ interna com redução da fotossíntese.

Ao comparar a concentração interna de CO₂ dos dois genótipos em ambiente sem e com aeração, verificam-se diferenças intergenotípicas nas três concentrações de Fe testadas (Figura 27). O genótipo SIAL 70, não alterou a concentração interna de CO₂ no decorrer do tempo para os dois ambientes testados, mas em média em ambiente sem aeração na dose 400,5 µmol L⁻¹ de Fe foi 9,2% mais alta que as do genótipo TSH 1188, já nas demais doses de Fe não houve diferença significativa entre os genótipos nesse ambiente (Figura 27A, 27C e 27E).

Em ambiente com aeração, o genótipo SIAL 70 apresentou concentração interna de CO₂ superior ao TSH 1188 em todas as doses de Fe testadas no decorrer do tempo. Em média elas foram, respectivamente, 13,6; 21,5 e 13,4% mais altas que o

genótipo TSH 1188 nas doses 44,5; 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe (Figura 27B, 27D e 27F).

Bertolde (2007), também observou diferenças interclonais entre os clones de cacau CA-1.4, CEPEC-2010, CEPEC-42, TSA-656 e TSH-774 em relação aos clones BE-07, CCN-10, CCN-51, CEPEC-2007 e CP-6, que apresentaram valores superiores na concentração interna de CO_2 em mudas expostas ao alagamento em comparação ao controle.

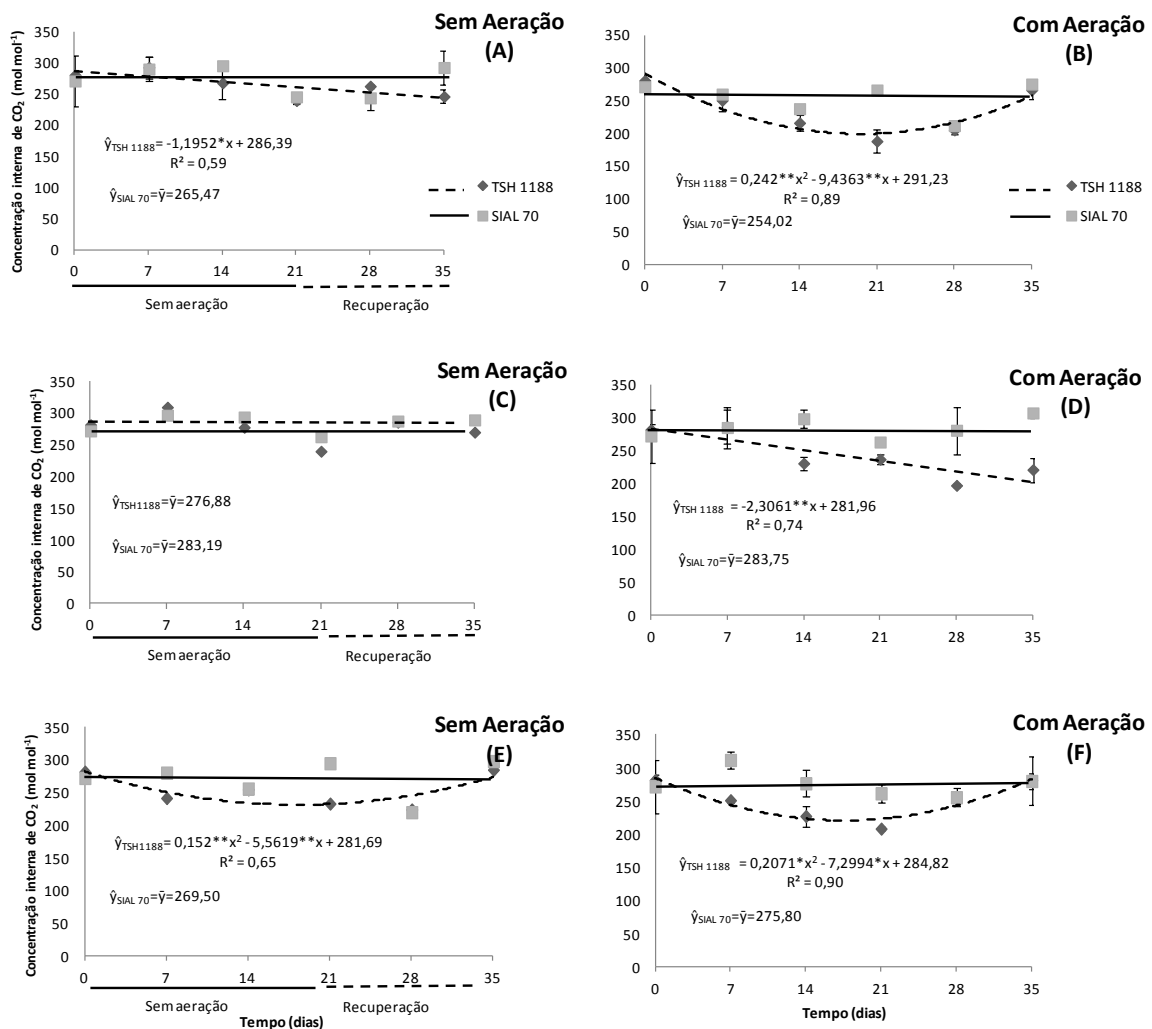


Figura 27 - Evolução da concentração interna de CO_2 (C_i) em função do tempo em dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a três concentrações de ferro, 44,5 (A e B), 133,5 (C e D) e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E e F), na presença e ausência de aeração em solução nutritiva. Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

4.4 COMPOSIÇÃO MINERAL

No genótipo TSH 1188, os teores de Nitrogênio (N), Fósforo (P), não diferiram estatisticamente entre os tratamentos de Fe e com e sem aeração, entretanto, comparando com os teores considerados normais desses elementos nas folhas do cacauzeiro, os resultados são considerados elevados conforme proposto por Souza Junior et al. (2012) (Tabela 1). Para o genótipo SIAL 70, o teor de N reduziu somente na dose mais elevada de Fe em condições sem aeração, enquanto que com aeração não foram observadas diferenças significativas. O teor de P na dose 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe sem aeração, observou-se aumento de 19,4% em relação ao ambiente com aeração. Dessa forma, também foi considerado alto o teor de N e P nas folhas do SIAL 70, pois os teores foliares considerados adequados para o N são 20,0 a 25 e P 1,7 a 2,5 g kg^{-1} (SOUZA JUNIOR et al., 2012).

Em contraste, o teor de Potássio (K) para o genótipo TSH 1188, nos dois ambientes estudados, apresentaram valores considerados baixos por Souza Junior et al. (2012), os teores foliares considerados adequados para o K é 18,0 a 24,0 g kg^{-1} . No entanto, em ambiente sem aeração, as concentrações mais baixas de Potássio (K) somente foram observadas na menor dose de Fe (44,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$), com redução de 14,1% em relação ao ambiente com aeração. Para o genótipo SIAL 70, sem aeração, o menor teor de K foi observado no tratamento com a menor dose de Fe (44,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$), e apenas na dose 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe os teores de K foram maiores estatisticamente no ambiente sem aeração. No entanto, a dose 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sem aeração e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com e sem aeração, apresentaram teores de K dentro da faixa considerada normal por Souza Junior et al. (2012).

O alagamento geralmente promove decréscimo na absorção e transporte de nutrientes das raízes para parte aérea pela ruptura do crescimento radicular, que está associada com a diminuição da respiração aeróbia ao nível celular (BARRETT-LENNARD; RATINGEN; MATHIE, 1999; SMETHURST; SHABALA 2003). Em espécies não tolerantes a falta de oxigenação, geralmente ocorre redução de N, P e K nas concentrações das folhas (DREW, 1997). Neste estudo, no entanto, não foram observadas diminuições abaixo dos teores recomendados de N e P comparando o ambiente com aeração, sugerindo que o TSH 1188 e SIAL 70 de maneira geral, não modificaram sua absorção quando foram submetidos a esses estresses.

Tabela 1. Influência de diferentes doses de ferro e presença e ausência da aeração sobre a concentração de nutrientes em folhas de *Theobroma cacao* L. genótipo TSH 1188 e SIAL 70, cultivado em solução nutritiva.

Nutriente	Aeração	Doses de Ferro ($\mu\text{mol L}^{-1}$)						CV(%)
		Fe 44,5	Fe 133,5	Fe 400,5	Fe 44,5	Fe 133,5	Fe 400,5	
		TSH 1188			SIAL 70			
Macronutrientes (g kg^{-1})								
Nitrogênio	SEM	30,6 Aa	29,6 Aa	29,6 Aa	30,2 Aa	31,8 Aa	27,4 Bb	3,57
	COM	31,8 Aa	30,4 Aa	30,7 Aa	30,8 Aa	30,7 Aa	29,5 Aa	
Fósforo	SEM	3,4 Aa	3,4 Aa	3,0 Aa	4,1 Aa	4,3 Aa	3,8 Aa	12,08
	COM	2,8 Aa	3,0 Aa	2,5 Aa	3,6 Aa	3,6 Ab	4,0 Aa	
Potássio	SEM	15,6 Aa	16,5 Aa	15,6 Aa	17,8 Ba	20,9 Aa	19,6 Aa	6,01
	COM	13,4 Bb	15,3 Aa	15,9 Aa	17,2 Aa	16,2 Ab	18,0 Aa	
Cálcio	SEM	22,3 Aa	19,5 Ba	16,9 Ca	20,6 Ba	22,4 Aa	18,8 Ca	3,70
	COM	20,0 Ab	18,1 Bb	17,0 Ba	21,4 Aa	21,1 Ab	18,4 Ba	
Magnésio	SEM	4,1 Aa	3,4 Aa	3,6 Aa	4,5 Aa	4,1 Aa	3,5 Ba	9,80
	COM	3,6 Aa	3,5 Aa	2,5 Bb	3,3 Ab	3,8 Aa	3,8 Aa	
Enxofre	SEM	2,0 Aa	1,6 Ba	1,5 Ba	1,6 Ba	2,0 Aa	1,5 Ba	10,12
	COM	1,6 Ab	1,6 Aa	1,4 Aa	1,5 Aa	1,5 Ab	1,7 Aa	
Micronutrientes (mg kg^{-1})								
Ferro	SEM	186,0 Ba	296,6 Aa	324,0 Aa	192,3 Ba	256,6 Aa	186,3 Bb	13,78
	COM	196,0 Aa	215,0 Ab	232,6 Ab	191,0 Ba	254,0 Aa	275,6 Aa	
Manganês	SEM	198,0 Aa	176,6 Aa	188,6 Aa	207,0 Ca	370,6 Aa	302,0 Bb	10,42
	COM	137 Bb	169,3 Ba	209,6 Aa	218,6 Ba	198,0 Bb	357,0Aa	
Boro	SEM	44,0 Aa	39,6 Ba	37,3 Ba	43,0 Ba	61,0 Aa	57,0 Aa	6,94
	COM	34,6 Ab	40,0 Aa	36,0 Aa	45,6 Ba	56,0 Aa	56,0 Aa	
Cobre	SEM	6,0 Aa	7,3 Aa	6,6 Aa	7,3 Ba	10,3 Aa	7,5 Ba	12,61
	COM	6,0 Aa	5,6 Ab	6,0 Aa	7,3 Aa	6,6 Ab	7,6 Aa	
Zinco	SEM	25,0 Ba	35,6 Aa	34,0 Aa	51,0 Aa	43,0 Ba	29,8 Ca	12,48
	COM	22,0 Ba	21,3 Bb	29,6 Aa	33,6 Ab	22,0 Bb	36,0 Aa	

As médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas nas linhas para as diferentes concentrações de Fe para cada genótipos e minúsculas nas colunas para os tratamentos com e sem aeração, para cada nutriente, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

O teor de Cálcio (Ca) no genótipo TSH 1188, tanto em ambiente sem e com aeração, apresentou-se elevado em relação aos teores foliares considerados adequados ($8,0$ a $15,0 \text{ g kg}^{-1}$) para o cacauzeiro (SOUZA JUNIOR et al., 2012), especialmente nas doses $44,5$ e $133,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe. Sem aeração, observou-se aumento de $11,5$ e $7,7\%$ nas concentrações $44,5$ e $133,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe,

respectivamente, em relação ao ambiente com aeração, contudo, houve redução de Ca à medida que se aumentaram as concentrações de Fe.

O genótipo SIAL 70 o teor de Ca, apresentou valores mais elevados na dose 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe sem aeração, sendo que na dose mais elevada de Fe (400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$), apresentou redução em relação à dose recomendada. Em ambiente com aeração, apenas a dose mais elevada de Fe apresentou redução em relação à dose recomendada. Ao comparar os teores de Ca entre os dois ambientes, apenas na dose 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe sem aeração apresentou maiores valores que o com aeração. Contudo, tanto em ambiente sem e com aeração, o teor de Ca apresentou-se elevado em relação aos teores foliares considerados adequados (SOUZA JUNIOR et al., 2012).

O teor de Magnésio (Mg) diminuiu 30% quando o genótipo TSH1188 foi submetido à maior dose de Fe em relação ao ambiente sem aeração. Já no genótipo SIAL 70, observou-se redução de 22,2% na dose mais alta de Fe em relação à dose recomendada de Fe. Comparando os dois ambientes estudados, verificou-se diferenças significativas apenas na dose recomendada de Fe, onde o ambiente sem aeração foi superior em 36,7% nos teores de Mg nas folhas. Segundo Souza Junior et al. (2012), a maioria dos tratamentos apresentaram teores foliares abaixo dos considerados adequados (4,0 a 8,0 g kg^{-1}), exceto para a dose recomendada de Fe sem aeração para o genótipo TSH 1188 e nas doses 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe sem aeração para o SIAL 70.

O aumento da concentração de Fe pode modificar os teores de outros nutrientes nas folhas. Para as folhas já estabelecidas de batata-doce, observou-se diminuição dos teores de Ca e Mg para as plantas submetidas aos elevados níveis de Fe (ADAMSKI, 2011), segundo Schmidt (2003), o excesso de ferro pode interferir na absorção de cálcio.

A alta concentração de Fe pode ter causado um desbalanço nutricional através de efeitos antagonísticos na absorção de Ca e Mg nas folhas (SAHRAWAT, 2005; SILVEIRA et al., 2007), como foi também afirmado por Müller (2015) e Fageria; Barbosa Filho; Carvalho (1981), avaliando plantas de arroz em diferentes concentrações de Fe esses autores observaram redução de Ca com aumento das concentrações de Fe.

O Mg é um importante componente da molécula de clorofila e está envolvido na ativação de várias enzimas fotossintéticas (LAING et al., 2000). A diminuição observada nas folhas de plantas dos dois genótipos de cacau estudados também foi verificada por Bertolde (2011), ao analisar os genótipos TSA 792 e TSH 774, observou redução significativa em presença de alagamento. Resultado também encontrado por Rehem et al. (2010), estudando seis clones de cacau também observou significativa redução desse nutriente nas folhas em presença de alagamento.

Para o Enxofre (S) no genótipo TSH 1188, em condições sem aeração, o teor desse nutriente foi maior na dose $44,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe sem aeração, com valores que ficaram na faixa considerada adequada ($1,0$ a $2,5 \text{ g kg}^{-1}$) (SOUZA JUNIOR et al., 2012). Nessa dose recomendada de Fe, os teores foram 25% mais elevados em ambiente sem aeração em relação ao com aeração. Em ambiente sem aeração, observou-se ainda que, houve redução de S à medida que se aumentaram as concentrações de Fe. Para o SIAL 70, observa-se que em ambiente sem aeração o maior teor foi encontrado na dose $133,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, na qual também observa-se maior teor sob condições de sem aeração. No ambiente com aeração, os teores de S foram semelhantes entre si nas diferentes doses de Fe, porém, todos os resultados desse nutriente ficaram na faixa considerada adequada por Souza Junior et al. (2012).

Segundo Viégas et al. (2013), o teor de S tende a aumentar quando há pouca disponibilidade de Fe na solução nutritiva. No entanto, nesse presente estudo foi observada essa afirmação apenas no genótipo TSH 1188 sem aeração, onde nesse tratamento obteve-se diferença estatística. Ainda assim, os teores de S nas folhas foram considerados adequados para o cacau.

Os teores de Fe no tecido foliar do genótipo TSH 1188 demonstraram tendência de aumento com o aumento das concentrações de Fe na solução nutritiva, sendo que somente foi constatada diferença significativa em ambiente com aeração. Segundo Souza Junior et al. (2012), os valores considerados adequados estão na faixa de $50,0$ a $250,0 \text{ g kg}^{-1}$, dessa forma em ambiente com aeração os teores de Fe podem ser considerados normais, no entanto, sem aeração apenas na dose de Fe

recomendada o teor de Fe ficou dentro da faixa recomendada pelos autores, nas demais doses o teor de Fe nas folhas foi considerado alto.

No SIAL 70, foi observado que os teores de Fe aumentaram à medida que se elevava as concentrações de Fe na solução nutritiva em ambiente com aeração, na qual, no ambiente sem aeração não foi observado esse mesmo comportamento. Contudo, quando comparado os dois ambientes, o sem aeração na dose mais elevada de Fe ($400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), foi observado redução de 32,4% em relação ao ambiente com aeração. Deste modo, a dose recomendada de Fe com e sem aeração e a dose mais elevada de Fe sem aeração podem ser consideradas normais segundo Souza Junior et al. (2012), já os demais tratamentos estão acima dos níveis de Fe recomendados nas folhas.

Adicionalmente, de modo geral houve aumento no teor de Fe à medida que se aumentou a disponibilidade desse nutriente para as plantas. Geralmente, a toxicidade do Fe está ligada com a absorção, translocação e acúmulo desse nutriente na parte aérea. Neste experimento, as altas concentrações de Fe não mostraram fitotoxidez nas folhas, uma vez que, as folhas não apresentaram coloração bronzeada intensa e manchas amarronzadas. Ou seja, a resposta fisiológica não foi alterada pelos níveis de Fe acumulados nos tecidos, mesmo chegando a ser expressivamente maior do que os valores requeridos para suprir as necessidades normais das plantas de 50 a 250 g kg^{-1} (SOUZA JUNIOR et al., 2012). Resultado semelhante foi encontrado com mamona, o acúmulo de ferro também não mostrou fitotoxidez nas folhas quando expostas a doses mais altas de Fe (MOTHÉ, 2012).

Esse resultado mostra a elevada capacidade dos dois genótipos em tolerar altas concentrações de Fe nas folhas, uma vez que o metabolismo fotossintético, bem como a maioria das características de crescimento de genótipos estudados não foi alterado drasticamente mesmo em níveis considerados tóxicos, principalmente para o genótipo TSH 1188.

Para plantas de arroz, valores entre 300 a 500 g kg^{-1} são considerados críticos para toxicidade (DOBERMANN; FAIRHUST, 2000). Porém, de acordo com Pugh; Dick; Fredeen, (2002), o nível crítico para as plantas estaria acima de 500 g kg^{-1} de massa seca. Estes dados podem indicar que existe variação entre as espécies, cultivares e

as condições de crescimento para a tolerância desse nutriente. Em café, por exemplo, a dose considerada tóxica é acima de 200 g kg⁻¹ (WILSON, 1985).

A capacidade de atuação dos mecanismos de proteção ou de tolerância à toxidez por Fe depende de diversos fatores, dentre os quais se destaca a duração do período em que as plantas são submetidas à toxidez. Para situações de curto prazo, os mecanismos de tolerância são provavelmente adequados. Para períodos longos, o mecanismo de tolerância pode não ser suficiente e a planta pode ter que adotar mecanismos de proteção (SCHMIDT, 2009), como mecanismos de exclusão e mecanismos de adaptação ou inativação do Fe nos tecidos das plantas (MARSCHNER, 1995).

Para as plantas de arroz, os mecanismos de proteção estão bem elucidados, e a toxidez por ferro pode ser dividida em mecanismos de exclusão e mecanismos de adaptação ou inativação do Fe nos tecidos das plantas, ou seja, mecanismo de tolerância (MARSCHNER, 1995; BECKER, ASCH, 2005).

Levando em consideração os resultados obtidos neste trabalho, provavelmente os genótipos de cacau estudados não apresentaram o mesmo mecanismo de proteção à toxidez por Fe. Em ambiente sem aeração o Fe se encontra mais disponível para as plantas, o mecanismo de proteção do TSH 1188 pode ter sido a estratégia de inclusão/proteção, onde o Fe²⁺ é absorvido na raiz, mas o dano no tecido pode ser evitado por outras compartimentalizações (imobilização do ferro ativo em “sítios de armazenamento”) ou pela exclusão no simplasto (imobilização pelo apoplasto da folha). As plantas que utilizam essa estratégia toleram níveis elevados de Fe²⁺ dentro das células da folha, provavelmente através da “destoxificação” enzimática no simplasto (BECKER, ASCH, 2005). A tolerância diferencial a níveis elevados de nutrientes entre espécies e cultivares, embora possa sofrer os efeitos do ambiente, é controlada geneticamente e pode ser devida à exclusão e, ou, à tolerância interna dos tecidos (MUKHOPADHYAY, SHARMA, 1991).

O genótipo SIAL 70, provavelmente empregou a estratégia de exclusão/proteção, onde excluem Fe²⁺ em nível da raiz, e assim evita o dano de Fe²⁺ ao tecido alvo (BECKER, ASCH, 2005), contudo, isso provavelmente ocorreu em ambiente sem aeração quando a disponibilidade de Fe é maior, dessa forma, mesmo com elevada dose de Fe, os resultados de teores foliares desse nutriente ficaram na faixa

recomendada, não proporcionando níveis críticos desse nutriente para o genótipo SIAL 70.

Os teores de Manganês (Mn) para o genótipo TSH 1188, não apresentaram alterações significativas em relação às doses de Fe sem aeração. Com aeração, na dose mais elevada de Fe, observou-se aumento do teor de Mn nas folhas em relação às demais doses. No genótipo SIAL 70, o teor desse nutriente foi maior na dose intermediária e mais baixo na menor dose de Fe no ambiente sem aeração, enquanto no ambiente com aeração o teor mais elevado foi obtido na maior dose de Fe. De maneira geral, os teores de Mn nas folhas foram considerados adequados segundo Souza Junior et al. (2012) (150,0 a 750,0 g kg⁻¹), exceto para o genótipo TSH 1188 na dose 44,5 µmol L⁻¹ com aeração.

As concentrações de Fe e Mn em partes vegetativas de plantas, muitas vezes aumentam devido às inundações. Estes elementos são encontrados em formas solúveis em solos alagados (PONNAMPERUMA, 1972), o que facilita sua absorção.

Neste experimento, foi observado aumento do Mn nas folhas das plantas com a maior dose de ferro com aeração para ambos os genótipos, esse resultado indica que a barreira de óxido de ferro na absorção desse nutriente não foi eficaz, no entanto, essa maior absorção não ultrapassou a faixa considerada adequada desse nutriente. Uma vez que, o Fe e o Mn competem pelo mesmo sítio de ligação fisiológico (BASER; SOMANI, 1982), o que pode ter inibido ou potencializado a absorção e a translocação do Mn para a parte aérea. De acordo com Krüeger et al. (2002), foi identificada, no floema de *Ricinus communis*, uma proteína de ligação e transporte de Fe²⁺, a qual pode ligar-se também aos metais Cu²⁺, Zn²⁺ Mn²⁺. Resultado também encontrado em arroz, onde verificou-se tendência de aumento nas concentrações de Mn nas folhas, à medida que se aumentaram as concentrações de Fe na solução nutritiva (CAMARGO, 1984).

No teor de Boro (B) para o genótipo TSH 1188, observou-se redução desse nutriente quando se elevou as doses de Fe na solução sem aeração, enquanto que no ambiente com aeração não foram verificadas diferenças significativas. Na dose 44,5 µmol L⁻¹ o teor de B foi mais elevado em condições sem aeração sendo superiores 27,2% no teor de B na folha em relação ao ambiente com aeração. O SIAL 70, o teor de B foi estatisticamente maior nas doses mais elevadas de Fe que não diferiram

entre si, tanto com e sem aeração. No entanto, independente dos tratamentos, observou-se que o teor de B na folha ficou dentro da faixa considerada normal por Souza Junior et al. (2012), sendo de 30 a 70 g kg⁻¹.

Os teores de Cobre (Cu) para o genótipo TSH 1188, não apresentaram diferenças significativas comparando as doses de Fe, no entanto, na dose intermediária de Fe comparando os dois ambientes de estudo, o ambiente sem aeração apresentou valores superiores que ambiente com aeração. Já o genótipo SIAL 70, foram maiores na dose intermediária 133,5 µmol L⁻¹ (41,1%) do que na dose recomendada de Fe sem aeração. Comparando os dois ambientes, o ambiente sem aeração foi 56,1% mais altos do que em ambiente com aeração. Esses teores estão abaixo da faixa considerada ótima para o cacauzeiro (10,0 a 20,0 g kg⁻¹), exceto para a dose 133,5 µmol L⁻¹ de Fe sem aeração (SOUZA JUNIOR et al., 2012).

Segundo estudos feitos por Viégas et al. (2013) em pimenta-longa (*Piper hispidum* C. DC.), o aumento do teor de Fe nas folhas pode ocasionar redução e/ou ausência de Cu nas folhas. Entretanto, essa redução do teor de Cu nas folhas dos dois genótipos de cacau estudado, não pode ser afirmada pelo aumento de Fe na solução nutritiva, pois todos os tratamentos apresentaram valores abaixo dos níveis considerados adequados para o cacauzeiro.

Os teores de Zinco (Zn) no TSH 1188 foram maiores nas doses 133,5 e 400 µmol L⁻¹ de Fe sem aeração, no entanto, com aeração na maior dose de Fe, observou-se aumento do teor de Zn. Comparando os dois ambientes, observou-se que, a dose 133,5 µmol L⁻¹ de Fe sem aeração apresentou valor superior ao ambiente com aeração. Para o genótipo SIAL 70, o teor de Zn, em ambiente sem aeração, observou-se redução do teor de Zn à medida que se elevava as concentrações de Fe na solução nutritiva. Com aeração na dose 133,5 µmol L⁻¹ de Fe apresentou redução em relação às demais doses de Fe. Comparando os dois ambientes, o ambiente sem aeração na dose 44,5 e 133,5 µmol L⁻¹ de Fe apresentou valores superiores ao ambiente com aeração. No entanto, segundo Souza Junior et al. (2012), os teores de Zn estão abaixo dos considerados ótimos para cacau para os dois genótipos estudados (80,0 a 150 g kg⁻¹).

Os resultados obtidos para o Zn no genótipo TSH 1188, corroboram com os obtidos por Yoshihara et al. (2010), que analisando brotos de arroz, observou aumento no

teor de Zn quando as plantas foram submetidas a elevadas doses de Fe. O íon Fe^{2+} é transportado para o interior do vegetal por transportadores capazes também de transportar outros minerais, como o Zn, resultando em um acúmulo maior desses nutrientes com o aumento do Fe no solo. Além disso, a acidificação do meio provocada pela raiz pode ter disponibilizado o Zn, possibilitando maior absorção de Zn^{2+} (GROTZ, GUERINOT, 2006; KOBAYASHI, NISHI, 2008). Já o genótipo SIAL 70, apresentou redução em ambiente sem aeração à medida que se aumentava o Fe, resultado que também está de acordo com Jugsujinda e Patrick (1993), que afirmaram menor absorção de Zn ao excesso de Fe. Esses resultados confirmam que, cada espécie/genótipo/cultivar tem formas diferentes de lidar com o estresse causado pelo excesso de Fe.

De modo geral, o genótipo SIAL 70 apresentou maior acumulação em seu tecido foliar de macro e micronutrientes em relação ao genótipo TSH 1188 (Tabela 2). Contudo, os teores de N para a maioria dos tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre os genótipos, exceto na dose $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe sem aeração, foi observado maiores teores de N (8%) para o genótipo TSH 1188 em relação do SIAL 70. Em relação aos teores de P e K, o SIAL 70 apresentou aumentos significativos em todos os tratamentos em relação o TSH 1188. Para os teores de Ca, o genótipo SIAL 70 também apresentou maiores teores em relação ao TSH 1188, exceto na dose $44,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe sem aeração, onde foi observado maiores valores para o TSH 1188 (8,2%). Os teores de Mg, de modo geral não foram observadas diferenças significativas entres os genótipos, exceto na dose $133,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ sem aeração e $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ com aeração, observaram-se reduções de 17,0 e 34,2% para o genótipo TSH 1188 respectivamente.

Para os micronutrientes, nos teores de Fe não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos, exceto na dose $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ sem aeração onde o SIAL 70 apresentou redução de 42,5% em relação ao genótipo TSH 1188, contudo na dose $133,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe com aeração o comportamento se inverteu, com redução de 15,3% para o genótipo TSH 1188 em relação ao SIAL 70. Os teores de Mn e B foram maiores no genótipo SIAL 70, exceto na dose recomendadas de Fe, onde os mesmos não apresentaram diferenças significativas entre si. Já para os teores de Cu, não foram encontrados diferenças significativas entre os genótipos, exceto na dose $133,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ sem aeração, onde os teores de Cu foram 41,0%

mais altos no SIAL 70 em relação ao TSH 1188. De modo geral, os teores de Zn foram maiores no SIAL 70 sem aeração, exceto na dose $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe reduzindo 12,3% em relação ao TSH 1188. Em ambiente com aeração, os teores de Zn não apresentaram diferenças entre os genótipos, exceto na dose $44,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, onde o TSH 1188 reduziu 34,5% em relação ao SIAL 70.

Contudo, o aumento das taxas transpiratórias deve ter contribuído para o aumento da eficiência de absorção de nutrientes do genótipo SIAL 70 (Figura 24), uma vez que, as taxas transpiratórias de modo geral, foram maiores que ao genótipo TSH 1188, pois dentre outros fatores, a concentração externa e as taxas transpiratórias podem favorecer a absorção de certos nutrientes (MARSCHNER, 1995). Muitas vezes, a eficiência de absorção aumenta, mais a eficiência de utilização diminui.

Decréscimos na eficiência de utilização com o aumento da disponibilidade de certos nutrientes na solução têm sido relatados para várias espécies vegetais (SILVA; FURTINI NETO; VALE, 1996). De acordo com Bridgham et al. (1995) e Silva, Furtini Neto e Vale (1996), a eficiência de utilização diminui com o aumento da disponibilidade do nutriente no substrato, uma vez que, nessa condição, a produção de biomassa pelas plantas não sofre incremento na mesma proporção que a absorção e acúmulo do nutriente nos tecidos, havendo, nesse caso, um declínio na utilização interna do nutriente para a produção de biomassa (SIDDIQI; GLASS, 1981).

Vários autores definem a eficiência nutricional de diferentes maneiras. Para Siqueira et al.(1999) o termo eficiência é utilizado para diferenciar as espécies de plantas, genótipos e cultivares pela as habilidade em absorver e utilizar os nutrientes. Já para Blair (1993) eficiência nutricional está relacionada com a habilidade do genótipo/cultivar adquirir nutrientes do meio de crescimento e/ou incorporar ou utiliza-lo na produção da biomassa da parte aérea e raiz.

Tabela 2. Concentração de nutrientes das folhas de *Theobroma cacao* L., genótipos TSH 1188 e SIAL 70, sob diferentes doses de Fe, com e sem aeração em solução nutritiva.

Aeração	Ferro ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Macronutrientes (g.kg^{-1})											
		Nitrogênio		Fósforo		Potássio		Cálcio		Magnésio		Enxofre	
		TSH 1188	SIAL 70	TSH 1188	SIAL 70	TSH 1188	SIAL 70	TSH 1188	SIAL 70	TSH 1188	SIAL 70	TSH 1188	SIAL 70
	44,5	30,6 A	30,2 A	3,4 B	4,1 A	15,6 B	17,8 A	22,3 A	20,6 B	4,1 A	4,5 A	2,0 A	1,6 B
SEM	133,5	29,6 A	31,8 A	3,4 B	4,3 A	16,5 B	20,9 A	19,5 B	22,4 A	3,4 B	4,1 A	1,6 B	2,0 A
	400,5	29,6 A	27,4 B	3,0 B	3,8 A	15,6 B	19,6 A	16,9 B	18,8 A	3,6 A	3,5 A	1,5 A	1,5 B
	44,5	31,8 A	30,8 A	2,8 B	3,6 A	13,4 B	17,2 A	20,0 B	21,4 A	3,6 A	3,3 A	1,6 A	1,5 A
COM	133,5	30,4 A	30,7 A	3,0 B	3,6 A	15,3 B	16,2 A	18,1 B	21,1 A	3,5 A	3,8 A	1,6 A	1,5 A
	400,5	30,7 A	29,5 A	2,5 B	4,0 A	15,9 B	18,0 A	17,0 B	18,4 A	2,5 B	3,8 A	1,4 A	1,7 A
CV(%)		3,57		12,08		6,01		3,7		9,8		10,12	
Micronutrientes (mg.kg^{-1})													
		Ferro		Manganês		Boro		Cobre		Zinco			
	44,5	186,0 A	192,3 A	198,0 A	207,0 A	44,0 A	43,0 A	6,0 A	7,3 A	25,0 B	51,0 A		
SEM	133,5	296,6 A	256,6 A	176,6 B	370,6 A	39,6 B	61,0 A	7,3 B	10,3 A	35,6 B	43,0 A		
	400,5	324,0 A	186,3 B	188,6 B	302,0 A	37,3 B	57,0 A	6,6 A	7,5 A	34,0 A	29,8 B		
	44,5	196,0 A	191,0 A	137,0 B	218,6 A	34,6 B	45,6 A	6,0 A	7,3 A	22,0 B	33,6 A		
COM	133,5	215,0 B	254,0 A	169,3 B	198,0 A	40,0 B	56,0 A	5,6 A	6,6 A	21,3 A	22,0 A		
	400,5	232,6 A	275,6 A	209,6 B	357,0 A	36,0 B	56,0 A	6,0 A	7,6 A	29,6 A	36,0 A		
CV(%)		13,78		10,42		6,94		12,61		12,48			

As médias seguidas pelas mesmas letras, nas linhas para genótipos, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Dessa forma, provavelmente o genótipo TSH 1188 apresenta maior eficiência no uso de nutrientes, uma vez que, mesmo com menor teor de nutrientes seu crescimento foi superior ao genótipo SIAL 70. Pode-se também levar em consideração, sua taxa fotossintética (Figura 18) que na maioria das vezes esteve superior ao genótipo SIAL 70, o que pode ter contribuído para seu elevado crescimento.

4.5 CRESCIMENTO

De modo geral, o diâmetro, a altura do caule, a área foliar e o número de folhas do genótipo TSH 1188 diminuíram ou não apresentaram diferenças em ambiente sem aeração, exceto para a área foliar na maior dose de Fe que foi maior em ambiente sem aeração (Figuras 28A, C, E e G). No genótipo TSH 1188, observou-se que sem aeração ocorreu redução de 28, 24,7 e 13,6% no diâmetro do caule com aumento das concentrações de Fe (Figura 28A). Por outro lado, para essa variável o genótipo SIAL 70 sem aeração, apresentou redução de 23,4% somente na dose 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe (Figura 28B).

Com relação à área foliar o genótipo TSH 1188, foi também observado, que a falta de aeração promoveu redução de 57,1 e 50,3% nas concentrações 44,5 e 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe respectivamente, entretanto, na dose 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, a área foliar aumentou 22,2% (Figura 28E). A área foliar do genótipo SIAL 70 não foi afetada pela ausência de aeração, independente da dose de Fe (Figura 28F), sendo que o genótipo TSH 1188 apresentou mesma tendência de redução no número de folhas observada para a área foliar, exceto na maior dose de Fe na qual a ausência de aeração não influenciou essa variável (Figuras 28E e G). O SIAL 70 apresentou maior número de folhas no ambiente sem aeração (50%) somente na dose 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe (Figura 28H).

Esses resultados sugerem, que a falta de aeração influencia negativamente o crescimento desses dois genótipos, uma vez que essas variáveis foram medidas 14 dias após o início da recuperação. Pode-se observar que as plantas que passam por esse estresse se recuperam fisiologicamente na maioria das vezes, contudo, seu crescimento é prejudicado em comparação as plantas que não são submetidas a esse estresse.

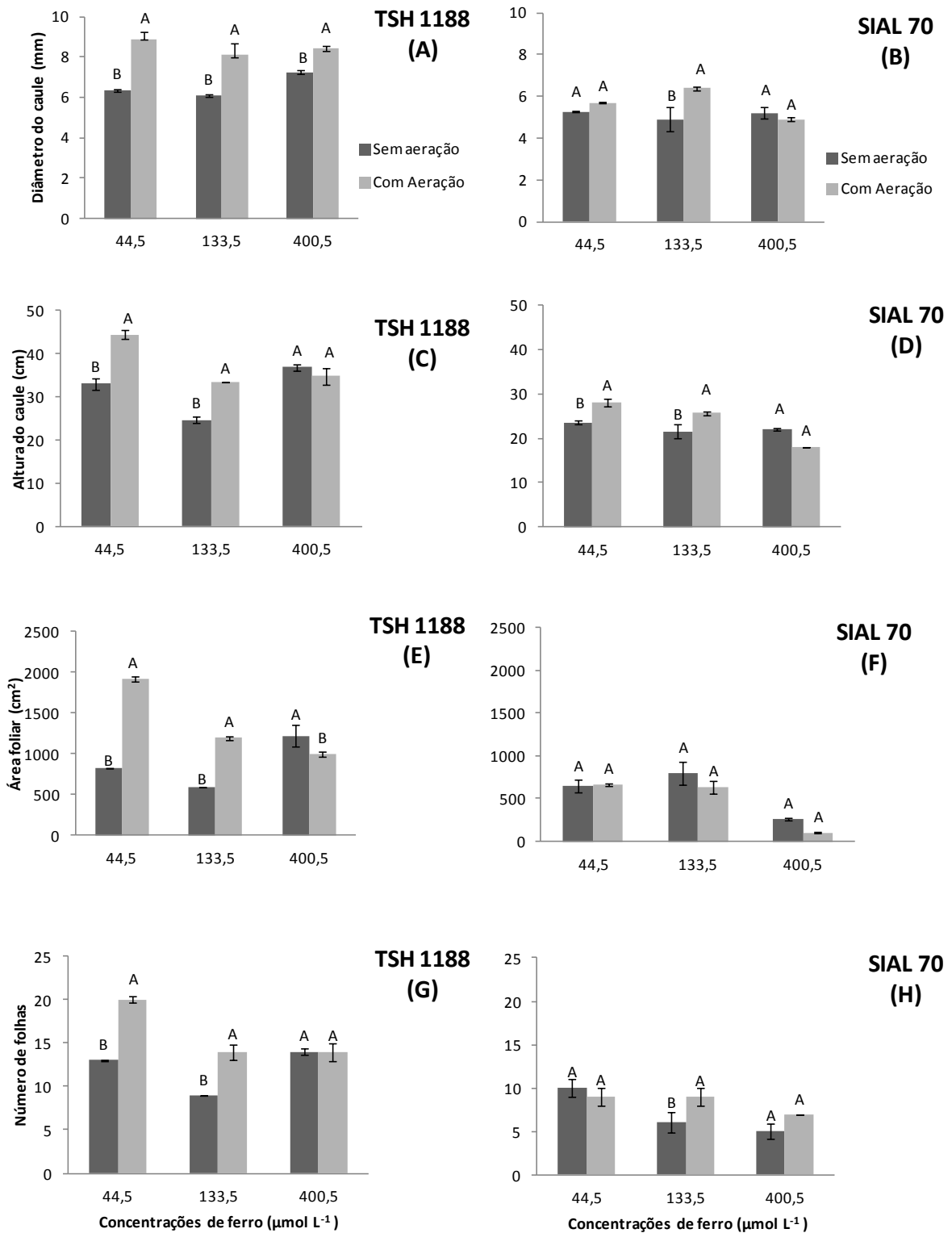


Figura 28. Influência da presença e ausência da aeração sobre o diâmetro do caule (A e B), altura do caule (C e D), área foliar (E e F) e número de folhas (G e H) dos genótipos de cacau TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a diferentes concentrações de ferro em solução nutritiva. Colunas seguidas da mesma letra, dentro de cada concentração de ferro, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Valores médios de três repetições (\pm EP).

A deficiência de O₂ diminui o crescimento das plantas em espécies tolerantes e não tolerantes (PEZESHK, 1993), contudo, as espécies consideradas sensíveis ao alagamento desenvolvem sintomas, os quais resultam principalmente de distúrbios causados pela hipóxia ou anóxia nas raízes, causando decréscimo no crescimento da planta podendo levar a morte (ARRUDA; CALBO, 2004). Em café, reduções por alagamento foram observadas nas variáveis número de folhas, área foliar, diâmetro do caule e massa seca das folhas (SILVEIRA, 2011), coincidindo com os resultados obtidos neste trabalho, principalmente para o genótipo TSH 1188. Decréscimos significativos também foram observados em plântulas alagadas de *Genipa americana*, na qual, o número de folhas foi afetado significativamente (MIELKE et al., 2003).

Rehem et al. (2010), analisando vários clones do cacauzeiro em presença de alagamento, observaram diminuição da área foliar e número de folhas em seis genótipos de cacau. No entanto, essa resposta de redução do crescimento das plantas, é também uma característica de espécies tolerantes ao alagamento, pois são raras as espécies que não apresentam redução do crescimento quando submetidas ao alagamento do solo (MEDRI et al., 2012).

Durante o período experimental, observaram-se sintomas de estresse por hipóxia ou anóxia em todas as plantas submetidas à ausência de aeração, como desenvolvimento de lenticelas hipertróficas e formação de raízes adventícias na base do caule e nas raízes adventícias preexistentes (dados não mostrados). Essas modificações morfológicas representam estratégias desenvolvidas por plantas submetidas ao estresse por alagamento e contribuem para a melhor aeração do sistema radicular (MEDINA et al., 2009). Estes mesmos sintomas foram também observados por Sena Gomes, Kozłowski (1986) em plântulas de cacauzeiro 'Catongo', durante 60 dias de alagamento.

Outro mecanismo das plantas responderem ao estresse é a formação de aerênquima em caules e raízes de espécies aquáticas e tolerantes ao alagamento, que geralmente ocorre por separação celular durante o desenvolvimento (esquisogenia) ou por lise de células corticais e morte celular (lisogenia). Aerênquimas são tecidos corticais com grandes espaços intercelulares, que fornecem baixa resistência interna à difusão do ar da parte aérea aeróbica para as

raízes anaeróbicas, promovendo sobrevivência das plantas ao alagamento do solo (DREW, 1997). Essas modificações levaram os dois genótipos de cacau utilizados neste estudo a sobreviverem e se crescerem nesse ambiente estressante.

Em todas as concentrações de Fe, o genótipo TSH 1188 apresentou maior diâmetro, altura do caule, área foliar e número de folhas em relação ao genótipo SIAL 70 nos dois ambientes de cultivo, exceto para a área foliar na dose $133,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe sem aeração, na qual o SIAL 70 superou o TSH 1188 (Figura 29).

Esse maior desenvolvimento do TSH 1188, pode estar relacionado à sua constituição genética, uma vez que este genótipo apresenta características de rápido crescimento, desenvolvimento e boa adaptabilidade sob diferentes condições ambientais (PINTO; PIRES, 1998), incluindo deficiência de O_2 no solo (BERTOLDE, 2007). Provavelmente, o genótipo TSH tem maior eficiência no uso de nutrientes, uma vez que conseguiu incorporar e utilizar na produção da biomassa (BLAIR, 1993).

Em relação às diferentes concentrações de Fe, o genótipo SIAL 70 apresentou nas variáveis, diâmetro e altura do caule em ambiente com aeração, na concentração $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, redução de 14 e 36,6% em relação à concentração recomendada para cacau. No genótipo TSH 1188 sem aeração, todas as variáveis aumentaram na concentração mais elevada de Fe, $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, em relação à concentração recomendada. No entanto, em ambiente com aeração todas as variáveis diminuíram com a elevação das concentrações de Fe em relação à concentração $44,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. O genótipo SIAL 70 apresentou redução em todas as variáveis na concentração $400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe em ambiente com aeração, enquanto que sem aeração apenas as variáveis área foliar e número de folhas diminuíram (Figura 30).

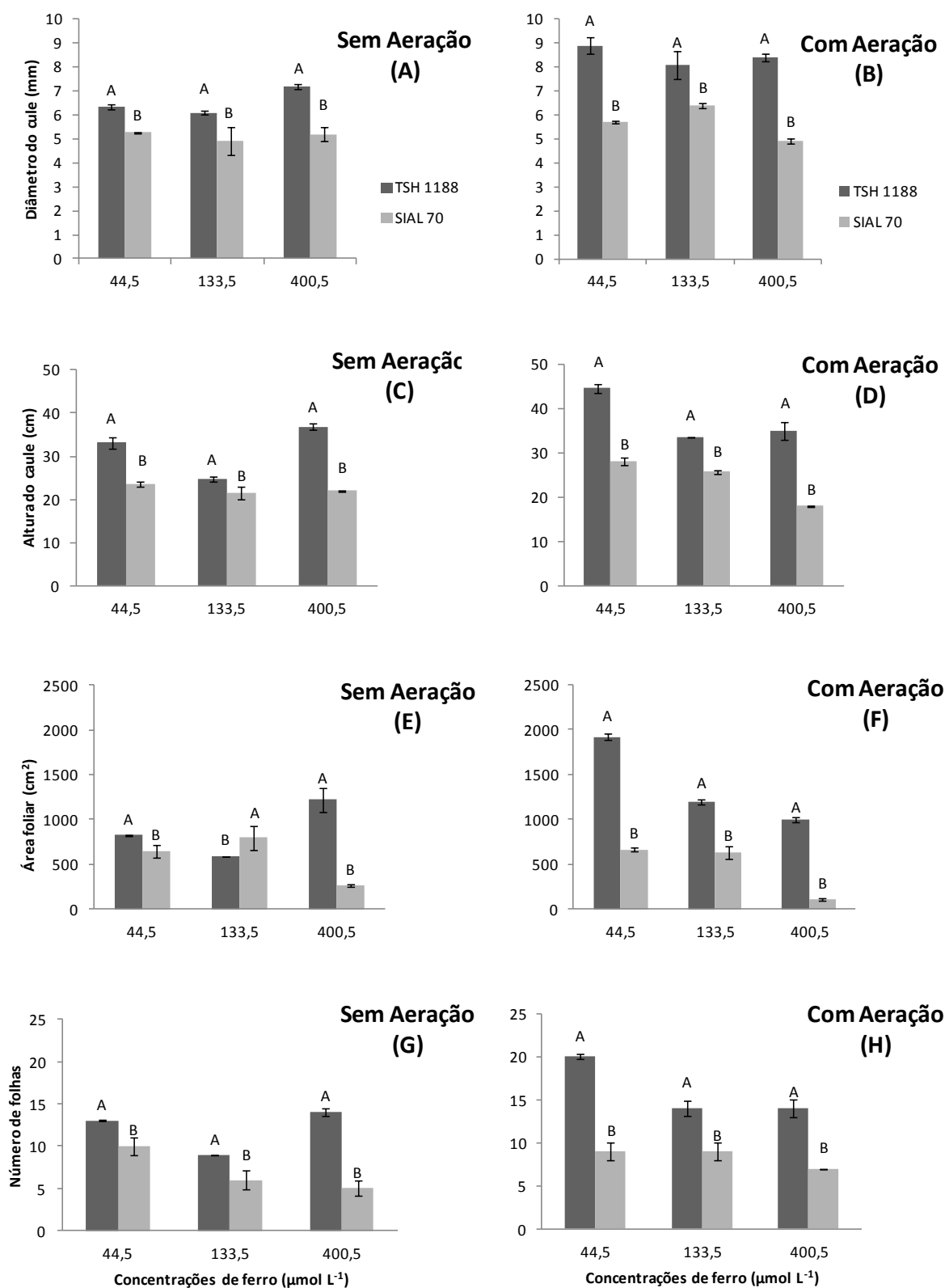


Figura 29. Diâmetro do caule (A e B), altura do caule (C e D), área foliar (E e F) e número de folhas (G e H) dos genótipos de cacau TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a diferentes concentrações de ferro na ausência e presença de aeração em solução nutritiva. Colunas seguidas da mesma letra dentro de cada concentração de ferro não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Valores médios de três repetições ($\pm\text{EP}$).

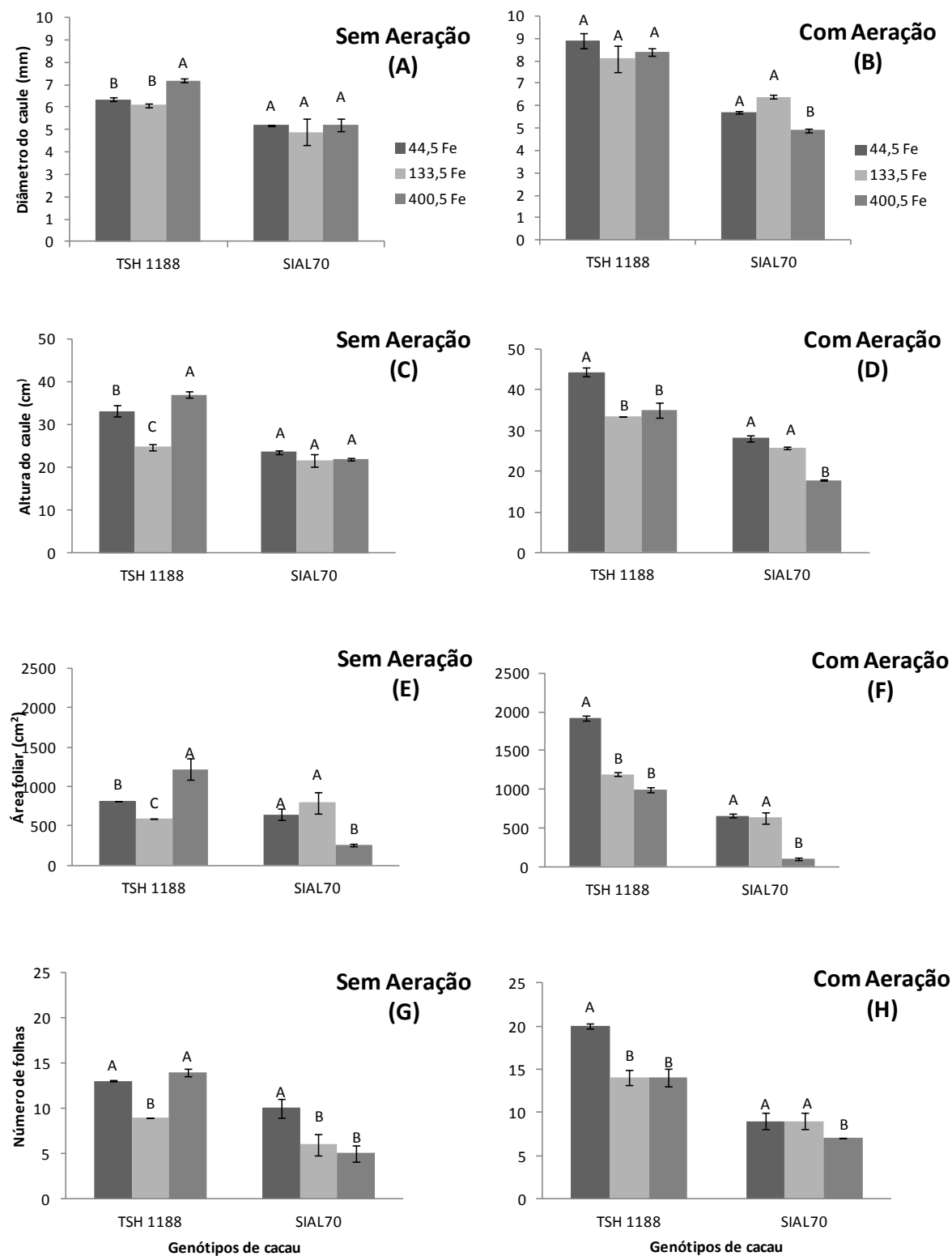


Figura 30. Influência das concentrações de ferro sobre o diâmetro do caule (A e B), altura do caule (C e D), área foliar (E e F) e número de folhas (G e H) de dois genótipos de cacau cultivados na ausência e presença de aeração em solução nutritiva. Colunas seguidas da mesma letra dentro de cada genótipo não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Valores médios de três repetições (\pm EP).

Contudo, o aumento de todas as variáveis na maior concentração de Fe 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sem aeração do genótipo TSH 1188, sugere tolerância a níveis mais elevados de Fe, uma vez que sua disponibilidade se intensifica para a planta em ambiente com hipóxia ou anóxia. As plantas desenvolvem mecanismos para evitar a toxidez, dentre os mecanismos de tolerância ao Fe, vacúolos armazenam o excesso (BRIAT et al., 2010) e dilui-se as concentrações do nutriente nos tecidos da planta (MUKHOPADHYAY; SHARMA, 1991). Entretanto, decréscimos significativos no crescimento da espécie *Eugenia uniflora* foram observados em altas concentrações de Fe (NEVES et al., 2009), no qual coincidem com os resultados do genótipo SIAL 70, que reduziu seu crescimento na concentração mais elevada de Fe.

No genótipo TSH 1188, as massas secas da raiz, caule e folha reduziram em ambiente sem aeração em todas as concentrações de Fe (Figura 31). Em ambiente sem aeração, a massa seca da raiz reduziu 53,8; 50,0 e 24,4% nas concentrações de 44,5; 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe para o genótipo TSH 1188 (Figura 28A). Para massa seca do caule nas concentrações 44,5; 133,5 e 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, observou-se redução de 51; 52,0 e 20,6% (Figura 31C). A massa seca das folhas decresceu 50 e 53% nas concentrações menores de Fe respectivamente, no entanto, observou-se, aumentou de 20% na concentração 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 31E). Contudo, o genótipo SIAL 70 não apresentou diferenças entre os tratamentos impostos na massa seca da raiz, no entanto, na massa seca do caule, nas doses 44,5 e 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ocorreram reduções de 46,6% sem aeração respectivamente (Figura 31B e D), nas massas secas das folhas, foram observadas reduções de 45,8% na menor concentração de Fe sem aeração (Figura 31F).

A redução da massa seca da raiz em função da falta de aeração (alagamento) é descrita em muitas espécies e, mesmo com o surgimento de raízes adventícias, observa-se o decréscimo da biomassa do sistema radicular. Isso porque o alagamento provoca morte de muitas raízes, além do fato de que a biomassa das raízes adventícias é relativamente pequena, por apresentar aerênquima e espaços intercelulares (SANTIAGO; PAOLI, 2003). Decréscimo na biomassa de raízes é considerado uma resposta comum ao alagamento em espécies arbóreas, que pode estar relacionado com a baixa atividade metabólica, acompanhado pela diminuição no crescimento sobre condições de anóxia ou hipóxia (MIELKE et al., 2005).

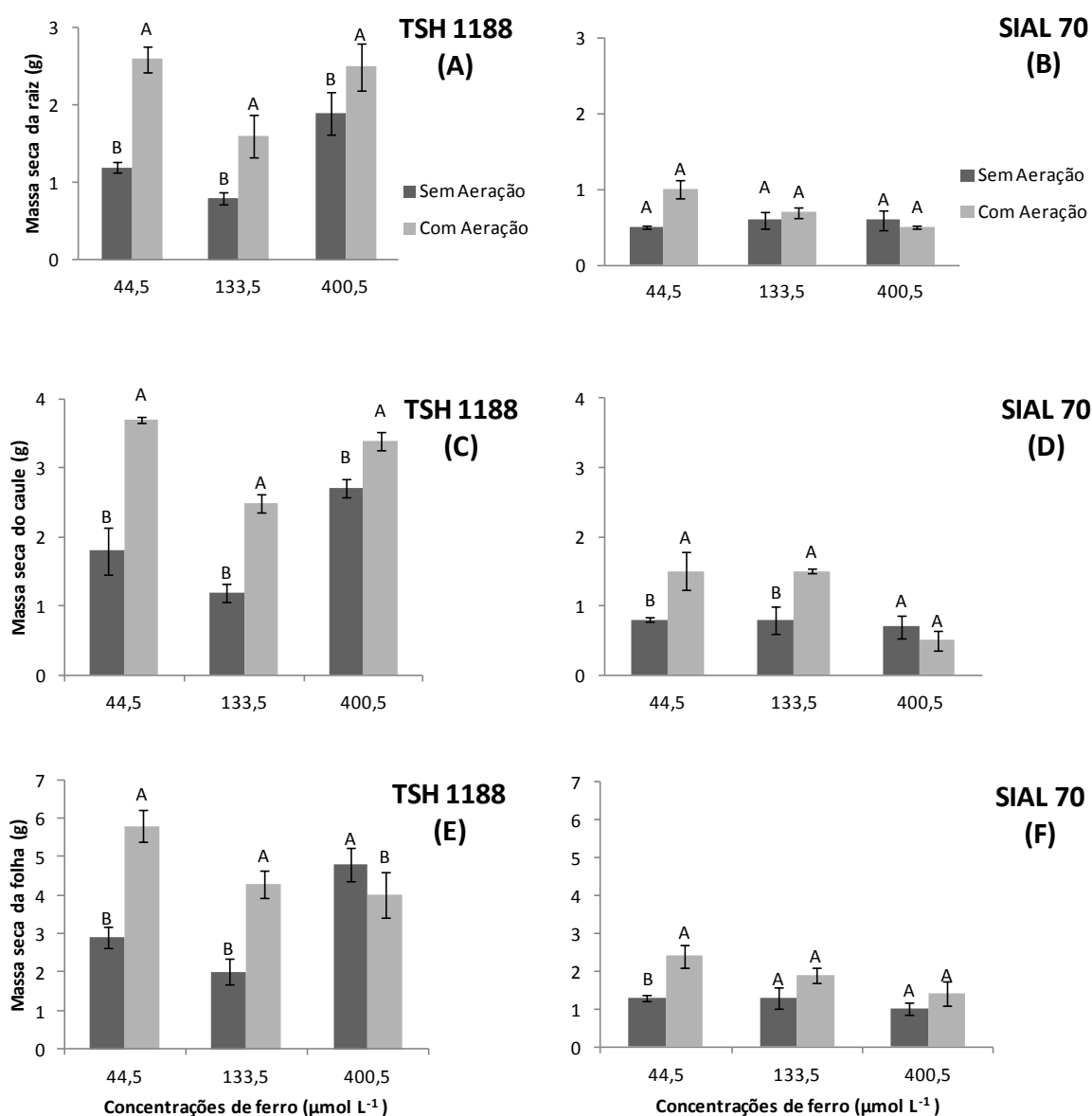


Figura 31. Influência da presença e ausência da aeração sobre as massas secas das raízes (A e B), caule (C e D) e folhas (E e F) dos genótipos de cacau TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a diferentes concentrações de ferro em solução nutritiva. Colunas seguidas da mesma letra dentro de cada dose de ferro não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Valores médios de três repetições ($\pm EP$).

Segundo Kozłowski (1997), é provável que as raízes adventícias facilitem a absorção e translocação de O_2 para as raízes submersas, podendo assim manter o crescimento da parte aérea durante períodos de alagamento (CHEN; QUALLS; MILLER, 2002). Desse modo, o contínuo crescimento das raízes em ambiente sem aeração e altas concentrações de Fe ($400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) no genótipo TSH 1188, mostra que as folhas estavam fotossinteticamente ativas como observado na Figura 14, mesmo com reduções no período de falta de aeração, o genótipo TSH 1188

manteve a capacidade suficiente para continuar com o crescimento da parte aérea e ainda favorecer carboidratos para o crescimento radicular.

O crescimento da parte aérea representa uma resposta adaptativa importante de algumas plantas tolerantes à hipóxia (MIELKE et al., 2005), no entanto, a resposta de crescimento das plantas estudadas, sugere que esse aumento se deu pelo sinergismo de altas concentrações de Fe com falta de aeração. Neste ponto, é importante destacar que o acúmulo de massa seca da parte aérea em plantas submetidas ao ambiente sem aeração, mostra que em altas concentrações de Fe os dois genótipos de *Theobroma cacao* L. apresentaram tolerância à falta de aeração (alagamento) uma vez que conseguiram crescer nessas condições.

Mielke et al. (2005), em estudo realizado com *Annona glabra*, uma espécie descrita pelos autores como altamente tolerante ao alagamento, verificaram que nessa condição houve aumentos significativos na biomassa das raízes e caules e planta inteira, sem induzir sintomas de estresse. Da mesma forma, Santiago e Paoli (2007), verificaram aumento na biomassa das raízes e parte aérea em *Genipa americana*, mostrando alta plasticidade em ambiente alagado.

Neste experimento, o genótipo TSH 1188 apresentou maior massa seca da raiz, caule e folhas para os tratamentos com e sem aeração nas diferentes concentrações de Fe (Figura 32). Esses resultados corroboram com o Bertolde (2007), que ao analisar 35 clones de *Theobroma cacao* L., classificou o genótipo TSH 1188 com tolerância média ao alagamento.

Em ambiente sem aeração o genótipo SIAL 70 não apresentou diferenças significativas para as diferentes concentrações de Fe na massa seca da raiz, caule e folha (Figura 33A, C e E). Já em ambiente com aeração, a dose 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe promoveu a menor massa seca do caule e das folhas do SIAL 70 (Figura 33D e F). No genótipo TSH 1188, observou-se maior produção da massa seca na concentração 400,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe em ambiente sem aeração, chegando a serem 58,3; 50,0 e 65,5% mais elevadas em relação à concentração 44,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, na raiz, caule e folha, respectivamente (Figura 33 A, C e E). Diferentemente, na concentração 133,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, o genótipo TSH 1188 apresentou redução em todas as partes da planta em relação à dose recomendada, exceto na massa seca

da folha em ambiente com aeração, na qual não houve diferença significativa entre a dose intermediária e mais elevada de Fe (Figura 33).

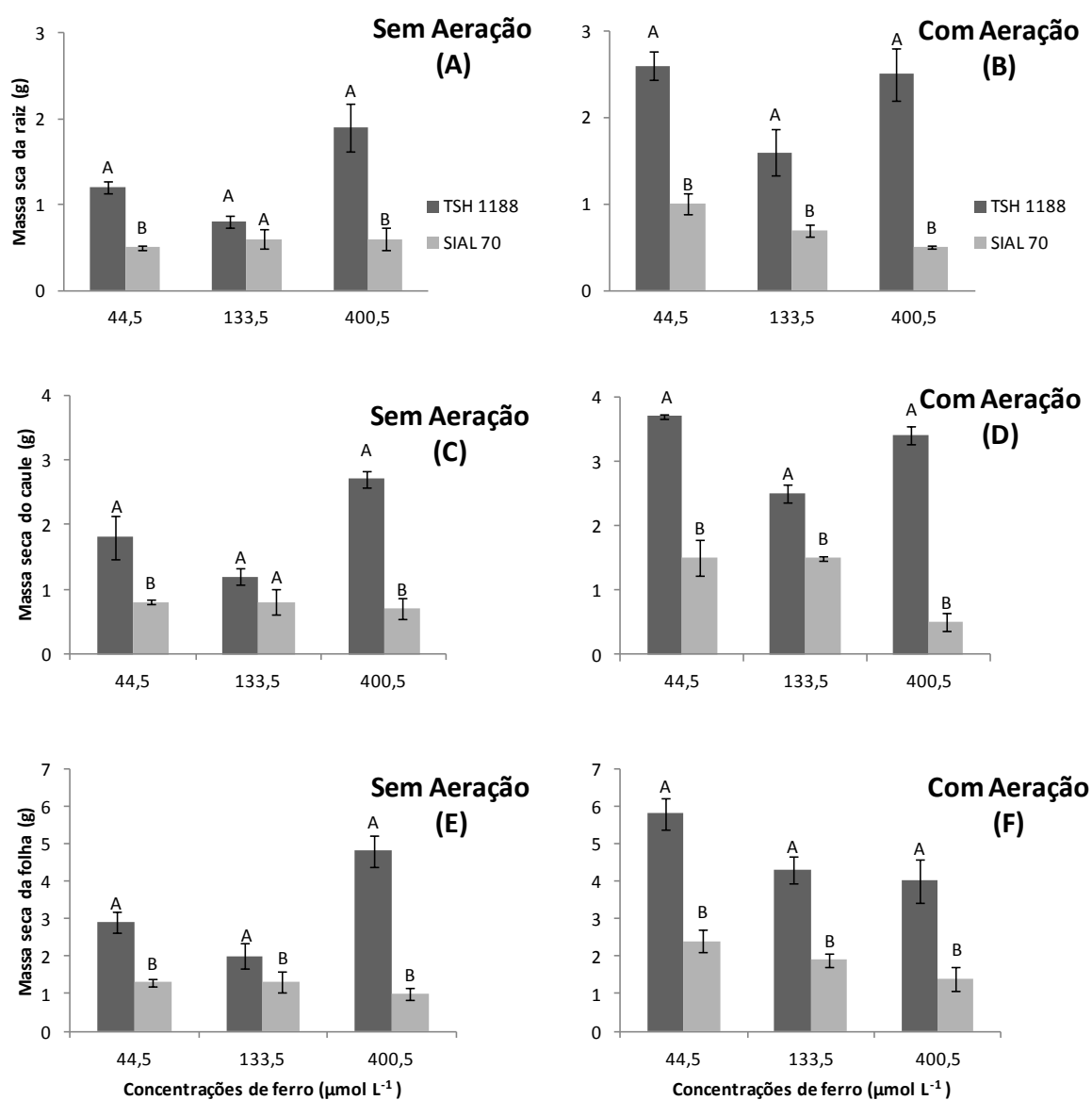


Figura 32. Massa seca das raízes (A e B), caule (C e D) e folhas (E e F) de dois genótipos de cacau, TSH 1188 e SIAL 70, submetidos a diferentes concentrações de ferro na ausência e presença de aeração em solução nutritiva. Colunas seguidas da mesma letra dentro de cada dose de ferro não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Valores médios de três repetições (\pm EP).

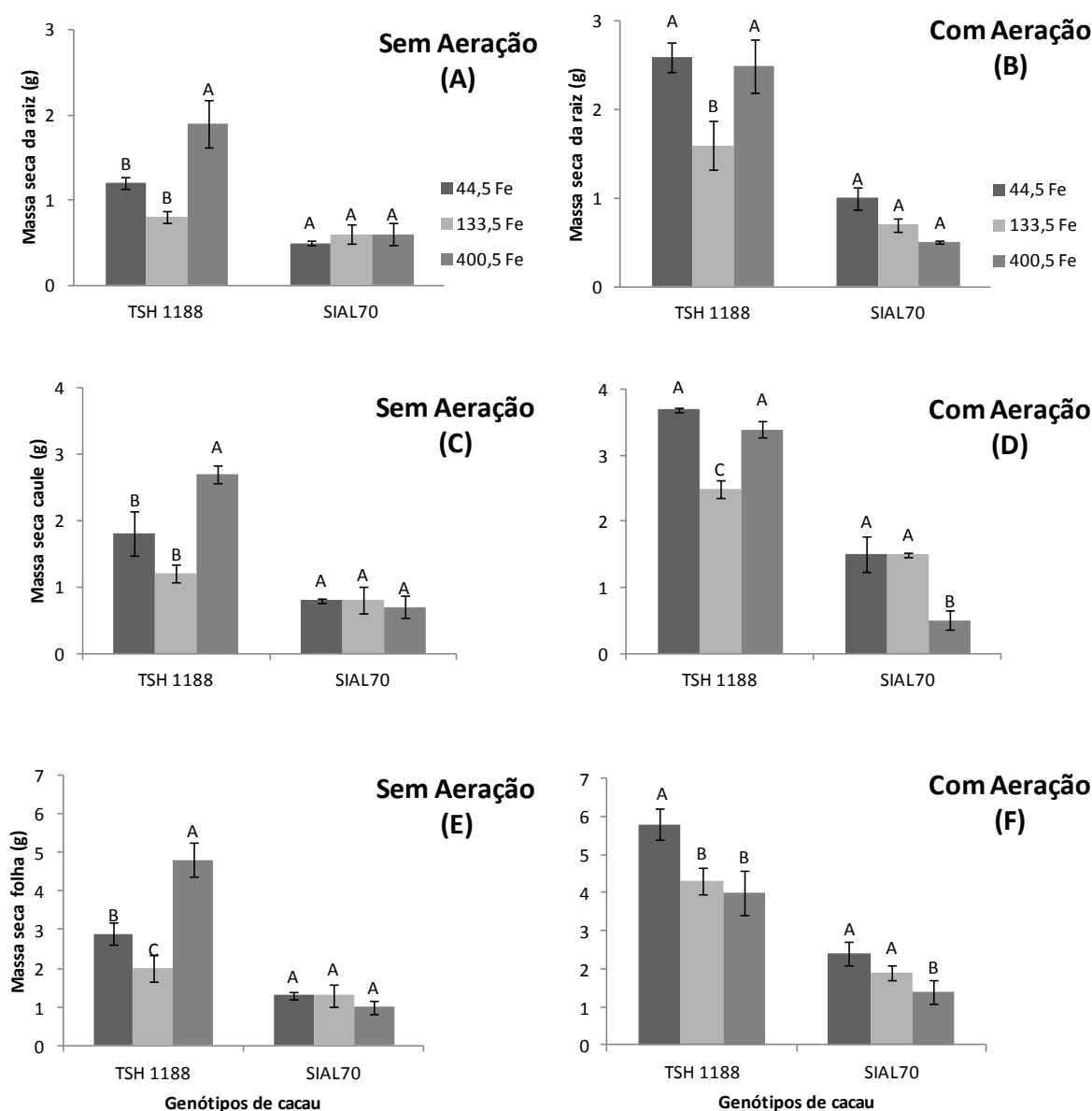


Figura 33. Influência das concentrações de ferro sobre a massa seca das raízes (A e B), caule (C e D) e folhas (E e F) de dois genótipos de cacau cultivados na ausência e presença de aeração em solução nutritiva. Colunas seguidas da mesma letra dentro de cada genótipo não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Valores médios de três repetições (\pm EP).

Os resultados obtidos para o genótipo SIAL 70 em ambiente não alagado, estão de acordo com os obtidos por Campos (2014), que analisando o crescimento de café Conilon submetido a altas concentrações de Fe, observou redução na massa seca das plantas. Abu et. al. (1989) afirma que a redução do acúmulo de massa seca está associada à toxicidade durante os estádios vegetativos. Esses resultados podem estar relacionados com o comprometimento do metabolismo das células da raiz. Conforme Chatterjee; Gopal; Dube, (2006), a inibição do crescimento ocorre devido

ao aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) provocado pelo excesso de Fe, o que por sua vez compromete o metabolismo da planta.

Entretanto, Mothé (2012) estudando *Ricinus communis* em diferentes níveis de Fe, concluiu que os teores elevados de Fe, não foram suficientes para causar comprometimentos no crescimento das plantas, pois mesmo em altas concentrações ocorreu aumento de sua massa seca.

A redução da massa seca na concentração $133,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Fe, sugere que o genótipo TSH 1188, desenvolveu um possível “consumo de luxo” de Fe, onde o aumento do teor de ferro nessa concentração refletiu em redução nessa variável. Segundo Fageria (1976), a redução do crescimento em determinadas concentrações de nutrientes confirma a hipótese de que a taxa de máximo crescimento de uma determinada espécie, sob determinada condição ambiental, pode ser atingida, e aumentos ainda maiores de absorção de nutrientes podem resultar em acumulação de elementos em concentrações maiores do que necessário para o crescimento máximo. Tal acumulação pode não ter efeito sobre a taxa de crescimento (consumo de luxo) ou pode causar redução no crescimento da planta.

5. CLONCLUSÕES

As atividades das enzimas antioxidantes demonstraram serem mecanismos fortemente atuantes na recuperação dos dois estresses, uma vez que as plantas recuperaram suas características fotossintéticas e continuaram com crescimento vigoroso após religação do sistema de aeração. O genótipo TSH 1188 na dose mais elevada de Fe aumentou a atividade da enzima POD e maior teor fenóis solúveis totais, sendo que o SIAL 70 nas doses acima da recomendada, ocorreu maior atividade da POD na presença de aeração e da PPO na ausência de aeração, indicando que nessas condições ocorreu estresse oxidativo para ambos genótipos.

Os teores de clorofila *a* *b* e *total*, foram afetados em maior grau pelo estresse de ferro para os dois genótipos, no entanto, quando houve redução nos teores de clorofilas ao longo do tempo, ambos os genótipos apresentaram posterior recuperação. Contudo, o genótipo TSH 1188, apresentou maior índice de clorofilas.

As trocas gasosas em geral foram afetadas pelo excesso de Fe e ausência de aeração, sendo que a taxa fotossintética do genótipo TSH 1188 apresentou maiores reduções que a do genótipo SIAL 70. A redução da condutância estomática e transpiração provocada pelo excesso de Fe, independente da presença ou não de aeração, foi verificada para os dois genótipos.

Os teores de alguns macro e micronutrientes foram afetados por ambos estresses nos dois genótipos, embora não tenham seguido um padrão único, provocando aumento ou diminuição de seus teores a depender do nutriente. Em geral, os teores de nutrientes foram maiores no SIAL 70 que no TSH 1188, especialmente para os teores dos macronutrientes P, K e Ca, e dos micronutrientes Mn e B.

De modo geral, o excesso de Fe na solução nutritiva e o estresse por ausência de aeração, prejudicaram o crescimento de ambos genótipos, porém de modo menos intenso no genótipo SIAL 70. Entretanto, independente do tipo de estresse, o genótipo TSH 1188, apresentou maior crescimento que o SIAL 70. A concentração mais elevada de Fe ($400,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), independente da condição ambiental, aumentou o crescimento do genótipo TSH 1188.

O presente estudo mostrou que os dois genótipos de *T. cacao* são tolerantes a ausência de aeração e excesso de Fe, contudo, apresentam diferentes respostas indicando que possuem mecanismos diferenciados para lidar com cada tipo de estresse.

6 REFERÊNCIAS

- ABU, M. B.; TUCKER, E. S.; HARDING S. S.; SESAY, J. S. Cultural practices to reduce iron toxicity in rice. **International Rice Research Newsletter**, v. 14, p. 19-19, 1989.
- ADAMSKI, J. M. **Respostas morfofisiológicas de Ipomoea batatas L. em função da concentração de ferro**. 2011. 62f. Dissertação - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2011.
- AGUILAR, M. A. G. **Influência do manganês sobre os aspectos bioquímicos e fisiológicos da tolerância de cacau (*Theobroma cacao* L.) à vassoura-de-bruxa – *Crinipellis perniciosa* (Stahel) (Singer)**. 1999. 199f. Tese de doutorado - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.
- ARRUDA, G. M. T.; CALBO, M. E. R. Efeitos da inundação no crescimento, trocas gasosas e porosidade radicular da carnaúba (*Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 18, p. 219-224, 2004.
- ALMEIDA, A-A. F.; VALLE, R. R. Ecophysiology of the cacao tree. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 425-448, 2007.
- ANDERSEN, P. C.; LOMBARD, P. B.; WESTWOOD, M. N. Effect of root anaerobiosis on the water relations of several *Pyrus* species. **Physiologia Plantarum**, v. 62. p. 245-252, 1984.
- ALVERSON, W. S.; WHITLOCK, B. A.; NYFFELER, R.; BAYER, C.; BAUM, D. A. Phylogeny of the core Malvales: evidence from *ndhF* sequence data. **American Journal of Botany**, v. 86, p.1474-1486, 1999.
- ARGENTA, G.; SILVA, P. R. F.; BORTOLINI, C. G. Clorofila na folha como indicador do nível de Nitrogênio em cereais. **Ciência Rural**, v. 31, p. 715-722, 2001.
- ASHRAF, M. Relationships between leaf gas exchange characteristics and growth of differently adapted populations of Blue panicgrass (*Panicum antidotale* Retz) under salinity or waterlogging. **Plant Science**. v. 165, p. 69-75, 2003.
- AYRES, R. S.; WESTCOT, D.W. **Qualidade de água na agricultura**. Campina Grande: UFPB, 1991. 218p.
- SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. S.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. Soil fertility, soil biology and plant nutrition. In: BALIGAR, V. C., FAGERIA, N. K. (Orgs). **Plant nutrient**

efficiency: towards the second paradigm. (eds). Lavras: **Brazilian Soil Science Society/ UFLA**, 1999, p. 183-204.

BARRETT-LENNARD, E. G.; RATINGEN, P. V.; MATHIE, M. H. The developing pattern of damage in wheat (*Triticum aestivum* L.) due to the combined stresses of salinity and hypoxia: experiments under controlled conditions suggest a methodology for plant selection. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 50, p.129–136, 1999.

BASER, B. L.; SOMANI, L. L. Effect of soil application of manganese on dry matter yield and uptake of manganese and iron by maize. **Anales de Edafologia y Agrobiologia**. v. 41, p. 2211–2220, 1982.

BAUER, P.; HELL, R. Translocation of Iron in Plant Tissues. In: BARTON, L.L.; ABADIA, J. (Orgs). **Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms**. (eds.) Dordrecht: Springer, 2006, p.279-288.

BECANA, M.; MORAN, J. F.; ITURBE-ORMAETXE, I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**, v.201, p.137-147, 1998.

BECKER, M.; ASCH. F. Iron Toxicity – Conditions and management concepts. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 168, p. 558-573, 2005.

BERTOLDE, F. Z. **Respostas fisiológicas ao alagamento do substrato e diversidade genética molecular de clones de *Theobroma cacao* L.** 2007. 107f. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, 2007.

BERTOLDE, F. Z. **Respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares de genótipos de cacau ao alagamento do solo.** 2011. 148f. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, 2011.

BLAIR, G. Nutrient efficiency – what do we really mean? In: RANDALL, P. J.; DELHAITZE, E.; RICHARDS, R. A., MUNNS, R. (Orgs). **Genetic aspects of plants mineral nutrition**. (eds.) Dondrecht: Klumer Academic. 1993, p. 205-213.

BOWLER, C; MONTAGU, M. V.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.83-116, 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantifications of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitycal Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.

BRADFORD K. J.; HSIAO, T. C. Stomatal behavior and water relations of waterlogged tomato plants. **Plant Physiology**, v. 70, p.1508-1513, 1982.

BRAGA, P. C. S.; ARPINI TT. S. **Influência do período do ano na germinação e vigor da semente de *Theobroma cacao* L.** 2011. 58f. Monografia – Faculdade Pitágoras de Linhares, Linhares, 2011.

BRANCO, M. C. S. **Respostas fisiológicas e expressão gênica de aquaporina em genótipos clonais de cacau submetidos ao sombreamento e ao alagamento do solo.** 2010. 149f. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ihéus, BA, 2010.

BRIAT J.-F.; FOBIS-LOISY, I.; GRIGNON, N.; LOBREAUX, S.; PASCALL, N.; SAVINO, G.; THOIRON, S.; VON WIREN, N.; WUYTSWINKEL, O. Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. **Biology of the Cell**, v. 84, p.69-81, 1995a.

BRIAT, J.-F.; LOBRÉAUX, S. Iron transport and storage in plants. **Trends in Plant Science**, v.2, p. 187-193. 1997.

BRIAT, J.-F.; CURIE, C. GAUMARD, F. Iron utilization and metabolism in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, p.276-282, 2007.

BRIAT, J.-F.; DUC, C.; RAVET, K., GAYMARD, F. Ferritins and iron storage in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1800, p. 806-814, 2010b.

BRIDGHAM, S. D.; PASTOR, J.; MCCLAUGHERTY, C. A.; RICHARDSON, C. J. Nutrient-use efficiency: a litterfall index, a model, and a test along a nutrient-availability gradient in North Carolina peatlands. **The American Naturalist**, v. 145, p. 1-21, 1995.

BRUGGEMANN, W.; MAASS-KANTEL, K.; MOOG, P. R. Iron uptake by leaf mesophyll cells: the role of the plasma membrane bound ferric-chelate reductase. **Planta**, v.190, p.151-155, 1993.

PIRES, J. L.; MONTEIRO, W. R.; LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S. D. V. M.; PINTO, L. R. M.; FIGUEIRA, A.; GRAMACHO, K. P.; LOPES, U. V.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; YAMADA, M. M.; AHNERT, D. E.; BRUGNEROTTO, M. I. B. Cocoa breeding for witches' broom resistance at CEPEC, Bahia, Brazil. Proceedings of the International Workshop on the Contribution on Disease Resistance to Cocoa Variety Improvement. **INGENIC**, p.91-101, 1999.

BUGHIO, N.; YAMAGUCHI, H.; NISHIZAWA, N. K.; NAKANISHI, H.; MORI, S. Cloning an iron regulated metal transporter from rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1677-1682, 2002.

- 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.
- CAMARGO, C. E. O. Tolerância de cultivares de arroz em estágio de plântula a diferentes níveis de ferro em solução nutritiva. **Bragantia**, v. 43, p.369,380,1984.
- CAMPOS L. M. **Respostas de café conilon à concentração de ferro**. 2014. 45 f. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, 2014.
- CAÑAL M. J.; TAMÉS R. S.; FERNÁNDEZ B. Peroxidase and polyphenoloxidase activities in *Cyperus esculentus* leaves following glyphosate applications. **Physiologia Plantarum**, v.74, p. 125-130, 1988.
- CARLI, V. G. **Avaliações fisiológicas, bioquímicas e histoquímica de Ipomoea pes-caprae cultivada em diferentes concentrações de ferro**. 2008. 52f. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.
- CASANO, L. M.; GÓMES, L. D.; LASCANO, H. R.; GONZÁLES, C. A.; TRIPPI, V. S. Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. **Plant Cell physiology**, v.38, p.433-440, 1997.
- CHATTERJEE, C.; GOPAL R.; DUBE, B. K. Impact of iron stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 108, p.1–6, 2006.
- CHEN, H.; QUALLS, R. G.; MILLER, G. C. Adaptive responses of *Lepidium latifolium* to soil flooding: biomass allocation, adventitious rooting, aerenchyma formation and ethylene production. **Environmental and Experimental Botany**, v. 48, p. 119-128, 2002.
- CHEPOTE, R. E.; SODRÉ, G. A.; REIS, E. L.; PACHECO, R. G.; MARROCOS, P. C. L.; SERÓDIO, M. H. C. F.; VALLE, R. R. **Recomendações de corretivos e fertilizantes na cultura do cacau no Sul da Bahia**. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC, 2005. 36p.
- COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA DO CACAUEIRA – CEPLAC. Cacau – História e evolução. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm>. Acesso em: 15 jul. 2014.
- CONNOLLY, E. L.; GUERINOT, M. L. Iron stress in plants. **Genome Biology**, v.3, p.1024.1 – 1024.4, 2002.

COSTA, M. C. S. **Terra e povoamento na implantação da lavoura cacaueteira no Espírito Santo: um estudo de caso – Linhares, 1900-1930**. 1989. 274f.

Dissertação de mestrado, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 1989.

CURIE, C.; BRIAT, J. F. Iron transport and signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p.183, 2003.

DAVIES, F. S.; FLORE, J. A. Short-term flooding effects on gas exchange and quantum yield of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). **Plant Physiology**, v. 81, p. 289-292, 1986.

DENNIS, E. S.; DOLFERUS, R.; ELLIS M.; RAHMAN, M.; WU, Y.; HOEREN, F. U.; GROOVER, A.; ISMOND, K. P.; GOOD, A. G.; PEACOCK, W. J. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. **Journal Experimental Botany**, v.51, p.89–97, 2000.

DIAS, L. A. S. Origem e dispersão de *Theobroma cacao* L.: um novo cenário. In: DIAS, L. A. S. (Orgs). **Melhoramento genético do cacaueteiro**. Viçosa, MG: FUNAPE, 2001, p.81-127.

DING, B.; SHI, G.; XU, Y.; HU, J.; XU, Q. Physiological responses of *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb leaves to cadmium stress. **Environmental Pollution**, v.147, p. 800-803, 2007.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

DOBERMANN, A.; FAIRHURST, T. H. **Rice: nutrient disorders and nutrient management**. Manila, The Philippines: International Rice Research Institute, 2000, v.1, 191 p.

DOGAN S.; ARSLAN, O.; OZEN, F. Polyphenol oxidase activity of oregano at different stages. **Food Chemistry**, v.91, p.341-345, 2005.

DREW, M. C. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.223–250, 1997.

DREYER, E. Compared sensitivity of seedlings from 3 woody species (*Quercus rubra* L., *Quercus rubra* L. and *Fagus sylvatica* L.) to water-logging and associated root hypoxia: effects on water relations and photosynthesis. **Annals of Forest Science**, v. 51, p. 417-428, 1994.

EATON, J. W.; QIAN, M. Molecular bases of cellular iron toxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, v.32, p.833-840, 2002.

EFRAIM, P. **Contribuição à melhoria de qualidade de produtos de cacau no Brasil, através da caracterização de derivados de cultivares resistentes à vassoura-de-bruxa e de sementes danificadas pelo fungo**. 2009. 208f. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2009.

EPSTEIN, M. **Nutrição mineral de plantas – princípios e perspectivas**. Rio de Janeiro: livros técnicos e científicos, 1975, 341p.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição Mineral de Plantas: Princípios e Perspectivas**. Londrina: Planta, 2006, 340 p.

FAGERIA, N. K. Effect of P, Ca, and Mg concentrations in solution culture on growth and uptake of these ions by rice. **Agronomy Journal**, v. 68, p.726-32, 1976.

FAGERIA, N. K.; BARBOSA FILHO, M. P.; CARVALHO, J. É. R. P. Influencia de ferro no crescimento e na absorção de P, K, Ca e Mg pela planta de arroz em solução nutritiva, **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.16, p. 483-488, 1981.

FALEIRO, F. G.; NIELLA, G. R.; CERQUEIRA, A. R. R. N.; DAMACENO, V. O.; GOMES, L. M. C.; FALEIRO, A. S. G. Produção de micélio de *Crinipellis pernicioso* em quatro meios de cultura, visando extração de DNA. **Revista Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 312-315, 2004.

FANG, C. W.; KAO, C. H. Enhanced peroxidase activity in Rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. **Plant Science**, v.158, p.71-76, 2000.

FANG, W.; WANG, J.; LIN, C.; KAO, C. Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v.35p.75-80, 2001.

FARAZDAGHI, H. The single-process biochemical reaction of Rubisco: A unified theory and model with the effects of irradiance, CO₂ and rate-limiting step on the kinetics of C₃ and C₄ photosynthesis from gas exchange. **Biosystems**, v. 103, p. 265-284, 2011.

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

GALLEGO, S. M.; BENAVIDES, M. P.; TOMARO, M. L. Effect of heavy metal in excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Science**, v.121, p.151-159, 1996.

GENON, J.; HEPCÉE, N.; DUFFEY, J.; DELVAUX, B.; HENNEBERT, P. Iron toxicity and other chemical soil constraints to rice in highland swamps of Burundi. **Plant and Soil**, v. 166, p. 109–115, 1994.

GHALY, A. E.; SNOW, A.; KAMAL, M.; MONFARED, S. H. Iron uptake and translocation by facultative and obligate wetland plants. **American Journal Environmental Sciences**. v.4, p. 608 – 619, 2008.

GOMES, F. B.; MORAES, J. C.; SANTOS, C. D.; GOUSSAIN, M. M. Resistance induction in wheat plants by silicon and aphids. **Scientia Agricola**, v. 62, p. 547-551, 2005.

GRANTZ, D. A.; GARNERB, J. H. B.; JOHNSON, D. W. Ecological effects of particulate matter. **Environment International**, v. 29, p. 213–239, 2003.

GRAVATT, D. A.; KIRBY, C. J. Patterns of photosynthesis and starch allocation in seedlings of four bottomland hardwood tree species subjected to flooding. **Tree Physiology**, v. 18, p. 411-417, 1998.

GRISI, F. A. **Aspectos fisiológicos de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), sob níveis distintos de saturação hídrica em ambiente protegido de mata ciliar em processo de recuperação**. 2010. 126f. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2010.

GROTZ, K.; GUERINOT, M. L. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, p. 595-608. 2006.

GUERINOT, M. A.; YI, Y. Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. **Plant Physiology**, v. 104, p. 815-820, 1994.

GURZAU, E. S.; NEAGU, C.; GURZAU, A. E. Essential metals - case study on iron. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.56, p. 190 –200, 2003.

HELDT, H.-W.; HELDT, F. The Calvin cycle catalyzes photosynthetic CO₂ assimilation. In: Heldt, H.-W. (ed.) **Plant Biochemistry**. California, USA: Elsevier Academic Press, 2005, p. 165-193.

HELL, R.; STEPHAN, U. W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta**, v. 216, p.541–551, 2003.

HERRERA, A.; TEZARA, W.; MARÍN, O.; RENGIFO, E. Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis in trees of a tropical seasonally flooded forest. **Physiologia Plantarum**, v. 134, p. 41–48, 2008.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. L. The water culture methods for growing plants without soil. Berkeley: **University of California**, 1950. 32 p. (Circular 347).

INCAPER. Governo do Estado do Espírito Santo. Programa de assistência técnica e extensão rural - PROATER 2011 / 2013 - **Linhares: planejamento e programação de ações (2011)**. Disponível em:

<<http://www.incaper.es.gov.br/proater/municipios/Nordeste/Linhares.pdf>>. Acesso em: 28 jan. 2014

INCAPER. A vassoura de bruxa no estado do Espírito Santo: Uma ameaça para a cacauicultura. 2007. **Documentos nº 153**. ISSN: 1519-2059. Disponível em: http://www.incaper.es.gov.br/sistemas/servicos/images/Vassoura_de_bruxadaCacaueiro.pdf> Acesso em: 14 agosto 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, janeiro de 2015. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?t=1&z=t&o=26&u2=1&u3=1&u4=1&u1=27>> Acesso em: 02 de fevereiro 2015.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION – ICCO. Quaterly Bulletin of Cocoa Statistics, v. 40, n. 4, Cocoa year 2013/14 .Disponível em: [Http://www.icco.org](http://www.icco.org). Acesso em 29 de dezembro de 2014.

ISHIMARU, Y.; SUZUKI, M.; TSUKAMOTO, T.; SUZUKI, K.; AKAZONO, M.; KOBAYASHI, T.; WADA, Y.; WATANABE, S.; MATSUHASHI, S.; TAKAHASHI, M.; AKANISHI, H.; MORI, S.; ISHIZAWA, K.. Rice plants take up iron as an Fe³⁺ - phytosiderophore and as Fe²⁺. **The Plant Journal**, v.45, p. 335–346, 2006.

JEONG, J.; CONNOLLY, E. L. Iron uptake mechanisms in plants: functions of the FRO family of ferric reductases. **Plant science**, v.176, p.709-714, 2009.

JIANRONG, X.; QIRAN, T. Early stage toxicity of excess copper to photosystem II of *Chlorella pyrenoidosa*—OJIP chlorophyll a fluorescence analysis. **Journal of Environmental Sciences**, v.21, p.1569-1574, 2009.

JUGSUJINDA, A.; PATRICK JR. W. H. Evaluation of toxic conditions associated with orange symptoms of rice in a flooded Oxisol in Sumatra, Indonesia. **Plant Soil** v.152, p. 237–243. 1993.

KAMPFENKEL, K.; MONTAGU, M. V.; INZÉ, D. Effects of iron excess on *Nicotiana plumbagnifolia* plants: Implications to oxidative stress. **Plant Physiology**, v.107, p.725-735, 1995.

KIM, S. C.; JUNG, J. The susceptibility of mung bean chloroplasts to photoinhibition is increased by an excess supply of iron to plants: a photobiological aspect of iron toxicity in plant leaves. **Photochemistry and Photobiology**, v.58, p.120-126, 1993.

KIM, S. A.; GUERINOT, L. Mining iron: Iron uptake and transport in plants. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2273–2280, 2007.

KOBAYASHI, T.; NISH, N. K. Regulation of iron and zinc uptake and translocation in rice. Section IV.3. In: HIRANO, H-Y.; HIRAI, A.; SANO, Y.; SASAKI, T. (Orgs) Rice Niology in the Genomics Era. Biotechnology in Agriculture and Forestry 62. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**. 2008, p.321-335.

KOVÁČIK, J.; KLEJDUS, B.; HEDBAVNY, J. Effect of aluminum uptake on physiology, phenols and amino acids in *Matricaria chamomilla* plants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 178, p. 949-955, 2010.

KOZLOWSKI, T. T.; KRAMER, P. L.; PALLARDY, S. G. **The physiological ecology of woody plants**. San Diego: Academic Press, 1991. 657p.

KOZLOWSKI, T. T. Responses of woody plants to flooding and salinity. **Tree Physiology Monograph**. v. 1, p. 1–29, 1997.

KRAMER, T. J.; KOZLOWSKI, T. T. **Physiology of woody plants**. New York, Academic Press, 1979. 811p.

KRATKY, B. A. A Capillary, Noncirculating Hydroponic Method for Leaf and Semi-head Lettuce. **HortTechnology**, v. 3, p.2016-207, 1993.

KRINSKY, N. I.; YEUM, K.-J. Carotenoid-radical interactions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.305, p. 754-760, 2003.

KRÜEGER, C.; BERKOWITZ, O.; STEPHAN, U. W.; HELL, R. A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.25062-25069, 2002.

KUKI, K. N.; OLIVA, M. A.; PEREIRA, E. G.; COSTA, A. C.; CAMBRAIA, J. Effects of simulated deposition of acid mist and iron ore particulate matter on photosynthesis and the generation of oxidative stress in *Schinus terebinthifolius* Raddi and *Sophora tomentosa* L. **Science of the Total Environment**, v.403, p.207-214, 2008.

LAING, W.; GREER, D.; SUN, O.; BEETS, P.; LOWE, A.; PAYN, T. Physiological impacts of Mg deficiency in *Pinus radiata*: growth and photosynthesis. **New Phytologist**, v.146, p.47-57, 2000.

LEE, D. W. Simulating forest shade to study the developmental ecology of tropical plants: juvenile growth in three vines in India. **Journal of Tropical Ecology**, v.4, p.281-292, 1988.

LEVIN A. S. Ecosystems and the biosphere as complex adaptive systems. **Ecosystems**, v.1, p. 431–436, 1998.

LIAO, C. T.; LIN, C. H. Effect of flooding stress on photosynthetic activities of *Momordica charantia*, **Plant Physiology and Biochemistry**, v.32, p.479-485, 1994.

LOBÃO, D. E.; SETENTA, W. C.; LOBÃO, E. S. P.; CURVELO, K.; VALLE, R. R. Cacau Cabruca – sistema agrossilvicultural tropical. In: VALLE, R. R. (Ed.). **Ciência, tecnologia e manejo do cacauero**. Brasília, DF: CEPLAC/CEPC/SEFIS, 2012, p. 467-506.

LOCATO, V.; PINTO, M. C.; PARADISO, A.; GARA, L. Reactive oxygen species and ascorbate-glutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S. D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. New York: Science Publishers, 2010. p.45-64.

LOPEZ, O. R.; KURSAR, T. A. Flood tolerance of four tropical tree species. **Tree Physiology**, v.19, p.925–932, 1999.

MACHADO, D. F. S. P; MACHADO, E. C; MACHADO, R. S; RIBEIRO, R. V. Efeito da baixa temperatura noturna e do porta-enxerto na variação diurna das trocas gasosas e na atividade fotoquímica de laranjeira 'valência'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 351-359, 2010.

MAJERUS, V.; BERTIN, P.; SWENDEN, V.; FORTEMPS, A.; LOBRÉAUX, S.; LUTTS, S. Organ-dependent responses of the African rice to short-term iron toxicity: ferritin regulation and antioxidative responses. **Biologia Plantarum**, v. 51, p. 303-312, 2007.

MAJERUS, V.; BERTIN, P.; LUTTS, S. Abscisic acid and oxidative stress implications in overall ferritin synthesis by African rice (*Oryza glaberrima* Steud.) seedlings exposed to short term iron toxicity. **Plant Soil**, v. 324, p. 253-265, 2009.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. Ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997, 319 p.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 638p

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=visualizarAtoPortalMapa&chave=73082341>>. Acesso em: 25 de setembro, 2014

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia Vegetal: Fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. Viçosa: Editora UFV, 2005, 451p.

MARIANO, A. H.; MONTEIRO, W. R. **Melhoramento genético do cacau – avaliação preliminar de cultivares, ensaio 30**. In: Informe Técnico, Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Centro de Pesquisas do Cacau, Ilhéus, Brazil, p.5-7, 1982.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1995, p. 889.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher plants**. New York: Academic Press, 2012, p.651 .

MARTINEZ, H. E. P.; CLEMENTE, J. M. **O uso do cultivo hidropônico de plantas em pesquisa**. Viçosa: Editora UFV, 2011, p. 76.

MEDINA, C. L.; SANCHES, M. C.; TUCCI, M. L. S.; SOUSA, C. A. F.; CUZZUOL, G. R. F.; JOLY, C. A. *Erythrina speciosa* (Leguminosae-Papilionoideae) under soil water saturation: morphophysiological and growth responses. **Annals of Botany**, v. 104, p. 671-680, 2009.

MEDRI, C.; PIMENTA, J. A.; RUAS, E. A.; SOUZA, L. A.; MEDRI, P. S.; SAYHUN, S.; BIANCHINI, E.; MEDRI, M. E. O alagamento do solo afeta a sobrevivência, o crescimento e o metabolismo de *Aegiphila sellowiana* Cham. (Lamiaceae)? **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, p. 124-134, 2012.

MENDES, M. A. S.; DUDA, G. P.; NASCIMENTO, C. W. A., LIMA, J. A. G., MEDEIROS, A. D. L. Acúmulo de metais pesados e alterações químicas em Cambissolo cultivados com meloeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.14, p.791-796, 2010.

MENEZES, S.; CARMO NETO, D. A **Modernização da agribusiness do cacau**. Salvador: CARGILL, 1993, p. 180.

MIELKE, M. S.; ALMEIDA, A.-A. F.; GOMES, F. P.; AGUILAR, M. A. G.; MANGABEIRA, P. A. O. Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and growth responses of *Genipa americana* seedlings to soil flooding. **Environmental and Experimental Botany**, v.50, p.221–231, 2003.

MIELKE, M. S.; ALMEIDA, A.-A. F.; GOMES, F. P.; MANGABEIRA, P. A. O.; SILVA D. C. Effects of soil flooding on leaf gas exchange and growth of two neotropical pioneer tree species. **New Forest**, v.29, p.161–168, 2005.

MONTEIRO, H. P.; WINTERBOURN, C. C. The superoxide-dependent transfer of iron from ferritin to transferritin. **Biochemical Journal**, v.256, p.923-928, 1988.

MORAES, R. M.; DELITTI, W. B. C.; MORAES, J. A. P. V. Respostas de indivíduos jovens de *Tibouchina pulchra* à poluição aérea de Cubatão, SP: Fotossíntese líquida, crescimento e química foliar. **Revista Brasileira de Botânica**, v.23, p.443-449, 2000.

MOTHÉ, G. P. B. **Capacidade fotossintética e crescimento de dois genótipos de *Ricinus communis* L. em resposta a doses de material sólido particulado à base de ferro aplicadas ao solo**. 2012. 76f. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, 2012.

MUKHOPADHYAY, M. J.; SHARMA, A. Manganese in cell metabolism of from higher plants. **The Botanical Review**, v.57, p.117-149, 1991.

MÜLLER C. **Resposta fotossintética à toxidez de ferro em diferentes cultivares de arroz**. 2009. 124f. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

MÜLLER, C.; KUKI, K. N.; PINHEIRO, D. T.; SOUZA, L. R.; SILVA, A. I. S.; LOUREIRO, M. E.; OLIVA, M. A.; ALMEIDA, A. M. Differential physiological responses in rice upon exposure to excess distinct iron forms. **Plant Soil**, v.391, p.123-138, 2015.

MURGIA, I.; DELLEDONNE, M.; SOAVE, C. Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 30, p. 521-528, 2002.

MUTHUCHELIAN, K.; MURUGAN, C.; HARIGOVIDAN, R.; NEDUNCHEZHIAN, N.; KULANDAIVELU, G. Effects of triaccontanol in flooded *Erythrina variegata* seedlings. 1. Changes in growth, photosynthetic pigments and biomass productivity. **Photosynthetica**, v. 31, p. 269-275, 1995.

NENOVA, V. R. Growth and photosynthesis of pea plants under different iron supply. **Acta Physiology Plant**, v.31, p.385-391, 2009.

NEVES, N. R.; OLIVA, M. A.; CENTENO, D. C.; COSTA, A. C.; RIBAS, R. F.; PEREIRA, E. G. Photosynthesis and oxidative stress in the restinga plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition:

Potential use in environmental risk assessment. **Science of Total Environment**, v.407, p.3740-3745, 2009.

NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M. L. V.; AGUILAR, M. A. G.; BEZERRA, K. M. T.; ANHERT, D. E. Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.148-154, 2003.

PATEL, P. K.; KUMAR, A.; SINGH, N. T.; YADAV, D.; HEMANTARANJAN, A. Flooding: abiotic constraint limiting vegetable productivity. **Advances in Plant and Agriculture Research**, v. 1, p. 2-9, 2014.

PARIDA, A. K.; DIAS, A. B.; MITTRA, B. Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. **Trees**, v.18, p.167-174, 2004.

PELL, E. J.; ECKART, N.; GLICK, R. E. Biochemical and molecular basis for impairment of photosynthesis potential. **Photosynthesis Research**, v.39, p.453-462, 1994.

PEREIRA, E. G.; OLIVA, M. A.; KUKI, K.; CAMBRAIA, J. Photosynthetic changes and oxidative stress caused by iron ore dust deposition in the tropical CAM tree *Clusia hilariana*. **Trees**, v.23, p.277-285, 2009.

PEZESHKI, S. R. Differences in patterns of photosynthetic responses to hypoxia in flood-tolerant and flood-sensitive tree species. **Photosynthetica**, v.28, p.423-430, 1993.

PEZESHKI, S. R. Responses of baldcypress (*Taxodium distichum*) seedlings to hypoxia: leaf protein content, ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity and photosynthesis. **Photosynthetica**, v.30, p.59-68, 1994.

PEZESHKI, S. R.; PARDUE, J. H.; DeLAUNE, R. D. Leaf gas exchange and growth of flood-tolerant and flood-sensitive tree species under low soil redox conditions. **Tree Physiology**, v.16, p.453-458, 1996.

PEZESHKI, S. R. Wetland plant responses to soil flooding. **Environmental and Experimental Botany**, v. 46, p.299-312, 2001.

PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L. **Seleção de plantas de cacau resistentes à vassoura-de-bruxa**. Ilhéus: CEPLAC/Cepec, 1998, 35p. (Boletim técnico n.181).

PONNAMPERUMA, F. N. The chemistry of submerged soils. In: BRADY, N. C. (Orgs) **Advance in Agronomy**. New York: Academic Press, 1972, p. 29-96.

PUGH, R. E.; DICK, D. G.; FREDEEN, A. L. Heavy metal (Pb, Zn, Cd, Fe and Cu) contents of plant foliage near the Anvil Range lead/zinc mine, Faro, Yukon Territory. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.52, n.3, p.273-279, 2002.

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: Biology, epidemiology, and Management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 573-594, 1996.

REDDY, K. R.; DELAUNE, R. **Biogeochemistry of Wetlands: Science and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2008, p.764.

REHEM, B. C. **Respostas fisiológicas de clones de Theobroma cacao L. ao alagamento do substrato**. 2006, 79f. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, 2006.

REHEM, B. C.; ALMEIDA, A-A. F.; MIELKE, M. S.; GOMES, F. P.; VALLE, R. R. Photosynthetic and growth responses of *Theobroma cacao* L. clones to Water logging. **Journal of Tropical Agriculture**, v.48, p.17-22, 2010.

RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. C. Some aspects of citrus ecophysiology in subtropical climates: re-visiting photosynthesis under natural conditions. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 393-411, 2007.

SAHRAWAT, K. L. Managing iron toxicity in lowland rice: the role of tolerant genotypes and plant nutrients. In: TORIYAMA, K.; HEONG, K.L.; HARDY, B. (Orgs), **Rice is life: scientific perspectives for the 21st century**, Los Baños, Philippines: International Rice Research Institute IRRI, 2005, p 452-453.

SÁNCHEZ, E.; SOTO, J. M.; GARCIA, P. C., LÓPEZ-LEFEBRE, L. R.; RIVERO, R. M.; JUAN M. RUIZ, J. M.; ROMERO, L. Phenolic compounds and oxidative metabolism in green bean plants under nitrogen toxicity. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.27, p.973-978, 2000.

SANTIAGO, E. F.; PAOLI, A. A. S. O aumento em superfície em *Adelia membranifolia* (Müll. Arg.) Pax & K. Hoffm. e *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., em resposta ao estresse por deficiência nutricional e alagamento do substrato. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 503-513, 2003.

SANTIAGO, E. F.; PAOLI, A. A. S. Respostas morfológicas em *Guibourtia hymenifolia* (Moric.) J. Leonard (Fabaceae) e *Genipa americana* L. (Rubiaceae), submetidas ao estresse por deficiência nutricional e alagamento do substrato. **Revista Brasileira de Botânica**, v.30, p.131-140, 2007.

SANTOS-SOUZA, P.; RAMOS, R. S.; FERREIRA, S. T.; CARVALHO-ALVES, P. C. Iron-induced oxidative damage of corn root plasma membrane H⁺-ATPase.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes, v.1512, p.357-366, 2001.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7-12, 1993.

SCHAFFER, B.; ANDERSEN, P. C.; PLOETZ, R. C. Responses of fruit crops to flooding. In: JANICK, J. (Orgs). **Horticultural Reviews**. Canadá: John Wiley, 1992, p.257–313.

SCHAFFER, B. Flooding responses and water – use efficiency of subtropical and tropical fruit trees in an environmental sensitive wetland. **Annals of Botany**. v. 81, p. 475-481, 1998.

SCHMIDT, W. Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. **Trends in plant science**, v.8, p.188-193, 2003.

SCHMIDT, F. **Manejo da irrigação por alagamento e a toxidez por ferro no arroz cultivado em casa de vegetação**. 2009. 87f. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2009.

SENA GOMES, A. R.; KOZLOWSKI, T. T. The effects of flooding on water relations and growth of *Theobroma cacao* var. Catongo seedlings. **Journal of Horticultural Science**, v.61, p.265-276, 1986.

SHAINBERG, O.; RUBIN, B.; RABINOWITCH, H. D.; LIBAL, Y.; TELOR, E. Acclimation of beans to oxidative stress by treatment with sublethal iron levels. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p. 93-99, 2000.

SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 4, p. 289-302, 1981.

SIEGEL, B. Z. Plant peroxidases – an organismic perspective. – **Plant Growth Regulation**, v.12, p.303-312, 1993.

SILVA, I. R.; FURTINI NETO, A. E.; VALE, F. R. Eficiência nutricional para potássio em espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 20, p. 257-264, 1996.

SILVA, F. DE A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. *In*: world congress on computers in

agriculture, 7, Reno-NV-USA: American. **Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SILVEIRA, V. C.; OLIVEIRA, A. P.; SPEROTTO, R. A.; AMARAL, L.; DIAS, J. F.; CUNHA, J. B.; FETT, J. P. Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 127-139, 2007.

SILVEIRA, H. R. O. **Excesso de água em mudas de café (*Coffea arabica* L.): efeitos fisiológicos e anatômicos**. 2011, 78f. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 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.

SINHA, S.; GUPTA, M.; CHANDRA, P. Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle: response of antioxidants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.38, p.286- 291, 1997.

SINHA, S.; SAXENA, R. Effect of iron lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. **Chemosphere**, v.62, p.1340-1350, 2006.

SMETHURST, C. F.; SHABALA, S. Screening methods for waterlogging tolerance in lucerne: comparative analysis of waterlogging effects on chlorophyll fluorescence, photosynthesis, biomass and chlorophyll content. **Functional Plant Biology**, v.30, p.335–343, 2003.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New phytologist**, v.125, p.27-58, 1993.

SMIRNOFF, N. Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. In: SMIRNOFF, N. (Orgs). **Antioxidants and reactive oxygen species in plants**. Oxford, USA: Blackwell Publishing Ltd. 2005, p. 53-86.

SNOWDEN, R.; WHEELER, B. D. Chemical changes in selected wetland plant species with increasing Fe supply, with specific reference to root precipitates and Fe tolerance. **New Phytologist**, v.131, p.503-520,1995.

SOARES, C. R. F. S.; ACCIOLY, A. M. A.; MARQUES, T. C. L. S. M.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA F. Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caules e

folhas de mudas de árvores em solos contaminados por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p.302-315, 2001.

SOLTI, A.; GÁSPÁR, L.; MÉZÁROS, I.; SZIGETI, Z.; LÉVAI, L.; SÁRVÁRI, E. Impact of Iron Supply on the Kinetics of Recovery of Photosynthesis in Cd-stressed Poplar (*Populus glauca*). **Annals of Botany**, v.102, p.771–782, 2008.

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, p. 339-353, 2003.

SOUZA, C. A. S.; AGUILAR, M. A. G.; SONEGHETI, S; SIQUEIRA, P. R.; SILVEIRA, J. S. M.; LANI, J. A.; FOLLI, F. B. 2005. Comportamento de clones de *Coffea canephora* pierre ex froenher sombreados com boleira (*Joanesia princeps* vell.) e cajazeira (*Spondia dulcis* forst.), no norte do Espírito Santo. In: IX SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, **Anais**. Londrina, PR: Embrapa Café, 2005.

SOUZA JÚNIOR, J. O.; MENEZES, A. A.; SODRÉ, G. A.; GATTWARD, J. N.; DANTAS, P. A. S.; CRUZ NETO, R. O. Diagnose foliar na cultura do cacau. In: PRADO, R. M. (Orgs). **Nutrição de plantas diagnose foliar em frutíferas**, Jaboticabal, SP: GENPLANT, 2012, p.443-476.

SPILLER, S.; TERRY, N. Limiting Factors in Photosynthesis: II. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units. **Plant Physiology**, v. 65, p. 121-125, 1980.

STEIN, R. J. **Excesso de ferro em arroz (*Oryza sativa* L.): efeitos tóxicos e mecanismos de tolerância em distintos genótipos**, 2009. 197f. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009.

SUH, H-J.; KIM, C. S.; LEE, J-Y.; JUNG, J. Photodynamic effect of iron excess on photosystem II function in pea plants. **Photochemistry and Photobiology**, v.75, p. 513-518, 2002.

TAMÁS, L.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I. Effect of alluminum on peroxidase activity in root of Al-sensitive and Al-resistant barley cultivars. **Rostlinná Výroba**, v. 48, p. 76-79, 2002.

TAYLOR, S. E.; TERRY, N.; HUSTON, R. P. Limiting Factors in Photosynthesis. III. Effects of iron nutrition on the activities of three regulatory enzymes of photosynthetic carbon metabolism. **Plant Physiology**, v. 70, p. 1541-1543, 1982.

- THIPYAPONG, P.; MELKONIAN, J.; WOLFE, D. W.; STEFFENS, J. C. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. **Plant Science**, v. 167, p. 693-704, 2004.
- THOMPSON, J. E.; LEGGE, R. L; BARBER, R. F. The role of free radicals in senescence and wounding. **New Phytologist**, v.105, p.317–344. 1987.
- TRIANAPHYLIDES, C.; HAVAUX, M. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. **Trends in Plant Science**, v.14, n.4, p.219-228, 2009.
- VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. Effects of metal on enzyme activity in plants. **Plant, Cell and Environment**, v.13, p.195-206, 1990.
- VAUGHN, K. C.; DUKE, S. O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. – **Physiologia Plantarum**, v.60, p.106-112, 1984.
- VIÉGAS, I. J. M.; SOUSA, G. O.; SILVA, A. F.; CARVALHO, J. G.; LIMA, M. M. Composição mineral e sintomas visuais de deficiências de nutrientes em plantas de pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC. **Acta Amazonica**, v. 43, p.43-50, 2013.
- XU, F. J.; LI, G.; JIN, C. W.; LIU, W. J.; ZHANG, S. S.; ZHANG, Y. S.; LIN, X. Y. Aluminum-induced changes in reactive oxygen species accumulation, lipid peroxidation and antioxidant capacity in wheat root tips. **Biologia Plantarum**, v.56, p.89-96, 2012.
- WILSON, K. C. Mineral nutrition and fertilizer needs. In: CLIFFORD M. N., WILLSON, K. C. (Orgs), **Coffee Botany, Biochemistry and production of beans and beverage**. Australia: Croom Helm. 1985, p.135-156.
- YU, Q.; RENGEL, Z. Waterlogging influences plant growth and activities of superoxide dismutases in narrow-leaved Lupine and transgenic tobacco plants. **Journal of Plant Physiology**, v.155, p.431–438, 1999.
- YORDANOVA, R. Y.; CHRISTOV, K. N.; POPOVA, L. P. Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. **Environmental and Experimental Botany**, v.51, p.93–101, 2004.
- YOSHIHARA, T.; GOTO, F.; SHOJI, K.; KOHNO, Y. Cross relationships of Cu, Fe, Zn, Mn, and Cd accumulations in common *japonica* and *indica* rice cultivars in Japan. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, p.180–187. 2010.
- ZANCANI, M.; PERESSON, C.; BIROCCIO, A.; FEDERICI, G.; URBANI, A.; MURGIA, I.; SOAVE, C.; MICALI, F.; VIANELLO, A.; MACRI, F. Evidence for the

resence of ferritin in plant mitochondria. **European Journal of Biochemistry**. v. 271, p.3657-3664, 2004.