



CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS DE FOLHAS DE MUDAS DE CACAUEIRO SUBMETIDAS AO ALAGAMENTO.

Fernanda Rodrigues Nunes e Silva¹, Guilherme Augusto Rodrigues de Souza¹, Thayanne Rangel Ferreira¹, Rizia Joyce Costa¹, Laís Zanelato Correia¹, Basílio Cerri Neto¹, Rafael Zucatei da Vitória¹, Rafael Ruy Gouvea¹, Sara Dousseau Arantes¹, Ana Paula Scalzer¹, Conceição Aparecida Fernandes Santos¹, Carlos Alberto Spaggiari Souza².

¹INCAPER – Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – Laboratório de Fisiologia vegetal e Pós-colheita - BR 101N- 29915-140 - Linhares-ES, Brasil, fernandarns@hotmail.com, guilherme.rodrigues@edu.uniube.br, thayanne_rangel@hotmail.com, r.joycecosta@gmail.com, laisa1102@gmail.com, basiliocerri@yahoo.com.br, zucatei_rafael@hotmail.com, faelrui91@gmail.com, saradousseau@gmail.com, ana.scalzer@incaper.es.gov.br, conceicaofernandes0676@gmail.com, spaggiari.ceplac@gmail.com

²CEPLAC – Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Gerência Regional da CEPLAC – Linhares-ES, Brasil.

Resumo – *Theobroma cacao* L. (*Malvaceae*), popularmente conhecida como cacau, o qual tem sua importância econômica como matéria - prima do chocolate. O encharcamento e a inundação são comuns em ecossistemas alimentados pela chuva, especialmente em solos com drenagem deficiente. Visando a elucidar aspectos da tolerância ao estresse hídrico, mudas de *Theobroma cacao* foram submetidas a cinco tratamentos (0, 20, 22, 24 e 28 dias após o alagamento). Foram avaliados os teores de clorofila “a”, “b”, clorofilas totais, carotenoides, SPAD e comprimentos de estruturas internas da folha. Houve diferenças significativas nas variáveis comprimentos do xilema, floema, nervura central, mesofilo e número de polos do xilema. Já nos índices SPAD, clorofilas “a” e “b” e carotenoides, as diferenças não foram significativas. Conclui-se que o cacauero demonstra-se capaz de alterar sua anatomia e desenvolver estratégias anatômicas a fim de tolerar o alagamento.

Palavras chaves: *Theobroma cacao*, cacau, anatomia, estresse hídrico, SPAD.

Área de conhecimento: Botânica

Introdução

O cacauero (*Theobroma cacao* L. – *Malvaceae*) é uma dicotiledônea da família das Malvaceas, cujo centro de origem é a Amazônia, tanto nas terras baixas, dentro dos bosques escuros e úmidos sob a proteção de grandes árvores, como em florestas menos exuberantes e relativamente menos úmidas, em altitudes variáveis, entre 0 e 1.000m do nível do mar (CEPLAC, 2007). Em condições silvestres cresce no substrato intermediário da floresta e pode alcançar até 20m de altura. Contudo, sob condições de cultivo, a altura está entre 3 a 5m. O sistema radicular consta de uma raiz pivotante que tem o seu comprimento e forma variando de acordo com a estrutura, textura e consistência do solo. Sua importância econômica se deve à produção de frutos dos quais se extraem sementes que servem como matéria-prima para a fabricação de chocolate (ALMEIDA et al., 2014)

O encharcamento e a inundação são comuns em ecossistemas alimentados pela chuva, especialmente em solos com drenagem deficiente (EZIN, 2010). O estresse sobre as plantas imposto pela inundação do solo e pela submersão mais profunda constitui uma das principais restrições abióticas ao crescimento, ao lado da escassez de água, salinidade e temperaturas extremas, como principais determinantes da distribuição de espécies em todo o mundo (JACKSON, 2005; VISSER et al., 2003). A privação de oxigênio nestes solos resulta de um desequilíbrio entre a lenta difusão dos gases na água em comparação com o ar e a taxa que o oxigênio é consumido pelos microrganismos e raízes das plantas (VISSER et al., 2003).



Nas plantas, os primeiros órgãos a responderem a condições ambientais são as folhas (DANQUAH, 2010). Nakayama (1996) considera o conhecimento da anatomia foliar de *T. cacao* uma importante contribuição no estudo da planta, pois através da avaliação comparativa das alterações das estruturas internas da planta, permite-se diferenciar, até certo ponto, a resistência do material botânico.

O objetivo do trabalho foi investigar os efeitos de diferentes períodos de alagamento sob a anatomia foliar e os pigmentos fotossintéticos em mudas de cacaueteiro.

Metodologia

Para a realização do experimento, que foi executado no mês de julho de 2018, foram utilizadas 15 mudas de *T. cacao* (cacau) fornecidas pela CEPLAC, Linhares, ES. As mudas estavam em sacolas de polietileno e foram transferidas para baldes de água, individualmente, e tiveram seu volume preenchido por água à altura correspondente a cerca de 1 cm acima do coleto das plantas submetidas ao tratamento. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), composto por cinco tratamentos (0, 20, 22, 24 e 28 dias após o alagamento) referentes a cada período de alagamento aos quais as plantas foram mantidas, com três repetições, cada uma constituída por uma planta.

Para extração e quantificação de clorofilas a, b e totais foi utilizada a metodologia proposta por ARNON (1949), onde foram realizadas as seguintes etapas: coleta de 5 folhas para cada tratamento, após as folhas serem cortadas e homogeneizadas, pesou-se 0,100g do material fresco, homogeneizou-se com o auxílio de gral com pistilo em 10ml de acetona (80%), foram filtrados com funil de vidro equipado com lã-de-vidro e, por fim, o material adquirido foi avolumado para 20ml de acetona (80%) e colocado em um recipiente frio. Após alguns segundos, o material foi depositado em cubetas de quartzo, e levados ao espectrofotômetro (Beckman, modelo 640B) para a leitura dos comprimentos de onda Clorofila "a" 663nm e Clorofila "b" 645nm. A cada etapa dos comprimentos de onda, deve-se realizar a leitura do branco (uma cubeta com acetona a 80%). Os cálculos foram mensurados a partir das formulas proposta na metodologia de ARNON (1949). As fórmulas descritas por Arnon (1949) para medir os teores de clorofilas são: Clorofila a ($\mu\text{g. ml}^{-1}$) = $12,7 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645}$; Clorofila b ($\mu\text{g. ml}^{-1}$) = $22,9 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{663}$; Clorofila total ($\mu\text{g. ml}^{-1}$) = $20,2 \cdot A_{645} + 8,02 \cdot A_{663}$.

Para a extração de carotenoides foi utilizada metodologia proposta por Rodriguez-Amaya e Kimura (2004) seguindo as etapas: pesou-se 0,500 gramas de folha, foi feita a homogeneização em almofariz junto com 10 ml da solução extratora, composta de hidróxido de potássio e metanol (6% p/v), centrifugação em 5000 giros durante 5 minutos. Posteriormente, o material foi depositado em funil de separação e adicionado 9 ml de éter de petróleo, findando com a agitação do material e descanso de 3 min, sendo a parte inferior de cor escura ou verde eliminada, e a parte clara superior é medida por proveta. Para a realização da leitura de carotenoides β -Carotene do material pelo espectrofotômetro, utilizou-se éter de petróleo com absorvância de 450nm e coeficiente de absorção de 2592.

Os cálculos foram mensurados a partir da formula proposta na metodologia de Rodriguez-Amaya e Kimura (2004): ($\mu\text{g. g}^{-1}$) = $\frac{A \times \text{volume (mL)} \times 10^4}{A_{1\text{cm}} \times \text{massa da amostra (g)}}$

Foi realizado leitura SPAD em três plantas, na qual duas folhas de cada planta foram utilizadas na leitura. As análises foram conduzidas no Laboratório de Fisiologia Vegetal e pós-colheita do próprio instituto.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo programa Sisvar versão 5.6 e as medias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O estudo anatômico foi realizado em material fresco onde secções transversais na nervura central da folha foram realizadas à mão livre, com auxílio de lâmina de barbear e isopor. Os cortes foram clarificados com hipoclorito de sódio por 15 minutos, depois disso foram lavados com cinco banhos de água destilada, após, foram corados com safra-blau, uma solução de safranina 20% e azul de astra 80%, depois dos cortes corados as laminas foram analisadas em microscópio de campo claro (Euromex) as imagens foram capturadas com microcâmera (CMEX 5), e as medidas biométricas dos tecidos foi realizado com o software ImageFocus 4. Foram obtidas as seguintes medidas:



Comprimento do xilema, Comprimento do floema, Comprimento da Nervura Central, Comprimento do mesofilo, Largura do Esclerenquima e Número de polos de xilema.

Resultados

Conforme dados coletados, houve diferença significativa na interação tratamento x dias (Tabela 1), em relação aos comprimentos das estruturas celulares. A largura do esclerenquima não foi significativa. Os valores do índice SPAD e pigmentos fotossintéticos não foram significativos em qualquer tratamento.

Para representar os valores significativos de comprimento de xilema, floema, nervura central, mesofilo, esclerenquima e número de polos de xilema, por análise de variância a 5% de variância, é construída a Tabela 1.

Tabela 1 – Quadro de resumo de análise de variância a 5% de significância.

| FV | GL | QM | | | | | |
|-------------------|----|--------------|--------------|--------------------|----------------|-----------------------|--------------------|
| | | Comp. Xilema | Comp. Floema | Comp. Ner. Central | Comp. Mesofilo | Largura Esclerenquima | N° polos de xilema |
| Tratamento | 4 | 0,003 * | 0,0008 * | 0,10 * | 0,008 * | 0,02 ns | 135,14 * |
| Erro | 55 | 0,0006 | 0,0005 | 0,02 | 0,0006 | 0,02 | 23,68 |
| Total | 59 | | | | | | |
| CV% | | 15,52 | 16,02 | 9,9 | 14,03 | 116,83 | 15,79 |

Legenda: *Correlação significativa a $P > 0,05$; ns – Não Significativo

Figura 1 e 2 – Comprimento do xilema e floema, de mudas de cacaueteiro, submetidas a diferentes períodos de alagamento.

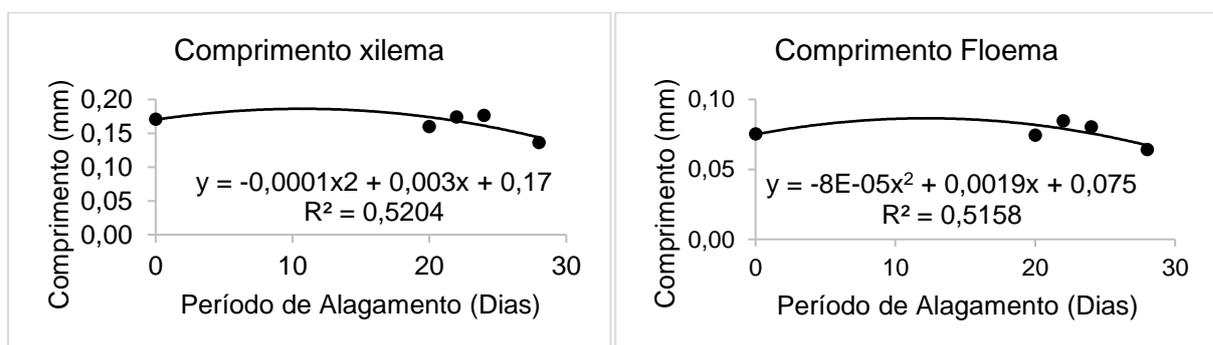


Figura 3 e 4 – Comprimento da nervura central e mesofilo, de mudas de cacaueteiro, submetidas a diferentes períodos de alagamento.

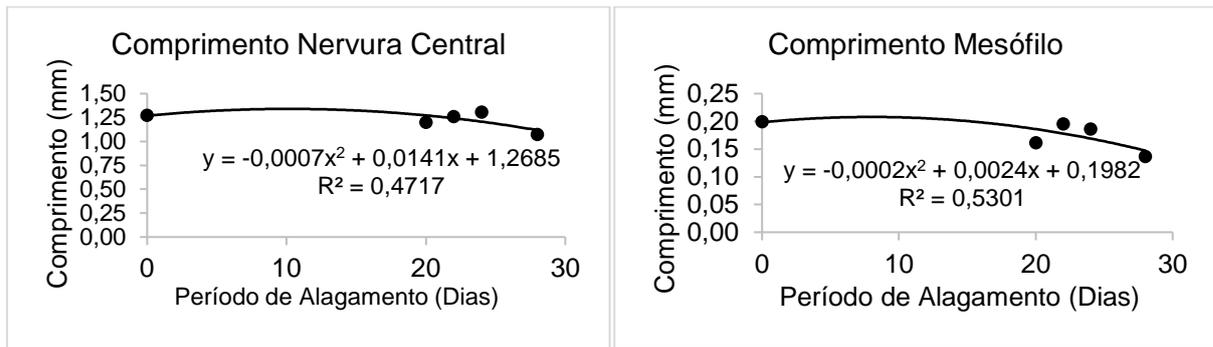
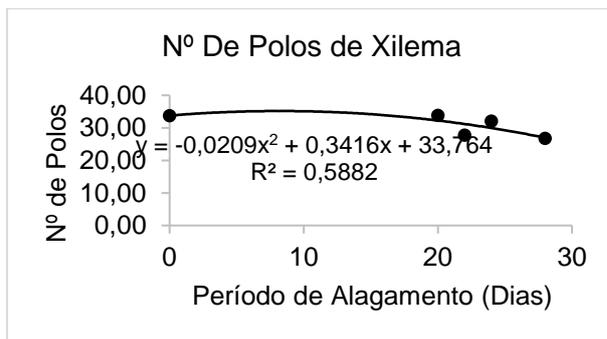


Figura 5 – Número de polos de xilema, de mudas de cacaueteiro, submetidas a diferentes períodos de alagamento.



Para representar os valores significativos de SPAD e dos pigmentos fotossintetizantes da Clorofila “a”, “b”, clorofilas totais e de carotenoides, por análise de variância a 5% de variância, é construída a Tabela 2.

Tabela 2 – Quadro de resumo de análise de variância a 5% de significância.

| FV | GL | QM | | | | |
|------------|----|----------|----------|---------|----------|--------------|
| | | SPAD | Cl "a" | Cl "b" | Cl total | Carotenoides |
| Tratamento | 4 | 85.65 ns | 8.003 ns | 7.26 ns | 31.46 ns | 110.77 ns |
| Erro | 55 | 50.58 | 7.02 | 14.1 | 40.06 | 66.39 |
| Total | 59 | | | | | |
| CV% | | 18.28 | 31.37 | 33.78 | 32.48 | 40.54 |

Discussão

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as mudas de cacaueteiro tendem a apresentar mudanças estruturais diante do estresse hídrico, que podem ser interpretados como uma estratégia de tolerância da própria planta.

Ferreira (2011), em estudos com espécies florestais, encontrou uma redução na intensidade de verde (índice SPAD) das folhas de Craibeira (*Tabebuia aurea*), Pau-Ferro (*Caesalpinia ferrea*) e de Pereiro (*Aspidosperma pyriformium* Mart), demonstrando que, diferentemente do cacaueteiro, essas espécies não apresentam tolerância a tal estresse.

Com relação aos valores de clorofila “a” e clorofila “b”, Ferreira (2011), apresentou variações entre espécies, o teor de clorofila “b” foi reduzido nas mudas de Pereiro por efeito do alagamento enquanto que em Mororó (*Bauhinia forficata* Link.) as médias desta variável não diferiam entre o controle e o



alagamento. Nas mudas de Pereiro e Mororó, o teor de clorofila “a” foi significativamente reduzido com a imposição do estresse anóxico. Quanto à relação clorofila “a”/ clorofila “b”, o alagamento não apresentou efeito sobre esta variável, em mudas de Pereiro, enquanto que reduziu a mesma em Mororó.

Houve diferenças significativas em cinco das seis variáveis analisadas na anatomia foliar (Tabela 1). Nas variáveis em que ocorreram variações, essa mudança foi um aumento no tamanho das médias dos comprimentos e logo em seguida uma queda nesses valores, com o passar dos dias de estresse hídrico. Em estudos com a espécie *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC. (Bignoniaceae) em ambientes alagados, Carrera (2008), observou um aumento na área da nervura central, diferentemente do encontrado nesse trabalho.

Em situações de saturação hídrica o desenvolvimento das plantas pode ser prejudicado, levando a uma série de distúrbios no metabolismo, que promovem alterações no crescimento e no desenvolvimento (ROCHA, 2017).

Devido à escassez de estudos que relacionem o comprimento das estruturas foliares com fatores ambientais, torna-se difícil uma discussão a respeito da variação desses caracteres.

Conclusão

Os resultados obtidos demonstraram uma alteração significativa nos comprimentos de estruturas celulares. Mas sem diferenças significativas no índice SPAD e pigmentos fotossintetizantes, indicando que a espécie é capaz de alterar sua anatomia e desenvolver estratégias anatômicas a fim de tolerar o alagamento.

Referências

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, 24(1): 1-15. 1949.

ALMEIDA, C.M.V.C. de; MENDES, F.A.T.; MÜLLER, M.W.; MATOS, P.G.G. de. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Implantação do cacau em sistemas agroflorestais / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. – Brasília: Mapa/ACS, 76 p. 2014.

CARRERA, Ú.S. Variação intraespecífica na anatomia da folha e do lenho de *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC. (Bignoniaceae) em ambientes distintos. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro / Escola Nacional de Botânica Tropical, 2008.

CEPLAC. Características gerais do cacau, 2007. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/cacau.htm>>. Acesso em: 16 ago. 2018.

DANQUAH, J. A. Phenotypic plasticity of leaf length to an environmental gradient in *Khaya ivorensis* (Meliaceae) populations in Ghana. **African journal of Environmental Science and Technology**, v. 4, n. 12, p. 860-865, 2010.

EZIN, V.; DE LA PENA, R.; AHANCHEDE, A. Flooding tolerance of tomato genotypes during vegetative and reproductive stages. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.22, p.131-142, 2010.

FERREIRA, D.T.R.G. Alterações fisiológicas e bioquímica de quatro espécies florestais do bioma caatinga submetidas a alagamento. Dissertação (mestrado em Agronomia: Produção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2011.

JACKSON, M. B.; COLMER, T. D. Response and adaptation by plants to flooding stress. **Annals of Botany**, v.96, p.501-505, 2005.



NAKAYAMA, L.H.I.; SOARES, M.K.M.; APPEZZATO-DA- GLÓRIA, B. Contribuição ao estudo anatômico da folha e do caule do cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) **Sci. agric.** vol. 53 n. 1 Piracicaba Jan./Apr. 1996.

ROCHA, G.A. Ecofisiologia em plantas de cedro submetidas ao alagamento. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais) – Universidade Federal de Alfenas, 2017.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. & KIMURA, M. Harvest Plus handbook for carotenoid analysis. Washington, DC: International Food Policy Research Institute; Cali: International Center for Tropical Agriculture, (Technical monograph series, 2), 58p. 2004.

VISSER, E.J.W.; VOESENEK, L.A.C.J.; VARTAPETIAN, B.B.; JACKSON, M.B. Flooding and plant growth. **Annals of Botany**, v.91, p.107-109, 2003.