

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE CACAU TOLERANTES À SECA

IVANILDES CONCEIÇÃO DOS SANTOS

ILHÉUS – BAHIA - BRASIL

Fevereiro 2012

IVANILDES CONCEIÇÃO DOS SANTOS

SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE CACAU TOLERANTES À SECA

**Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.**

**Área de concentração: Genética
e Biologia Molecular**

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2012

S237

Santos, Ivanildes Conceição dos.

Seleção de genótipos de cacau tolerantes à seca
/ Ivanildes Conceição dos Santos. – Ilhéus, BA:
UESC, 2012.

xvi, 1151f. : Il.

Orientador: Alex-Alan Furtado de Almeida.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular.

Inclui bibliografia e apêndice.

1. Cacau – Melhoramento genético. 2. Stress
oxidativo. 3. Biomassa vegetal. 4. Análise Multiva-
riada. 5. Plantas – Efeito da seca. I. Título.

CDD 633.743

IVANILDES CONCEIÇÃO DOS SANTOS

SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE CACAU TOLERANTES À SECA

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Genética e Biologia
Molecular.

Área de concentração: Genética e
Biologia Molecular

APROVADA: 16 de fevereiro de 2012

Dr. Walter dos Santos Soares Filho
(EMBRAPA)

Prof. Dr. Abelmon da Silva Gesteira
(EMBRAPA)

Prof. Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa
(UESC)

Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida
(UESC – Orientador)

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo, Marcos Aurélio Dias dos Santos, por todo amor, compreensão, incentivo e ajuda, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todo amor e bênçãos e por iluminar os meus passos e proteger-me ao longo dessa caminhada.

À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao meu orientador, Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida, por todos os ensinamentos, pela paciência e confiança depositada.

Aos meus co-orientadores Professores Dr. Dário Ahnert e Carlos Priminho Pirovani, pelo valioso apoio e confiança.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa.

Ao *United States Department of Agriculture* (USDA), na pessoa de Virupax C. Baligar, pelo apoio financeiro e científico ao projeto de pesquisa.

À Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira/Centro de Pesquisa do Cacau - CEPLAC/CEPEC, pelo apoio na implantação e execução dos experimentos; aos funcionários da Seção de Fisiologia Vegetal, pelo apoio e ajuda nas análises, ao Setor de Transporte, na pessoa de Reinaldo, pelo apoio logístico; a Seção de Solos pela realização de análises; a Seção de Genética, pela ajuda na execução do experimento; aos pesquisadores Raul René Valle e José Luis Pires, pelo apoio na implantação e desenvolvimento do experimento.

Aos meus pais, José e Iva, pela dedicação, amor e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

Ao meu esposo, Marcos Aurélio, pelo amor, carinho, paciência e ajuda.

As minhas irmãs, Ivana, Ivanilce e Joseane, pelo amor e companheirismo.

Aos amigos Paulo Silva e Rosângela, pelo carinho, companheirismo e auxílio logístico na execução do experimento.

À minha colega de turma e amiga Romária, pela amizade e auxílio na execução do experimento.

Aos amigos Bruna, Vânia, Fabiana, Marcela, Wellington, Emerson e Abel, pelo auxílio, incentivo e amizade.

Ao amigo e bolsista de iniciação científica Alessandro, pela ajuda na execução das atividades em casa de vegetação e nos laboratórios.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pelos ensinamentos.

À coordenação e aos funcionários do colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pelo grande apoio.

A todos que colaboraram de alguma maneira para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

EXTRATO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. O cacau	4
2.2. Estresse por deficiência hídrica no solo	5
2.2.1. Respostas à deficiência hídrica	6
2.2.2. Estresse oxidativo em plantas	7
2.2.3. Expressão diferencial de genes candidatos à tolerância à seca	9
2.3. Melhoramento genético do cacauero	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Material vegetal e condições de cultivo	14
3.1.1. Progênies de Meios Irmãos	14
3.1.2. Análise do solo e monitoramento da casa de vegetação	14
3.2. Status hídrico foliar	19
3.3. Variáveis de crescimento	19
3.4. Conteúdo de macro e micronutrientes minerais	22
3.5. Atividade de enzimas de estresse oxidativo	22
3.5.1. Obtenção do extrato enzimático	22
3.5.2. Atividade de peroxidases (POD)	23
3.5.3. Atividade da oxidase do polifenol (PPO)	23
3.6. Análise multivariada para variáveis de crescimento, composição química e estresse oxidativo	24
3.7. Análise de expressão gênica	24
3.8. Análise estatística	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28

4.1. Variáveis de crescimento	28
4.2. Conteúdo de macro e micronutrientes minerais	61
4.3. Atividade enzimática	77
4.4. Análise de agrupamento por similaridade, entre as variáveis de crescimento, composição química, estresse oxidativo, e análise de componentes principais	81
4.4.1. Análise de agrupamento por similaridade entre as variáveis de crescimento, composição química e enzimas POD e PPO.....	81
4.4.2. Análise de componentes principais a partir das oito variáveis não colineares.....	86
4.5. Expressão gênica	90
5. CONCLUSÕES	93
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
APÊNDICE	111
Apêndice A- Matriz das distâncias Euclidianas entre 36 genótipos de Theobroma cacao L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias, a partir da diferença entre os tratamentos controle e seca para as variáveis de crescimento, do estresse oxidativo (POD e PPO) e da composição química avaliadas.	112
Apêndice B- Matriz das distâncias Euclidianas entre 36 genótipos de Theobroma cacao L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias, a partir da diferença entre os tratamentos controle e seca para as variáveis não colineares AFP, BPA, BT, TCR, AR, N, Ca e Mg avaliadas.....	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Vista parcial do experimento, mostrando a disposição dos vasos de acordo com o delineamento estatístico.....	17
Figura 2- Curso médio diurno da temperatura e umidade relativa média do ar durante o período experimental. Valores médios de 60 dias \pm erro padrão.....	18
Figura 3- Plantas jovens dos 36 genótipos de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.), crescidas em casa de vegetação, aos três (A) e seis meses de idade (B).....	20
Figura 4- Interface do <i>software</i> GIMP 2 para limiarização das imagens de raízes (A, B). Interface do <i>software</i> Sigma Scan Pro 5 para análise da área radicular das imagens das raízes dos 36 genótipos de <i>Theobroma cacao</i> L. controle e sob déficit hídrico (C, D).....	21
Figura 5- Biomassa seca foliar (BF) de 36 genótipos de <i>Theobroma cacao</i> L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$..	31
Figura 6- Biomassa seca do caule (BC) de 36 genótipos de <i>Theobroma cacao</i> L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$..	32
Figura 7- Biomassa seca da parte aérea (BPA) de 36 genótipos de <i>Theobroma cacao</i> L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$..	33
Figura 8- Biomassa seca da raiz (BR) de 36 genótipos de <i>Theobroma cacao</i> L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$..	34
Figura 9- Biomassa seca total (BT) de 36 genótipos de <i>Theobroma cacao</i> L.	35

submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01^{**}$ e $P < 0,05^{*}$). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$

Figura 10- Razão raiz/parte aérea (R/PA) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01^{**}$ e $P < 0,05^{*}$). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.. 36

Figura 11- Área foliar por planta (AFP) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01^{**}$ e $P < 0,05^{*}$). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$ 39

Figura 12- Área foliar individual (AFI) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01^{**}$ e $P < 0,05^{*}$). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$ 40

Figura 13- Número de folhas por planta (NF) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01^{**}$ e $P < 0,05^{*}$). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$ 41

Figura 14- Massa foliar específica (MFE) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01^{**}$ e $P < 0,05^{*}$). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.. 42

Figura 15- Altura da planta (ALT) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01^{**}$ e $P < 0,05^{*}$). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$ 44

Figura 16- Razão de área foliar (RAF) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01^{**}$ e $P < 0,05^{*}$). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$ 45

Figura 17- Taxa assimilatória líquida (TAL) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01^{**}$ e $P < 0,05^{*}$). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$. 47

Figura 18- Taxa de crescimento relativo (TCR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01^{**}$ e $P < 0,05^{*}$). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.. 49

Figura 19- Diâmetro do coleto (DC) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01^{**}$ e $P < 0,05^{*}$). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$. 52

Figura 20- Volume radicular (VR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01^{**}$ e $P < 0,05^{*}$). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$ 53

- Figura 21-** Área radicular (AR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$. 54
- Figura 22-** Amostra das raízes fotografadas para mensuração da área radicular (AR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. Controle (A, C, E, G I, K); Deficiência hídrica (B, D, F, H, J, L). Escala: - 2 cm.. 55
- Figura 23-** Amostra das raízes fotografadas para mensuração da área radicular (AR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. Controle (A, C, E, G I, K); Deficiência hídrica (B, D, F, H, J, L). Escala: - 2 cm.. 56
- Figura 24-** Amostra das raízes fotografadas para mensuração da área radicular (AR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. Controle (A, C, E, G I, K); Deficiência hídrica (B, D, F, H, J, L). Escala: - 2 cm.. 57
- Figura 25-** Amostra das raízes fotografadas para mensuração da área radicular (AR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. Controle (A, C, E, G I, K); Deficiência hídrica (B, D, F, H, J, L). Escala: - 2 cm.. 58
- Figura 26-** Amostra das raízes fotografadas para mensuração da área radicular (AR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. Controle (A, C, E, G I, K); Deficiência hídrica (B, D, F, H, J, L). Escala: - 2 cm.. 59
- Figura 27-** Amostra das raízes fotografadas para mensuração da área radicular (AR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. Controle (A, C, E, G I, K); Deficiência hídrica (B, D, F, H, J, L). Escala: - 2 cm.. 60
- Figura 28-** Conteúdo foliar de nitrogênio (N) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$ 62
- Figura 29-** Conteúdo foliar de fósforo (P) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$ 64
- Figura 30-** Conteúdo foliar de potássio (K) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$ 66

Figura 31- Conteúdo foliar de cálcio (Ca) de 36 genótipos de <i>Theobroma cacao</i> L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e n = 6	68
Figura 32- Conteúdo foliar de magnésio (Mg) de 36 genótipos de <i>Theobroma cacao</i> L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e n = 6	70
Figura 33- Conteúdo foliar de ferro (Fe) de 36 genótipos de <i>Theobroma cacao</i> L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e n = 6	73
Figura 34- Conteúdo foliar de zinco (Zn) de 36 genótipos de <i>Theobroma cacao</i> L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e n = 6	74
Figura 35- Conteúdo foliar de cobre (Cu) de 36 genótipos de <i>Theobroma cacao</i> L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e n = 6	75
Figura 36- Conteúdo foliar de manganês (Mn) de 36 genótipos de <i>Theobroma cacao</i> L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e n = 6	76
Figura 37- Atividade de peroxidases (POD) de 36 genótipos de <i>Theobroma cacao</i> L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e n = 8.	79
Figura 38- Atividade de oxidase do polifenol (PPO) de 36 genótipos de <i>Theobroma cacao</i> L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e n = 8.....	80
Figura 39- Análise de agrupamento de 36 genótipos de <i>Theobroma cacao</i> L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias, baseada na distância Euclidiana, a partir da diferença entre os tratamentos controle e seca para as variáveis de crescimento, do estresse oxidativo (POD e PPO) e da composição química avaliadas, utilizando o método hierárquico aglomerativo de Ward (1963).....	82
Figura 40- Análise de agrupamento de 36 genótipos de <i>Theobroma cacao</i> L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias, baseada na distância Euclidiana, a partir da diferença entre os tratamentos controle e seca para as variáveis AFP, BPA, BT, TCR, AR, N, Ca e Mg, utilizando o método hierárquico aglomerativo de Ward (1963).....	85

Figura 41- Análise de componentes principais de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias, baseado na diferença entre os tratamentos controle e seca para as variáveis AFP, BPA, BT, TCR, AR, N, Ca e Mg..... 87

Figura 42 - Expressão dos gene PP2C, NCED5, psbA e psbO em folhas de plantas de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Gene β -tubulina como referência... 92

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Relação dos 36 genótipos de <i>T. cacao</i> submetidos à deficiência hídrica no solo, origem geográfica, grupo botânico e compatibilidade gamética	15
Tabela 2- Análise física e química do solo.....	18
Tabela 3- Pares de <i>primers</i> gene-específicos utilizados nas análises de qPCR	26
Tabela 4- Número de variáveis significativas de 36 genótipos de cacau submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias, comparadas pelo teste t-Student ($P < 0,01$ e $P < 0,05$).....	83
Tabela 5- Autovalores e autovetores da matriz de correlação para as variáveis AFP, BPA, BT, TCR, AR, N, Ca e Mg em 36 genótipos de <i>Theobroma cacao</i> L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias.....	88
Tabela 6- Correlações entre as oito variáveis não colineares avaliadas em 36 genótipos de <i>Theobroma cacao</i> L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias.....	89

EXTRATO

Santos, Ivanildes Conceição, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Fevereiro de 2012. **Seleção de genótipos de cacau tolerantes à seca.** Orientador: Alex- Alan Furtado de Almeida. Co-orientador: Dário Ahnert. Colaborador: Carlos Priminho Pirovani.

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie perene de grande importância econômica mundial, cultivada quase que exclusivamente para fabricação de chocolate. Embora o cacau seja tipicamente cultivado em áreas de alta precipitação anual, algumas regiões de cultivo possuem, em determinadas áreas, solos rasos, com baixa capacidade de armazenamento de água; e outras estão propensas a precipitações pluviais irregulares, que podem se intensificar com o aquecimento global, uma das causas principais das variações de produtividade do cacau, considerada uma espécie sensível à deficiência hídrica no solo. Objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar o crescimento, a composição química e o estresse oxidativo em 36 genótipos de cacau submetidos à deficiência hídrica no solo. As plantas seminais dos diversos genótipos, com seis meses de idade, obtidas por meio de polinização aberta, foram submetidas a dois regimes hídricos (controle - potencial hídrico foliar (Ψ_{WF}) entre -0,1 e -0,5 MPa; e deficiência hídrica- Ψ_{WF} entre -2,0 e -2,5 MPa) por 60 dias. Estimaram-se a biomassa seca da planta toda e de suas partes (raiz, caule e folha), o conteúdo de nutrientes minerais, a atividade das enzimas peroxidases do guaiacol (POD) e oxidase do polifenol (PPO) em nível foliar. A partir dos resultados dessas análises, foram selecionados seis genótipos de cacau contrastantes em relação a tolerância à deficiência hídrica no solo [CC-40, C. SUL-4 e SIC-2 (intolerantes); e MA-15, MO-20, PA-13 (tolerantes)] para avaliação da expressão de dois genes candidatos envolvidos na tolerância à seca [(NCED5- 9-*cis-epoxycarotenoid dioxygenase 5* - associado à biossíntese do ácido abscísico - ABA) e (PP2C - proteína fosfatase 2C - regulador negativo nas respostas ao ABA)] e dois genes relacionados à biossíntese das proteínas do fotossistema II (PSII) da fase fotoquímica da fotossíntese (*psbA* e *psbO*)]. Os resultados obtidos mostraram que a maioria dos genótipos avaliados, quando comparado ao controle, apresentou reduções significativas ($P < 0,01$ e $P < 0,05$) em (i) biomassa seca para todos os órgãos vegetativos; (ii) área foliar por planta (AFP) e individual; (iii) número de folhas; (iv) taxa de assimilação líquida (TAL); (v) taxa de crescimento relativo (TCR); (vi) volume e área do sistema radicular (AR); (vii) diâmetro do coleto; e (viii) conteúdo de macro e micronutrientes minerais em nível foliar; os decréscimos mais acentuados foram encontrados nos genótipos CA-1, C. SUL-4, CC-40, CAB-139, MOC-2, SIC-2, SIC-17 e RB-48. Entretanto, não houve reduções significativas, para a maioria dessas variáveis, nos genótipos EET-53, EET-103, MA-14, MA-15, MO-20,

OC-77, PA-13, PA-150, PS-1319, SIAL-169 e SPA-5. Por outro lado, as atividades das enzimas POD e PPO apresentaram aumentos significativos para 78 e 56%, respectivamente, dos genótipos avaliados quando comparados ao controle. Verificou-se maior variação da atividade de POD para os genótipos PS-1319, MO-20 e MA-15, com aumento de 193, 188 e 170%, respectivamente, em relação ao controle; ao passo que para atividade de PPO as maiores variações foram observadas nos genótipos CA-3, EET-103 e AMAZON-15.1, com aumento de 202, 107 e 87%, respectivamente. A partir da análise de componentes principais, constatou-se maior contribuição das variáveis AFP, TCR, AR, BPA (biomassa seca da parte aérea), BT (biomassa seca total), conteúdo foliar de N, Ca, e Mg, na formação dos grupos contrastantes em relação à tolerância à seca. Observou-se aumento na expressão dos genes candidatos à tolerância à seca e dos associados à biossíntese das proteínas de PSII, para os genótipos considerados suscetíveis à deficiência hídrica no solo; e repressão destes mesmos genes para os genótipos tolerantes, quando comparados ao controle. Para o genótipo C. SUL-4, houve aumento de 14, 8 e 2 vezes nos níveis de expressão dos genes *NCED5*, *PP2C* e *psbO*, respectivamente; ao passo que para o genótipo MA-15 ocorreu repressão de 0,8; 0,5 e 0,4 vez nos níveis de expressão dos genes *psbA*, *psbO* e *NCED5*, respectivamente. Em suma, baseado nos resultados do presente trabalho, concluiu-se que os genótipos de cacau EET-53, ICS-9, MA-15, MA-14, MO-20, OC-77, PA-13, PS-1319, PA-150, RB-39 e SIAL-169 foram os mais tolerantes à deficiência hídrica no solo. Por outro lado, os genótipos EET-103, EQX-107, ICS-98, IMC-27, SCA-6, SPA-5 e TSH-1188 apresentaram-se medianamente tolerantes, ao passo que os genótipos CA-1, CAB-139, CC-40, C. SUL-4, IMC-76, MOC-2, RB-48, SIC-2, SIC-17 e TSA-792 e foram os menos tolerantes.

Palavras-chave: *Theobroma cacao* L., déficit hídrico, biomassa, q-PCR, estresse oxidativo, análise multivariada.

ABSTRACT

Santos, Ivanildes Conceição, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Fevereiro de 2012. **Selection of cacao genotypes drought tolerant.** Advisor: Alex- Alan Furtado de Almeida. Co-advisor: Dário Ahnert. Counselor: Carlos Priminho Pirovani.

Cacao (*Theobroma cacao* L.) is a perennial species of great economic importance worldwide, cultivated almost exclusively for the manufacture of chocolate. Although cocoa is typically grown in areas of high annual rainfall, some regions are growing in certain areas, shallow soils with low water storage capacity, and others are prone to irregular rainfall, which can intensify the heat overall, a major cause of changes in productivity of cacao, considered a species sensitive to water deficiency in soil. The aim of the present study was to evaluate the growth, chemical composition and oxidative stress in 36 cacao genotypes submitted to water deficiency in soil. The seminal plants of various genotypes, with six months of age, obtained through open pollination, were submitted to two water regimes (control - leaf water potential (Ψ_{WF}) between -0.1 and -0.5 MPa, and water deficit - Ψ_{WF} between -2.0 and -2.5 MPa) for 60 days. We estimated the biomass of the whole plant and its parts (root, stem and leaf), the contents of mineral nutrients, the enzyme activity of guaiacol peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO) at leaf level. From the results of these analyzes, we selected six contrasting cacao genotypes in relation to drought tolerance in the soil [CC-40, C. SUL-4 and SIC-2 (intolerant) and MA-15 MO-20, PA-13 (tolerant)] to evaluate the expression of two candidate genes involved in tolerance to drought [(9-cis-NCED5 epoxy-carotenoid-dioxygenase 5 - associated with the biosynthesis of abscisic acid - ABA) and (PP2C - protein phosphatase 2C - negative regulator in response to ABA)] and two genes related to proteins biosynthesis of photosystem II (PSII) of the photosynthesis photochemical phase (psbA and psbO)]. The results showed that the majority of genotypes, compared with the control, showed significant reductions ($P < 0.01$ and $P < 0.05$) in (i) dry weight for all vegetative organs, (ii) leaf area per plant (LAP) and individual (iii) leaves number, (iv) net assimilation rate (NAR), (v) relative growth rate (RGR), (vi) volume (RV) and root area (RA), (vii) collar diameter, and (viii) macro and micromineral content in leaf level, the most pronounced decreases were found for the genotypes CA-1, C. SUL-4, CC-40, CAB-139, MOC-2, SIC-2, SIC-17 and RB-48. However, there were significant reductions for most of these variables in the genotypes EET-53, EET-103, MA-14 MA-15, MO-20, OC-77, PA-13, PA-150, PS-1319, SIAL-169 and SPA-5. On the other hand, the activities of POD and PPO enzymes showed significant increases to 78 and 56% of genotypes, respectively. There was greater variation in the POD activity for genotypes PS-1319, MO-20 and MA-15, an increase of 193, 188 and 170% respectively, compared to control; whereas for the highest PPO activity variations

were observed in genotypes CA-3, EET-103 and AMZ-15.1, an increase of 202, 107 and 87%, respectively. From the principal component analysis, there was a higher contribution of the variables LAP, RGR, RA, SDB (shoot dry biomass), TB (total biomass), leaf content of N, Ca, and Mg in the formation of contrasting groups in relation to drought tolerance. There was an increase in the expression of candidate genes for drought tolerance and in the biosynthesis of proteins associated with PSII, for genotypes considered sensitive to water deficiency in soil; and repression of these same genes in the tolerant genotypes, when compared to control. For the genotype C. SUL-4, there was an increase of 14, 8 and 2 times the levels of gene expression *NCED5*, *psbO* and *PP2C*, respectively, whereas for the MA-15 genotype there was repression of 0.8, 0.5 and 0.4 times the levels of expression of the genes *psbA*, *psbO* and *NCED*, respectively. In summary, based on the results of this work, it was concluded that the cacao genotypes EET-53, ICS-9, MA-15, MA-14, MO-20, OC-77, PA-13, PS-1319, PA-150, RB-39 and SIAL-169 were the most tolerant to water stress in soil. On the other hand, the genotypes EET-103, EQX-107, ICS-98, IMC-27, SCA-6, SPA-5 and TSH-1188 showed up moderately tolerant genotypes whereas CA-1, CAB-139, CC-40, C. SUL-4, IMC-76, MOC-2, RB-48, SIC-2, SIC-17 and TSA-792 were the least tolerant.

Keywords: *Theobroma cacao* L., water stress, dry biomass, q-PCR, oxidative stress, multivariate analysis.

1. INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie perene, cultivada principalmente para fabricação de chocolate e apresenta grande importância econômica mundial (ALMEIDA et al., 2007). A produção mundial de cacau, da safra 2009/2010, ficou em torno de quatro milhões de toneladas. O Brasil teve participação em 225 mil toneladas anuais de amêndoas, que representa 5% do total mundial (FAO, 2010). Embora seja tipicamente cultivado em áreas de alta precipitação anual (BAE et al., 2008), as regiões de cultivo encontram-se propensas a precipitações pluviárias irregulares. Além disso, algumas destas áreas apresentam baixa capacidade de armazenamento de água no solo, sendo uma das principais causas das variações de produtividade do cacauzeiro, uma espécie considerada sensível à deficiência hídrica no solo (ALVIM, 1977; BALASIMHA, 1988). Entretanto, poucas pesquisas têm sido realizadas visando avaliar o uso da água em cacau (CARR; LOCKWOOD, 2011).

Os episódios de seca no mundo vêm sendo agravados pelo aumento da radiação solar e temperatura do ar, em virtude das mudanças climáticas globais, promovidas pelo aumento do efeito estufa. A água deverá ser considerada, até o final da próxima década, como recurso estratégico e insumo mais importante para o desenvolvimento econômico, principalmente dos países essencialmente agrícolas como o Brasil (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2011). Além disso, com o aumento crescente da população, a demanda hídrica deverá aumentar ainda mais, o que justifica a mobilização da comunidade científica no sentido de otimizar o manejo da água, selecionando espécies e genótipos resistentes a seca, para desenvolver cultivares de sequeiro.

Nos últimos anos, o cultivo de cacau vem sendo introduzido com êxito na região semi-árida da Bahia, Mucugê, em altitude cerca de 300 m. Nesta região,

cultiva-se o cacau a pleno sol como monocultivo, em sistema de fertirrigação por gotejamento, como forma de escape das doenças fúngicas, principalmente a vassoura-de-bruxa, que tem como agente causal a *M. pernicioso*, que reduziu, nos últimos anos, a produção de cacau na Bahia de 400 mil para 100 mil toneladas ano . Dessa forma, verifica-se a necessidade de estudos visando o fornecimento de bases sólidas para a expansão da cultura cacauzeira para o semiárido.

As plantas apresentam vários mecanismos de sobrevivência sob condições de seca, os quais podem ser explorados para identificar genótipos tolerantes que mantenham uma boa produção de frutos em condições de baixa disponibilidade de água no solo (GUO et al., 2010). Avaliações de parâmetros morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, têm sido muito utilizadas em estudos voltados à seleção de genótipos tolerantes à deficiência hídrica no solo, mostrando-se eficiente para diferenciar genótipos tolerantes e suscetíveis (AREND et al., 2011). Por outro lado, alterações nas concentrações de macro e micronutrientes minerais podem conferir às plantas condições de sobreviver sob estresse (HU; SCHMIDHALTER, 2005). Alguns nutrientes minerais desempenham papel importante nas respostas das plantas aos estresses bióticos e abióticos, como, por exemplo, o Ca^{2+} , conhecido por estar envolvido como mensageiro secundário nas vias de transdução de sinal, cuja concentração geralmente aumenta em resposta aos sinais de estresse (TUTEJA; SOPORY, 2008).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) têm papel fundamental na regulação da expressão gênica (JUBANY-MARÍ, et al., 2010; CARVALHO, 2008). Em condições de deficiência hídrica, as plantas podem aumentar a produção de ERO, provocar oxidação parcial ou total de componentes celulares, induzindo alterações do estado redox, com consequentes danos aos componentes celulares, especialmente DNA, lipídios e proteínas (MITTLER, 2002). A manutenção na produção de ERO e do seu metabolismo é decisiva para tolerância da planta sob condições de estresse (FOYER; NOCTOR, 2009; CARVALHO, 2008). Por outro lado, as alterações na atividade de enzimas envolvidas na maquinaria de defesa para proteger as plantas contra o estresse oxidativo, na remoção de EROs, podem conferir à planta tolerância à deficiência hídrica no solo. (JIANG; ZHANG, 2002; LEI et al., 2006; GILL; TUTEJA 2010).

A expressão de genes em respostas aos estresses bióticos e abióticos em cacau ainda é pouco estudada (BAILEY et al., 2005). Estudos da regulação e expressão de genes, que são altamente expressos em plantas submetidas à deficiência hídrica no solo, têm sido exaustivamente explorados em outras espécies (BRAY, 2004). Dentre os quais se encontram aqueles relacionados às vias dependentes e independentes de ácido abscísico (ABA). O ABA é um hormônio vegetal que desempenha papel importante na regulação de mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares durante o crescimento e desenvolvimento das plantas, atuando como um mensageiro endógeno em respostas ao estresse (CHRISTMANN et al., 2006). Quando as plantas são submetidas à deficiência hídrica no solo, há alterações na concentração de ABA em nível celular e um incremento na síntese de ABA nas raízes (WILKINSON e DAVIES, 2002), que, por sua vez, ao ser transportado para a parte aérea promove uma série de alterações na planta: (i) induz o fechamento dos estômatos; (ii) reduz a perda de água da planta por transpiração; (iii) inibe o crescimento da parte aérea; (iv) aumenta o comprimento ou área das raízes, em busca de água em regiões mais profundas do solo; e (v) regula a expressão gênica nas vias dependentes de ABA. Além disso, alguns genes apresentam-se como reguladores negativos das vias dependentes de ABA, como, por exemplo, os da família PP2C, que codificam para as proteínas fosfatase e atuam inibindo as proteínas quinase e consequente expressão gênica; promovem a ativação de canais de ânions (SLAC1) e ativam canais de cátions (UMEZAWA et al., 2010).

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o crescimento, a composição química e o estresse oxidativo em 36 genótipos de cacau (*T. cacao* L.) submetidos à deficiência hídrica no solo. A partir dos resultados dessas análises, foram selecionados seis genótipos de cacau, contrastantes em relação à tolerância à deficiência hídrica no solo, para avaliar a expressão de genes relacionados a tolerância à seca e à biossíntese de proteínas do fotossistema II (PSII), visando elucidar os possíveis mecanismos de tolerância à seca e subsidiar a seleção de genótipos para serem cultivados em solos com baixa capacidade de armazenamento de água e, ou em regiões com precipitações pluviárias irregulares, a partir do agrupamento de genótipos mais e menos tolerantes à deficiência hídrica no solo, baseado nas variáveis analisadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O cacau

O gênero *Theobroma* pertence à família Malvaceae, compreende 22 espécies, dentre as quais se destaca *T. cacao*, que tem como centro de origem as florestas quentes e úmidas das terras baixas do México, da América Central e das bacias do rio Amazonas e Orinoco (METCALFE; CHALK, 1979; JOLY, 2002).

O cacau é uma espécie preferencialmente alógama, caracterizada por apresentar fecundação cruzada (BORÉM; MIRANDA, 2005). Embora seja uma planta hermafrodita, muitos de seus genótipos apresentam incompatibilidade gamética (DIAS, 2001). Além disso, grande parte não produz zigotos por autopolinização (autoincompatíveis), outros apresentam autopolinização (auto-compatíveis) e alguns podem apresentar ainda inter-incompatibilidade (DIAS, 2001). Desta forma, as populações de cacau apresentam grande variabilidade genética, sendo uma característica importante para os programas de melhoramento (DIAS, 2001).

A espécie *T. cacao* está dividida em três grupos principais denominados Crioulo, Forasteiro e Trinitário, caracterizados por diferenças morfológicas, sensoriais, geográficas e relacionadas a tipos botânicos (CARR; LOCKWOOD, 2011). O grupo Crioulo, considerado o príncipe da espécie, foi domesticado a mais de três mil anos na Mesoamérica pelos indígenas (McNEIL, 2006). Hoje esse grupo é cultivado principalmente na Venezuela, outros países da América Latina, Madagascar, Ilhas Comores, Sri Lanka, Java e Samoa, e representa apenas 5% da produção mundial. O Forasteiro foi introduzido nas regiões de cultivo do Crioulo em meados do século XVIII, cujas árvores são consideradas estrangeiras, razão pela qual apresentam essa denominação. Esse grupo representa aproximadamente 80% da produção mundial (MARITA et al., 2001), além de ser o mais cultivado no Brasil, seus genótipos são resistentes a doenças e altamente produtivos. Por outro lado, o grupo Trinitário foi originado da hibridização entre Forasteiro e Crioulo, iniciado em Trinidad, em meados do século XVIII, sendo cultivado comercialmente no Caribe e

Papua Nova Guiné; representa 15% da produção mundial (CHEESMAN 1944; ZHANG et al., 2011; CARR; LOCKWOOD, 2011).

2.2. Estresse por deficiência hídrica no solo

As plantas estão constantemente expostas a diversos tipos de estresse, tanto bióticos quanto abióticos (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2011). Condições adversas interferem negativamente no crescimento, uma das principais causas de perda da colheita e redução no rendimento das culturas (BRAY et al., 2000). Dentre os estresses abióticos se destacam a salinidade, altas e baixas temperaturas e irradiâncias, excesso e, ou escassez de água, deficiência e excesso de nutrientes minerais no solo e toxidez por metais pesados. A escassez de água no solo é considerada como um dos fatores limitantes à produção de várias culturas no mundo, que vem sendo agravada nos últimos anos devido ao aumento da radiação solar e temperatura do ar (ANJUM et al., 2011; TUTEJA; SOPORY, 2008; CARVALHO, 2008).

O cultivo de várias espécies de valor econômico se encontra em regiões que sofrem constantemente com as alterações climáticas globais. Logo, torna-se necessária a seleção de genótipos que consigam se aclimatar a tais condições adversas, a partir da associação de inúmeros fatores (ANJUM et al., 2011), incluindo a plasticidade fenotípica. As condições hídricas da planta dependem das interações entre os sistemas solo-planta-atmosfera, cujas alterações podem causar danos à cultura. Além disso, nem toda água existente no solo está disponível para a planta (TAIZ; ZEIGER, 2009) e sua escassez interfere nos processos fisiológicos e bioquímicos, podendo ocasionar a morte das plantas (BARGALI; TEWARI, 2004). Convém ressaltar, ainda, que a deficiência hídrica no solo também compromete a disponibilidade e a absorção de nutrientes pelas raízes, interferindo, conseqüentemente, no crescimento e desenvolvimento das plantas (HU; SCHMIDHALTER, 2005).

Embora vários fatores influenciem a produção de cacau, as condições meteorológicas constituem um dos principais responsáveis pela queda na produção. Fatores climáticos como temperatura e precipitação pluviométrica são importantes

para que se tenha uma produção satisfatória do cacauzeiro (ICCO, 2012). Avaliando-se as relações existentes entre os episódios do *El niño* (quente) e *La niña* (frio) e o impacto na produção mundial de cacau, ao longo de 55 anos, verificou-se que a produção em consequência do El niño apresentou queda em torno de 2,4%, tendo o Equador as maiores reduções anuais (6%), ao passo que os eventos de *La niña* não apresentaram impacto sobre a produção mundial (ICCO, 2010).

2.2.1. Respostas à deficiência hídrica

Quando expostas a condições adversas, as plantas apresentam vários mecanismos de sobrevivência, por meio de alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares, as quais podem ser exploradas na identificação de genótipos tolerantes que mantêm uma boa produção de frutos em condições de baixa disponibilidade de água no solo, em função, por exemplo, do (i) potencial hídrico foliar; (ii) regulação hormonal (LEI et al., 2006); (iii) abscisão foliar (ARBONA et al., 2005); (iv) alterações na taxa de assimilação de CO₂ em nível foliar; (v) eficiência do uso da água; (vi) concentração de CO₂ intracelular; (vii) manutenção do teor relativo de água; (viii) ajustamentos osmótico e elástico; (ix) aumento no teor de prolina e de açúcares solúveis totais nas folhas (GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2007); (x) ajustamento de área foliar; (xi) controle da abertura e fechamento dos estômatos (GÓMEZ-CADENAS et al., 1996; TUDELA; PRIMO-MILLO, 1992; BRAKKE; ALLEN, 1995; GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2007); (xii) mudanças na composição de pigmentos cloroplastídicos e vacuolares; (xiii) alteração na razão raiz/parte aérea (R/PA); (xiv) eficiência de aquaporinas; (xv) alterações na condutância hidráulica (MARTRE et al., 2001); (xvi) distribuição do sistema radicular no solo, de forma a aumentar a eficiência de absorção de água e nutrientes; (xvii) alterações da atividade de enzimas de estresse oxidativo (LEI et al., 2006); (xviii) expressão gênica diferenciada, dentre outras.

O potencial hídrico foliar (Ψ_{WF}) influencia principalmente o crescimento celular, a fotossíntese e a produtividade (TAIZ; ZEIGER, 2009). O fechamento dos estômatos é uma das primeiras respostas das plantas em condições de restrição hídrica. As alterações na abertura e no fechamento estomático são vitais para a

tolerância das plantas ao estresse hídrico (GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2007; UMEZAWA et al., 2010). Em muitas espécies lenhosas, a maior tolerância à seca está associada ao ajuste osmótico, por meio do acúmulo de solutos e manutenção da turgescência celular (KOZLOWSKI; PALLARDY, 2002).

No caso de restrição hídrica, as plantas apresentam inibição no crescimento; alteração na razão raiz e parte aérea, promovendo aumento na alocação de biomassa para as raízes em detrimento da parte aérea (BARGALI; TEWARI, 2004); modificações na área e comprimento do sistema radicular, para explorar um maior volume de solo (TAIZ; ZEIGER, 2009) e, conseqüentemente, absorver água e nutrientes (KOZLOWSKI; PALLARDY, 2002; GUO et al., 2010). Nesse processo, os nutrientes podem tornar-se escassos para as plantas, principalmente durante o transporte e distribuição para a parte aérea (HÄNSCH; MENDEL, 2009).

As funções relacionadas aos macro e micronutrientes minerais são específicas na planta, podendo ser classificadas em (i) estruturais, onde o elemento é parte constituinte da molécula de um ou mais compostos orgânicos (N e S); (ii) iônicos (K, Ca, Mg, Mn e Cl); (iii) transferentes de elétrons (Fe, Cu, Zn e Mo); e (iv) esterificados (P e B) (KERBAUY, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2009). Alguns nutrientes minerais desempenham papel importante nas respostas das plantas ao estresse, a exemplo do Ca^{2+} , mensageiro secundário em diversas respostas aos sinais hormonais e ambientais (WHITE; BOADLEY, 2003). Esse elemento está envolvido nas vias de transdução de sinal; sua concentração geralmente aumenta em resposta aos sinais de estresse, que, por sua vez, aumenta a sensibilidade das células, ativando canais de ânions *S- Type anion channel (SLAC1)*, causando efluxo de ânions e a despolarização da membrana plasmática das células-guarda e promovendo, conseqüentemente, o fechamento estomático (TUTEJA; SOPORY, 2008). Além disso, o Ca^{2+} se liga à calmodulina e, conseqüentemente, a diferentes tipos de proteínas, regulando vários processos celulares (TAIZ; ZEIGER, 2009; XIONG et al., 2002).

2.2.2. Estresse oxidativo em plantas

As espécies reativas de oxigênio (EROs), resultado da redução parcial do O₂ molecular, apresentam-se em quatro formas, oxigênio singlete (¹O₂), radical superóxidos (O₂⁻), radicais hidroxila (OH⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (CARVALHO, 2008). EROs são subprodutos do metabolismo celular, cuja produção se intensifica, quando as plantas são submetidas a estresses bióticos e abióticos, resultando em estresse oxidativo (MITTLER, 2002; ASADA, 2006). O equilíbrio entre a produção e remoção de EROs irá determinar seu tipo e concentração e, conseqüentemente, o tipo de mecanismo de sinalização envolvido, por exemplo, na defesa a patógenos, morte celular programada e regulação do desenvolvimento da planta, ou ocasionará danos a componentes celulares (APEL; HIRT, 2004).

Em nível celular, os orgânulos de maior produção de EROs são os cloroplastos, mitocôndrios e peroxissomos (ASADA, 2006; APEL, HIRT, 2004; MØLLER, 2001). Esses orgânulos apresentam sistemas de defesa antioxidantes envolvidos na remoção de EROs (APEL; HIRT, 2004), que podem ser enzimáticos e não-enzimáticos (glutathiona, ascorbato, carotenoides, α-tocoferol e flavonoides) (PANDA; KHAN, 2009). Alterações na atividade enzimática têm sido bastante estudadas em plantas. O aumento na atividade de enzimas, como peroxidases (PODs- E.C.1.11.1.7), peroxidase do ascorbato (APX- EC 1.11.1.11), catalases (CAT- EC 1.11.1.6), redutase da glutathiona (RG- EC 1.8.1.7), dismutase do superóxido (SOD- 1.15.1.1) e oxidase do polifenol (PPO- EC 1.10.3.1) está relacionado com a remoção de EROs e é observado em plantas submetidas à deficiência hídrica no solo (JIANG e ZHANG, 2002; LEI et al., 2006).

As PODs são hemoproteínas que atuam em vários processos metabólicos essenciais, incluindo regulação do crescimento celular (GOLDBERG et al., 1986), lignificação, oxidação fenólica, defesa contra patógenos e proteção contra estresses bióticos e abióticos (GRISEBACH, 1981). Nas espécies vegetais, as peroxidases do guaiacol apresentam isoformas ácidas e básicas. As isoformas ácidas estão envolvidas numa variedade de processos relacionados à síntese da parede celular, incluindo a formação de lignina. As isoformas básicas participam da regulação da degradação de AIA (ácido indol-3-acético) e da síntese de etileno (FIELDES; GERHARDT, 1998).

As enzimas oxidases do polifenol (PPO), responsáveis pela oxidação de compostos fenólicos e de vários fenóis (RIVERO et al, 2001), têm sua atividade

normalmente elevada em tecidos infectados e estão diretamente envolvida nos mecanismos de defesa e indução de resistência das plantas a estresses bióticos e abióticos e à senescência foliar (JOUILI, FERJANI, 2003). A PPO está relacionada à lignificação das paredes celulares e, conseqüentemente, ao fortalecimento do caule, além de estar associada ao deslocamento de água e de sais minerais via xilema, como componente de traqueídeos e elementos de vasos, tecidos-chave no transporte de água (BOUDET, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2009). Embora seja abundante nos tilacoides e plastídeos, pouca ou nenhuma atividade detectável está associada às células-guarda e aos cloroplastos (VAUGHN et al., 1988).

2.2.3. Expressão diferencial de genes candidatos à tolerância à seca

Diversos genes podem ser superexpressos ou reprimidos quando as plantas encontram-se sob estresse e o aumento e/ou repressão poderá determinar a tolerância a condições adversas (NEPOMUCENO et al., 2000). Dentre os genes que são induzidos pela deficiência hídrica, encontram-se aqueles relacionados à biossíntese de aquaporinas (AQPs) e ABA e a fatores de transcrição. As AQPs são proteínas transmembranas codificadas por uma família multigênica de grande porte, com 35 membros em *Arabidopsis thaliana* L., responsáveis por controlar o transporte específico de água através das membranas celulares em todos os organismos vivos (HENZLER et al., 1999). Muitas destas AQPs mostram um padrão de expressão em células específicas na raiz e estão envolvidas na absorção de água (TYERMAN et al., 2002, JAVOT; MAUREL, 2002). Algumas AQPs desenvolvem outras funções como o transporte de amônia e outras substâncias, incluindo CO₂ no mesófilo foliar durante a fotossíntese (UEHLEIN et al., 2003; HANBA et al., 2004; FLEXAS et al., 2006). Apesar disso, pouco se conhece sobre o papel fisiológico das AQPs sob condições desfavoráveis. Estudos recentes confirmam o envolvimento direto das AQPs nas relações hídricas em plantas e demonstram sua participação na tolerância à deficiência hídrica (PENG et al., 2007). Entretanto, a interrelação entre a função de AQPs na regulação do *status* hídrico na planta e na expressão de genes é confusa, algumas AQPs são constitutivamente expressadas (JOHANSSON et al., 1996), enquanto a expressão de outras é regulada por diferentes estímulos, tais como

estágio de desenvolvimento, hormônios ou por condições ambientais adversas (VERA-ESTRELLA et al., 2004), tal como a deficiência hídrica (MAHDIEH et al., 2008; INGRAM; BARTELS, 1996).

Em condições de deficiência hídrica no solo a percepção e transdução de sinal se dão por duas vias distintas, a dependente e a independente de ABA. O ABA é sintetizado na rota biossintética dos carotenoides, a clivagem de cis-xantofilas é catalisada por uma família de 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenases (NCED), para formar xantoxal, um precursor de ABA, que se move para o citosol e é convertida em abscísico-aldeído, por uma enzima semelhante à desidrogenase/reductase de cadeia curta (SDR1), que depois é oxidado a ABA por uma família de abscísico-aldeído oxidases (AAOs) (NAMBARA; MARION-POLL, 2005; SEO et al., 2004).

O ABA atua como intermediário na ativação de vários genes em resposta a deficiência hídrica (BRAY, 2004; HUANG et al., 2008), a partir de uma cascata de sinalização, além de ser um regulador negativo de proteínas fosfatases 2C (PP2Cs) e envolvido na sinalização e ativação de diversos fatores de transcrição (MA et al., 2009; CHRISTMANN et al., 2006). Sugere-se que as PP2Cs atuem como moduladoras negativas das vias das proteínas quinases, envolvidas em diversas respostas ao estresse ambiental e processos de desenvolvimento. Estudos recentes revelaram que as PP2Cs são codificadas por uma das maiores famílias multigênica identificadas em plantas, com 78 e 80 genes PP2Cs em *Oryza sativa* L. (OsPP2Cs) e *A. thaliana* L. (AtPP2Cs), respectivamente (XUE, et al., 2008).

Descobriu-se uma família de receptores ABA (PYR- *Pyrabactin Resistência 1*/ PYL- *Pyr1-Like*/ RCAR- *Regulatory Component Of Aba Response 1*) altamente conservada entre espécies cultivadas, constituída por 14 membros, que estão envolvidos no complexo de sinalização do ABA. Esse fitormônio promove a interação desses receptores aos PP2Cs, como ABI1 (*Abscisic Acid Insensitive 1*) e ABI2, resultando na inativação dessas fosfatases e consequentemente na fosforilação de proteínas quinases (SnRK2) e de fatores de transcrição envolvidos nas vias dependentes de ABA, como AREB/ABFs (*ABRE-binding protein/ABRE-binding factor*), que se ligam a elementos ABA-responsivos como ABRE (*ABA-responsive element*), ativando a expressão de vários genes (CHAVES et al., 2003; FUJITA et al., 2005; HIRAYAMA; SHINOZAKI, 2007; PENNISI, 2009; CUTLER et al.,

2010; KLINGLER et al., 2010; RAGHAVENDRA et al., 2010, UMEZAWA et al., 2010).

Os produtos gênicos induzidos pelas vias ABA-dependentes podem atuar tanto na regulação da expressão gênica (proteínas envolvidas na transdução de sinal e fatores de transcrição), como na proteção das plantas contra o estresse (proteínas osmoprotetoras e regulação da condutância estomática) (SEKI et al., 2002; ZHU, 2002). Várias pesquisas vêm sendo realizadas, visando elucidar as respostas das plantas a deficiência hídrica e identificar receptores que se ligam ao ABA e desencadeiam eventos de sinalização que promovam efeitos distintos na fisiologia das plantas. Os resultados dessas pesquisas poderão subsidiar o melhoramento genético das espécies vegetais, em relação à eficiência no uso da água, podendo, desta forma, aumentar o rendimento das culturas em condições de baixa disponibilidade de água no solo (KLINGLER et al., 2010; FUJITA et al., 2005; HIRAYAMA; SHINOZAKI, 2007).

As vias independentes de ABA ainda são pouco compreendidas (CHAVES et al., 2003). Estudos têm revelado a atuação de fatores de transcrição nas respostas aos estresses abióticos e regulação da expressão gênica, como NAC (seca e salinidade), DREB2 [(seca e alta salinidade)- *Dehydration-Response-Element-Binding protein 2*] e DREB1/CBF [(frio)- *Dehydration-Response-Element-Binding protein 1/ C-repeat-binding factor*] que se ligam aos elementos responsivos como ERD1 (*Early Responsive to Dehydration 1*) e DRE/CRT (*dehydration-responsive element/ C-repeat*) (FUJITA et al., 2005; HIRAYAMA; SHINOZAKI, 2007).

Além dos genes conhecidamente envolvidos na tolerância a deficiência hídrica, a identificação da superexpressão e/ou repressão de genes envolvidos em rotas de biossíntese de proteínas relacionadas à fotossíntese são de grande importância, já que o conhecimento acerca da expressão desses genes tem grande influência sobre a produtividade de espécies cultivadas, visto que a fotossíntese é necessária à produção de energia e crescimento da planta (GIARDI et al., 1996). As proteínas do centro de reação do fotossistema II (PSII), como a proteína D1, codificada pelo gene *PsbA*, e a proteína *PsbO*, também têm sido estudadas (REHEM et al., 2011). A proteína *psbA* pode ser facilmente degradada e continuamente sintetizada em condições de estresse, além de estar envolvida no transporte fotossintético de elétrons (TAIZ; ZEIGER, 2009; GIARDI et al., 1996). Por

outro lado, a proteína *PsbO* está envolvida na estabilização e evolução de oxigênio no *cluster* de Mn, em nível de PS II, e apresenta papel fundamental na fotossíntese (MURAKAMI et al., 2005).

2.3. Melhoramento genético do cacauero

Nas últimas décadas, os melhoristas têm visado a seleção de genótipos tolerantes a estresses bióticos e abióticos, a partir da obtenção de plantas que apresentem características peculiares para sobreviver e manter a produtividade em condições ambientais adversas (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2011). As plantas desenvolveram diferentes mecanismos de tolerância e, embora os genes relacionados à tolerância aos diversos tipos de estresse sejam comuns a todos os genótipos de determinada espécie, os mecanismos adaptativos para tolerar o estresse requerem plasticidade genética e combinação de processos morfológicos, fisiológicos e metabólicos, que dependem de diversos genes e variam conforme o ambiente (BARTELS; SUNKAR, 2005).

A avaliação de progênies nos programas de melhoramento genético utiliza-se da herança de caracteres qualitativos ou quantitativos, governados por um ou poucos genes (monogênica ou oligogênica) ou por muitos genes (poligênica), respectivamente (SNUSTAD; SIMMONS, 2008). Os estudos, de modo geral, avaliam caracteres de interesse econômico e a estimativa de ganhos genéticos (MORAES et al., 2007).

Os estudos visando melhoramento do cacauero no Brasil tiveram início em 1920, entretanto, só a partir de 1950 as pesquisas foram intensificadas, visando a seleção de genótipos altamente produtivos e resistentes a doenças, nos estados da Bahia (Estação Experimental de Jucará) e Espírito Santo (Goitacazes) (VELLO et al., 1969; PEREIRA et al., 1999; DIAS, 2001;). Além disso, desde 1930, seleções de genótipos já haviam sido realizadas pela Estação Experimental de Uruçuca (ICB), BA. As pesquisas desenvolvidas nestas estações promoveram a seleção de 300 matrizes que apresentaram alta produção e, a partir desta seleção, fez-se nova seleção com base em caracteres, como índice dos frutos e idade das plantas, dentre outros (VELLO et al., 1969).

Estudos relacionados à seleção de genótipos de cacau superiores no tocante à resistência a doenças vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos (DIAS, 2001). Entretanto, até o presente momento, poucas pesquisas foram realizadas objetivando a seleção de genótipos tolerantes à seca e à determinação de caracteres que possam ser utilizados em programas de melhoramento genético do cacauero (CARR; LOCKWOOD, 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições de cultivo

Avaliaram-se 36 genótipos de cacau [AMZ-15.1(AMAZON 15.1), BE-08, CAT (CATONGO), CA-1, CA-3, CAB-139, CAB-274, CC-40, C.SUL-3, C. SUL-4, EET-53, EET-103, EQX-107, GU-114, ICS-9, ICS-98, IMC-27, IMC-76, MA-14, MA-15, MOC-2(MOCORONGO-2), MO-20, OC-77, PA-13, PA-150, PS-1319, RB-39, RB-48, RIM-6, SCA-6, SIAL-169, SIC-2, SIC-17, SPA-5, TSA-792, TSH-1188], com características morfológicas, genéticas e geográficas distintas (Tabela 1). Os estudos foram realizados na casa de vegetação do CEPEC/CEPLAC, Ilhéus, BA, Brasil (14°47'S, 39°16'W, 55 m a.n.m.) e nos laboratórios da UESC.

3.1.1. Progenies de Meios Irmãos

Os genótipos foram obtidos por meio de polinização aberta no Banco Ativo de Germoplasma de Cacau do Centro de Pesquisa do Cacau/ Comissão Executiva de Planejamento da Lavoura Cacaueira- CEPEC/CEPLAC. Coletaram-se cinco frutos de cada um dos 36 genótipos avaliados. Em seguida, as sementes dos frutos de cada genótipo foram aleatorizadas e retiradas 40 sementes para plantio em vaso de 16 L, contendo solo como substrato, em condições de casa de vegetação (Figura 1).

3.1.2. Análise do solo e monitoramento da casa de vegetação

Fez-se análise química e física do solo (Tabela 2) para verificar a necessidade de adubação, de acordo com as exigências da cultura (SOUZA JR.; MENEZES, 2000). Durante o período experimental, monitoraram-se a temperatura e

a umidade relativa do ar, usando um termo-higrógrafo (Kipp & Zonen. Modelo 836) (Figura 2), e a radiação fotossinteticamente ativa (RFA) por meio de um *Quantum Meter* modelo QMSS-SUN-1350 (Apogee,USA). Os valores de RFA máxima, no interior da casa de vegetação, variaram de 1000 a 1200 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabela 1- Relação dos 36 gen\u00f3tipos de *T. cacao* submetidos \u00e0 defici\u00eancia h\u00eddrica no solo, origem geogr\u00e1fica, grupo bot\u00e2nico e compatibilidade gam\u00e9tica*.

Gen\u00f3tipo	Origem	Grupo	Compatibilidade Gam\u00e9tica
AMAZON -15.1 (AMZ-15.1)	Peru	Forasteiro	Autoincompativel
BE- 08	Para	Forasteiro	Autocompativel
C SUL-3	Acre	Forasteiro	Autoincompativel
C SUL-4	Acre	Forasteiro	Autoincompativel
CA-1	Amazonas	Forasteiro	-
CA-3	Amazonas	Forasteiro	-
CAB-139	Acre	Forasteiro	-
CAB-274	Amazonas	Forasteiro	-
CATONGO (CAT)	Bahia	Forasteiro	Autocompativel
CC-40	Costa rica	-	Autocompativel
EET-103	Equador	Forasteiro	-
EET-53	Equador	Forasteiro	Autocompativel
EQX-107	Equador	-	-
GU-114	Guiana francesa	Forasteiro	-
ICS-9	Trinidad	Trinit\u00e1rio	Autocompativel
ICS-98	Trinidad	Trinit\u00e1rio	Autoincompativel
IMC-27	Peru	Forasteiro	-
IMC-76	Peru	Forasteiro	Autoincompativel

MA-14	Amazonas	Forasteiro	Autoincompatível
MA-15	Amazonas	Forasteiro	Autoincompatível
MO-20	Peru	Forasteiro	-
MOCORONGO 2 (MOC-2)	Pará	Forasteiro	-
OC-77	Venezuela	Crioulo	Autocompatível
PA-13	Peru	Forasteiro	Autoincompatível
PA-150	Peru	Forasteiro	Autoincompatível
PS-1319	Bahia	Híbrido de Crioulo	Autocompatível
RB-39	Acre	Forasteiro	Autoincompatível
RB-48	Acre	Forasteiro	Autoincompatível
RIM-6	México	Crioulo	Autoincompatível
SCA-6	Peru	Forasteiro	Autoincompatível
SIAL-169	Bahia	Forasteiro	Autocompatível
SIC-17	Bahia	Forasteiro	Autocompatível
SIC-2	Bahia	Forasteiro	Autocompatível
SPA-5	Colômbia	-	Autocompatível
TSA-792	Trinidad	Trinitário	Autoincompatível
TSH-1188	Bahia	Trinitário	Autoincompatível

*Turnbull, C.J. and Hadley, P. *International Cocoa Germplasm Database (ICGD)*. [Online Database]. CRA Ltd./NYSE Liffe/University of Reading, UK. Available: <http://www.icgd.reading.ac.uk> (10th Dez, 2011)



Figura 1- Vista parcial do experimento mostrando a disposição dos vasos de acordo com o delineamento estatístico.

Tabela 2- Análise física e química do solo.

Al	H+Al	Ca	Mg	Ca+Mg	K	P	Mn	Fe	Cu	Zn	pH
.....cmol _c dm ⁻³mg dm ⁻³					CaCl ₂	
0,05	2,7	3,1	0,7	3,7	0,2	13,5	23,3	180,2	2,3	6,7	5,3

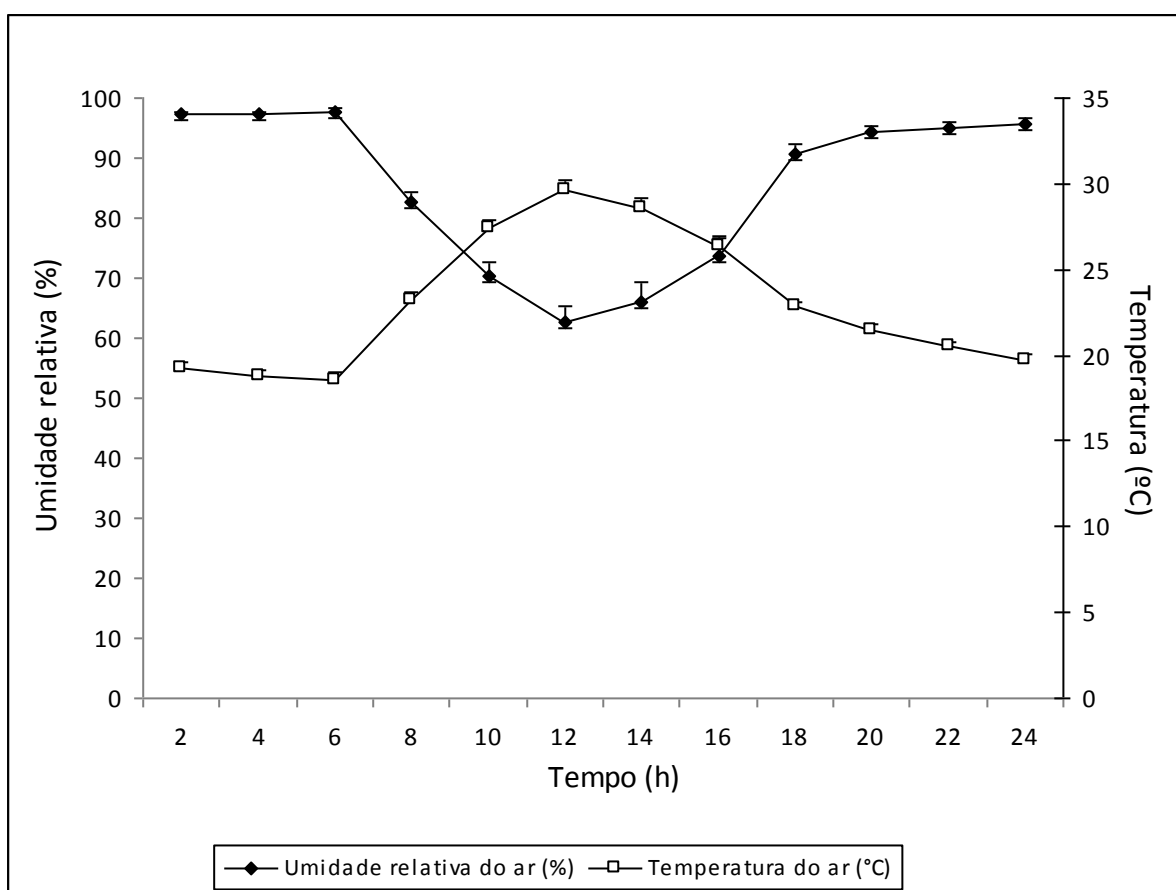


Figura 2- Curso médio diurno da temperatura e umidade relativa média do ar durante o período experimental. Valores médios de 60 dias ± erro padrão.

3.2. Status hídrico foliar

As plantas com seis meses de idade (Figura 3 A, B) foram submetidas à desidratação, com a redução do teor de água no solo, pela suspensão gradativa da água aplicada manualmente, por um período de 60 dias, até que o potencial hídrico foliar antimanhã (Ψ_{WF}) atingisse entre -2,0 a -2,5 MPa. As plantas, utilizadas como controle, foram irrigadas diariamente para manter a umidade do solo próxima à capacidade de campo, cujos valores de Ψ_{WF} permaneceram entre -0,1 a -0,5 MPa. As medições de Ψ_{WF} foram realizadas na segunda ou terceira folha madura a partir da extremidade do eixo ortotrópico, entre 2 e 4 h da manhã, utilizando-se uma câmara de pressão modelo 1000 (PMS Instrument Company, EUA), segundo a metodologia descrita por SCHOLANDER et al. (1965).

3.3. Variáveis de crescimento

As plantas dos 36 genótipos, submetidas à deficiência hídrica e controle, foram coletadas no momento da aplicação dos tratamentos, quando o Ψ_{WF} encontrava-se entre -0,1 a -0,5 MPa, e aos 60 dias de duração do estresse, com Ψ_{WF} entre -2,0 a -2,5 MPa. Durante as coletas, as plantas foram divididas em partes (raiz, caule e folha). Em seguida, após medição de área foliar total; contagem do número de folhas por planta; estimativa do volume radicular; obtenção de imagens das raízes, para estimativa da área radicular; altura da planta e diâmetro do coleto, as diferentes partes foram armazenadas isoladamente em sacos de papel e colocadas para secar em estufa de circulação forçada de ar a 75 °C até massa constante, para obtenção da biomassa seca total da planta e de suas partes. A área foliar foi mensurada com um medidor de área Li-Cor, modelo Li-3100 (Li-Cor, inc. Lincoln, Nebraska, USA). A área do sistema radicular foi estimada após limiarização no software Gimp 2 (Figura 4 A, B) e posterior análise no programa computacional Sigma Scan® Pro 5 (Figura 4 C,D), ao passo que o volume radicular foi estimado após a imersão da raiz em água com volume definido, usando proveta, e observando o seu deslocamento. O diâmetro do coleto e a altura do caule foram medidos com o uso de paquímetro digital e régua, respectivamente.



Figura 3- Plantas jovens dos 36 genótipos de cacau (*Theobroma cacao* L.), crescidas em casa de vegetação, aos três (A) e seis meses de idade (B).

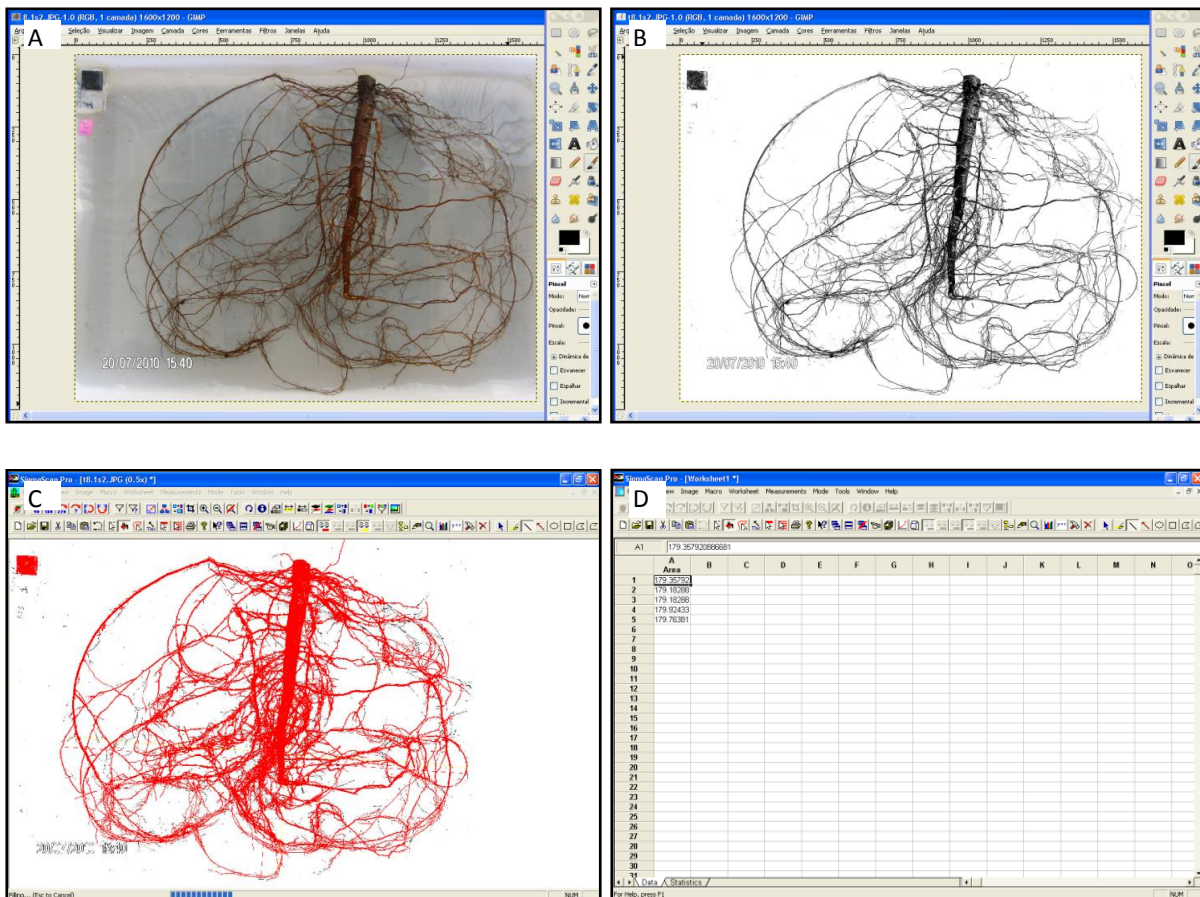


Figura 4- Interface do *software* GIMP 2 para limiarização das imagens de raízes (A, B). Interface do *software* Sigma Scan Pro 5 para análise da área radicular das imagens das raízes dos 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. controle e sob déficit hídrico (C, D).

A partir da biomassa seca das diferentes partes da planta (raiz -BR; caule -BC; folha -BF) e área foliar por planta (AFP) dos diferentes genótipos, foram determinados: (i) acúmulo de biomassa seca total (BT); (ii) taxa de crescimento relativo $[TCR = (\ln BT_2 - \ln BT_1)/(T_2 - T_1)]$; (iii) taxa assimilatória líquida $\{TAL = [(BT_2 - BT_1)/(AFP_2 - AFP_1)] \times [(\ln AFP_2 - \ln AFP_1)/(T_2 - T_1)]\}$; (iv) área foliar individual (AFI= AFP/nº de folhas); (v) número de folhas (NF); razão de área foliar (AFP/BT); (vi) massa foliar específica (MFE= BF/AFP); (vii) biomassa da parte aérea (BPA=BF+BC) e (viii) razão BR/BPA (R/PA), de acordo com as metodologias descritas por RADFORD (1967), RICHARDS (1969) e HUNT (1990).

3.4. Conteúdo de macro e micronutrientes minerais

O conteúdo de macro e micronutrientes minerais foram avaliados a partir da biomassa seca foliar dos 36 genótipos submetidos à deficiência hídrica e controle, coletadas no momento da aplicação dos tratamentos (Ψ_{WF} entre -0,1 a -0,5 MPa) e aos 60 dias de duração do estresse (Ψ_{WF} entre -2,0 a -2,5 MPa). Fez-se a digestão nitroperclórica da amostra, e, em seguida, a determinação dos teores foliares de Ca, Mg, Fe, Zn, Cu e Mn por espectrofotometria de absorção atômica; de P por colorimetria, utilizando o método da vitamina C (BRAGA; DEFELIPO, 1974); e de K por fotometria de emissão de chama. O teor de N foi determinado pelo método de Kjeldahl, após digestão sulfusalicídica da amostra (JACKSON, 1958). A partir dos teores foliares de macro e micronutrientes minerais, determinou-se o conteúdo foliar ($g\ planta^{-1}$) para cada genótipo e tratamento.

3.5. Atividade de enzimas de estresse oxidativo

3.5.1. Obtenção do extrato enzimático

Para análise da atividade das enzimas peroxidases do guaiacol (PODs- E.C.1.11.1.7) e oxidases do polifenol (PPOs, E.C.1.10.3.1), foram coletadas amostras foliares (2ª ou 3ª folha madura a partir do ápice do eixo ortotrófico) dos 36

genótipos de *T. cacao*, submetidos à deficiência hídrica no solo e controle, que, em seguida, foram imersas em nitrogênio líquido, armazenadas em freezer -80 °C, e posteriormente liofilizadas. A obtenção do extrato enzimático e a leitura da atividade enzimática foram realizadas seguindo metodologia descrita por Pirovani et al. (2008). No momento da determinação da atividade enzimática, foram macerados aproximadamente 20 mg de tecido foliar, de cada genótipo e tratamento, em nitrogênio líquido. Em seguida, adicionou-se tampão fosfato (50 mmol L⁻¹, pH 6,0), na proporção 20:1 (tampão : massa seca), e procedeu a ultra-sonicação (Ultrasonic processor Gex 130, 130 W) da amostra em gelo até o rompimento total do tecido, com pulsos de 5 s, a intervalos de 10 s e amplitudes de 70% e 80%. Logo após, a amostra foi centrifugada por 5 min. a 13000 x g.

3.5.2. Atividade de peroxidases (POD)

Para determinação da atividade de POD, coletou-se uma alíquota de 10 µL da fase aquosa, que, em seguida, foi diluída em 90 µL de tampão fosfato, pH 6,0. Logo após, foram preparadas microplacas de 96 poços contendo 140 µL de tampão POD 2x (40 mmol L⁻¹ de guaiacol, 20 mM NaH₂PO₄ pH 6,0, 0,6% H₂O₂), 120 µL de tampão fosfato 50 mM, pH 6,0, e 20 µL de extrato enzimático diluído (1:10). A atividade de peroxidases foi expressa com o aumento do consumo de guaiacol em mmol g⁻¹ de matéria seca h⁻¹. Para PODs a conversão dos dados obtidos em valores de absorvância, a 470 nm min⁻¹ g⁻¹ (DM) para o consumo de guaiacol em mmol g⁻¹ (DM) h⁻¹, foi realizada com o uso da equação $y = 0.1324 + 0.8382x$ (R²= 0.99). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de microplacas (VERSAmax).

3.5.3. Atividade da oxidase do polifenol (PPO)

Para determinação da atividade de PPO, coletou-se uma alíquota de 10 µL da fase aquosa, diluída em 90 µL de tampão fosfato 50 mM, pH 6,0. Em seguida, foram preparadas microplacas de 96 poços contendo 200 µL de tampão PPO

(epicatequina 5 mmol L⁻¹, 100mM ácido cítrico, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7,5), 60 µL de tampão fosfato 50 mM, pH 6,0 e 20 µL de extrato enzimático diluído (1:10). A atividade de PPO foi expressa com o aumento do consumo de epicatequina em mg g⁻¹ matéria seca min⁻¹. A conversão dos dados obtidos em valores de absorvância, a 444 nm min⁻¹ g⁻¹ (DM), baseado no consumo de epicatequina em mg g⁻¹ (DM) min⁻¹, foi efetuada usando a equação $y = - 0.091 + 50.657x$ (R²= 0.99). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de microplacas (VERSAmax).

3.6. Análise multivariada para variáveis de crescimento, composição química e estresse oxidativo

As análises dos componentes principais e de agrupamento foram realizadas a partir dos valores das variáveis de crescimento, composição química e estresse oxidativo, obtidos pela diferença (Δ) entre plantas controle (-0.1 a -0.5 MPa) e submetidas à deficiência hídrica no solo (-2.0 a -2.5 MPa). Inicialmente, procedeu-se a padronização dos dados e fez-se análise de agrupamento, baseada em 28 variáveis (AFT, NF, AFI, BR, BC, BF, BPA, BT, MFE, R/PA, ALT, AR, VOL, DC, RAF, TCR, TAL, POD, PPO, conteúdo foliar de N, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu e Mn). Posteriormente, efetuou-se análise de colinearidade, identificando oito variáveis não colineares (AFP, BPA, BT, TCR, AR, conteúdo foliar de N, Ca, e Mg), que foram submetidas a análise de agrupamento e de componentes principais. A matriz de distância foi baseada na distância Euclidiana e as análises de agrupamento via dendrograma, usando o método hierárquico aglomerativo proposto por Ward (1963) como critério de agrupamento.

3.7. Análise de expressão gênica

A partir dos resultados das análises multivariadas foram selecionados seis genótipos de cacau [CC-40, C. Sul-4, SIC-2- (Intolerantes), MA-15, MO-20, PA-13 (tolerante)], contrastantes em relação à tolerância a deficiência hídrica no solo, para análise da expressão gênica. Utilizaram-se dois genes candidatos relacionados a

tolerância à seca, envolvidos nas vias ABA dependente [(NCED5- 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase 5- associado à biossíntese do ácido abscísico - ABA) e (PP2C- proteína fosfatase 2C - regulador negativo nas respostas ao ABA)] e dois genes relacionados à biossíntese das proteínas do fotossistema II (PSII) da fase fotoquímica da fotossíntese (*psbA* e *psbO*) (Tabela 3).

Usou-se, para análise de expressão gênica, parte das amostras foliares coletadas para as medições de atividade das enzimas do estresse oxidativo. Foram maceradas aproximadamente 20 mg de tecido de cada amostra foliar em nitrogênio líquido, dos seis genótipos selecionados, com valores de Ψ_{WF} correspondentes a -0,1 a -0,5 MPa (controle) e a -2,0 a -2,5 MPa (estressado). Para extração de RNA foi utilizado o kit RNAqueous® (Ambion), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram utilizadas para a síntese do cDNA 1ª fita com o RevertAid™ H Minus M-MuLV *Reverse Transcriptase* (Fermentas), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando primers oligo d(T)18. As reações foram incubadas a 65°C por 5 min., 37°C por 5 min., 42°C por 60 min. e 70°C por 10 min.

Os *primers* foram desenhados após a análise de sequências conservadas em *T. cacao*. A qPCR foi realizada em um termociclador da “Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System”, usando sequência de detecção (fluoróforo) não específica SYBR Green I. O mix para a reação foi composto por cDNA como molde, 0,5 µM de cada primer e 12,5 µL de Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x). Os números da expressão relativa dos genes foram calculados como o número de vezes em relação à planta controle, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), tendo o gene β -tubulina como referência.

Tabela 3- Pares de *primers* gene-específicos utilizados nas análises de qPCR.

Gene	Acesso	Primer
<i>NCED5</i>	TC09:23395416..2 3395838 *	<i>Forward</i> ; 5'- CAGACATTTTCAGGACTTCTTCA -3' <i>Reverse</i> ; 5'-TGGAGCGTTCCATAAACACTTG -3'
PP2C	CL5350Contig1 **	<i>Forward</i> ; 5'-TGCTGAAGATCAAAATTGGTTAGG-3' <i>Reverse</i> ; 5'-GGAAAAGATAAGCATGAAGTGG-3'
<i>PsbO</i>	CL326Contig1 **	<i>Forward</i> ; 5'-GCAAACGCTGAAGGAGTT-3' <i>Reverse</i> ; 5'-GGCTTGAAGGCAAATGAGTC-3'
<i>PsbA</i>	NC_014676.2 ***	<i>Forward</i> ; 5'-GGTTTGCACCTTTTACCCGA-3' <i>Reverse</i> ; 5'- CTCATAAGGACCGCCATT -3'
<i>β-Tubulina</i>	GU570572.1 ***	<i>Forward</i> ; 5'-TGCAACCATGAGTGGTGTCA- 3' <i>Reverse</i> ; 5'-CAGACGAGGGAAAGGAATGA- 3'

* <http://cocoagendb.cirad.fr/>

** <http://esttik.cirad.fr/index.html>

*** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

3.8. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 144 tratamentos para as variáveis taxa de crescimento relativo e taxa assimilatória líquida [36 genótipos, 2 regimes hídricos (Ψ_{WF} , controle: -0,1 a -0,5 MPa e seca: -2,0 a -2,5 MPa) e 2 épocas de coleta de material vegetal (início e aos 60 dias de estresse)] e 6 repetições.

Para as demais variáveis o delineamento também foi inteiramente casualizado, porém, com 72 tratamentos para as variáveis de crescimento, composição química e atividade das enzimas POD e PPO {36 genótipos e 2 regimes hídricos [Ψ_{WF} , controle (-0,1 a -0,5 MPa) e seca (-2,0 a -2,5 MPa)]} e 6 a 8 repetições; e com 12 tratamentos para análise da expressão gênica {seis genótipos de cacau [CC-40, C. Sul-4, SIC-2 (intolerantes), MA-15, MO-20, PA-13 (tolerante)], contrastantes em relação à tolerância a deficiência hídrica no solo e 2 regimes hídricos [Ψ_{WF} , controle (-0,1 a -0,5 MPa) e seca (-2,0 a -2,5 MPa)]} e 8 repetições.

Fez-se também comparações de médias dos tratamentos controle (-0,1 a -0,5 MPa) e seca (-2,0 a -2,5 MPa), por meio do teste *t*-Student ($P < 0,05$ e $P < 0,01$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Variáveis de crescimento

Aos 60 dias de duração do estresse por deficiência hídrica no solo, verificaram-se reduções significativas ($P < 0,05$) da biomassa seca, em todos os órgãos vegetativos analisados, para a maioria dos genótipos de cacau avaliados, exceto os genótipos EET-53, ICS-9, MA-15, OC-77, PA 150, PS-1319 e SPA-5 (Figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10).

Reduções significativas ($P < 0,05$) em biomassa seca foliar (BF) foram verificadas para 50% dos genótipos avaliados, em relação ao controle, principalmente para C. SUL-4, CC-40 e SIC-17, que apresentaram reduções significativas ($P < 0,01$) de 40, 38 e 36%, respectivamente, em relação aos seus respectivos controles (Figura 5). Em relação à biomassa seca do caule (BC), os menores valores significativos ($P < 0,01$) foram observados para os genótipos C. SUL-4, GU-114, IMC-76, CA-3 e CC-40, com decréscimos de 38, 35, 35, 34, 34 e 33%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 6). Por outro lado, em relação à biomassa seca da parte aérea (BPA), verificaram-se reduções significativas ($P < 0,05$) para 58% dos genótipos avaliados, especialmente para os genótipos C. SUL-4, CC-40, CAB-139, IMC-76 e SIC-17, que apresentaram reduções significativas ($P < 0,01$) em resposta ao estresse hídrico, com decréscimo de 39, 36, 34, 33 e 32 %, quando comparado aos controles (Figura 7). Já os valores de biomassa seca de raiz (BR) reduziram em 42% dos genótipos estudados, cujos maiores decréscimos foram verificados para os genótipos CAB-139, EQX-107, SIC-2, RB-48, C. SUL-4 e SIC-17, que apresentaram reduções significativas ($P < 0,01$) de 39, 37, 37, 35, 35 e 33%, respectivamente, nas plantas submetidas à seca, quando comparado ao controle (Figura 8). Além disso, verificaram-se reduções na biomassa

seca total (BT) para 64% dos genótipos avaliados (Figura 9). Ademais, para a razão raiz (R) e parte aérea (PA) (R/PA), não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos de seca e controle dos genótipos avaliados (Figura 10).

Observou-se que os genótipos sensíveis à seca tiveram reduções significativas da biomassa, tanto da parte aérea quanto da raiz, enquanto os genótipos tolerantes não tiveram reduções significativas para ambos os órgãos. Em condições de estresse, as plantas podem apresentar diversas alterações fisiológicas, dentre as quais o fechamento dos estômatos, como forma de reduzir a perda de água pela transpiração, que, em longo prazo, leva à redução na fotossíntese líquida e, conseqüentemente, diminuição na biomassa de todos os órgãos (TAIZ; ZEIGER, 2009). Além disso, as alterações são principalmente em nível foliar, devido principalmente à redução na assimilação de CO_2 e abscisão foliar (RASCHER et al., 2004). GUO et al. (2010), ao avaliarem três híbridos da espécie *Populus*, em relação a tolerância à seca, observaram que a manutenção da taxa fotossintética e do crescimento, em condições de deficiência hídrica no solo, sugere maior capacidade de tolerância a este tipo de estresse. Esses autores verificaram que, embora os híbridos avaliados tivessem apresentado reduções na biomassa seca total, na medida em que o regime de rega tornava-se mais severo, o híbrido mais tolerante manteve-se semelhante ao controle. Fato verificado também no presente estudo.

Além do mais, em espécies simpátricas de *Populus* (*P. cathayana*; *P. przewalskii*), o déficit hídrico no solo (25% da capacidade de campo) também causou reduções significativas da biomassa radicular, caulinar, foliar e total, principalmente para *P. cathayana*, ao passo que para *P. przewalskii* essas reduções foram menores. Ademais, essa espécie apresentou melhor eficiência no uso da água, sugerindo ser a mais tolerante e com melhores estratégias para aclimatar em condições de seca (YIN et al., 2005). Li; Wang (2003) e Yang et al. (2005) em estudo com populações de espécies contrastantes de *Eucalyptus microtheca* e de *Hippophae rhamnoides*, respectivamente, submetidas a diferentes regimes hídricos, também verificaram reduções significativas do crescimento em biomassa total e razão R/PA.

Em relação à razão R/PA, embora as alterações não tenham sido significativas, observou-se uma tendência de diminuição na alocação de biomassa

para as raízes em 56% dos genótipos avaliados, indicado pela menor R/PA. Entretanto, para alguns genótipos que se mostraram mais tolerantes à deficiência hídrica, como OC-77, PA-13 e MA-15, verificou-se um aumento na alocação de biomassa para as raízes. Desta forma, sugere-se que, em condições de deficiência hídrica, os genótipos de cacau mais tolerantes podem apresentar alterações em R/PA, alocando mais biomassa para as raízes, para explorar um maior volume de solo. TSCHAPLINSKI et al. (1998) realizaram estudos com híbridos de *Populus* e verificaram, para o clone mais tolerante à deficiência hídrica, a existência de plasticidade fenotípica em relação a maior alocação de carbono para as raízes, favorecendo o aumento da densidade radicular e, conseqüentemente, a ocupação de um maior volume de solo, restabelecendo, dessa forma, o balanço hídrico na planta. Li; Wang, (2003) e Yin et al. (2005), trabalhando com *Populus* e *Eucalyptus microtheca*, respectivamente, verificaram aumento significativo em R/PA para as plantas que se encontravam em solos com 25% da capacidade de campo, principalmente para espécie que se mostrou mais tolerante a deficiência hídrica no solo. Estes autores sugeriram diferentes estratégias de uso da água entre as populações das espécies estudadas, e possível utilização de tais variações como critério de seleção de genótipos para diferentes regiões de cultivo.

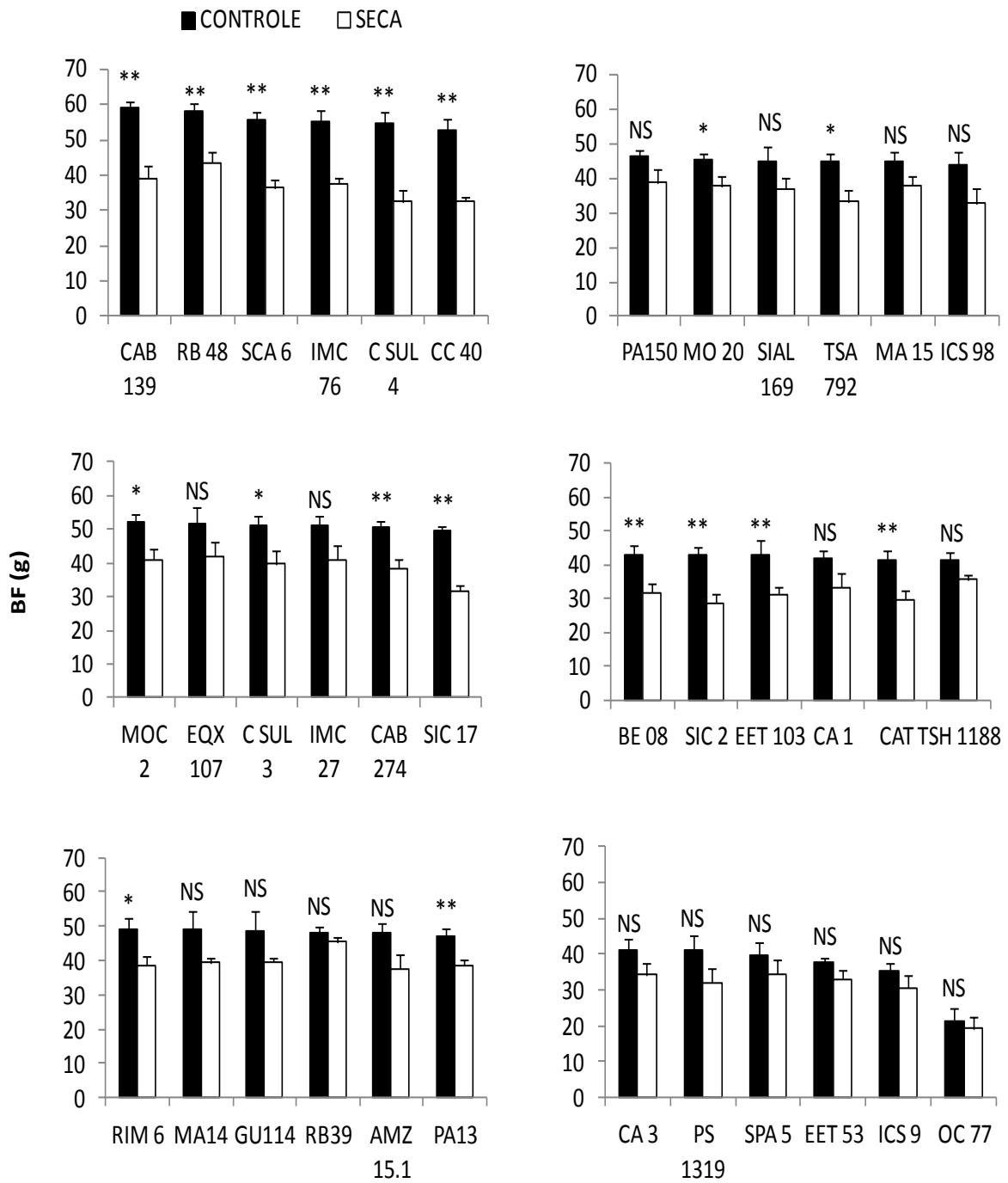


Figura 5- Biomassa seca foliar (BF) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e n = 6.

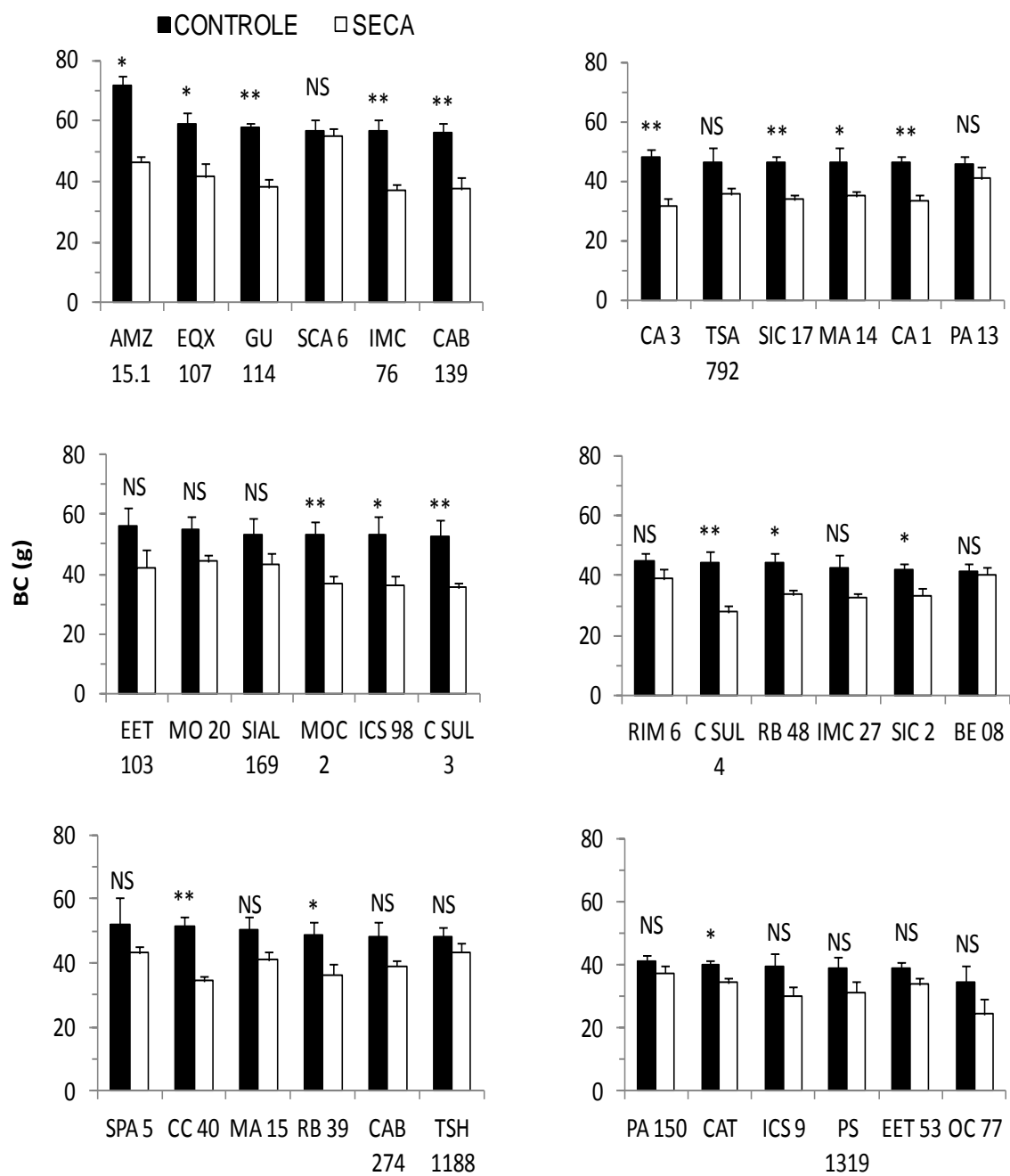


Figura 6- Biomassa seca do caule (BC) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

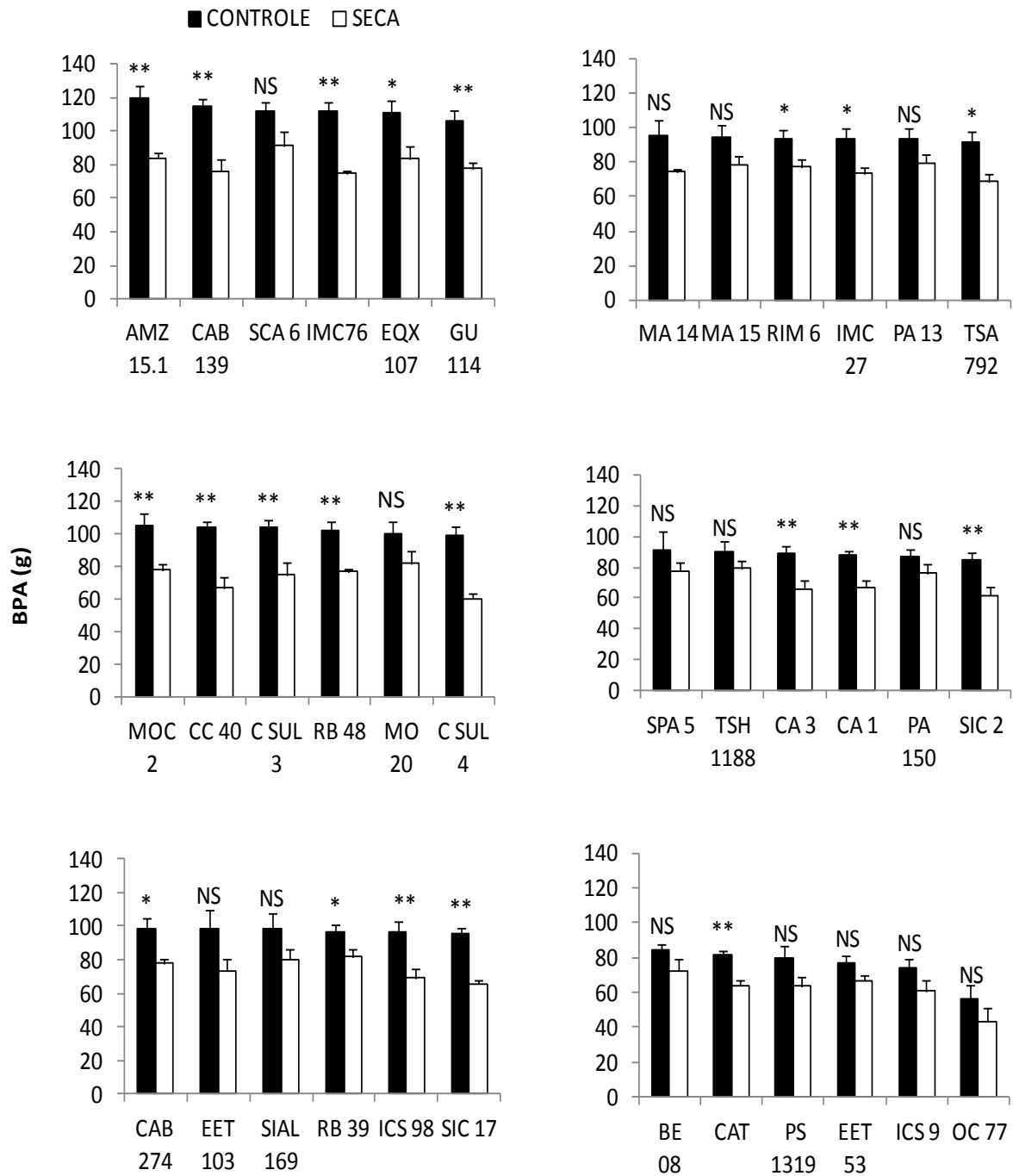


Figura 7- Biomassa seca da parte aérea (BPA) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

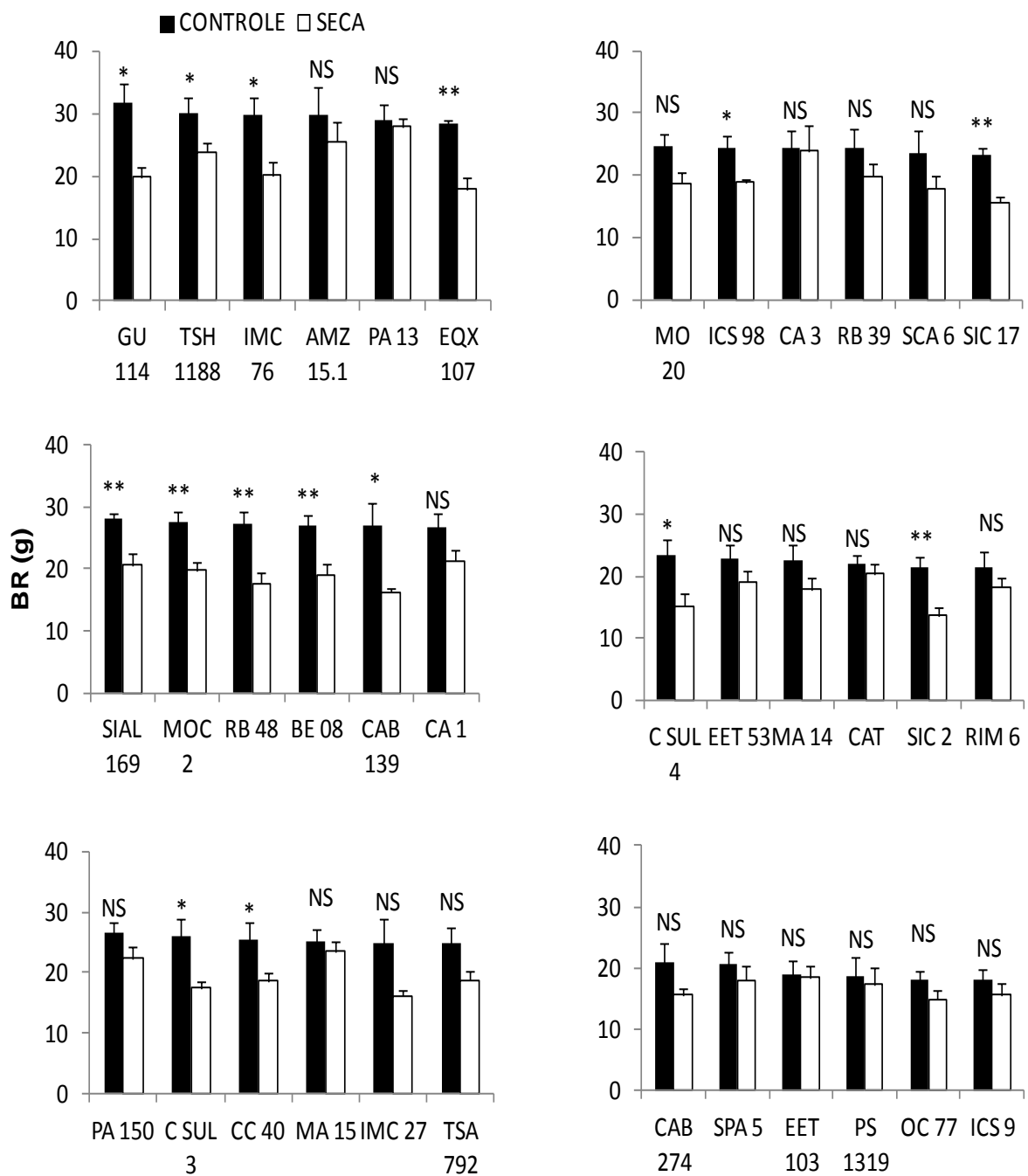


Figura 8- Biomassa seca da raiz (BR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e n = 6.

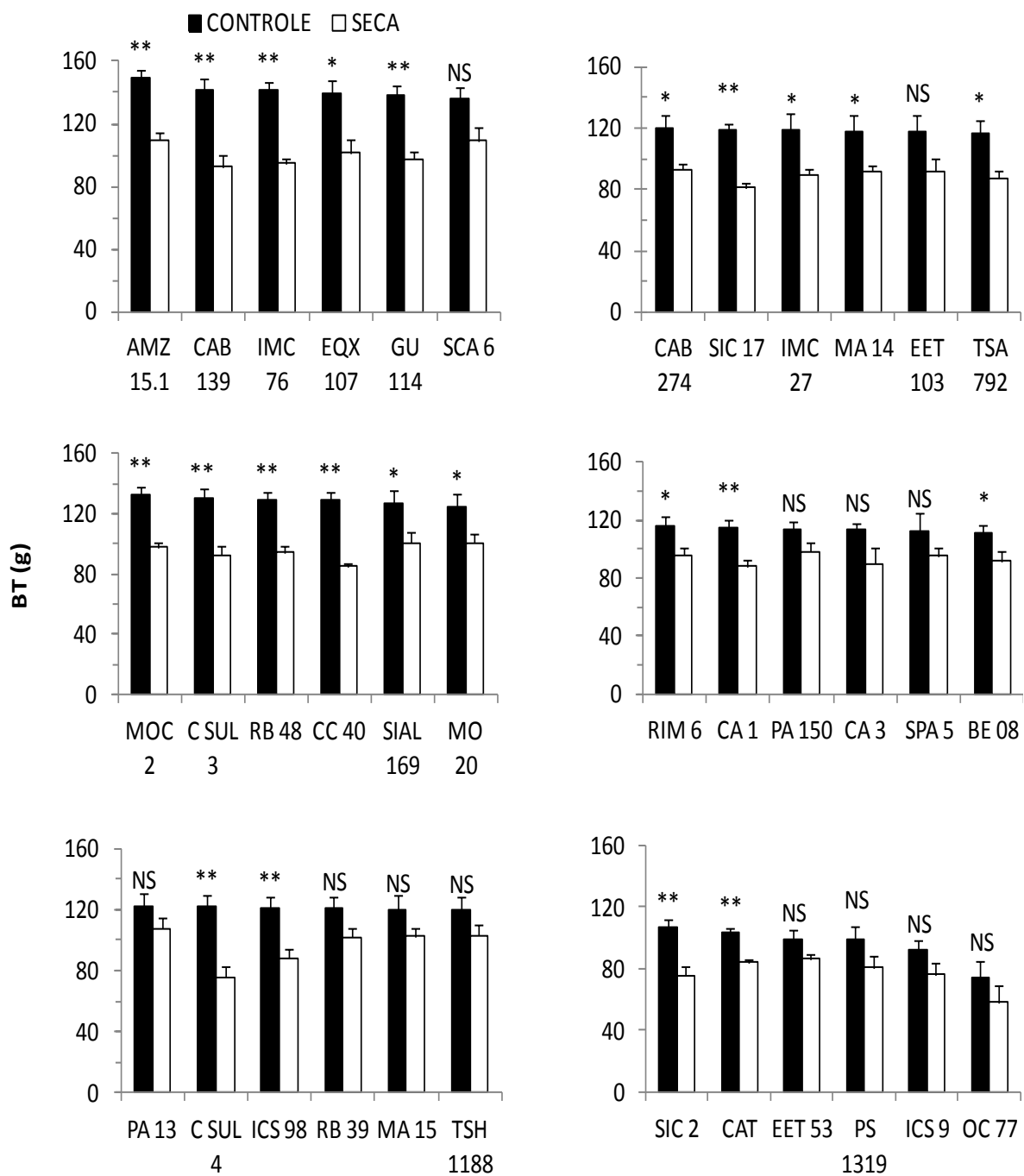


Figura 9- Biomassa seca total (BT) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

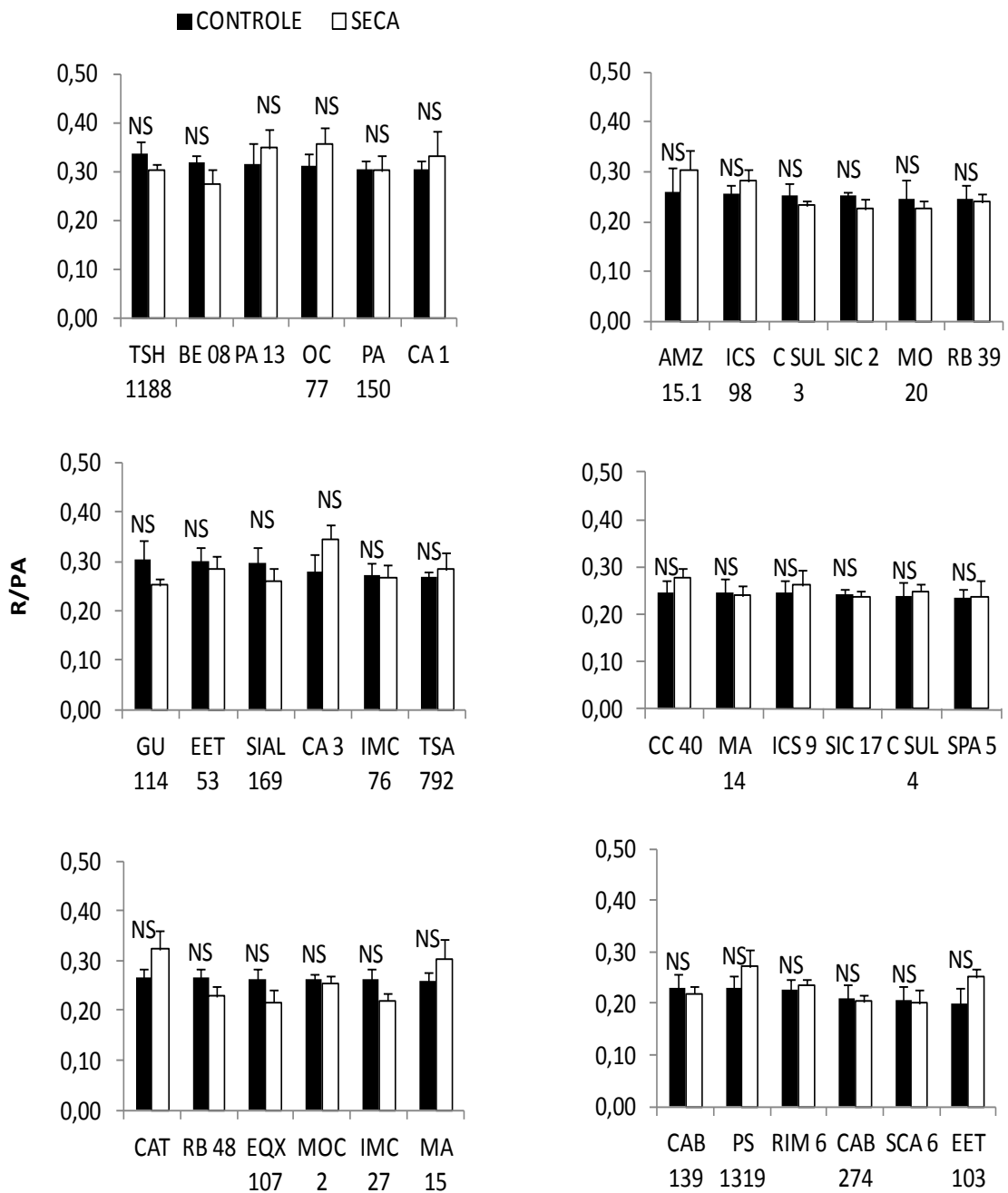


Figura 10- Razão raiz/parte aérea (R/PA) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

Houve reduções significativas ($P < 0,05$) da área foliar por planta (AFP), da área foliar individual (AFI) e do número de folhas por planta (NF) para a maioria dos genótipos de cacau avaliados, exceto para os genótipos AMZ-15.1, EET-103, EET-53, EQX-107, MA-14, MA-15, RB-39, SIAL-169 e SPA-5, que não apresentaram alterações significativas dessas variáveis.

Verificou-se reduções significativas ($P < 0,05$) para AFP em 58% dos genótipos avaliados, em comparação com seus respectivos controles. Os genótipos C. SUL-4, ICS-98, IMC-76 e SIC-2 apresentaram decréscimos de 43, 37,36 e 36%, respectivamente (Figura 11). Em relação à área foliar individual (AFI), representada pela razão AFP/NF, somente os genótipos C. SUL-4, CC-40 e CAB-274, apresentaram reduções significativas ($P < 0,05$), correspondentes a 13, 10 e 8%, respectivamente, em comparação aos seus respectivos controles (Figura 12). Em contrapartida, para os genótipos CA-3 e RIM-6, houve um incremento de 19% de AFI, em relação ao controle.

Em condições de deficiência hídrica, observam-se reduções nas taxas de expansão de área foliar e na área foliar total em plantas de cacau (JOLY; DAHN, 1989), consideradas uma das primeiras respostas da planta, devido à redução na turgescência celular e na taxa fotossintética líquida (RUCKER et al., 1995; TAIZ; ZEIGER, 2009). Marron et al. (2003), avaliando dois clones do gênero *Populus*, observaram durante três ciclos de desidratação e reidratação do solo, com duração de 10 dias cada, que os clones sofreram reduções na AFP, NF e AFI, apresentando-se mais severas para o clone considerado sensível à seca. Esses autores sugeriram que as alterações em AFP podem ser explicadas por diferenças no número de folhas e pela maior expansão de AFI.

Reduções significativas ($P < 0,05$) no NF foram observadas para 58% dos genótipos avaliados, principalmente para os genótipos SCA-6, IMC-76, SIC-17, PS-1319 e CSUL-4, cujos decréscimos foram de 42, 41, 39, 38 e 36%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 13). Normalmente, há ocorrência de abscisão foliar, em condições de deficiência hídrica severa, como forma de redução nos gastos energéticos, pois, nessas condições, o sistema radicular passa a ser um dos drenos metabólicos preferenciais para os fotoassimilados, para favorecer o crescimento das raízes em detrimento da parte aérea, em busca de água em regiões mais profundas no solo (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Para massa foliar específica (MFE), que representa a razão entre a biomassa seca foliar (BF) e área foliar por planta (AFI) $[BF/AFI]$, e estima a proporção de biomassa foliar em relação à superfície assimilatória, não foram observadas reduções intergenotípicas significativas ($P < 0,05$) (Figura 14). Nash; Graves (1993), em estudo com espécies arbóreas, observaram aumento da MFE quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica no solo. Segundo estes autores, tal mecanismo pode ser uma forma de tolerância ao estresse hídrico, além de sugerirem que o aumento da espessura da folha pode reduzir as perdas de água por unidade de massa foliar. Tais resultados corroboram com o encontrado no presente estudo, onde se observou uma tendência de aumento nos valores de MFE para os genótipos que se mostraram mais tolerantes às condições de deficiência hídrica no solo.

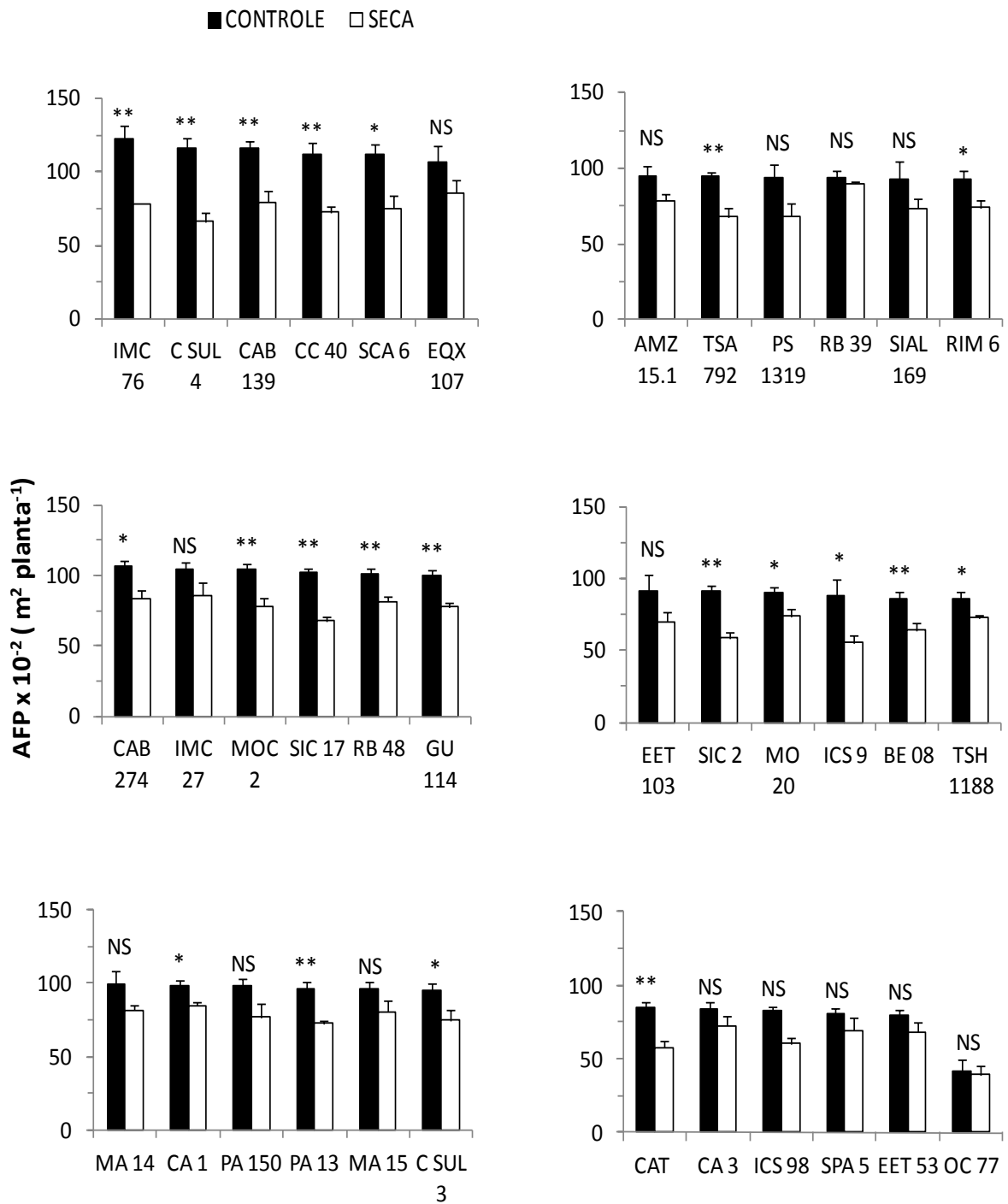


Figura 11- Área foliar por planta (AFP) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

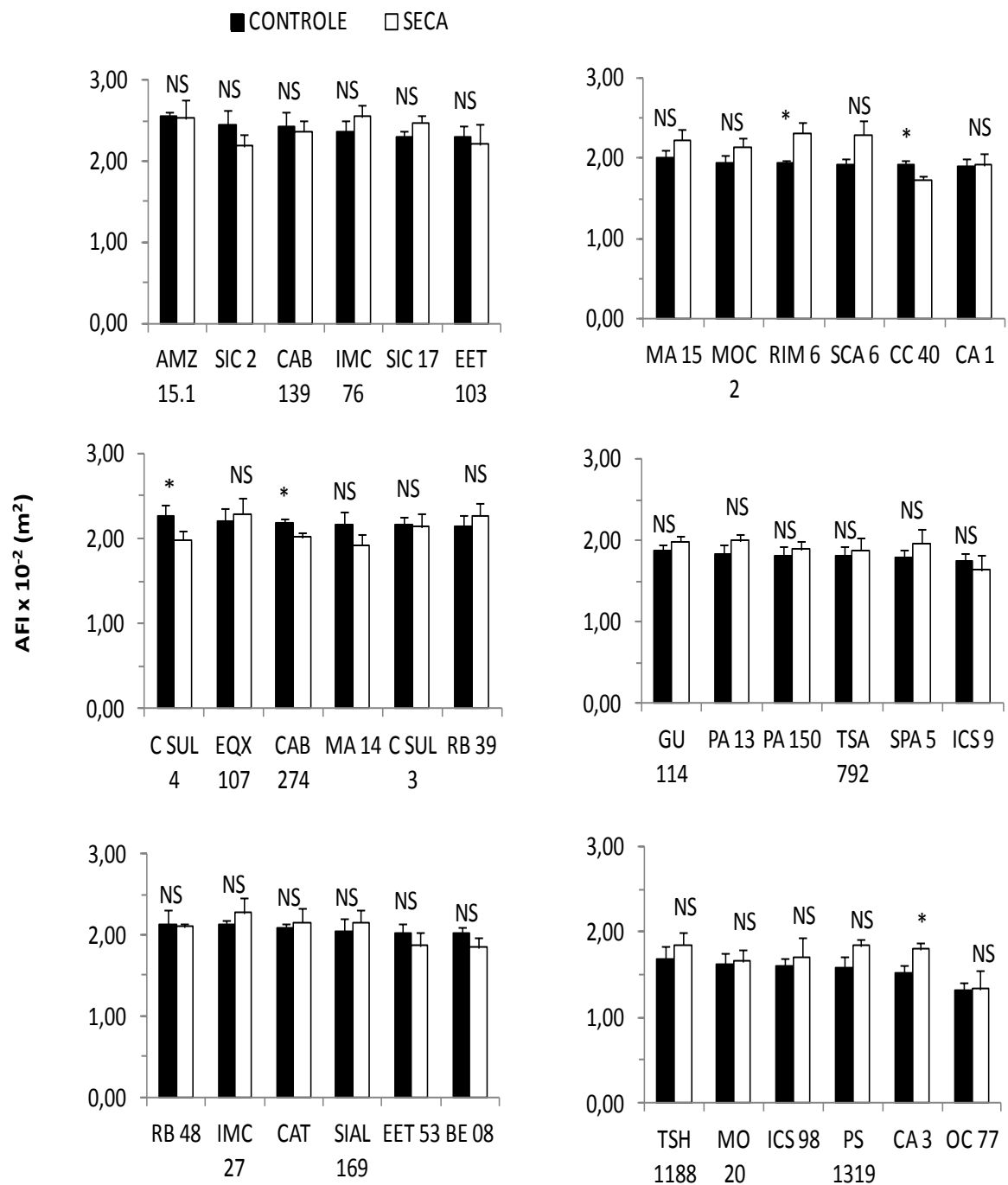


Figura 12- Área foliar individual (AFI) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

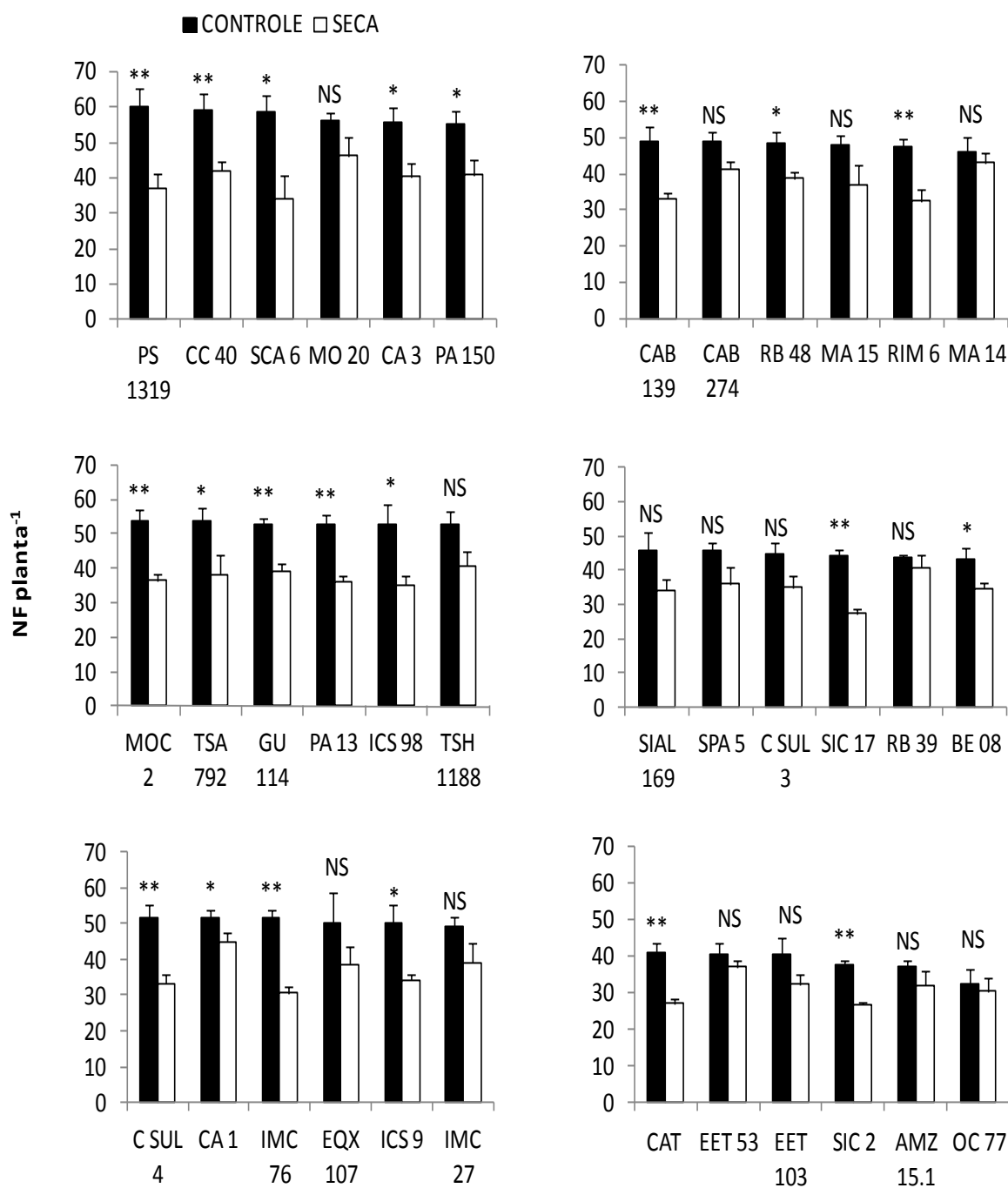


Figura 13- Número de folhas por planta (NF) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

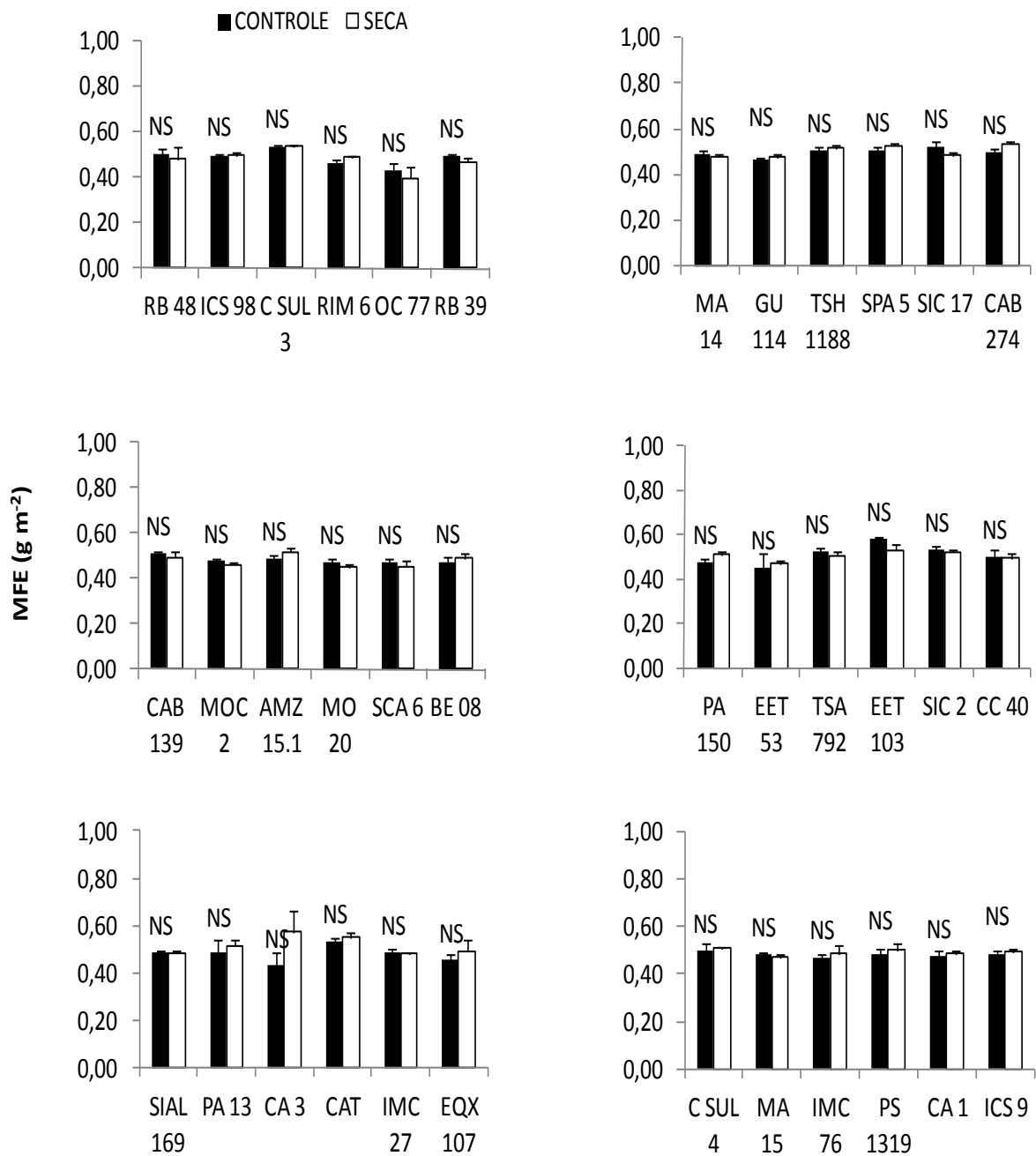


Figura 14– Massa foliar específica (MFE) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

Houve reduções significativas ($P < 0,05$) na altura das plantas (ALT) somente para os genótipos C. SUL-4, AMZ-15.1, SIC-2, PA-13 e CA-3. (Figura15). Este resultado foi consistente com o encontrado em estudos anteriores realizados com espécies de *Populus* (REGIER et al., 2009; XIAO et al., 2008) e de *Quercus* (AREND et al., 2011) submetidas a deficiência hídrica no solo. As condições de deficiência hídrica contribuem significativamente para a inibição no crescimento de plantas, causada, dentre outros fatores, pela redução na fotossíntese (JOLLY et al., 2005).

Para os valores da razão de área foliar (RAF), que é a razão AFP/BT e representa a área foliar disponível para a fotossíntese (MAGALHÃES, 1979), não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos de deficiência hídrica e o controle para os genótipos avaliados (Figura 16) e observou-se tendência de aumento para os genótipos mais tolerantes. Corroborando com estudo realizado por Bargali; Tewari (2004) que verificaram aumento desta razão ao longo do período de seca em genótipos de *Coriaria nepalensis* tolerantes à deficiência hídrica no solo.

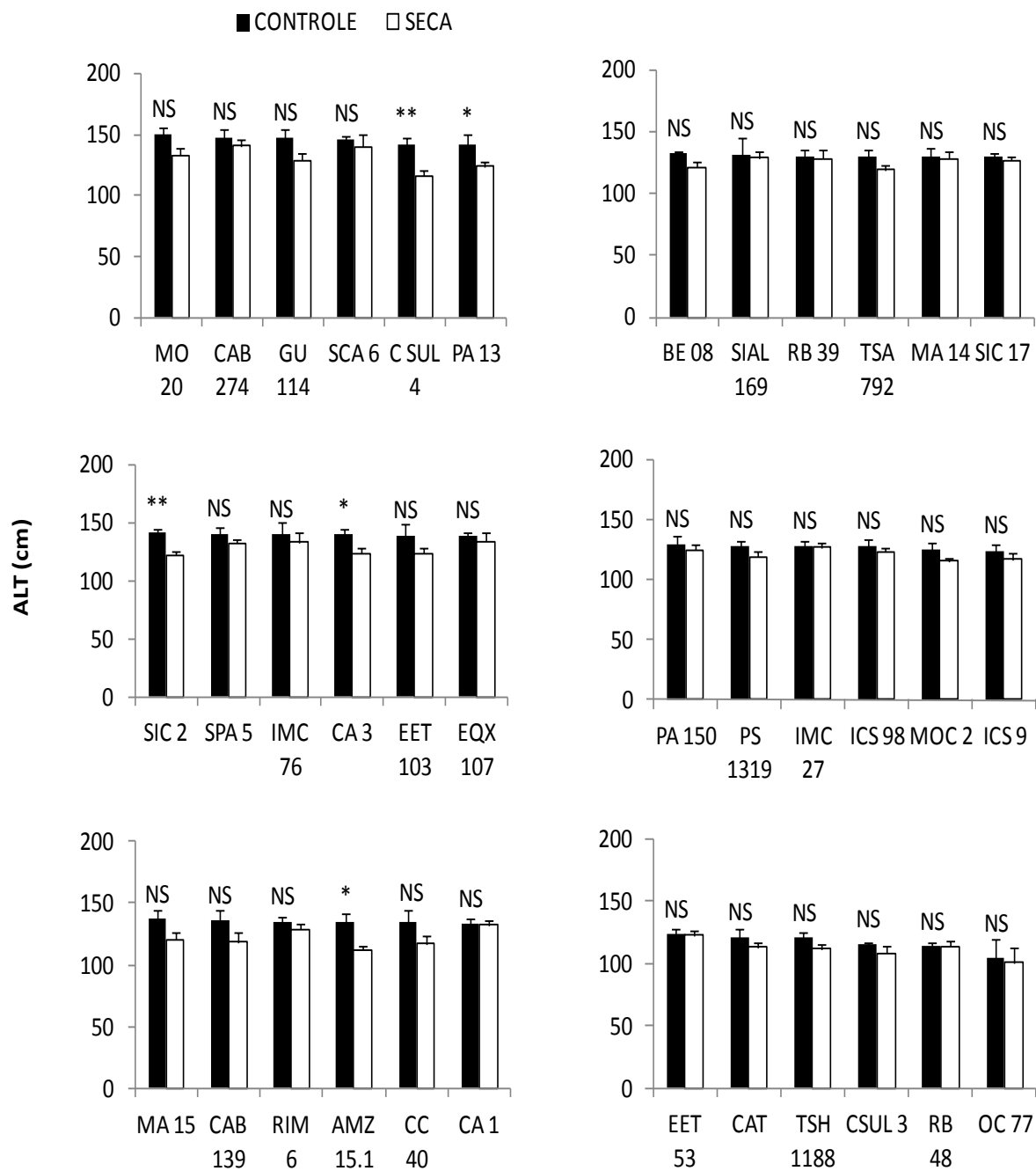


Figura 15- Altura da planta (ALT) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

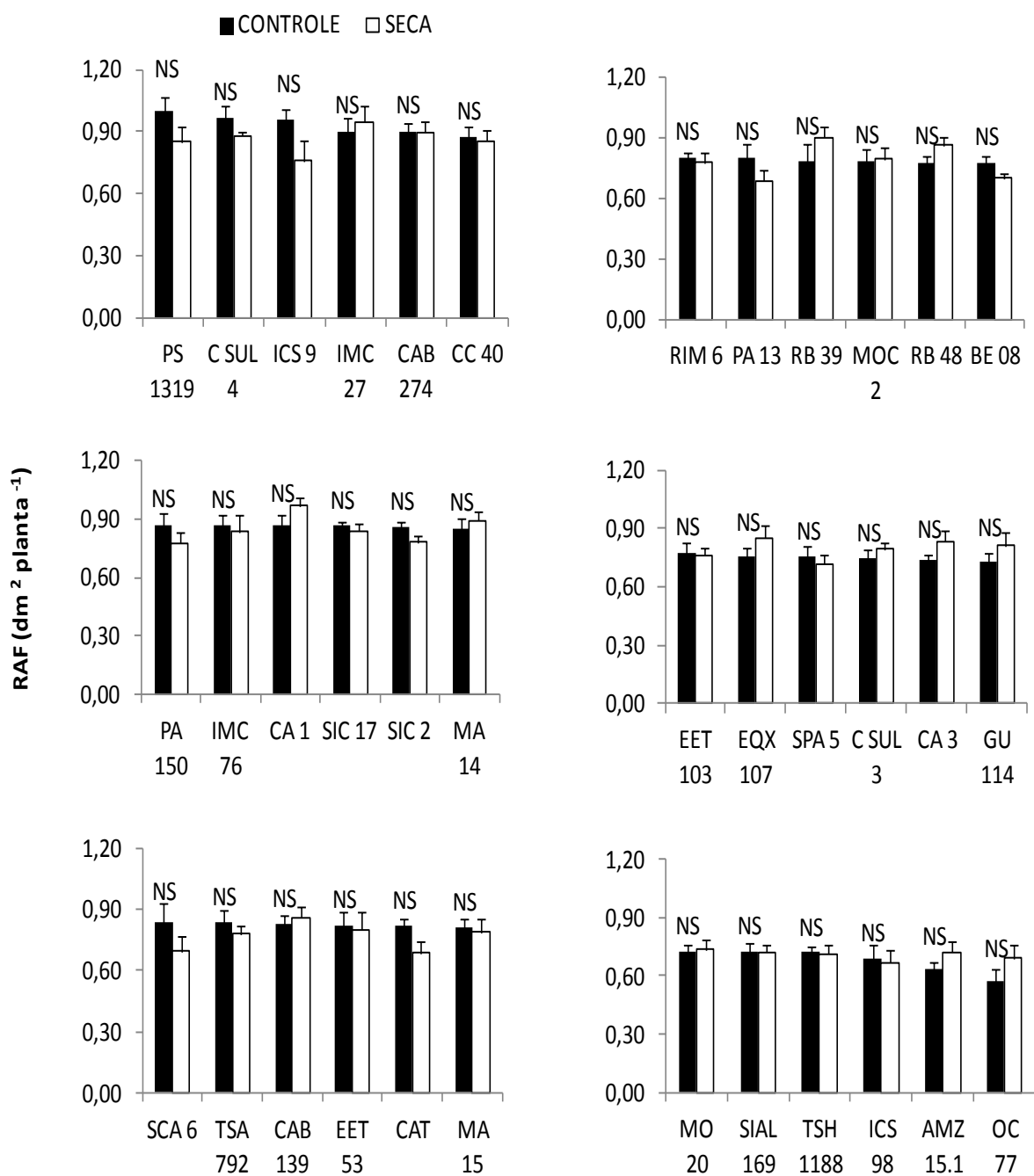


Figura 16- Razão de área foliar (RAF) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

A taxa assimilatória líquida (TAL), que reflete a fotossíntese líquida (RADFORD, 1967), apresentou reduções significativas ($P < 0,01$), principalmente para os genótipos C. SUL-4, IMC-76, OC-77 e CC-40, que corresponderam a 55, 54, 53 e 47%, respectivamente. Por outro lado, dentre os demais genótipos, especialmente ICS-9, PA-13, PA-150 e MA-15, não foram constatadas alterações significativas de TAL (Figura 17). Isto, por sua vez, pode ter sido um dos fatores que contribuíram para manutenção do crescimento em altura e da biomassa destes genótipos. Em estudos com três espécies arbóreas, Landhüsser et al. (1996) verificaram que as plantas responderam diferentemente à baixa disponibilidade de água no solo, enquanto a espécie *Betula papyrifera* manteve baixos valores de TAL, *Populus balsamifera* apresentou maior TAL, consistentes com a distribuição geográfica destas espécies.

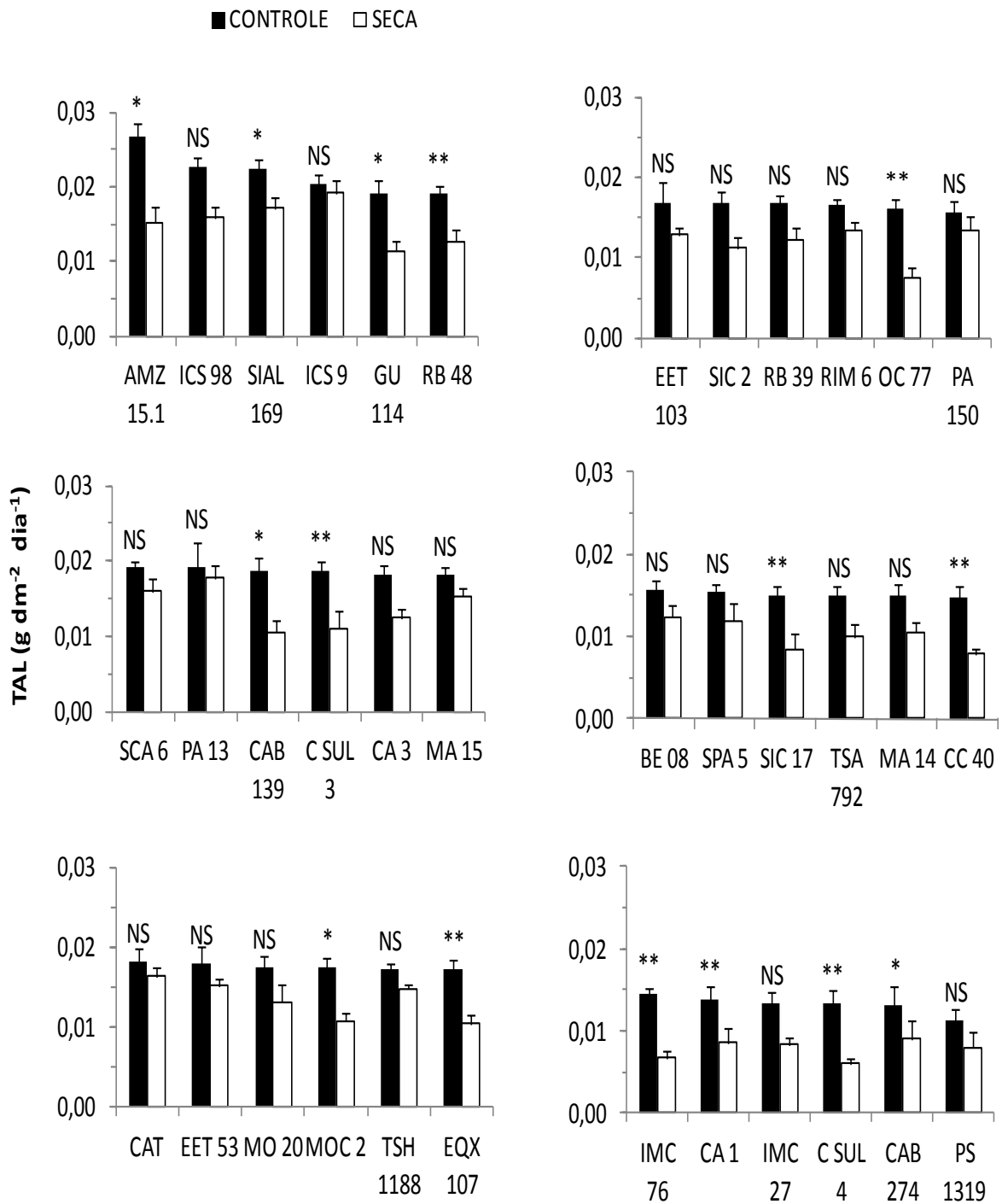


Figura 17- Taxa assimilatória líquida (TAL) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

A taxa de crescimento relativo (TCR), que representa o incremento de biomassa seca em relação à biomassa seca pré-existente, decresceu em 42 % dos genótipos avaliados, principalmente para C. SUL-4, IMC-76 e CC-40, que apresentaram as maiores reduções significativas ($P < 0,01$) em relação ao controle, cujos valores foram de 57, 56 e 46%, respectivamente. Contudo, especialmente para os genótipos PA-13, EET-53 e MA-15, essas reduções não foram significativas (Figura 18). Bargali; Tewari (2004) verificaram, após 28 dias de seca, que mudas de *Coriaria nepalensis* apresentaram redução de 28% na TCR em relação ao controle. RASCHER et al. (2004), em estudo realizado com espécies arbóreas, observaram que TCR é afetada em condições de deficiência hídrica no solo, juntamente com a AFP. Entretanto, segundo estes autores, as diferentes espécies estudadas responderam diferentemente a restrição hídrica imposta, sugerindo que as respostas à deficiência hídrica são complexas e heterogêneas.

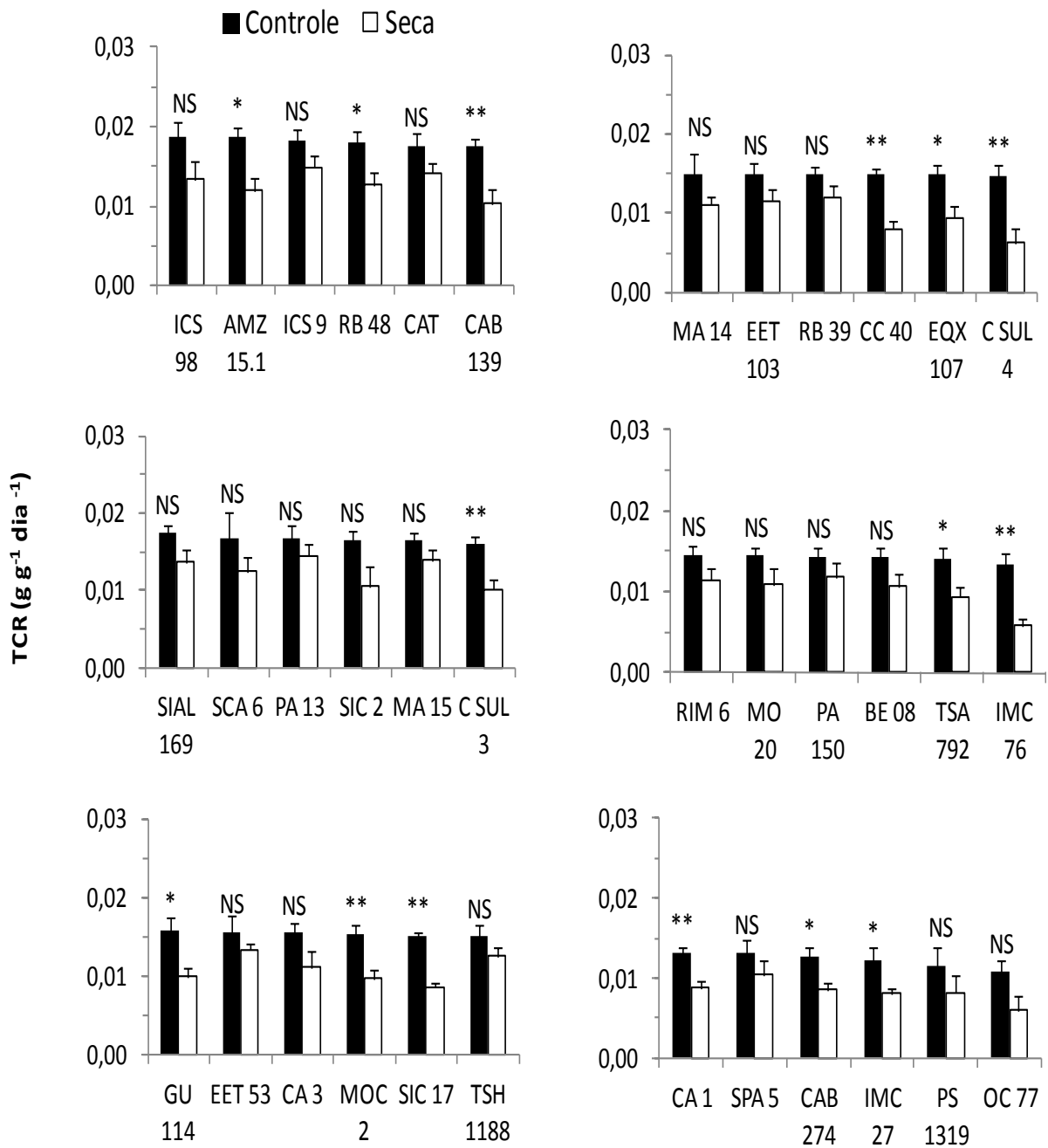


Figura 18- Taxa de crescimento relativo (TCR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

De modo geral, para as variáveis de diâmetro do coleto (DC), volume (VR) e área radicular (AR), os genótipos de cacau apresentaram reduções significativas ($P < 0,05$), exceto os genótipos CAT, EET-103, ICS-9, MA-15, MO-20, OC-77, e PS-1319 (Figuras 19, 20 e 21). Houve redução significativa ($P < 0,05$) de DC para 55% dos genótipos avaliados, principalmente para EQX-107, MOC-2 e CSUL-4, que apresentaram decréscimos de 24, 20 e 18%, respectivamente, em relação aos seus respectivos controles (Figura 19). Para VR, houve redução em 75% dos genótipos submetidos à seca, principalmente os genótipos RB-48, C. SUL-3, GU-114, MOC-2, IMC-76, EQX-107, SIC-2, C. SUL-4 e CC-40, que apresentaram decréscimos de 56, 54, 51, 51, 49, 46, 46, 46 e 37%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 20). Entretanto, para AR, esta redução ocorreu em 81% dos genótipos estudados, cujos decréscimos mais acentuados foram encontrados para os genótipos SIC-17, IMC-76, EQX-107, SIAL-169, RB-48, AMZ-15.1, C. SUL-3 e CC-40 que corresponderam a 68, 66, 66, 63%, 59, 57, 53 e 34% respectivamente em relação ao controle (Figuras 21, 22A-L, 23A-L, 24 A-L, 25A-L, 26A-L, 27A-L).

Em diferentes espécies híbridas de *Populus*, observaram-se reduções significativas de DC quando as plantas foram submetidas a diferentes regimes hídricos, e os híbridos, considerados mais tolerantes à deficiência hídrica, mantiveram essa variável com valores semelhantes ao controle (GUO et al., 2010). O mesmo fato foi observado nas espécies *Quercus robur*, *Q. petraea* e *Q. pubescens* oriundas de três regiões distintas e submetidas a diferentes regimes hídricos no solo, conforme AREND et al. (2011). Além disso, estes autores também observaram reduções na parte aérea e no comprimento de raízes, entre as diferentes procedências e espécies; entretanto, as respostas das plantas foram muito variáveis entre as procedências, sugerindo que fatores genéticos possam interferir na tolerância à deficiências hídrica.

No presente estudo, os genótipos que apresentaram reduções acentuadas de VR e AR também tiveram diminuição de BPA, sugerindo que plantas sensíveis à deficiência hídrica apresentam reduções tanto no sistema radicular como na parte aérea. Além disso, a limitação do sistema radicular desses genótipos pode ter influenciado a absorção de água e nutrientes e na manutenção do *status* hídrico dessas plantas. Dessa forma, infere-se que os genótipos de cacau tolerantes à deficiência hídrica no solo apresentam sistema radicular mais robusto; ao passo que

os menos tolerantes não conseguem manter o crescimento do sistema radicular durante o período de estresse. Silva; Kummerow (1998) verificaram que plantas de *T. cacao*, em condições de campo, apresentaram grande número de raízes finas (diâmetro < 1 mm), que se renovavam rapidamente entre um e dez dias, e eram dependentes da frequência de chuvas para crescer. A dinâmica de crescimento e a renovação de raízes, dentre outros fatores, pode interferir no crescimento das plantas (ZOBEL et al., 2007, MUÑOZ; BEER, 2001). No presente estudo, pôde-se constatar que os genótipos de cacau tolerantes à seca mantiveram o crescimento radicular semelhante ao do controle, e apresentaram maior quantidade de raízes finas. Em contrapartida, nos genótipos que apresentaram reduções significativas das variáveis de crescimento, a proporção de raízes finas mostrou reduções em relação ao controle (Figuras 22A-L, 23A-L, 24 A-L, 25A-L, 26A-I, 27A- L).

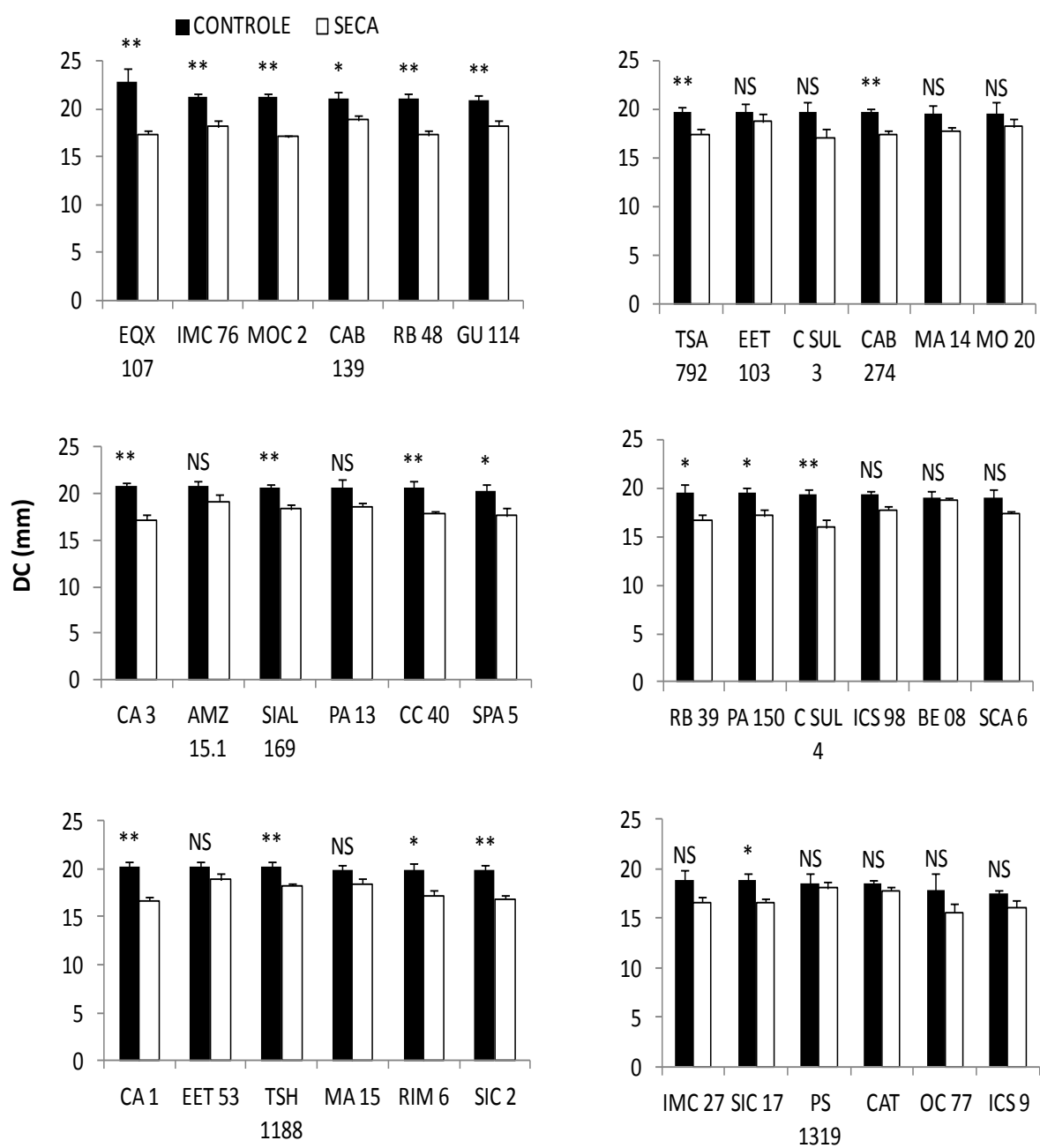


Figura 19- Diâmetro do coleto (DC) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e n = 6.

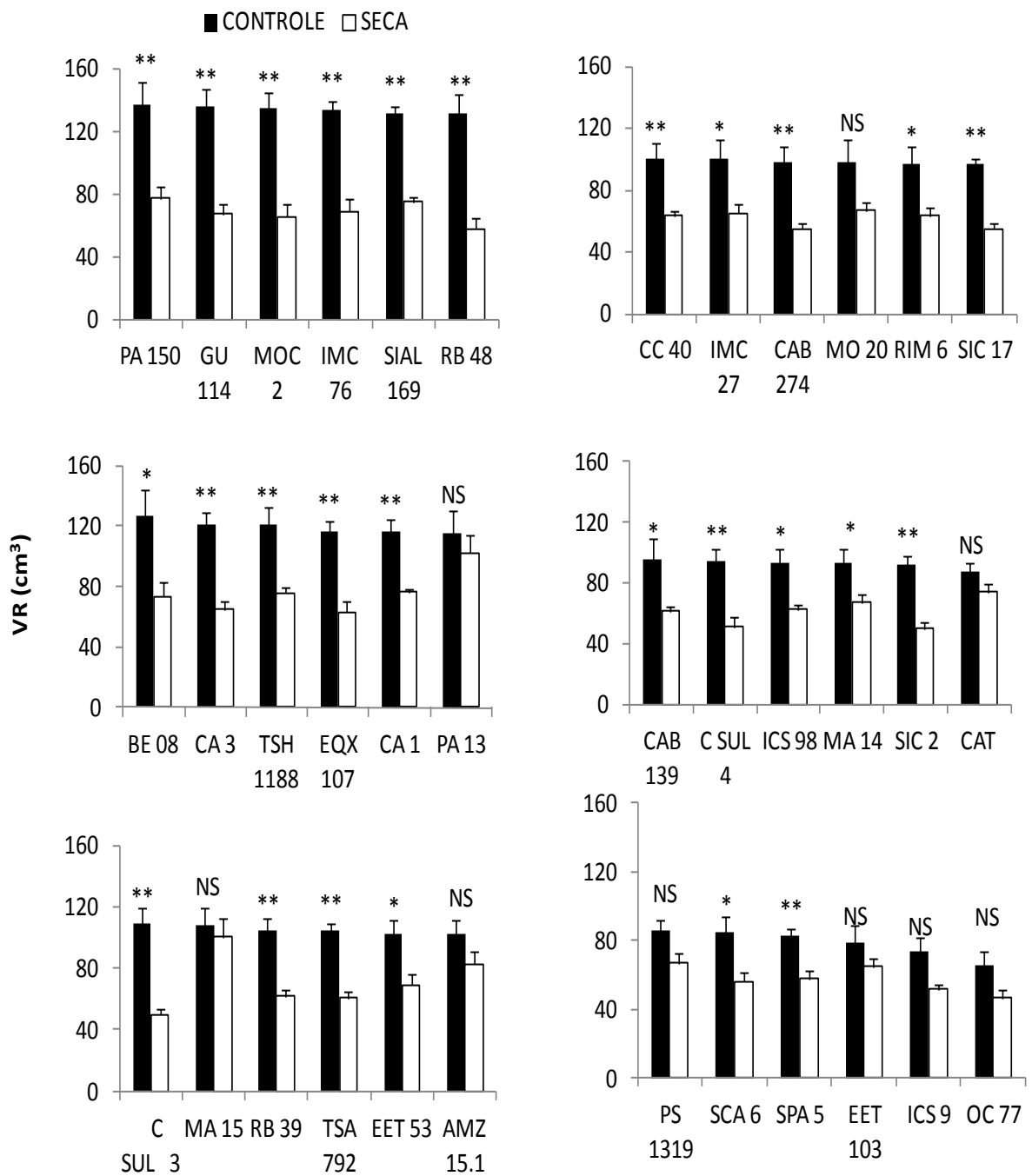


Figura 20- Volume radicular (VR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

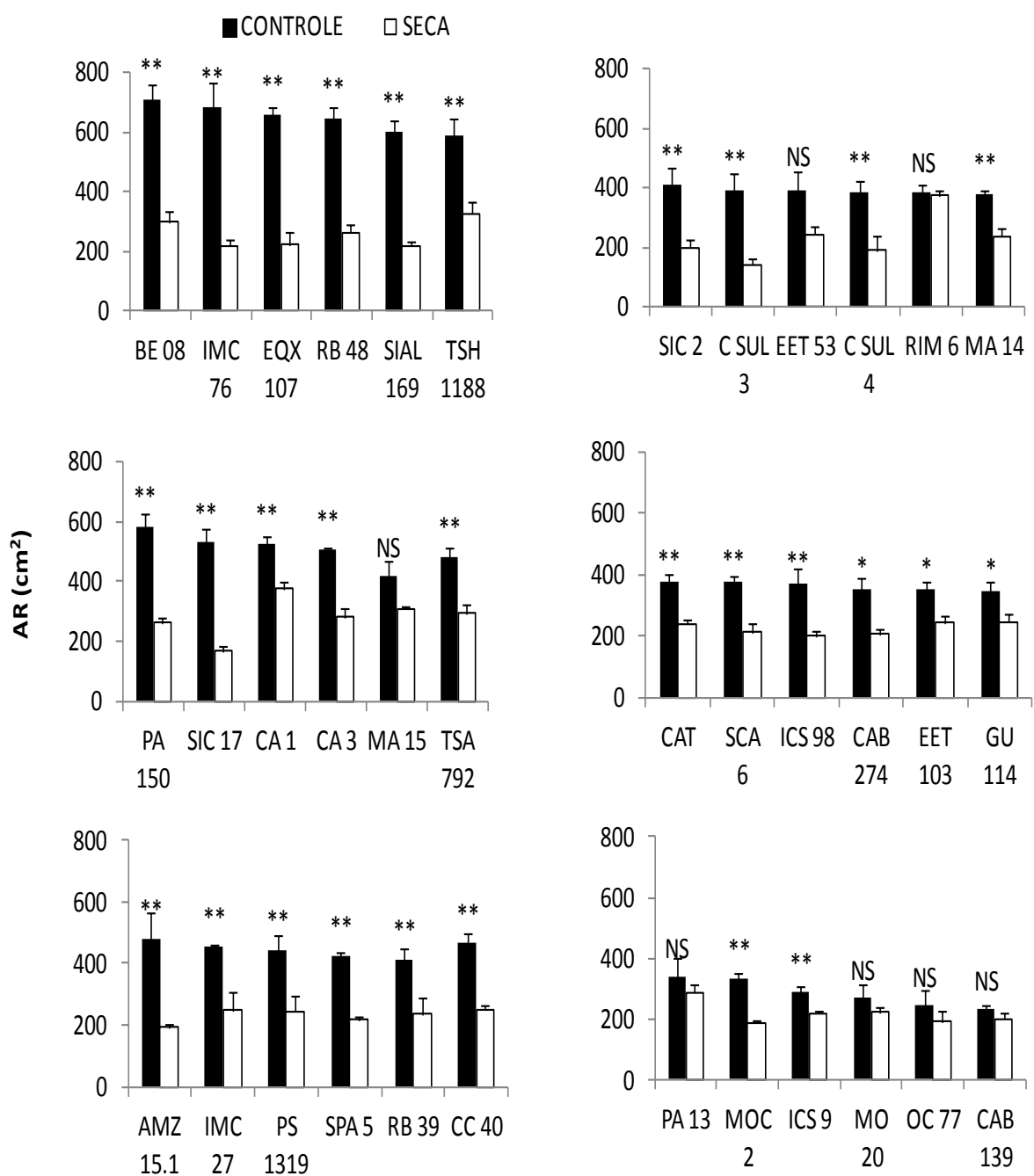


Figura 21- Área radicular (AR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

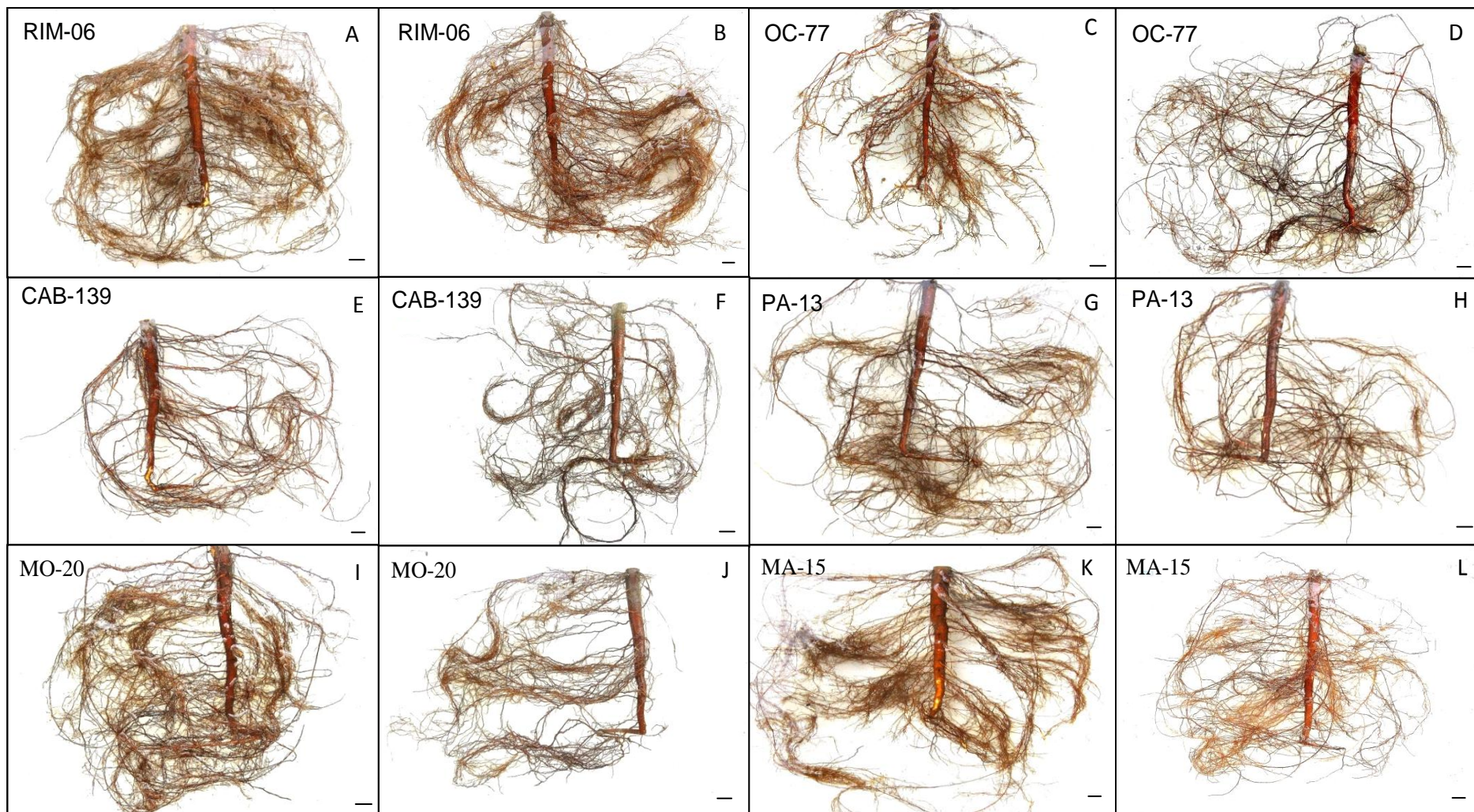


Figura 22 – Amostra das raízes fotografadas para mensuração da área radicular (AR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. Controle (A, C, E, G, I, K); Deficiência hídrica (B, D, F, H, J, L). Escala: - 2 cm.

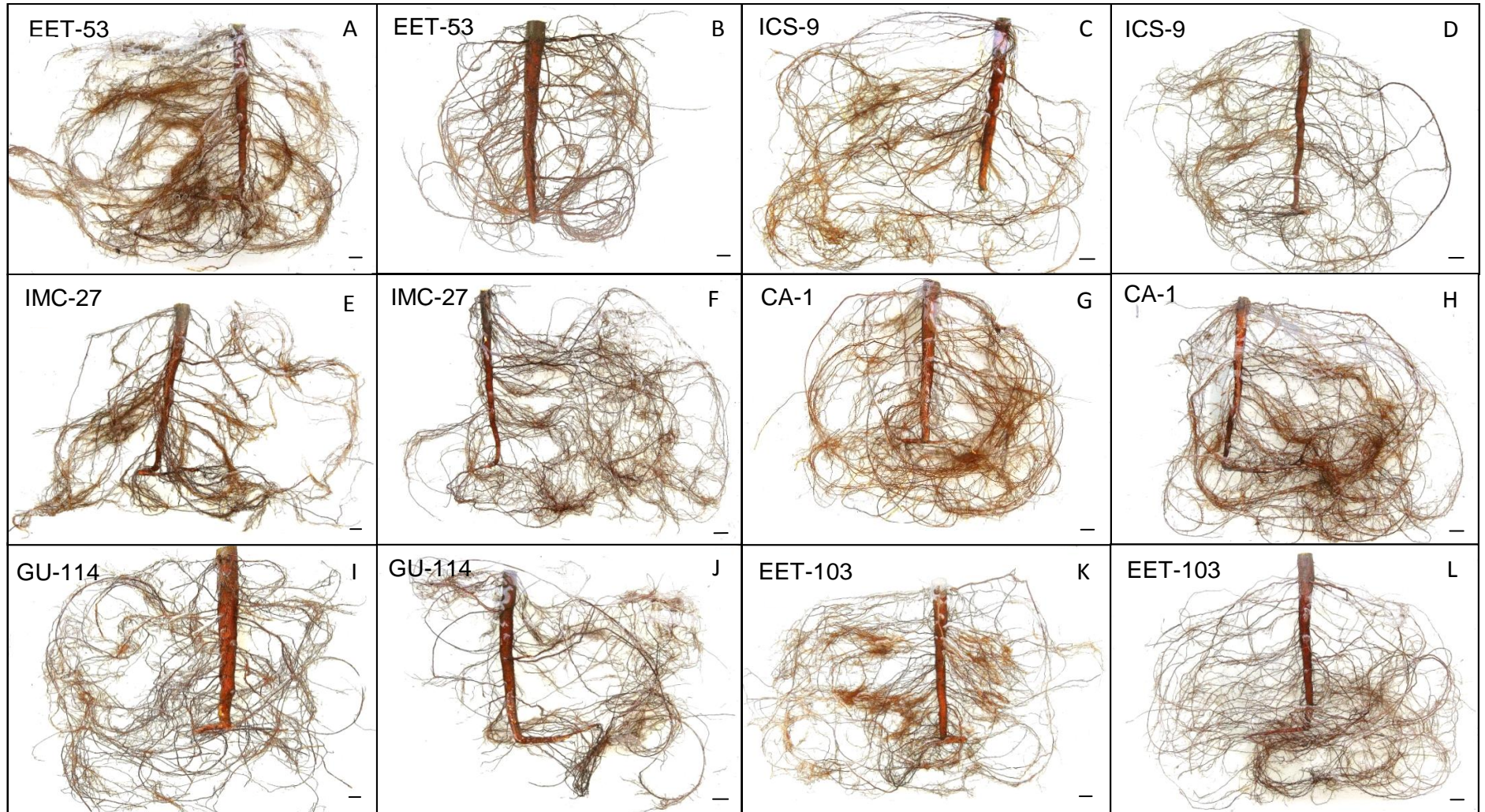


Figura 23 – Amostra das raízes fotografadas para mensuração da área radicular (AR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. Controle (A, C, E, G, I, K); Deficiência hídrica (B, D, F, H, J, L). Escala: - 2 cm.

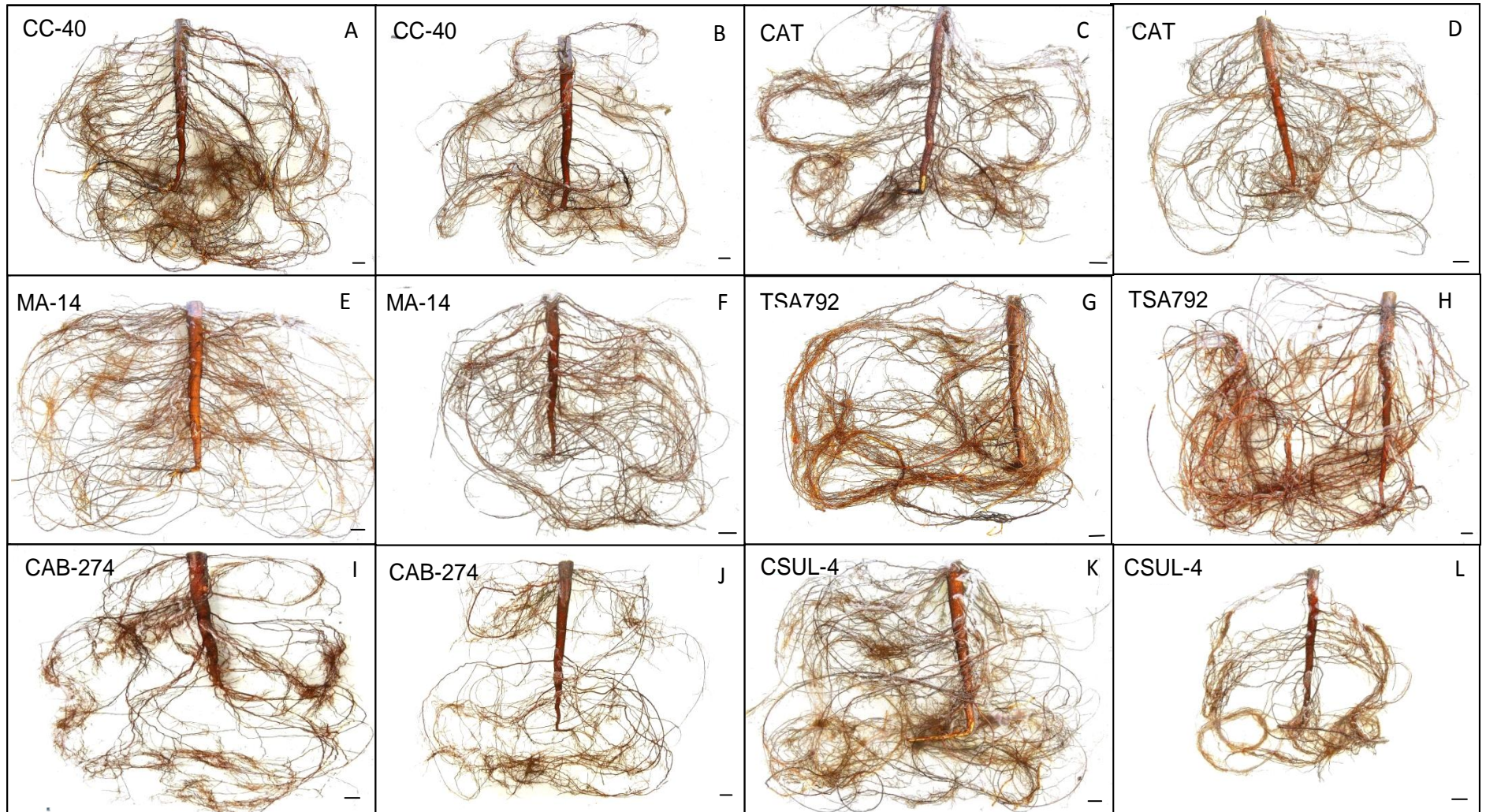


Figura 24 – Amostra das raízes fotografadas para mensuração da área radicular (AR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. Controle (A, C, E, G, I, K); Deficiência hídrica (B, D, F, H, J, L). Escala: - 2 cm.

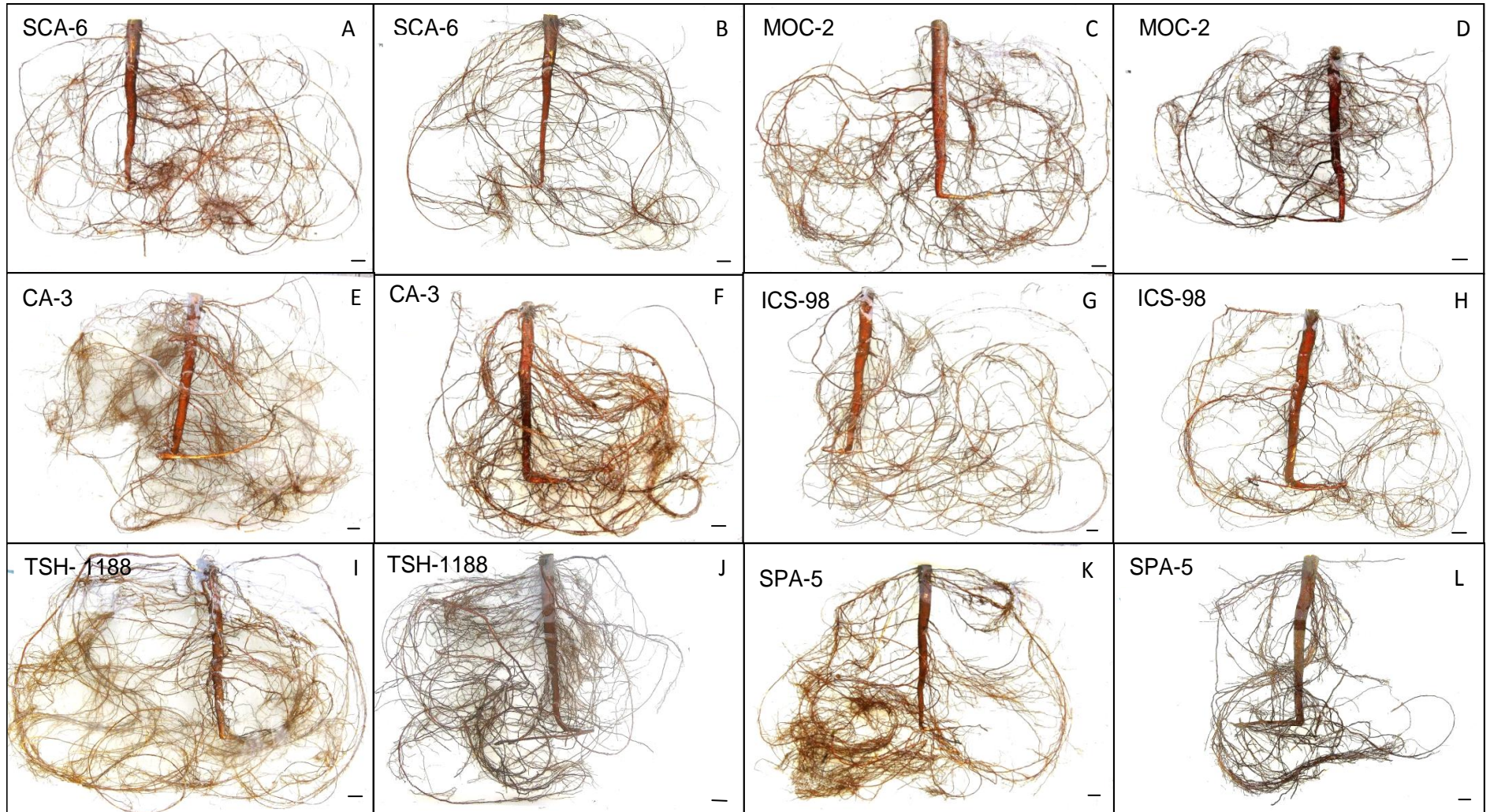


Figura 25 – Amostra das raízes fotografadas para mensuração da área radicular (AR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. Controle (A, C, E, G, I, K); Deficiência hídrica (B, D, F, H, J, L). Escala: - 2 cm.

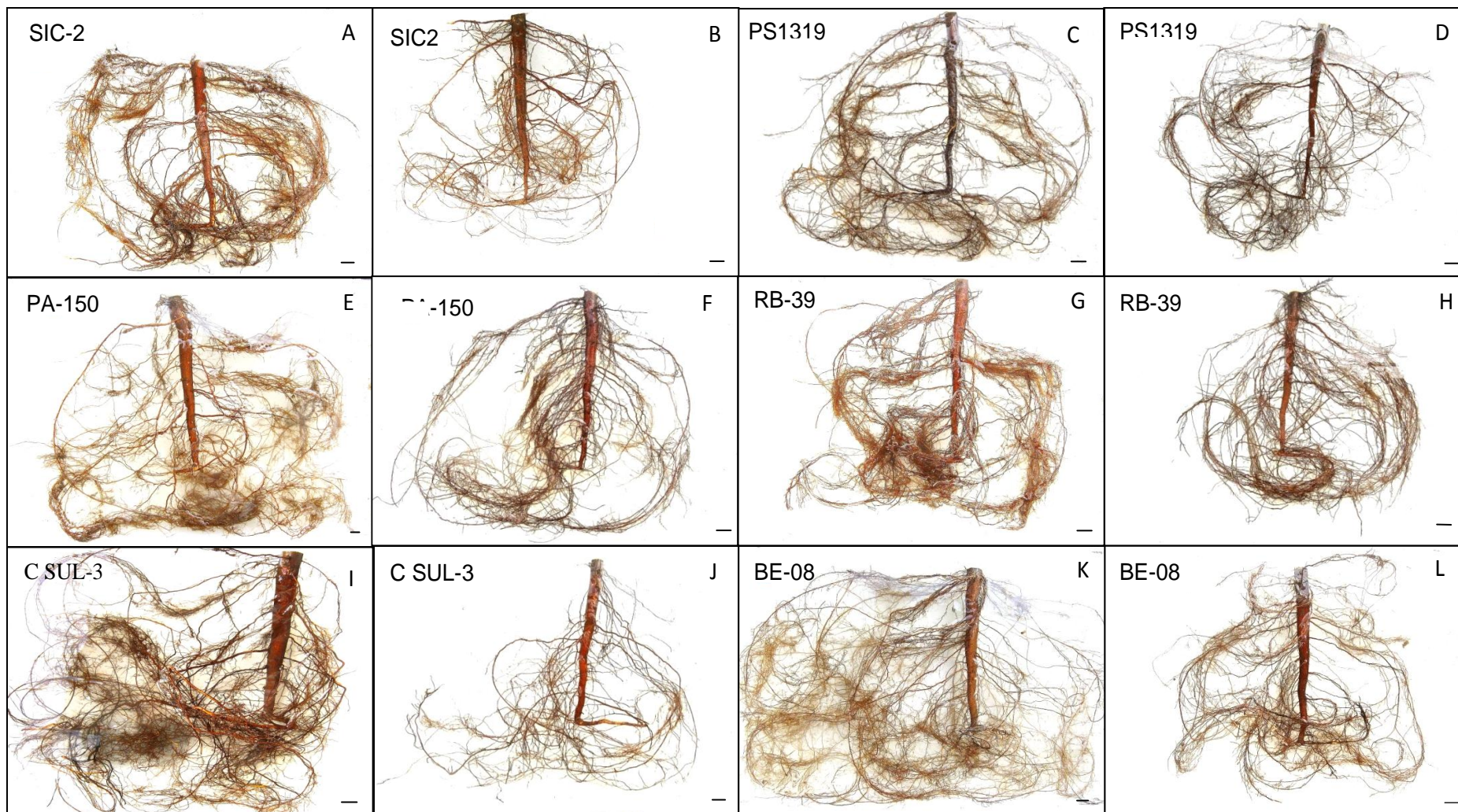


Figura 26 – Amostra das raízes fotografadas para mensuração da área radicular (AR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. Controle (A, C, E, G, I, K); Deficiência hídrica (B, D, F, H, J, L). Escala: - 2 cm.

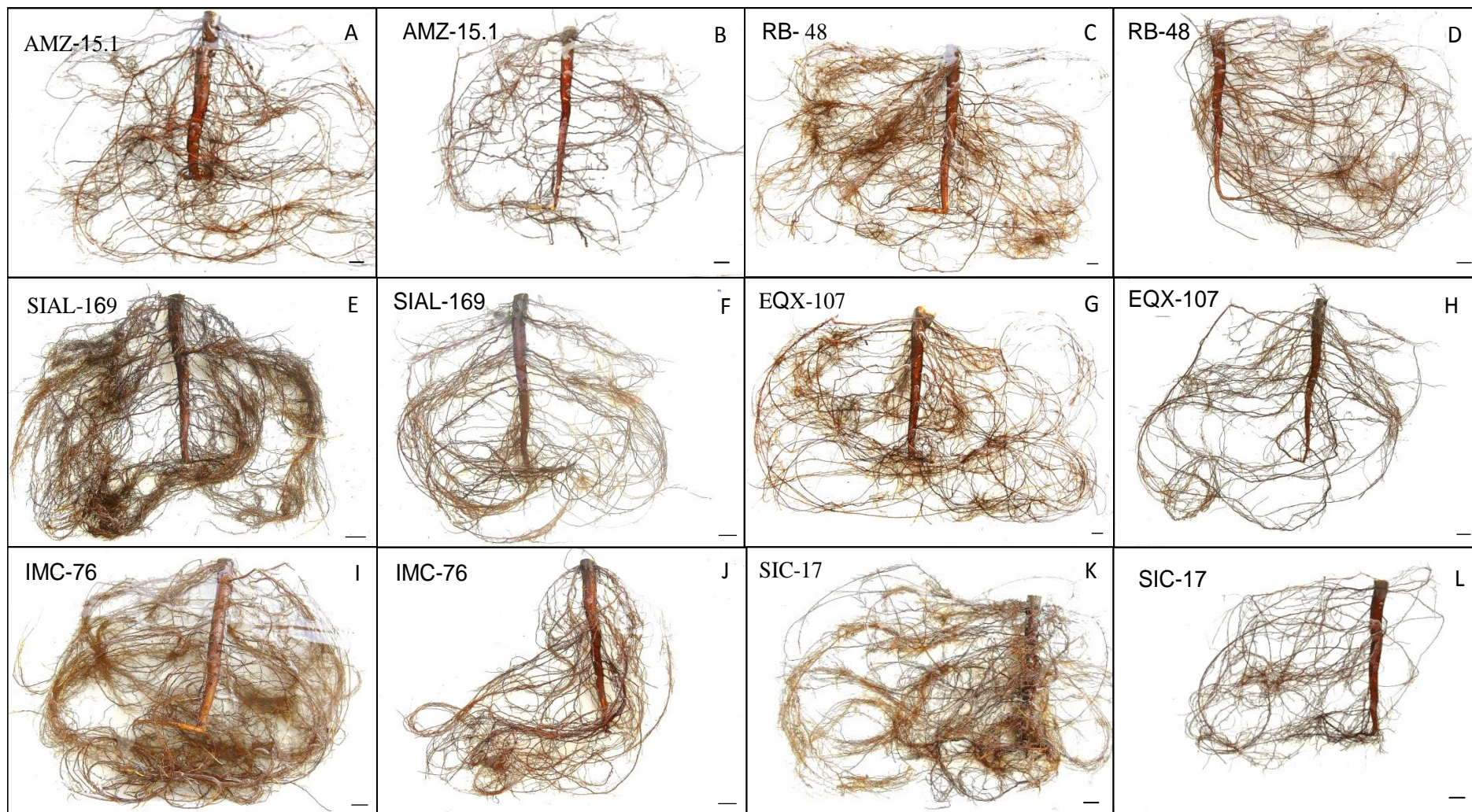


Figura 27 – Amostra das raízes fotografadas para mensuração da área radicular (AR) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. Controle (A, C, E, G, I, K); Deficiência hídrica (B, D, F, H, J, L). Escala: - 2 cm.

4.2. Conteúdo de macro e micronutrientes minerais

De um modo geral, houve reduções significativas ($P < 0,01$) do conteúdo de macronutrientes minerais em nível foliar para maioria dos genótipos de cacau avaliados, quando submetidos à deficiência hídrica no solo, exceto para os genótipos EQX-107, GU-114, ICS-98, MA-14, MA-15, PA-13 e SIAL-169 (Figuras 28, 29, 30, 31 e 32). Observou-se o mesmo fato, em condições de deficiência hídrica no solo, para a espécie arbórea *Fagus sylvatica*, cujas reduções nas concentrações de macro e micro elementos minerais foram altamente significativas (PEUKE; RENNENBERG, 2011).

Os genótipos EET-103, CAB-139, C. SUL-4, SIC-17, IMC-76, SCA-6, CC-40, e TSA-792, quando submetidos à deficiência hídrica no solo, apresentaram reduções significativas ($P < 0,01$) no conteúdo de N foliar, em relação ao controle, correspondentes a 49, 41, 40, 33, 32, 32, 27 e 26%, respectivamente; ao passo que os genótipos CA-1, OC-77, PA-150, C.SUL-3 e TSH-1188 apresentaram uma tendência de aumento no conteúdo desse macronutriente embora não foi significativo (Figura 28). Sánchez-Rodríguez et al. (2010) e Hu; Schmidhalter (1998) em estudos com *Solanum lycopersicum* e *Triticum aestivum*, respectivamente, também verificaram diminuição nas concentrações de N, quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica no solo.

O N, principal constituinte dos compostos orgânicos, apresenta grande importância para o metabolismo, e faz parte da composição de aminoácidos, proteínas, poliaminas, metabólitos secundários e pigmentos fotossintéticos (MAATHUIS, 2009). A deficiência desse nutriente pode causar (i) clorose foliar, (ii) retardamento do crescimento vegetativo, (iii) senescência foliar precoce e (iv) problemas relacionados a características morfológicas, levando a redução na razão PA/R (MALAVOLTA, 1980), provavelmente devido à menor transpiração e transporte de N da raiz para parte aérea (ALAM, 1999). Normalmente, concentrações elevadas de $N-NO_3^-$ são depositadas no vacúolo, contribuindo significativamente para a manutenção da turgescência celular (MAATHUIS, 2009). No presente trabalho, alguns dos genótipos que se mostraram mais tolerantes à deficiência hídrica no solo apresentaram tendência de aumento no conteúdo foliar de N.

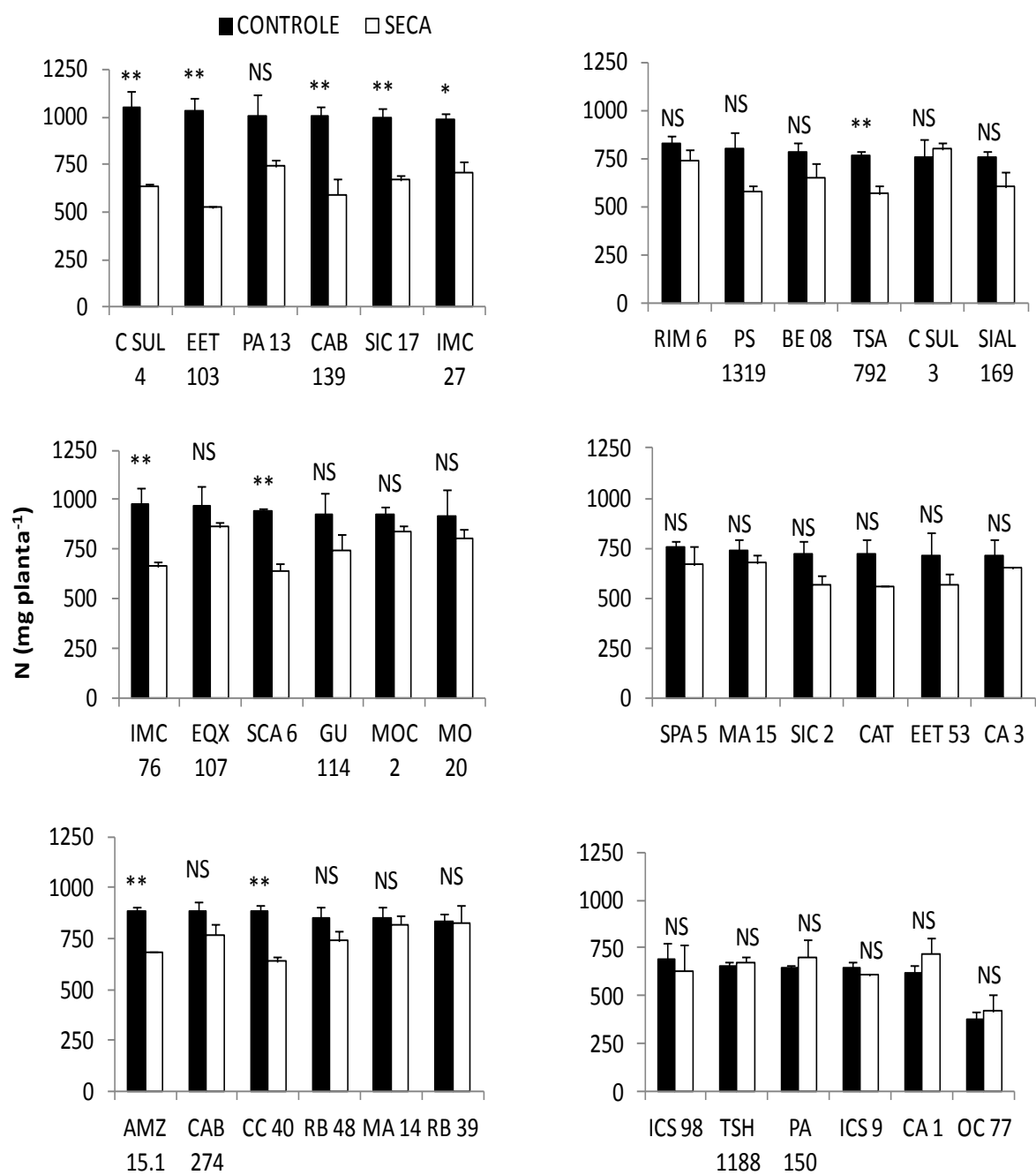


Figura 28- Conteúdo foliar de nitrogênio (N) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e n = 6.

Observou-se decréscimos significativos ($P < 0,05$) no conteúdo de P para os genótipos IMC-76, C. SUL-4, EET-53, SIC-17 e CAT submetidos à deficiência hídrica no solo, cujas reduções corresponderam a 38, 34, 30, 29 e 24%, respectivamente, em relação ao controle; exceto para o genótipo MOC-2, que apresentou um aumento de 84% no conteúdo foliar do referido macronutriente (Figura 29). O P, responsável pelo armazenamento e transferência de energia, compõe os ésteres de carboidratos, nucleotídeos e ácidos nucléicos, dentre outros, e sua deficiência causa mudanças no nível de expressão de genes e proteínas envolvidos na fotossíntese e na síntese de sacarose (BRÜCK et al., 2000). Em condições de deficiência hídrica as plantas podem apresentar alterações nas concentrações desse nutriente, com efeitos positivos no aumento da eficiência do uso da água e condutância estomática (BRÜCK et al., 2000). Além disso, sob deficiência hídrica, a ativação de vários fatores de transcrição e a regulação da expressão gênica dependem da fosforilação de proteínas, mediada pela ação de proteínas quinases (MAATHUIS, 2009).

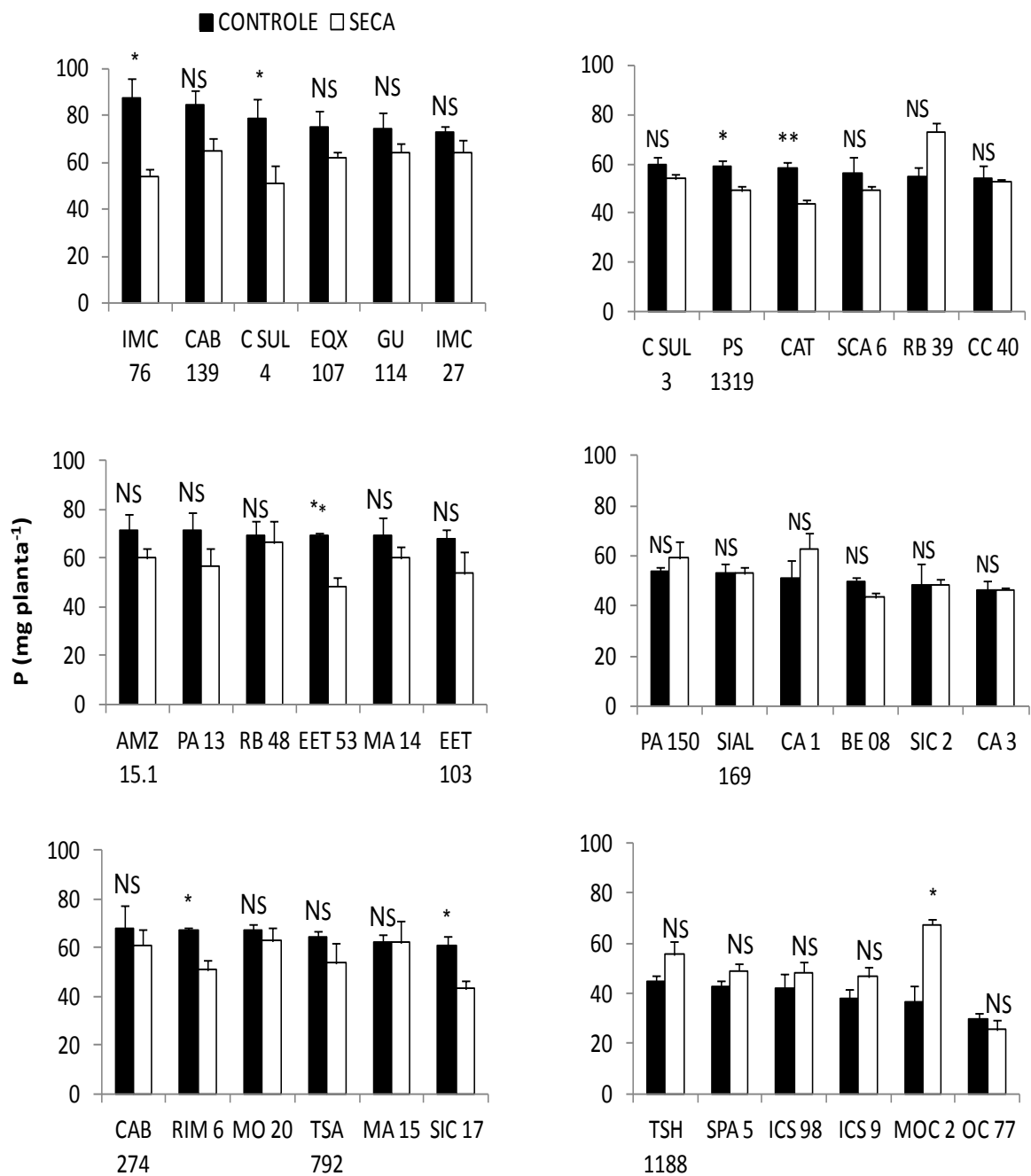


Figura 29- Conteúdo foliar de fósforo (P) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e n = 6.

Em relação ao conteúdo foliar de K, os maiores decréscimos significativos ($P < 0,01$) foram verificados para os genótipos SIC-17 e CC-40, com reduções de 51 e 38%, respectivamente, em comparação ao controle; ao passo que para o genótipo MOC-2 verificou-se aumento significativo ($P < 0,05$) de 15% em relação ao seu controle (Figura 30). O K, um macronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, representa cerca de 70% dos nutrientes na seiva do xilema de cacau (MARTINS, 1976). Além disso, este macro elemento desempenha um papel fundamental em vários processos metabólicos: (i) regulando o potencial osmótico, necessário à atividade enzimática e à síntese proteica e de carboidratos, (ii) auxiliando no processo de abertura e fechamento estomático e (iii) participando das relações hídricas e alongamento celular, cuja deficiência desse macronutriente retarda o crescimento vegetal, promove a clorose foliar, as manchas necróticas e o encurtamento de entrenós (MACROBBIE, 1998). Além do mais, em condições de seca, o aumento de ABA desencadeia a ativação dos canais de ânions na membrana plasmática das células-guarda, promovendo a liberação de K^+ e ânions e, conseqüentemente, o fechamento dos estômatos (SCHROEDER et al., 2001; WANG; WU, 2010).

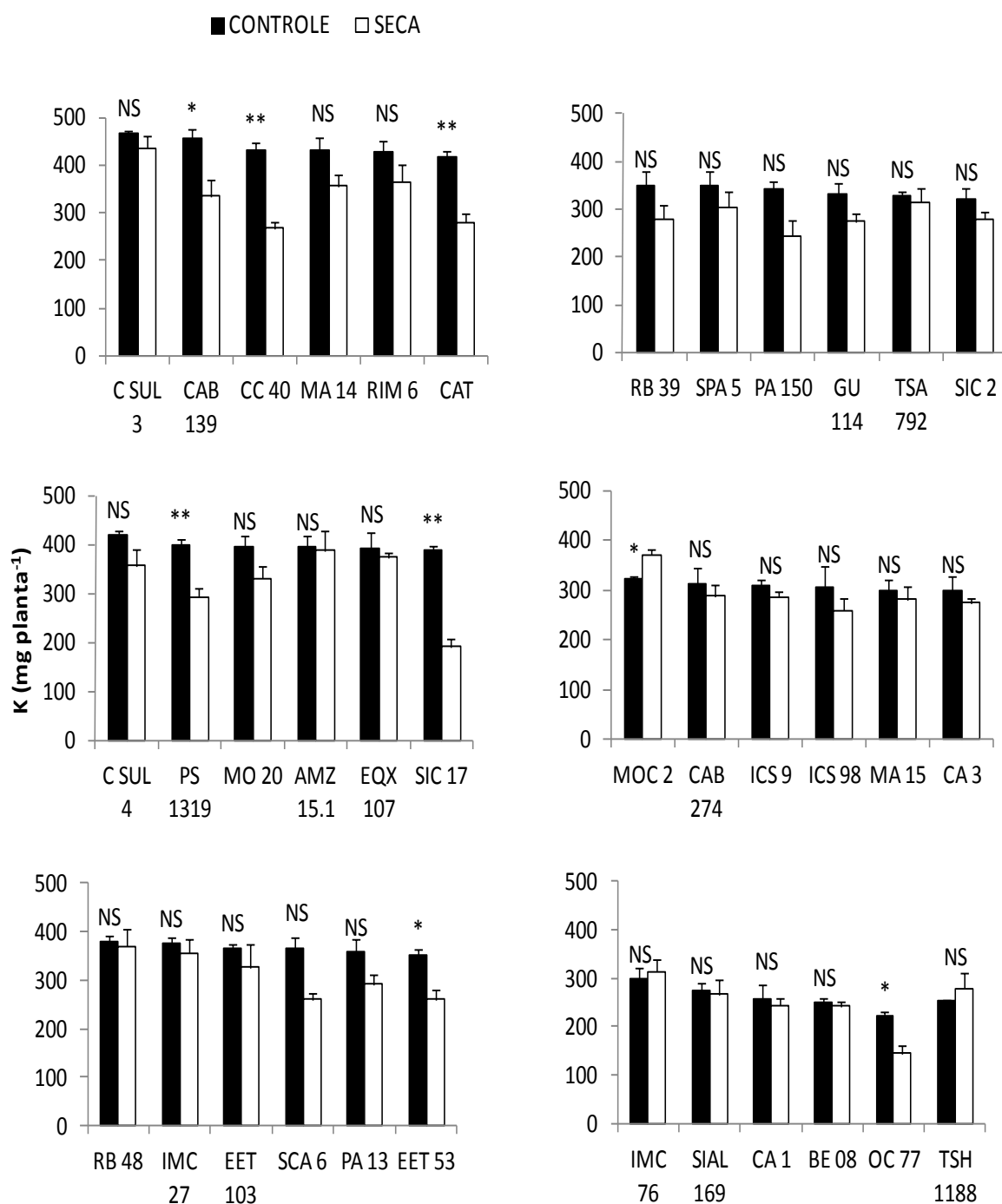


Figura 30– Conteúdo foliar de potássio (K) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e n = 6.

Quanto ao conteúdo foliar de Ca, verificou-se diferenças significativas ($P < 0,05$) para 69% dos genótipos avaliados, principalmente para os genótipos CA-3, SIC-2, SIC-17, MOC-2, CA-1, IMC-76 e CC-40 submetidos à deficiência hídrica no solo, cujos decréscimos foram de 54, 53, 51, 49, 47, 46, e 45%, respectivamente (Figura 31). O Ca, absorvido pelas plantas na forma de cátion (Ca^{2+}), é responsável pela estabilidade e permeabilidade das paredes das membranas celulares (MALAVOLTA, 1980). A deficiência de Ca provoca diminuição do número de folhas, clorose, deformação e necrose do limbo foliar e comprometimento de integridade da membrana (MAATHUIS, 2009). Segundo Rosolem (1980) e Rodrigues et al. (1993) a carência de Ca leva a redução da área foliar e a diminuição na produção de biomassa da parte aérea. Além disso, o Ca^{2+} atua (i) como mensageiro secundário nas vias de transdução de sinal, (ii) está envolvido no controle das respostas das plantas a condições adversas, como a deficiência hídrica, (iii) modula a expressão gênica, (iv) participa de reações químicas, (v) ativa canais de ânions (SLAC1, slow anion channel-associated 1) e inibe canais de entrada de potássio na membrana plasmática das células-guarda, (vi) atua na regulação osmótica, (vii) na ativação de proteínas quinases e (viii) está envolvido no fechamento dos estômatos (TUTEJA; SOPORY, 2008; GEIGER et al., 2009).

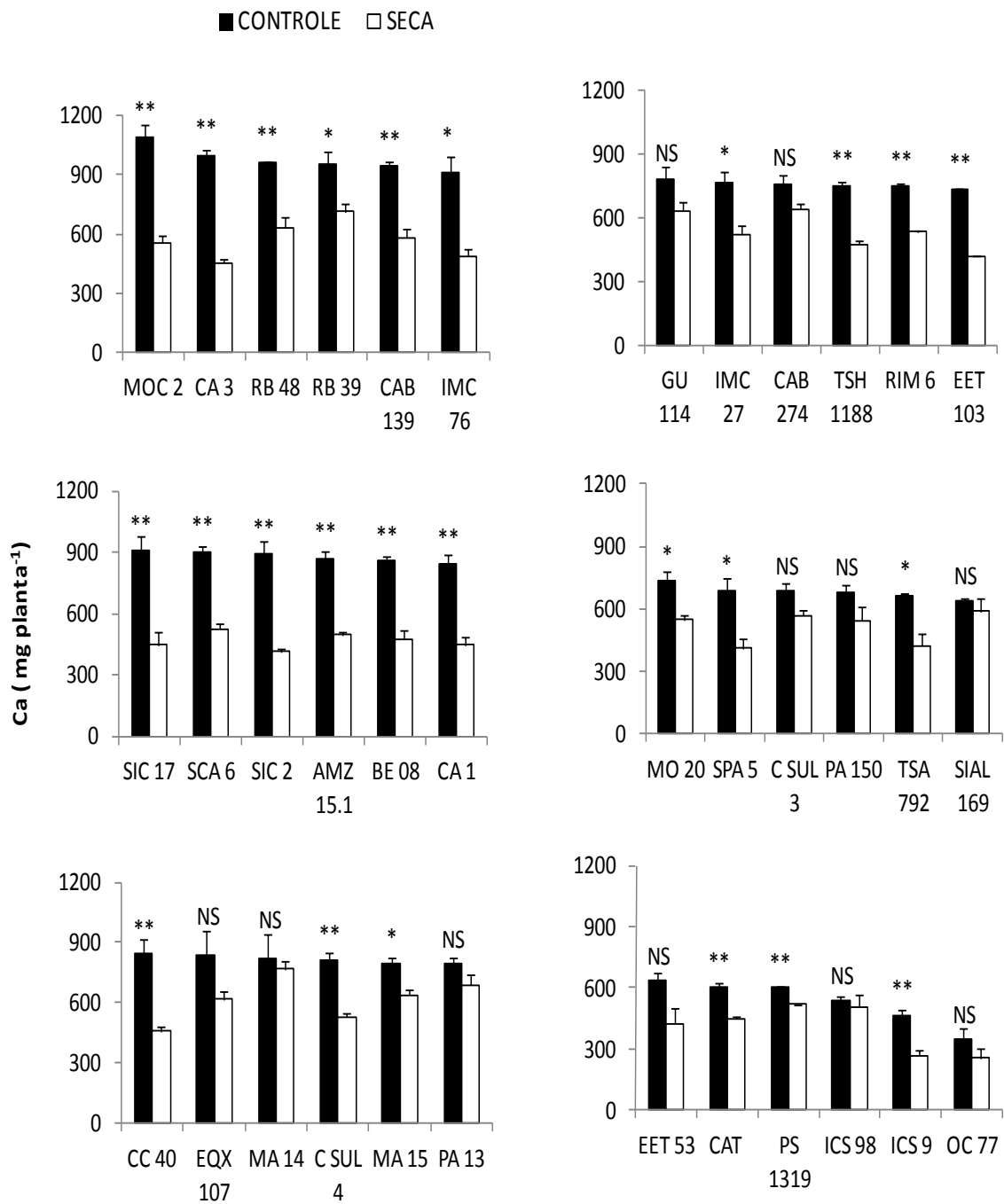


Figura 31- Conteúdo foliar de cálcio (Ca) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

Observou-se diferenças significativas ($P < 0,05$) no conteúdo foliar de Mg para 56% dos genótipos submetidos à deficiência hídrica no solo, sendo as maiores reduções verificadas para os genótipos C. SUL-4, SIC-2, AMZ-15.1, CA-3, MOC-2, CAB-139, CA-1 e CC-40, cujos decréscimos foram de 42, 40, 37, 36, 35, 34, 34 e 33%, respectivamente (Figura 32). O Mg^{2+} é um elemento essencial para a ativação de muitas enzimas, incluindo ATPases, proteínas quinases e fosfatases (MAATHUIS, 2009). A estabilidade dos ribossomos e da fotossíntese pode ser afetada pela deficiência de Mg^{2+} , uma vez que este elemento é o átomo central da molécula de clorofila e participa da agregação dos ribossomos, além de atuar na estabilidade das membranas celulares (SHAUL, 2002). Em estudo realizado com *Oryza sativa*, a deficiência de Mg^{2+} resultou em redução significativa na biomassa da parte aérea, diminuição da concentração de clorofila total e da taxa fotossintética líquida e redução da atividade da redutase do nitrato e da sintetase da glutamina em nível foliar (DING et al., 2006). Além disso, a proteína Mg-chelatase (ABAR), responsável por catalisar a introdução de Mg nas vias de biossíntese de clorofila, é um receptor ABA responsivo presente no cloroplasto; e um ativador da expressão de genes dependentes de ABA (SHANG et al., 2010).

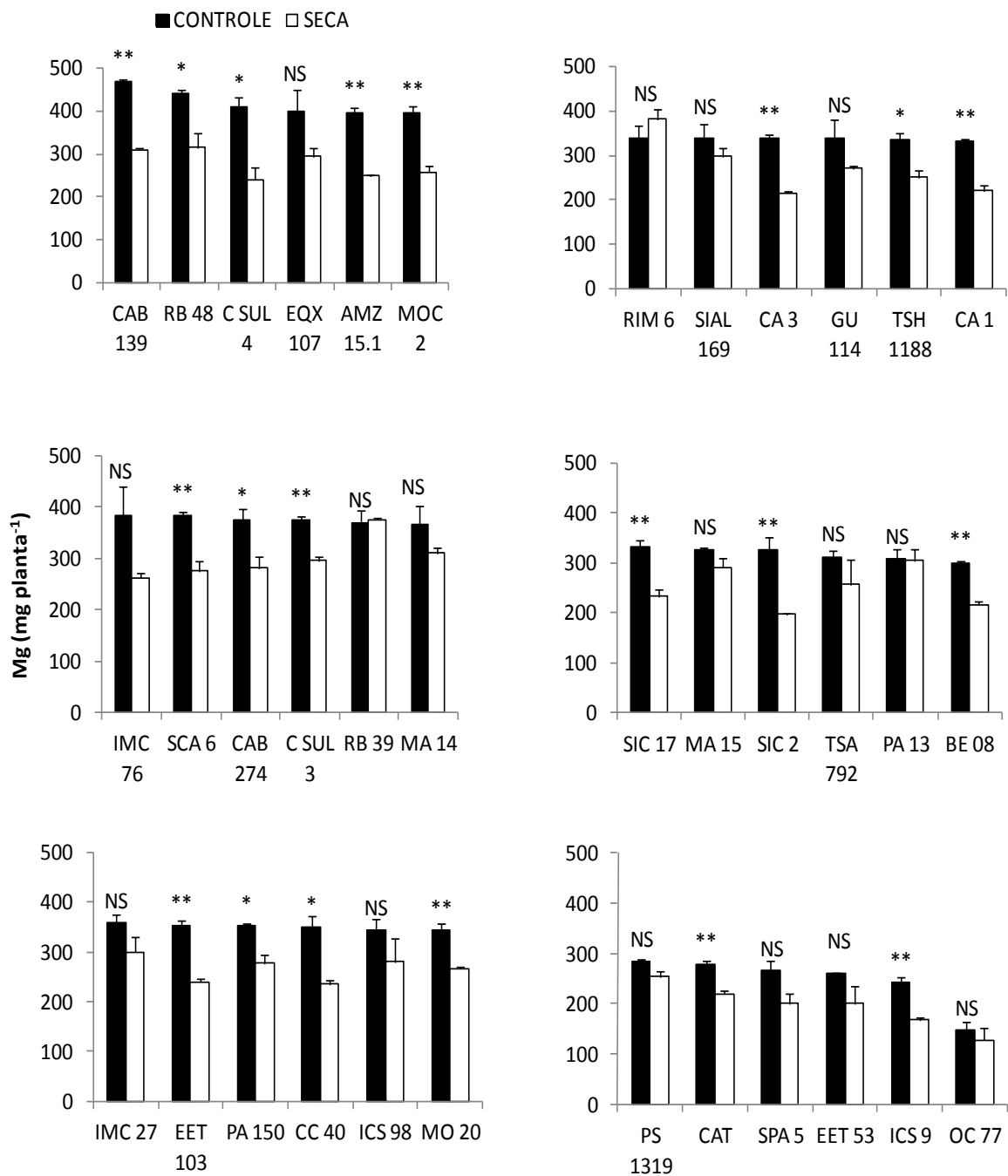


Figura 32- Conteúdo foliar de magnésio (Mg) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e n = 6.

A maioria dos genótipos apresentou alterações no conteúdo foliar de micronutrientes minerais, quando submetidos à deficiência hídrica no solo, exceto os genótipos MA-14, PA-13 e SIAL-169, que não apresentaram alterações significativas ($P < 0,05$). Verificou-se reduções significativas nos conteúdos foliares dos micronutrientes Fe, Zn, Cu e Mn, correspondentes a 53, 50, 81 e 69%, respectivamente, para os genótipos avaliados (Figuras 33, 34, 35 e 36). Em condições de deficiência hídrica pode ocorrer carência desses microelementos nas plantas (HU, SCHMIDHALTER, 2005) e provocar uma série de danos no metabolismo celular, uma vez que os micronutrientes apresentam grande importância na proteção contra o estresse oxidativo e estão envolvidos na regulação e ativação de enzimas para remoção de EROs (HÄNSCH; MENDEL, 2009).

Houve redução do conteúdo foliar de Fe com a deficiência hídrica, principalmente para os genótipos CA-3, SIC-2, CAT, ICS-98 e EET-53, que apresentaram decréscimo de 83, 80, 79, 76 e 76%, respectivamente em relação ao controle (Figura 33). Este elemento metálico está envolvido na biossíntese de clorofila, fixação de N_2 , biossíntese de hormônios, faz parte da composição de enzimas envolvidas nas transferências de elétrons (reações redox), bem como de citocromos, cuja deficiência pode levar a clorose foliar (TAIZ; ZEIGER, 2009; MARSCHNER, 1994) e redução da fotossíntese (REHEM et al., 2011). Além disso, o Fe está envolvido na eliminação de EROs, osmoproteção (HÄNSCH; MENDEL, 2009) e ativação de catalases e peroxidases (LYNCH; CLAIR, 2004).

Em relação ao conteúdo foliar de Zn, as maiores reduções significativas foram observadas nos genótipos SPA-5, CC-40, CA-1, RB-48, TSH-1188, CAB-139, CA-3 e SIC-2 submetidos à deficiência hídrica no solo, com decréscimos correspondentes a 54, 49, 48, 45, 44, 43, 43, e 41%, respectivamente, ao passo que o genótipo MO-20 apresentou aumento de 49% quando comparado ao controle (Figura 34). O Zn atua principalmente como cofator de enzimas antioxidantes e na biossíntese de clorofila, e sua carência causa danos ao metabolismo de carboidratos (CAKMAK, 2000; HÄNSCH; MENDEL, 2009; TAIZ; ZEIGER, 2009). Este elemento metálico está envolvido na atividade da dismutase do superóxido e consequente eliminação de EROs (BAGCI et al., 2007), além de ser precursor do aminoácido triptofano, associado à biossíntese de auxinas, hormônio envolvido na formação de raízes laterais e adventícias (TAIZ; ZEIGER, 2009), podendo, desta forma, contribuir

para a tolerância à deficiência hídrica em plantas (BAGCI et al., 2007). Além do mais, sua absorção pelas raízes pode ser dificultada, quando as plantas são submetidas à deficiência hídrica, e promover a deficiência desse elemento na planta, agravando sua resposta à seca (BAGCI et al., 2007; WARAICH et al., 2011).

Observou-se reduções no conteúdo de Cu principalmente para os genótipos C.SUL-4, CA-1, RIM-6, CC-40, e SIC-2, apresentaram os maiores decréscimos, correspondentes a 87, 86, 85, 84 e 80%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 35). O Cu está envolvido na biossíntese de oxidase do polifenol, seu excesso inibe a atividade de uma série de enzimas e interfere em vários aspectos associados à bioquímica vegetal, incluindo a fotossíntese, a síntese de pigmentos, o metabolismo de ácidos graxos e de proteínas, a respiração, os processos de fixação de N e a integridade de membrana (ALMEIDA et al., 2007).

As maiores reduções significativas ($P < 0,05$) no conteúdo de Mn, sob condições de deficiência hídrica, foram observadas para os genótipos CA-3, AMZ-15.1, CAB-139, SPA-5, SIC-2 e RB-48, que apresentaram decréscimos de 62, 61, 55, 54, 51 e 50%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 36). A deficiência de Mn, evidenciada por meio da clorose intervenal nas folhas mais novas, pode prejudicar o crescimento da planta, afetar a evolução fotossintética de oxigênio, ao passo que o excesso de Mn promove toxidez na parte aérea e nas raízes da planta (VELOSO et al., 1995; PAVAN; BINGHAM, 1981). Além disso, o Mn apresenta papel catalisador na atividade da dismutase do superóxido, para proteção das plantas contra EROs e de outras enzimas (HÄNSCH; MENDEL, 2009), contribuindo na tolerância à deficiência hídrica em plantas.

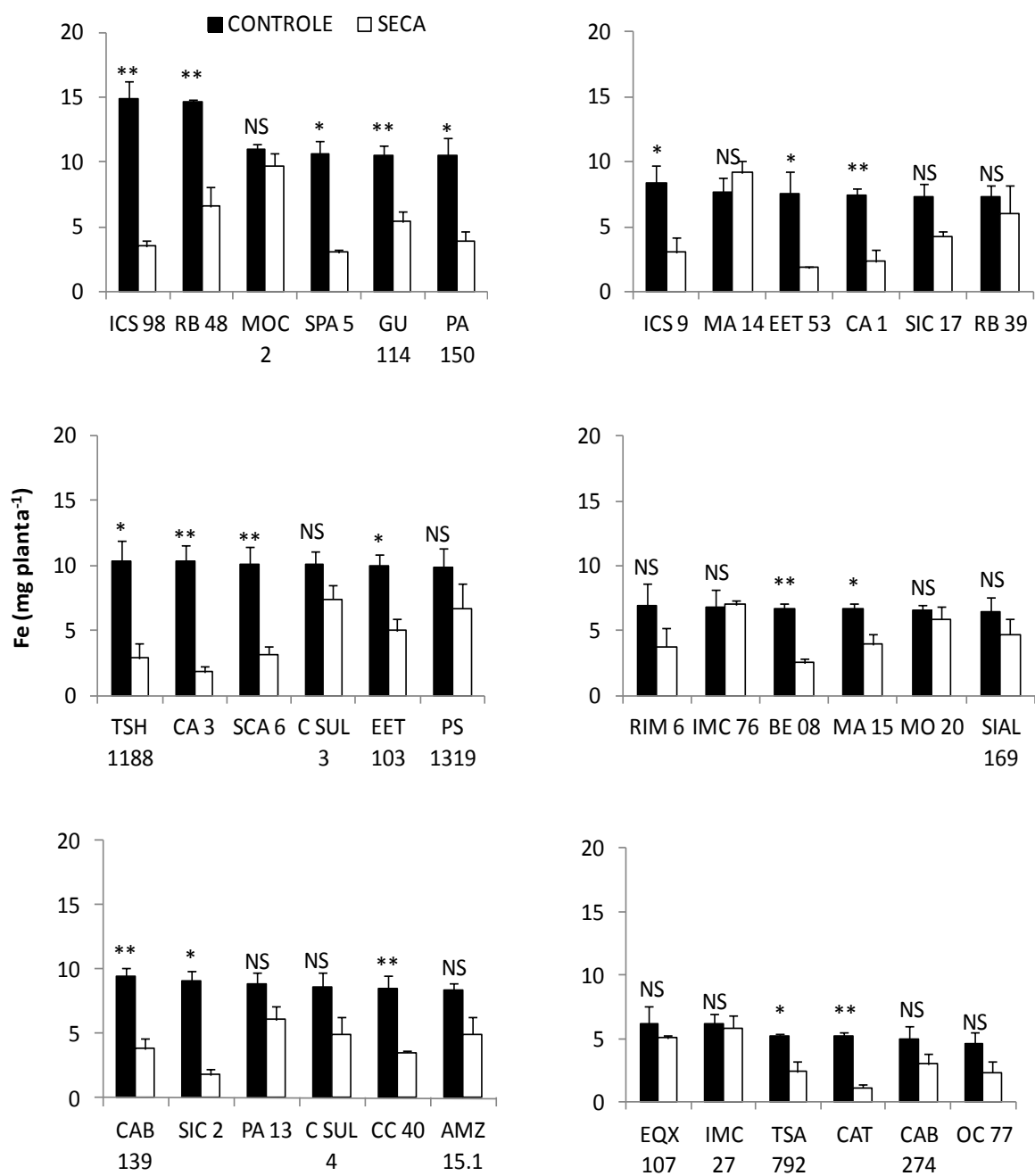


Figura 33- Conteúdo foliar de ferro (Fe) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

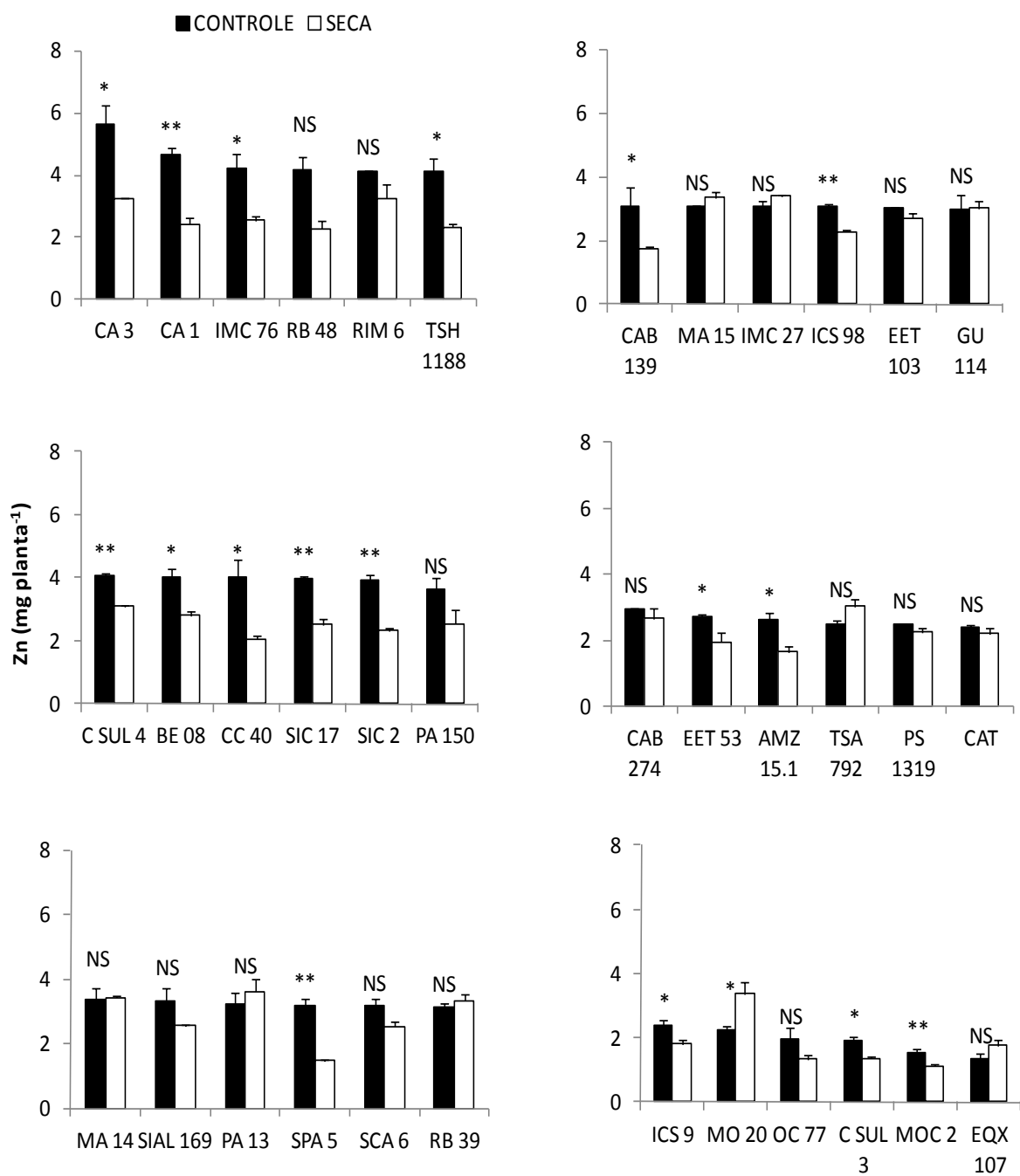


Figura 34- Conteúdo foliar de zinco (Zn) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

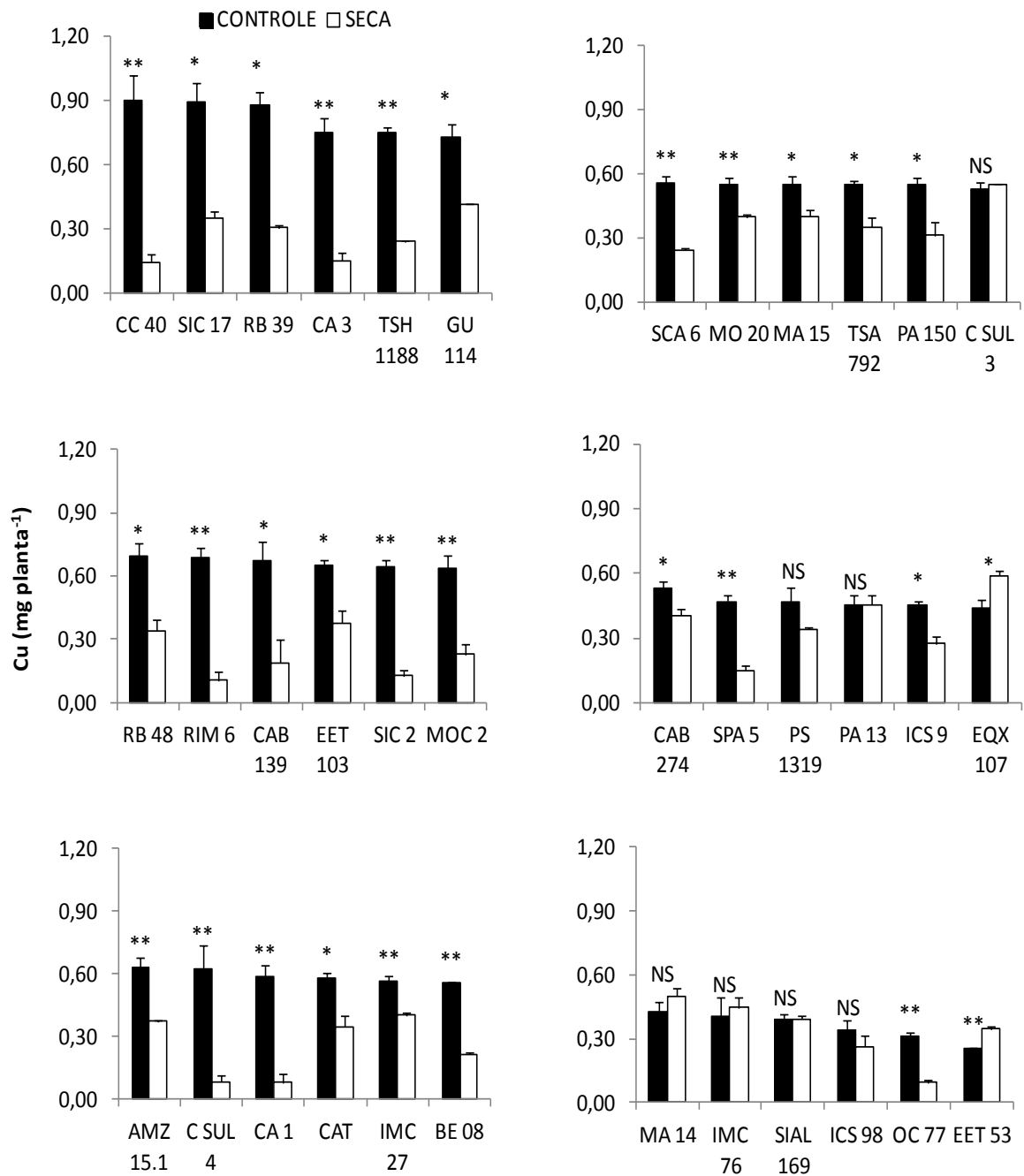


Figura 35- Conteúdo foliar de cobre (Cu) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

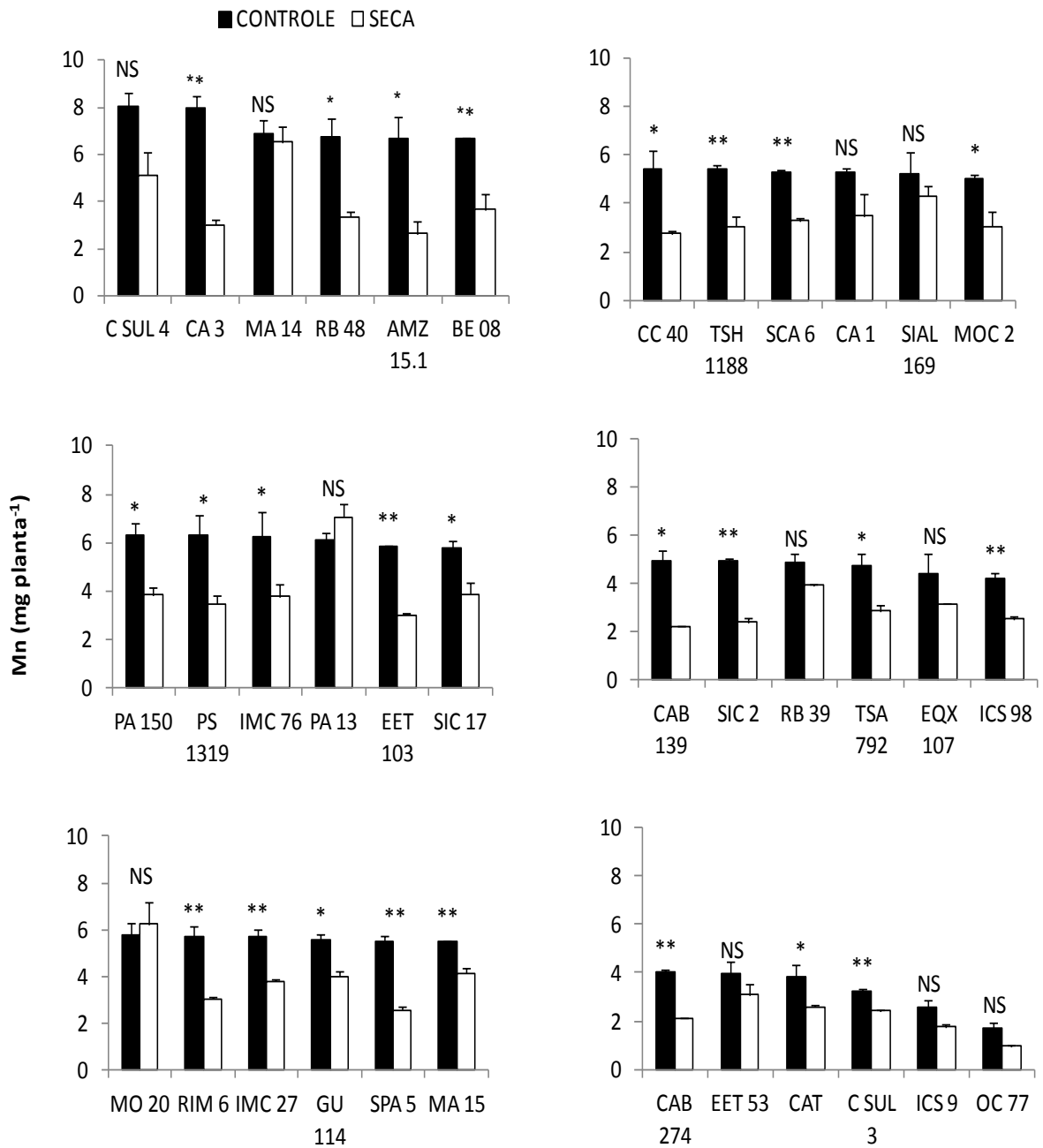


Figura 36- Conteúdo foliar de manganês (Mn) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 6$.

4.3. Atividade enzimática

De modo geral, verificou-se aumento na atividade de enzimas do estresse oxidativo para a maioria dos genótipos de cacau avaliados, exceto para os genótipos ICS-9, PA-13 e SIC-2, que não apresentaram alterações significativas. Observou-se aumento na atividade de peroxidases (POD) em 78% dos genótipos avaliados, quando submetidos à deficiência hídrica no solo. Houve maior variação significativa ($P < 0,01$) de POD para os genótipos PS-1319, MO-20 e MA-15, cujo aumento na atividade correspondeu a 193, 188 e 170%, respectivamente, em relação ao controle. Entretanto, para os genótipos CA-3, CAB-274, CAT e SCA-6, observou-se reduções significativas ($P < 0,01$) na atividade desta enzima sob condições de deficiência hídrica, com reduções de 31, 23, 15 e 13%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 37).

Em condições de deficiência hídrica no solo, as plantas tendem a aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como uma das primeiras respostas da planta às condições de estresse, em virtude do fechamento dos estômatos e da diminuição na fixação de CO_2 , que leva a um excesso de energia de excitação não dissipada pelos mecanismos de proteção da planta (KHANNA-CHOPRA, 2011; GUO et al., 2010). As enzimas do estresse oxidativo são ativadas para a remoção de EROs, que podem promover danos celulares e induzir a morte celular programada (JIANG; ZHANG, 2002). A atividade de POD, uma das enzimas-chave envolvidas no estresse oxidativo, promove a remoção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (JIANG; ZHANG, 2002; LEI et al., 2006). A diminuição na atividade de enzimas do estresse oxidativo, e consequente danos celulares causados pelas EROs, pode levar à senescência e à abscisão foliar em condições de estresse (KHANNA-CHOPRA, 2011). Fato também observado no presente trabalho, mas com diferenças intergenotípicas. Muitos estudos mostram uma relação entre a variação na atividade de peroxidases e a tolerância de plantas ao estresse, podendo ser uma adaptação do tecido vegetal ao estresse (GASPAR et al., 1985).

Em relação à oxidase do polifenol (PPO), verificou-se aumento significativo ($P < 0,01$) em sua atividade, principalmente para os genótipos CA-3, EET-103, AMZ-15.1, SIC-17, RB-39, ICS-98, MOC-2 e CAB-274, correspondentes a 202, 107, 87,

84, 80, 58, 55 e 54%, respectivamente, em comparação ao controle. Por outro lado, para os genótipos TSH-1188, SCA-6, BE-08, EET-53, CAT, IMC-27 e C. SUL-4, houve uma redução significativa na atividade dessa enzima de 50, 42, 33, 23, 22, 13 e 11%, respectivamente, ao passo que para os genótipos SIAL-169, PA-13, CAB-139, PA-150, C. SUL-3, IMC-76, SIC-2, RB-48 e MA-15, não houve diferenças significativas em relação ao controle (Figura 38). A partir dos resultados da atividade de PPO não foi possível separar os genótipos de cacau contrastantes em relação à tolerância à deficiência hídrica no solo. As enzimas PPO são encontradas nos tilacoides e plastídeos, porém não se tem muito conhecimento sobre as alterações na atividade dessa enzima no crescimento das plantas, em resposta à deficiência hídrica (LEE et al., 2007). Na maioria dos estudos direcionados à atividade de PPO, verifica-se uma relação dessa enzima aos danos fisiológicos, cuja atividade aumenta em resposta a diferentes tipos de estresses (RUIZ et al., 1998;. RIVERO et al., 2001;. JOUILI;EL FERJANI, 2003).

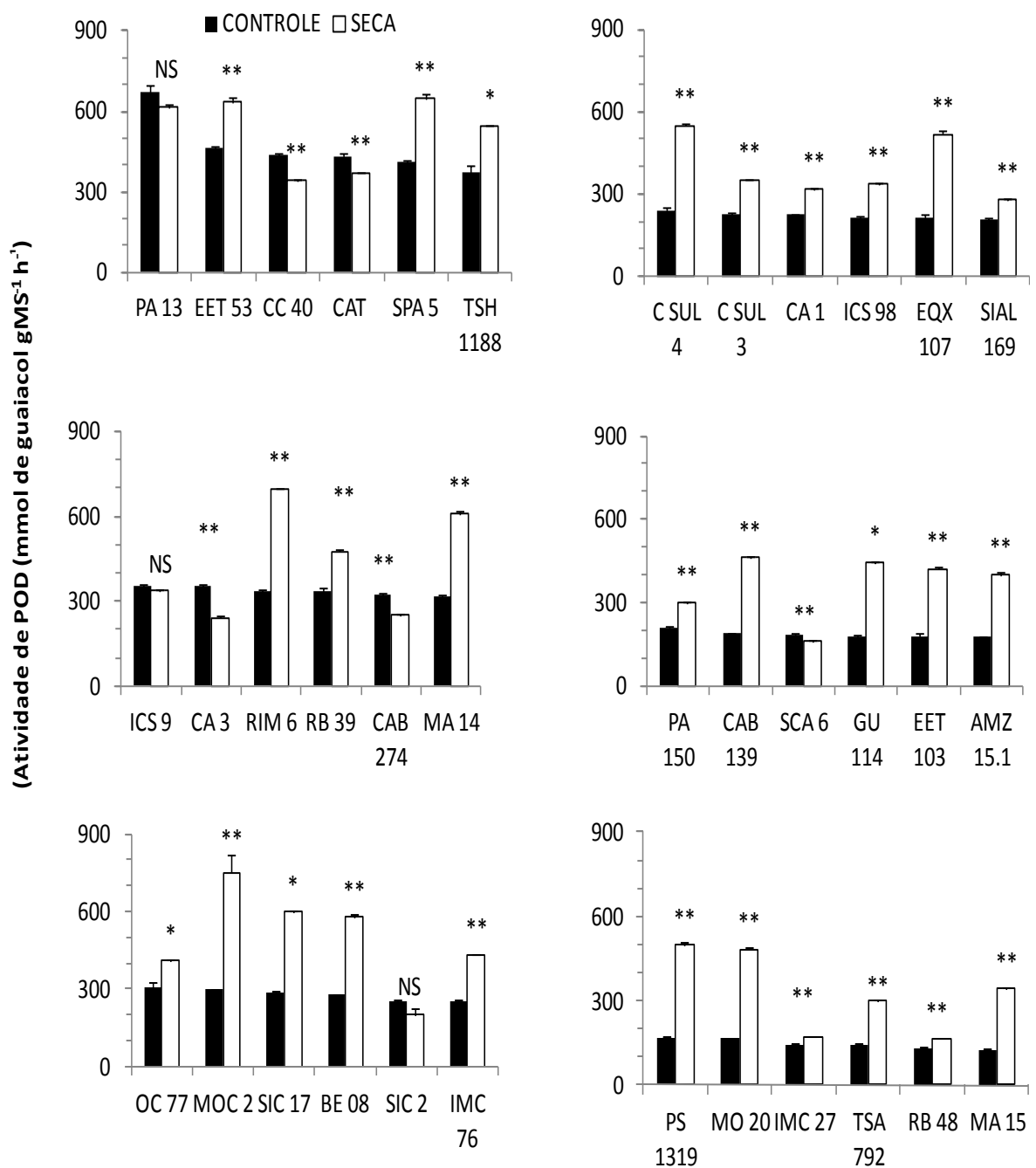


Figura 37- Atividade de peroxidases (POD) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e $n = 8$.

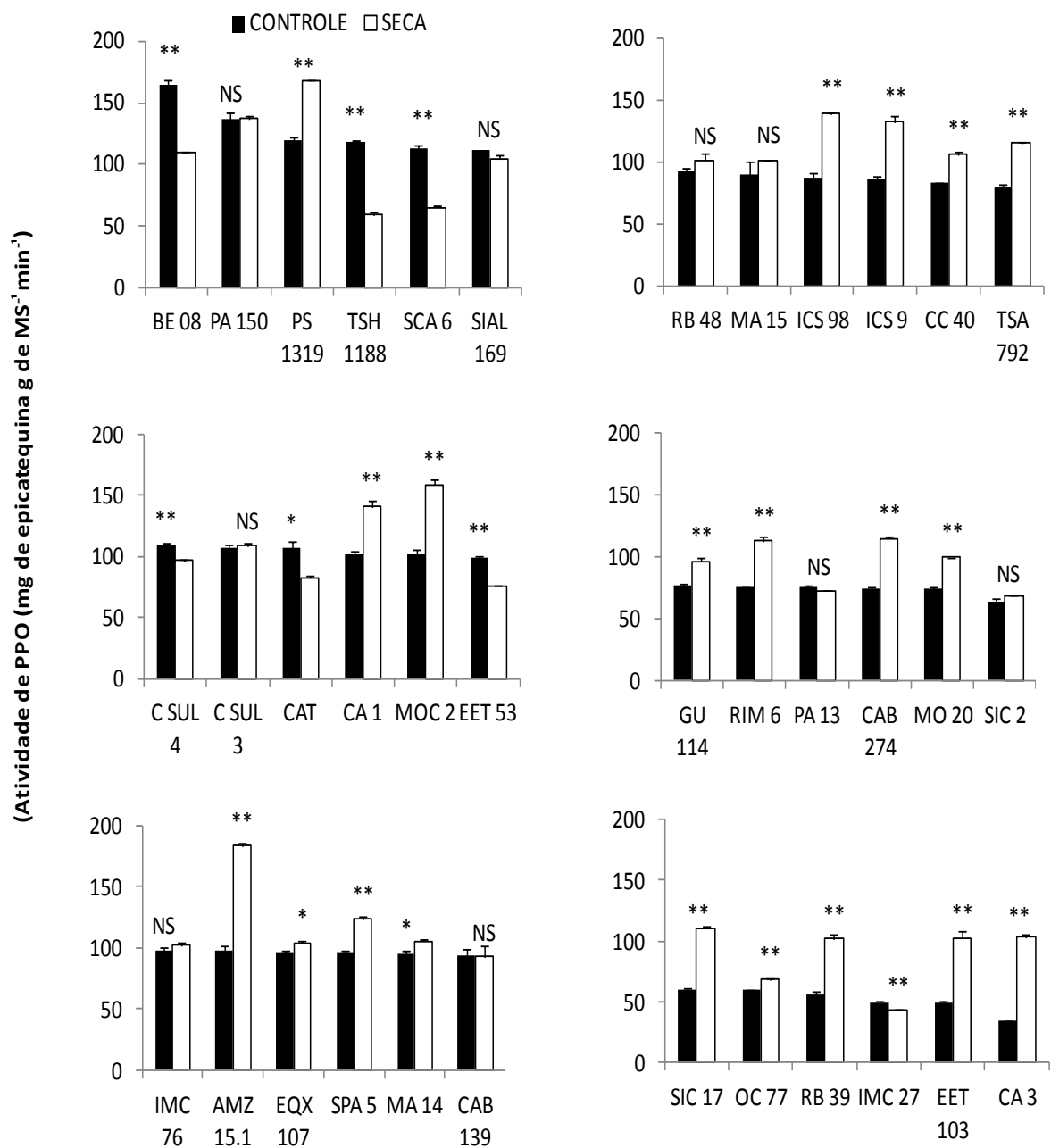


Figura 38- Atividade de oxidase do polifenol (PPO) de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. As médias foram comparadas pelo teste-t ($P < 0,01$ -** e $P < 0,05$ -*). Valores médios (\pm EP) e n = 8.

4.4. Análise de agrupamento por similaridade, entre as variáveis de crescimento, composição química, estresse oxidativo, e análise de componentes principais.

4.4.1. Análise de agrupamento por similaridade entre as variáveis de crescimento, composição química e enzimas POD e PPO.

A análise de agrupamento, baseada na similaridade, a partir da diferença entre os tratamentos controle e estresse por deficiência hídrica (Δ), para as variáveis de crescimento, estresse oxidativo (POD e PPO) e composição química avaliadas, mostrou a formação de três grupos distintos (Figura 39). O primeiro grupo (I) foi representado por 14 genótipos de cacau, o segundo (II) com sete genótipos e o terceiro (III) com 15 genótipos (Figura 39). Verificou-se relação entre os grupos formados e o número de variáveis significativas para os diferentes genótipos (Tabela 4). Além disso, observou-se associação entre a similaridade, baseada nas variáveis analisadas, e a tolerância à deficiência hídrica. Com isso, os genótipos PA-13, MA-15, OC-77, MO-20, PS-1319 e MA-14, tolerantes à deficiência hídrica, com menores diferenças em relação aos seus respectivos controles, fizeram parte do terceiro grupo (círculo cheio), ao passo que o segundo grupo foi formado pelos genótipos CC-40, C. SUL-4, SIC-2 e SIC-17, sensíveis à deficiência hídrica, cujas diferenças foram maiores em relação aos controles (círculo vazio).

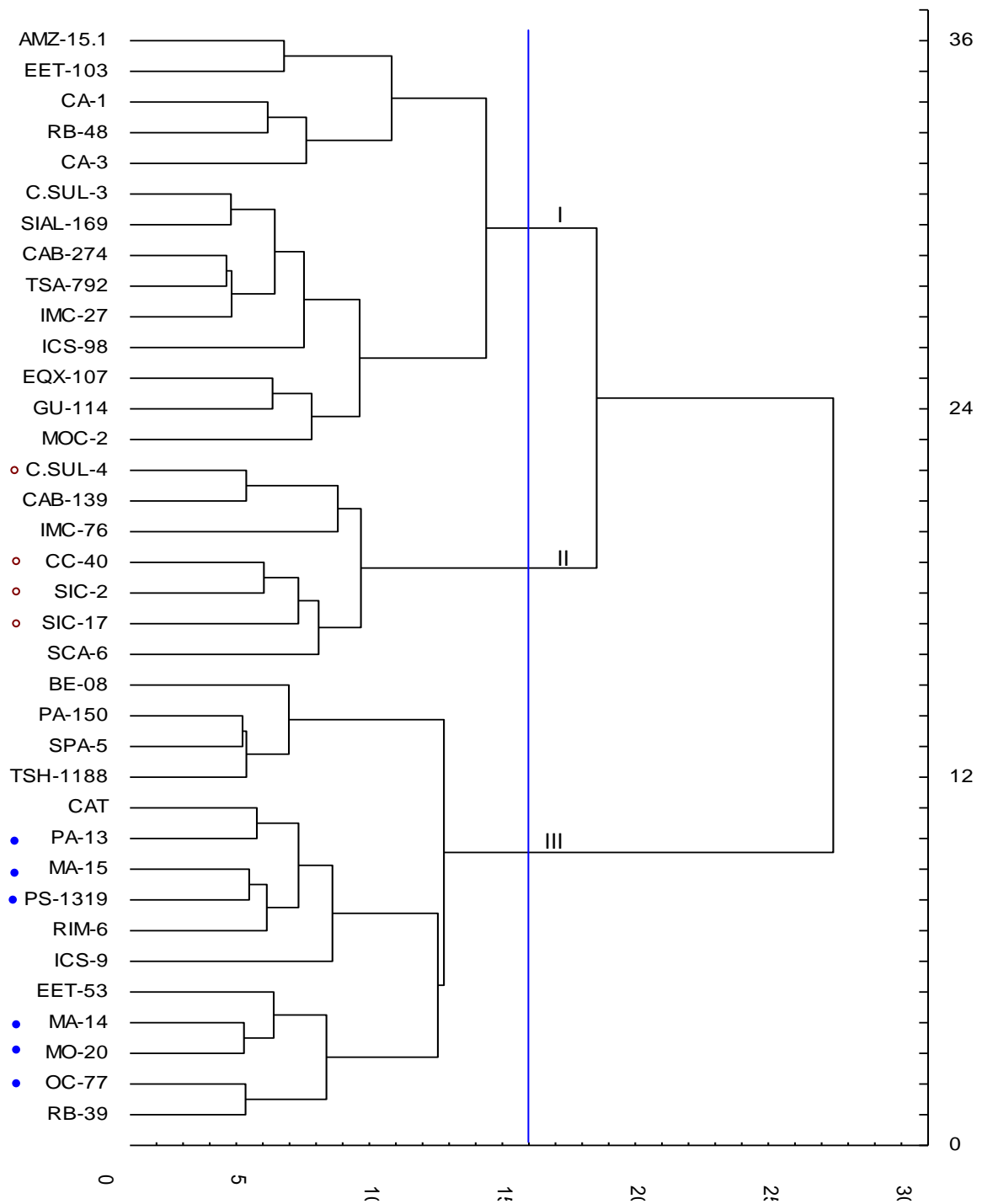


Figura 39- Análise de agrupamento de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias, baseada na distância Euclidiana, a partir da diferença entre os tratamentos controle e seca para as variáveis de crescimento, do estresse oxidativo (POD e PPO) e da composição química avaliadas, utilizando o método hierárquico aglomerativo de Ward (1963).

Tabela 4- Número de variáveis significativas de 36 genótipos de cacau submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias, comparadas pelo teste t-Student ($P < 0,05$).

Genótipo	Total	Genótipo	Total
PA-13	4	C.SUL-3	14
OC-77	5	RIM-6	14
MA-15	5	AMZ-15.1	15
MA-14	6	BE-08	15
SIAL-169	7	CAB-274	15
EET-53	8	CAT	16
PS-1319	8	CA-3	16
ICS-9	9	GU-114	16
PA-150	9	TSA-792	16
RB-39	9	CA-1	17
MO-20	9	SIC-2	17
EET-103	10	IMC-76	18
SPA-5	10	RB-48	18
IMC-27	11	CAB-139	20
EQX-107	12	MOC-2	21
ICS-98	12	C.SUL-4	22
SCA-6	13	SIC-17	22
TSH-1188	13	CC-40	23

Realizou-se teste de colinearidade entre as 28 variáveis estudadas, baseado no fator de inflação de variação, visando avaliar a existência de variáveis independentes correlacionadas. A partir dos resultados deste teste, observou-se que as variáveis AFP, BPA, BT, TCR, AR, N, Ca e Mg não foram colineares. A análise de agrupamento, baseada na similaridade, a partir dos valores de Δ , com as variáveis não colineares (Figura 40), mostrou a formação de quatro grupos principais, semelhantes ao agrupamento formado a partir de todas variáveis de crescimento, estresse oxidativo (POD e PPO) e composição química. Com isso, pode-se sugerir que as oito variáveis não colineares são suficientes para separar os genótipos de cacau contrastantes em relação à tolerância à deficiência hídrica no solo.

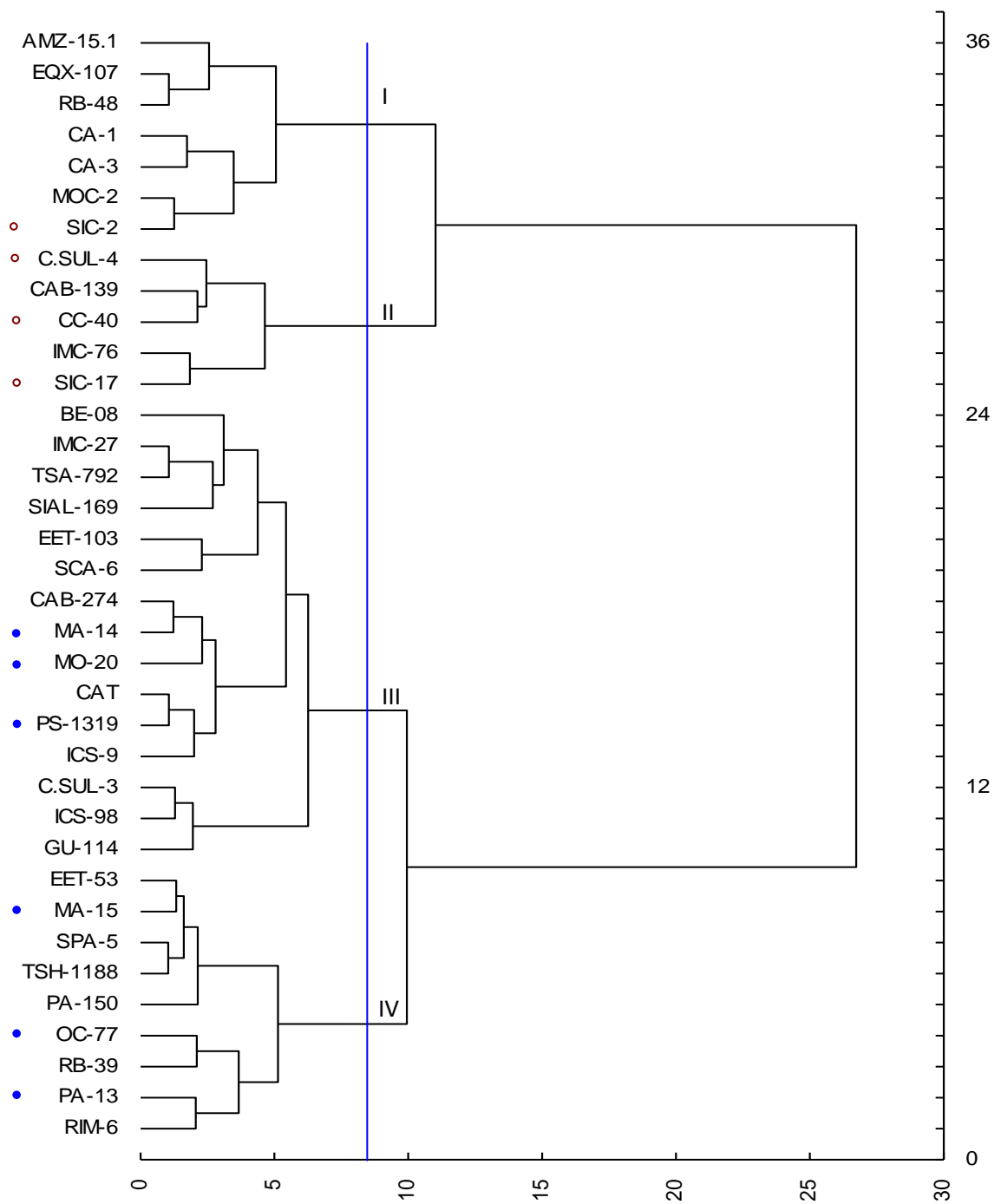


Figura 40- Análise de agrupamento de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias, baseada na distância Euclidiana, a partir da diferença entre os tratamentos controle e seca para as variáveis AFP, BPA, BT, TCR, AR, N, Ca e Mg, utilizando o método hierárquico aglomerativo de Ward (1963).

4.4.2. Análise de componentes principais a partir das oito variáveis não colineares.

A partir da representação gráfica da análise dos componentes principais, observou-se a formação de quatro grupos e a separação dos genótipos de cacau mais contrastantes em relação à tolerância à deficiência hídrica no solo (Figura 41). Além disso, verificou-se concordância com a análise de agrupamento pelo método aglomerativo de Ward.

O primeiro e segundo componentes explicaram 58 e 14%, respectivamente, da variância total, com autovalor acumulado de 72%. A partir dos valores dos autovetores, observou-se que as variáveis que apresentaram maior contribuição na formação do primeiro componente foram BPA, BT, TCR, AFP e conteúdo foliar de Mg; ao passo que para formação do segundo componente, as variáveis AR, conteúdo foliar de N e Ca tiveram maiores contribuições. Os demais componentes explicaram 10; 9; 4; 3; 1 e 0,4%, respectivamente, da variância total (Tabela 5).

De acordo com o primeiro componente, verificou-se, principalmente para os genótipos PA-13, MA-15, OC-77, PS-1319, MO-20 e EET-53 (Figura 41, elipse linha contínua), uma maior distinção intergenotípica, por apresentarem os menores valores de Δ para as combinações lineares das variáveis analisadas. Por outro lado, os genótipos C. SUL-4, CC-40, CAB-139, IMC-76, SIC-17, SIC-2, MOC-2 e AMZ-15.1 agruparam-se com base nos altos valores de Δ para as variáveis com maior contribuição na formação deste componente. Constatou-se, no presente trabalho, que estas variáveis contribuíram fortemente para separação dos genótipos tolerantes dos não tolerantes à deficiência hídrica no solo.

As variáveis AR e N tiveram maior contribuição na formação do segundo componente. Entretanto, verificou-se uma correlação negativa para estas variáveis (Tabela 6). Os genótipos CAB-139, MO-20 e PA-13 (Figura 41, elipse linha tracejada), que se agruparam na parte positiva do eixo, apresentaram menores valores de Δ para a variável AR e maiores valores para o conteúdo foliar de N. Por outro lado, agruparam-se, na parte negativa do eixo, principalmente os genótipos BE-08, CA-3 e RB-48, que apresentaram altos valores de Δ para AR e baixos para o conteúdo foliar de N, sugerindo que um incremento no valor de AR pode conferir maior tolerância à deficiência hídrica em cacau.

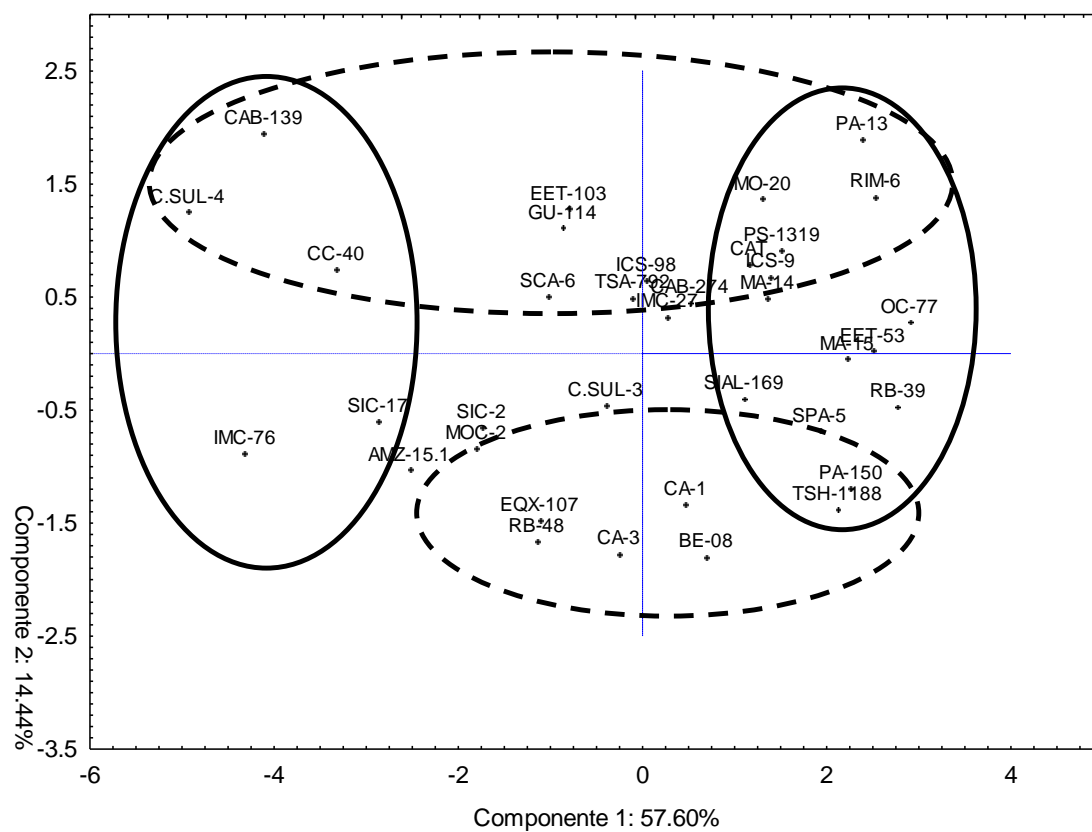


Figura 41- Análise de componentes principais de 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias, baseado na diferença entre os tratamentos controle e seca para as variáveis AFP, BPA, BT, TCR, AR, N, Ca e Mg.

Tabela 5- Autovalores e autovetores da matriz de correlação para as variáveis AFP, BPA, BT, TCR, AR, N, Ca e Mg em 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias.

Componente	Autovalor	%	Autovetor							
			(Coeficiente para componente principal)							
			AFPX10 ⁻²	BPA	BT	TCR	AR	N	Ca	Mg
1	4,61	57,60	-0,35	-0,43	-0,43	-0,43	-0,12	-0,29	-0,27	-0,38
2	1,15	72,04	0,28	0,10	0,03	0,00	-0,71	0,44	-0,39	-0,25
3	0,80	82,01	-0,07	0,25	0,32	0,29	0,28	-0,34	-0,70	-0,24
4	0,75	91,37	0,42	-0,18	-0,16	-0,22	0,62	0,50	-0,21	-0,18
5	0,34	95,57	0,71	-0,22	-0,17	-0,01	-0,12	-0,52	-0,15	0,34
6	0,26	98,81	0,32	0,03	0,06	0,19	0,00	-0,24	0,46	-0,76
7	0,07	99,67	-0,11	-0,44	-0,35	0,80	0,00	0,16	-0,06	0,02
8	0,03	100,00	-0,01	-0,68	0,73	-0,07	-0,06	0,04	0,02	0,01

Tabela 6- Correlações entre as oito variáveis não colineares avaliadas em 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias.

	AFP x10 ⁻²	BPA	BT	TCR	AR	N	Ca	Mg
AFP x10 ⁻²								
BPA	0,63**							
BT	0,62**	0,97**						
TCR	0,62**	0,92**	0,94**					
AR	0,11	0,13	0,21	0,19				
N	0,65**	0,53**	0,47*	0,41*	-0,03			
Ca	0,29	0,40*	0,39*	0,42**	0,22	0,27		
Mg	0,52**	0,68**	0,67**	0,68**	0,25	0,37*	0,64**	

*P < 0,05; **P < 0,01.

4.5. Expressão gênica

Observou-se aumento na expressão dos genes candidatos a tolerância à deficiência hídrica, associados à biossíntese de ABA, e dos genes relacionadas à biossíntese das proteínas de PSII avaliados, para os genótipos considerados sensíveis à deficiência hídrica no solo; e repressão destes genes para os genótipos tolerantes, quando comparados ao controle (Figura 42).

Tem-se verificado o inverso em *Arabidopsis thaliana* (TAN et al., 2003). Entretanto, isto provavelmente se deve ao fato do período de duração e intensidade da deficiência hídrica imposta no presente estudo, terem sido aplicados de forma progressiva e durante um período maior de tempo, motivo pelo qual a transcrição de alguns genes poder ter se estabilizado nos genótipos tolerantes. Observam-se, em plantas submetidas a estresse abióticos, alterações na regulação e expressão gênica, a curto e, ou a longo prazo, como respostas de tolerância às condições desfavoráveis (SAIBO et al., 2009).

Houve um aumento significativo ($P < 0,01$) na expressão do gene *NCED5*, principalmente para os genótipos C. SUL-4 e CC-40, cujos incrementos corresponderam a 14 e 3 vezes, respectivamente, em relação ao controle. Por outro lado, para os genótipos MA-15 e PA-13, observou-se repressão significativa ($P < 0,01$) de 0,4 e 0,2 vez nos níveis de expressão desse gene (Figura 42A). Tan et al. (2003), em estudos com cinco genes da família NCED em *Arabidopsis*, verificaram aumento na expressão em flores e folhas do gene *NCED5* em condições de deficiência hídrica, cujas análises foram feitas no período de 35 h. Chao et al. (2012) verificaram que a deficiência de Mg resultou em aumento no teor de ABA em folhas de plantas de *Oriza sativa*. Fato também evidenciado no presente estudo com o aumento da expressão de *NCED5* no genótipo C. SUL-4. Contudo, existem poucos estudos relacionados à função e expressão de *NCED5*, os quais, em sua maioria, foram realizados com *Arabidopsis*, com aumento na expressão desse gene em condições de estresse (FREY et al., 2011; TAN et al., 2003).

Verificou-se superexpressão de *PP2C*, principalmente para os genótipos C. SUL-4, CC-40 e SIC-2, com aumentos de 8, 3 e 2 vezes; ao passo que para os genótipos PA-13 e MA-15 não houve diferenças significativas ($P < 0,05$) (Figura 42B). Tais resultados sugerem que a superexpressão de *PP2C* inativa as proteínas

quinases, bloqueando o processo de transdução de sinal nas vias dependentes de ABA, a fosforilação, a ativação de fatores de transcrição, os segundos mensageiros e a expressão de genes que conferem tolerância à deficiência hídrica (TAIZ; ZEIGER, 2009; UMEZAWA et al., 2010; MA et al., 2009).

Em relação ao número de transcritos do gene *psbO*, observou-se aumento significativo ($P < 0,01$) na sua expressão para o genótipo C. SUL-4, em 2 vezes, já para os genótipos MO-20 e MA-15 houve repressão significativa ($P < 0,01$) de 0,9 e 0,5 vez (Figura 42C). Além disso, verificou-se aumento significativo ($P < 0,01$) no número de transcritos do gene *psbA* para os genótipos PA-13, CC-40 e SIC-2 de 36, 12 e 2 vezes, respectivamente, em comparação ao controle; enquanto o genótipo MA-15 apresentou repressão desse gene em 0,8 vez (Figura 42D). Segundo Sakamoto et al. (2004), a expressão de genes associados às proteínas envolvidas na fotossíntese pode ser aumentada ou reprimida sob condições de estresse abiótico. Segundo estes autores, alguns fatores de transcrição podem atuar como repressores da transcrição. Além disso, genes como o *psbA*, que codifica a proteína D1 do centro de reação de PSII, podem ser diferencialmente expressos e a proteína facilmente danificada em condições de estresse (CHRISTOPHER; MULLET, 1994; TAIZ; ZEIGER, 2009). Por outro lado, a concentração de proteína, codificada por *psbO* é um fator fundamental para a fotossíntese e o crescimento de plantas, e pode limitar a concentração de outras proteínas, codificadas tanto por *psbA* como *psbP* (MURAKAMI et al., 2005). Em estudos realizados com *T. cacao*, Rehem et al. (2011) verificaram, a partir de análise por espectrofotometria de massas, que plantas do genótipo PA-13, com caráter letal 'Luteus-Pa', apresentaram peptídeos com 100% de similaridade a *psbO*, cuja menor concentração foi verificada no genótipo mutante, sugerindo que esse genótipo apresenta danos no PSII.

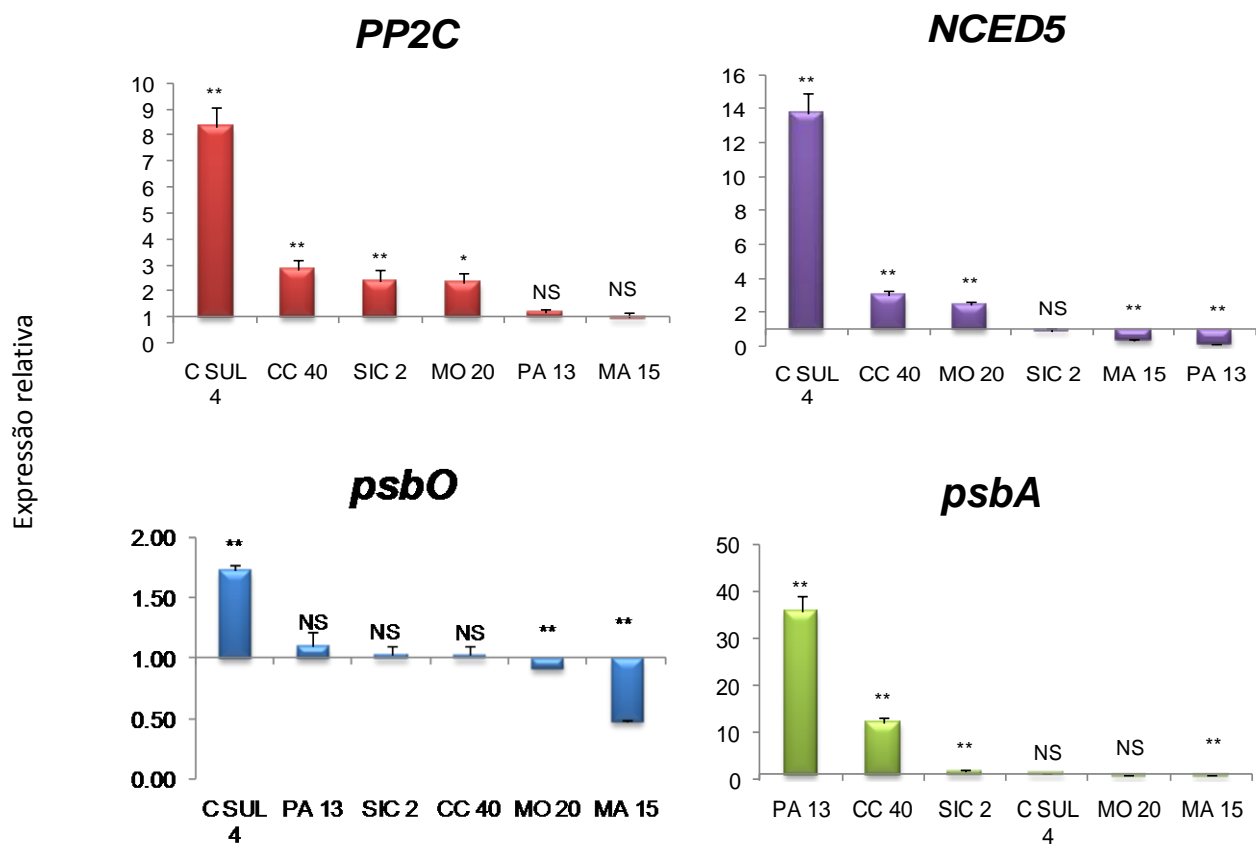


Figura 42 - Expressão dos gene *PP2C*, *NCED5*, *psbA* e *psbO* em folhas de plantas de 6 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias. Método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Gene β -tubulina como referência.

5. CONCLUSÕES

- Os genótipos de cacau EET-53, ICS-9, MA-15, MA-14, MO-20, OC-77, PA-13, PS-1319, PA-150, RB-39 e SIAL-169 foram os mais tolerantes à deficiência hídrica no solo;
- Dentre os seis genótipos de cacau selecionados como contrastantes para a deficiência hídrica no solo, os genótipos MA-15, PA-13 e MO-20 se mostraram mais aclimatados à seca, especialmente o MA-15;
- Os genótipos de cacau EET-103, EQX-107, ICS-98, IMC-27, SCA-6, SPA-5 e TSH-1188 apresentaram-se medianamente tolerantes e os genótipos CA-1, CAB-139, CC-40, C. SUL-4, IMC-76, MOC-2, RB-48, SIC-2, SIC-17 e TSA-792 os menos tolerantes à deficiência hídrica no solo;
- A análise dos componentes principais mostrou-se de suma importância na determinação de variáveis que podem vir a ser utilizadas em programas de melhoramento genético do cacauzeiro, como ferramenta na seleção de genótipos tolerantes à deficiência hídrica no solo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.-A. F.; VALLE, R. R.; MIELKE, M. S.; GOMES, F. P. Tolerance and prospection of phytoremediator woody species of Cd, Pb, Cu and Cr. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 2, p. 83-98, 2007.

ANJUM, S. A.; XIE, X.; WANG, L.; SALEEM, M. F.; MAN, C.; LEI, W. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6(9), pp. 2026-2032, 2011.

ALAM, S.M. Nutrient uptake by plants under stress conditions. In: PESSARAKLI, M. (Ed.). **Handbook of plant and crop stress**. New York: Marcel Dekker. p, 285-313, 1999.

ALVIM, P.T. Cacao. In: ALVIM, P.T.; KOZLOWSKY, T.T. (ed) **Ecophysiology of tropical crops**. Academic Press, New York, p. 279-313, 1977.

APEL, K.; HIRT, A. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review Plant Biology**, v. 55, p.373–99, 2004.

ARBONA, V.; IGLESIAS, D.J.; JACAS, J.; PRIMO-MILLO, E.; TALON, M.; GOMEZ-CADENAS, A.. Hydrogel substrate amendment alleviates drought effects on young citrus plants. **Plant Soil**, v. 270, p.73-82, 2005.

AREND, M.; KUSTER, T.; GÜNTHARDT-GOERG, M.S.; DOBBERTIN, M. Provenance-specific growth responses to drought and air warming in three European oak species (*Quercus robur*, *Q. petraea* and *Q. pubescens*). **Tree Physiology**, v.31, p. 287–297, 2011.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v.141, p. 391–96, 2006.

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

BAGCI, S. A.; EKIZ, H.; YILMAZ, A.; CAKMAK, I. Mineral Toxicity Stress: Effects of Zinc Deficiency and Drought on Grain Yield of Field-grown Wheat Cultivars in Central Anatolia. **Journal Agronomy & Crop Science**, v.193, p. 198-206, 2007.

BAILEY, B.A.; BAE H.; STREM, M. D.; MAYOLO, G. A.D.E.; GUILTINAN, M. J.; VERICA, J.A.; MAXIMOVA, S. N.; BOWERS, J. H. Developmental expression of stress response genes in *Theobroma cacao* leaves and their response to Nep1 treatment and a compatible infection by *Phytophthora megakarya*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, p. 611–622, 2005.

BAJJI, M.; KINET, J-M.; LUTTS, S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. **Plant Growth Regulation**, v.0, p.1-10, 2001.

BALASIMHA, D. Water relations, growth and other indicators of plant water stress in cocoa under drought. In: **Proc. 10th Int. Cocoa Res. Conf., Santo Domingo**, Dominican Republic, pp.215-217, 1988.

BARGALI, K.; TEWARI, A. Growth and water relation parameters in drought-stressed *Coriaria nepalensis* seedlings. **Journal of Arid Environments**, v.58, p. 505–512, 2004.

BARTELS, D.; SUNKAR. R. **Drought and salt tolerance in plants**. Critical Reviews in Plant Sciences, v.24, p. 23-58, 2005.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 4 ed., 2005. p. 525.

BOUDET, A.M. Lignins and lignification: selected issues. **Plant Physiology Biochemistry**. v.38, p. 81–96, 2000.

BRAGA, J. M.; DEFELIPO, B. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e plantas. **Revista Ceres**, v. 21, p. 73-85, 1974.

BRAKKE, M.; ALLEN, L. H. Gas-exchange of citrus seedlings at different temperatures, vapor-pressure deficits, and soil-water contents. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 120, p. 497–504, 1995.

BRAY, E. A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n.407, pp. 2331–2341, 2004.

BRAY E. A.; BAILEY SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: Gruissem W, Buchannan B, Jones R (Eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Biologists**, Rockville, MD 2000; pp. 158–1249.

BRÜCK, H.; PAYNE, W. A.; SATTELMACHER, B. Effects of phosphorus and water supply on yield, transpirational water-use efficiency, and carbon isotope discrimination of pearl millet. **Crop Science**, v.40, p. 120–125, 2000.

CAKMAK, I. Role of zinc in protecting plant cells from reactive oxygen species. **New Phytologist**, v. 146, p. 185–205, 2000.

CARR, M.K.V.; LOCKWOOD, G. The water relations and irrigation requirements of cocoa (*Theobroma cacao* L.): A review. **Experimental Agriculture**, v.47 (4), pp. 653-676, 2011.

CARVALHO, M. H. C. Drought Stress and Reactive Oxygen Species. **Plant Signaling & Behavior**, v.3(3), p. 156-165. 2008.

CHAO, Y.-Y.; CHOU, T.-S.; KAO, C. Involvement of abscisic acid and hydrogen peroxide in regulating the activities of antioxidant enzymes in leaves of rice seedlings under magnesium deficiency . **Plant Growth Regulation**, v. 66, n. 1, p. 1-8, 2012.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology** v. 30, p. 239–264, 2003.

CHEESMAN, E. E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationship of cocoa populations. **Tropical Agriculture**, v. 21, p. 144-159, 1944.

CHRISTMANN, A.; MOES, D.; HIMMELBACH, A.; YANG, Y.; TANG, Y.; GRILL, E. Integration of abscisic acid signalling into plant responses. **Plant Biology**, v.8(3), p. 314–25, 2006.

CHRISTOPHER, D. A.; MULLET, J.E. Separate photosensory pathways co-regulate blue light/ultraviolet-A-activated *psbD-psbC* transcription and light-induced D2 and CP43 degradation in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplasts. **Plant Physiology** v.104, p. 1119–1129, 1994.

CUTLER, S. R.; RODRIGUEZ, P. L.; FINKELSTEIN, R. R.; ABRAMS, S. R. Abscisic acid: emergence of a core signalling network. **Annual Review Plant Biology**, v. 61, p. 651-79, 2010.

DE NETTANCOURT, D. **Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants**. Berlin : Springer, 2000. 320p.

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

DING, Y.; LUO, W.; XU, G. Characterisation of magnesium nutrition and interaction of magnesium and potassium in rice. **Annals of Applied Biology**, v.149, p. 111–123, 2006.

FAO, Area harvested and production of cereals 2009. Source. **FAO Statistical Yearbook**. 2010. Disponível em: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/ess-yearbook2010/yearbook2010-production/en/>. Acesso em: 16 de dez. de 2011.

FIELDES, M.A.; GERHARDT, K.E. Flax guaiacol peroxidases can be used to illustrate the possibility of misinterpreting the effects of stress on the activity of developmentally regulated enzymes. **Plant Science**, v. 132, p. 89-99, 1998.

FLEXAS, J.; RIBAS-CARBÓ, M.; HANSON, D. T.; BOTA, J.; OTTO, B.; CIFRE, J.; McDOWELL, N., MEDRANO, H.; KALDENHOFF, R. Tobacco aquaporin Nt AQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ in vivo. **Plant Journal**., v.48 (13), p. 427-439, 2006.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. **Antioxidants Redox Signal**, v.11, p. 861-905, 2009.

FREY, A.; EFFROY, D.; LEFEBVRE, D.; SEO, M.; PERREAU, F.; BERGER, A.; SECHET, J.; TO, A.; NORTH, H. M.; MARION-POLL, A. Epoxycarotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members. **The Plant Journal**, v. 70-3, p. 501–512, 2012.

FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas para Condições de Estresses Abióticos**. Viaconde do Rio Branco: Suprema, 2011, 250p.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SATOH, R.; MARUYAMA, K.; PARVEZ, M. M.; SEKI, M.; et al. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. **Plant Cell**, v.17, p. 3470–3488, 2005.

GARCÍA-SANCHEZ, F.; SYVERTSEN, J.P.; GIMENO, V.; BOTIA, P.; PEREZ-PEREZ, J.G. Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstocks seedlings with different water-use efficiency. **Physiol. Plant.**, v.130, p. 532–542, 2007.

GASPAR, T.; PENEL, C.; CASTILLO, F.J.; GREPPIN, H. A. Two step control of basic and acidic peroxidase and significance for growth and development. **Physical Plant**, v. 64, p. 418-423, 1985.

GEIGER, D.; SCHERZER, S.; MUMM, P.; STANGE, A.; MARTEN, I.; BAUER, H.; ACHE, P.; MATSCHI, S.; LIESE, A.; AL-RASHEID, K.A.S.; ROMEIS, T.; HEDRICH, R. Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA v.106, p. 21425–21430, 2009.

GIARDI, M. T.; CONA, A.; GEIKEN, B.; KUCERA, T.; MASOJÍDEK, J.; MATTOO, A. K. Long-term drought stress induces structural and functional reorganization of photosystem II. **Planta** v.199, p. 118-125, 1996.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.5, p. 26–33. 2010;

GOLDBERG, R.; IMBEERTY, A.; LIBERMAN, M.; PRAT, R. Relationship between peroxidatic activities and cell plasticity. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPER JR. T. (eds.). **Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases**. University of Geneva, Switzerland, p. 208-220. 1986.

GOMEZ-CADENAS, A.; TADEO, F.R.; TALON, M.; PRIMO-MILLO, E.. Leaf abscission induced by ethylene in water stressed intact seedling of (*Citrus reshni* Hort ex Tan) requires previous abscisic acid accumulation in roots. **Plant Physiology**, v.112, p. 401–408, 1996.

GRISEBACH, H.L. In: CONN, E.E. (ed.). **The Biochemistry of plants**. New York: Academy Press., v. 7, p. 457-458. 1981.

GUO, X. Y.; ZHANG, X. S. ; HUANG, Z. Y. Drought tolerance in three hybrid poplar clones submitted to different watering regimes. **Journal of Plant Ecology**, v.3, n.2, pp. 79-87, 2010.

HANBA, Y. T.; SHIBASAKA, M.; HAYASHI, Y.; HAYAKAWA, T., KASAMO, K.; TERASHIMA, I.; KATSUHARA, M. Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO₂ conductance and CO₂ assimilation in the leaves of transgenic rice plants. **Plant Cell Physiol.**, v.45, p. 521-529, 2004.

HÄNSCH, R.; MENDEL, R.R.. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p. 259–266, 2009.

HENZLER, T.; WATERHOUSE, R. N.; SMYTH, A. J.; CARVAJAL, M.; COOKE, D. T.; SCHÄFFNER, A. R.; STEUDLE, E.; CLARKSON, D. T. Diurnal variations in hydraulic conductivity and root pressure can be correlated with the expression of putative aquaporins in the roots of *Lotus japonicus*. **Planta**, v.210, p. 50 – 60, 1999.

HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. **Trends Plant Science**, v.12 (8), p. 343-51, 2007.

HU, Y.; SCHMIDHALTER, U. Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science** v.168, p. 541–549, 2005.

HU, Y.; SCHMIDHALTER, U. Spatial distributions and net deposition rates of mineral elements in the elongating wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf under saline soil conditions. **Planta**, v. 204, p. 212–219, 1998.

HUANG, D.; WU, W.; ABRAMS, S. R.; CUTLER, A. J.. The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 11, pp. 2991–3007, 2008.

HUNT, R. **Growth analysis – plant growth analysis for beginners**. Unwin Hyman. London. 112p, 1990.

ICCO- INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. **Growing Cocoa**. Disponível em: <<http://www.icco.org/about/growing.aspx> > Acesso em: 04 de jan. de 2012.

ICCO- INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. **Impact of el niño / la niña weather events on the world cocoa economy ex/142/7**, London, 2010.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol**, v. 47, p. 377–403, 1996.

JACKSON, M. L. Nitrogen determinations for soil and plant tissue. In: **Soil chemical analysis**. Englewood Cliffs Prentice – Hall. 1958. p.183-204.

JAVOT, H.; MAUREL, C. The role of aquaporins in root water uptake. **Annals Botany**, v. 90, p. 301–313, 2002.

JIANG, M.; ZHANG, J. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p. 2401–2410, 2002.

JOHANSSON, I.; LARSSON, C.; EK, B.; KJELLBOM, P. The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca^{2+} and apoplastic water potential. **Plant Cell**. v. 8, p. 1181-1191, 1996.

JOLLY, W. M.; DOBBERTIN, M.; ZIMMERMANN, N. E.; REICHSTEIN, M. **Divergent vegetation growth responses to the 2003 heat wave in the Swiss Alps**, Geophysical Research Letters v.32, 2005.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

JOLY, R.; HAHN, D. An empirical model for leaf expansion in cacao in relation to plant water deficit. **Annals. Botany**, v.64, p. 1-8, 1989.

JOUILI H, E.L.; FERJANI, E. Changes in antioxidant and lignifying enzyme activities in sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) stressed with copper excess. **Comptes Rendus Biologies**, v.326, p. 639-644. 2003.

JUBANY, M.T.; MUNNE, B.S.; ALEGRE, L. Redox regulation of water stress responses in field-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate. **Plant Physiology Biochemistry**, p.48 (5), p. 351-358, 2010.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan, 2004. 452p.

KHANNA-CHOPRA, R. Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen species-mediated chloroplast degradation. **Protoplasma**. 2011. DOI: 10.1007/s00709-011-0308-z

KLINGLER, J. P.; BATELLI, G.; ZHU, J. K. ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signaling. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 3199-3210, 2010.

KOZLOWSKI, T.T.; PALLARDY, S.G. Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. **Botanical Review**, New York, v.68, p.270-334, 2002.

LANDHÄUSSER, S. M.; WEIN, R. W.; LANGE, P. Gas exchange and growth of three arctic tree-line tree species under different soil temperature and drought preconditioning regimes. **Canadian Journal of Botany**, v.74:(5), p. 686-693, 0.1139/b96-087, 1996.

LEE, B-R.; KIM, K-Y.; JUNG, W-J.; AVICE, J-C.; OURRY, A., KIM, T-H. Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). **Journal of Experimental Botany** , v.58 (6), p.1271-1279. 2007.

LEI, Y.; YIN, C.; LI, C.. Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. **Physiologia Plantarum**, v.127, p. 182–191, 2006.

LI, C.; WANG, K. Differences in drought responses of three contrasting *Eucalyptus microtheca* F. Muell. populations. **Forest Ecology and Management**, v. 179, p. 377–85, 2003.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DC T method. **Methods**, v.25, p. 402–408, 2001.

Lynch, J. P.; Clair, S. B. S. Mineral stress: the missing link in understanding how global climate change will affect plants in real world soils. **Field Crops Research**, v. 90, p. 101–115, 2004.

MA, Y.; SZOSTKIEWICZ, I.; KORTE, A.; MOES, D.; YANG, Y., et al. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. **Science** v.324, p. 1064–1068, 2009.

MAATHUIS, F. J. M. Physiological functions of mineral macronutrients. **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p. 250–258, 2009.

MACROBBIE, E.A. Signal transduction and ion channels in guard cells. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 353, p.1475–1488, 1998.

MAGALHÃES, A.C.N. Análise quantitativa do crescimento. In: FERRI, M.G. (Coord.). **Fisiologia Vegetal**. São Paulo:EPU, v.1, 1979. 362p.

MAHDIEH, M.; MOSTAJERAN, A.; HORIE, T.; KATSUHARA, M.. Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. **Plant Cell Physiology**, v.49(5), p. 801–813, 2008.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres, 1980. 215p.

MANIVANNAN, P.; C.A. JALEEL, R.; SOMASUNDARAM; R. PANNEERSELVAM. Osmoregulation and antioxidant metabolism in drought stressed *Helianthus annuus* under triadimefon drenching. **Comp. Rend. Biol.**, v. 331, p. 418–425, 2008.

MARITA, J.M.; NIENHUIS J.; PIRES J.L.; AITKEN, W.M. Analysis of genetic diversity in *Theobroma cacao* with emphasis on witches' broom disease resistance. **Crop Science**, v.41, p. 1305-1316, 2001.

MARRON, N.; DREYER, E.; BOUDOURESQUE, E.; DELAY, D.; PETIT, J.-M.; FRANCIS M.; DELMOTTE, F. M.; BRIGNOLAS, F. Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf area of two *Populus x canadensis*

(Moench) clones, 'Dorskamp' and 'Luisa_Avanzo' **Tree Physiology**, v. 23, p. 1225–1235, 2003.

MARSCHNER, H.; ROMHELD, V., Strategies of plants for acquisition of Iron. **Plant Soil**, v. 165, p. 261–274, 1994.

MARTINS, D.V. **Variação sazonal de alguns elementos minerais na seiva xilemática do cacauero (*Theobroma cacao* L.)**. 1976. Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1976.

MARTRE P.; NORTH G.B.; NOBEL P.S. Hydraulic conductance and mercury-sensitive water transport for roots of *Opuntia acanthocarpa* in relation to soil drying and rewetting. **Plant Physiol.**, v. 26, p. 352–362, 2001.

MCCARTY, D.R.; CHORY, J. Conservation and innovation in plant signaling pathways. **Cell**, v.103, p. 201–209, 2000.

MCNEIL, C.L. **Chocolate in Mesoamerica: A Cultural History of Cacao**. Univ Press of Florida, Gainesville, FL, 2006.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. 2.ed. Oxford: Clarendon Press, v.1. 1979.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trens Plant**, v.7, p. 405-410. 2002.

MØLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress. Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v.52, p. 561–91, 2001.

MORAES, M. A.; ZANATT, A. C. S.; MORAES, E.; FREITAS, M. L. M. Variação genética para caracteres silviculturais em progênies de polinização aberta de *Eucalyptus camaldulensis* em Luiz Antonio-SP. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.19, n.2, p.113-118, 2007.

MUÑOZ, F.; BEER, J. Fine root dynamics of shaded cacao plantations in Costa Rica. **Agrofor. Syst.** v. 1, p. 119-130, 2001.

MURAKAMI, R.; IFUKE, K.; TAKABAYASHI, A.; SHIKANAI, T.; ENDO, T.; SATO, F. Functional dissection of two *Arabidopsis* PsbO proteins PsbO1 and PsbO2. **FEBS Journal**, v. 272, p. 2165-2175, 2005.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, M. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. **Annual Review of Plant Biology**, v.56, p. 165–185. 2005.

NASH, L. J.; GRAVES, W. R. Drought and Flood Stress Effects on Plant Development and Leaf Water Relations of Five Taxa of Trees Native to Bottomland Habitats. **J. AMER. SOC. HORT. SCI.** v. 118(6), p. 845-850. 1993.

NEPOMUCENO, A.L.; STEWART, J.M.; OOSTEHUIS, D.M.; TURLEY, R.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J.R. B. Isolation of a cotton NADP(H) oxidase homologue induced by drought stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35(7), p.1407-1416, 2000.

PANDA, S. K.; S.K.; KHAN, M. H. Growth, Oxidative Damage and Antioxidant Responses in Greengram (*Vigna radiata* L.) under Short-term Salinity Stress and its Recovery. **Journal of Agronomy and Crop Science**. v 195, p. 442–454, 2009.

PAVAN, M. A; BINGHAM, F.T. Toxidez de metais em plantas. I. Caracterização de toxidez de manganês em cafeeiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 16, n.6, p.825-821, 1981.

PENG, Y.H.; LIN, W.L.; CAI, W.M.; ARORA, R. Overexpression of a panax ginseng tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. **Planta** v.226, p. 729–740, 2007.

PENNISI, E. Stressed Out Over a Stress Hormone. **Science**, 324 (5930), p. 1012-1013, 2009.

PEREIRA, M.G., MONTERIRO, W.R., PIRES, J.L. Melhoramento do cacau. In: Borém, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, p.159-188. 1999.

PEUKE, A. D.; RENNENBERG, H. Impacts of drought on mineral macro- and microelements in provenances of beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings. **Tree Physiology**, v.31, p. 196–207, 2011.

PIROVANI C. P.; CARVALHO H. A.; MACHADO R. C.; GOMES D. S.; ALVIM F. C.; POMELLA, A. W.; GRAMACHO, K. P.; CASCARDO, J. C.; PEREIRA, G. A.; MICHELI, F. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis**, v. 29 (11), p. 2391-401, 2008.

RADFORD, R. J. Growth analysis formula their use and abuse. **Crop Science** v.7, p. 171-175. 1967.

RAGHAVENDRA , A.S.; GONUGUNTA , V.K.; CHRISTMANN , A.; GRILL , E. ABA perception and signalling. **Trends Plant Science**. v.15, p. 395 – 401, 2010.

RASCHER, U.; BOBICH, E.G.; LIN, G.; et al.. Functional diversity of photosynthesis during drought in a model tropical rainforest – the contributions of leaf area, photosynthetic electron transport and stomatal conductance to reduction in net ecosystem carbon exchange. **Plant Cell and Environment**, v.27, p. 1239–1256, 2004.

REGIER, N.; STREB, S.; COCOZZA, C.; SCHAUB. M.; CHERUBINI, P.; ZEEMAN, S. C.; FREY, B. Drought tolerance of two black poplar (*Populus nigra* L.) clones: contribution of carbohydrates and oxidative stress defence. **Plant, Cell and Environment**, v.32, p. 1724–1736, 2009.

REHEM, B. C.; ALMEIDA, A-A. F.; SANTOS, I. C.; GOMES, F. P.; PIROVANI, C.P.; MANGABEIRA, P.A.O.; CORRÊA, R.X., M.M. YAMADA, R.X., VALLE, R.R. Photosynthesis, chloroplast ultrastructure, chemical composition and oxidative stress in *Theobroma cacao* hybrids with the lethal gene *Luteus-Pa* mutant. **Photosynthetica** , v.49 (1), p. 127-139, 2011.

RICHARDS, F.J. The quantitative analysis of growth. In: STEWARD, F. C. (Ed.) **Plant physiology: a treatise**, New York: Academic Press, 1969.

RIVERO, R.M.; RUIZ, J.M.; GARCÍA, P.C.; LÓPEZ-LEFEBRE, L.R.; SÁNCHEZ, E.; ROMERO, L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Science**, v. 160, p. 315-321, 2001.

RODRIGUES, J.D.; RODRIGUES, S.D.; PEDRAS, J.F.; DELACHIAVE, M.E.A.; BOARO, C.S.F.; ONO, E.O. Diferentes níveis de cálcio e o desenvolvimento de plantas de estilosantes (*Stylosanthes guyanensis* (Aubl.) Sw. cv "Cook"). **Scientia agricola (Piracicaba, Braz.)**, v.50, n.2, pp. 166-175, 1993.

RODRÍGUEZ-GAMIR, J.; ANCILLO, G.; APARICIO F.; BORDAS, M.; PRIMO-MILLO, E.; FORNER-GINER, M. Á. Water-deficit tolerance in citrus is mediated by the down regulation of PIP gene expression in the root. **Plant Soil**, 2011.

ROSOLEM, C.A. Nutrição mineral e adubação da soja. Piracicaba: POTAFOS80p. (POTAFOS. Boletim Técnico, 6), 1980.

RUCKER, K.S.; KVIEN, C.K.; HOLBROOK, C.C. AND WOOD, J.E. Identification of peanut genotypes with improved drought avoidance traits. **Peanut Science**, v. 22, p. 14-18, 1995.

RUIZ, J.M.; BRETONES, G.; BAGHOUR, M.; RAGALA, L.; BELAKBIR, A., ROMERO, L. Relationship between boron and phenolic metabolism in tobacco leaves. **Phytochemistry** v. 48, p.269-272, 1998.

SAIBO, N. J. M.; TIAGO LOURENÇO, T.; OLIVEIRA, M. M. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. **Annals of Botany**, v. 103, p. 609–623, 2009.

SAKAMOTO, H.; MARUYAMA, K.; SAKUMA, Y.; MESHII, T.; IWABUCHI, K. S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis cys2/his2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. **Plant Physiology**, v.136, p. 2734-2746, 2004.

SANCHEZ-RODRIGUEZ, E.; RUBIO-WILHELMI, M.M.; CERVILLA, L. M.; BLASCO, B.; RIOS, J.J.; LEYVA, R.; et al. Study of the ionome and uptake fluxes in cherry tomato plants under moderate water stress conditions. **Plant Soil**, v. 335, p. 339–47, 2010.

SANCHEZ-RODRIGUEZ, E.; RUBIO-WILHELMI, M. M.; RIOS, J. J.; BLASCO, B.; ROSALES, M. A.; MELGAREJO, R.; ROMERO, L.; RUIZ, J. M. Ammonia production and assimilation: Its importance as a tolerance mechanism during moderate water deficit in tomato plants. **Journal of Plant Physiology**, v.168, p. 816–823, 2011.

SCHOLANDER, P.F.; HAMMEL, H.T.; BRADSTREET, E.D.; HEMMINGSEN, E. A. Sap pressure in vascular plants. **Science**, v. 148, p. 339–46, 1965.

SCHROEDER, J. I.; ALLEN, G. J.; HUGOUVIEUX, V.; KWAK, J. M.; WANER, D. Guard cell signal transduction. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v.52, p. 627–658, 2001.

SEKI, M.; ISHIDA, J.; NARUSAKA, M.; FUJITA, M.; NANJO, T.; UMEZAWA, T.; et al. Monitoring the expression pattern of around 7,000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. **Funct. Integr. Genomics**, v.2, p. 282–291, 2002.

SEO, M.; AOKI, H.; KOIWAI, H.; KAMIYA, Y.; NAMBARA, E.; KOSHIBA, T. Comparative Studies on the Arabidopsis Aldehyde Oxidase (AAO) Gene Family Revealed a Major Role of AAO3 in ABA Biosynthesis in Seeds. **Plant Cell Physiology**, v.45(11), p. 1694–1703. 2004.

SHANG, Y.; YAN, L.; LIU, Z.; CÃO, Z.; MEI, C.; XIN, Q. The Mg-chelatase H subunit of Arabidopsis antagonizes a group of transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition. **Plant Cell**, v.22, p.1909-1935, 2010.

SHAUL, O. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. **Biometals**, v.15, p. 309–323, 2002.

SILVA, W.; KUMMEROW, J. Fine-root growth and longevity in a cacao (*Theobroma cacao* L.) plantation. **Agrotrópica**, v.10, p. 31-34, 1998.

SNUSTAD, P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética** - 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 903p.

SOUZA JR. J. O.; MENEZES, A. A. Identificação de características físicas de solo e espaciais que influenciam a morte de cacauzeiros (*Theobroma cacao*) em anos secos, em Itagibá-BA. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE MANEJO E CONSERVAÇÃO DO SOLO E DA ÁGUA, 13, Ilhéus, 2000. **Anais...** Ilhéus. SBCS. 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2009. 719p.

TAN, B-C.; JOSEPH, L. M.; DENG, W-T.; LIU, L.; LI, Q-B.; CLINE, K.; MCCARTY, D. R. Molecular characterization of the arabidopsis 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. **The Plant Journal**, v.35, 44-46, 2003.

TSCHAPLINSKI, T.J.; TUSKAN, G.A. GEBRE, G.M.; TODD, D.E.. Drought resistance of two hybrid *Populus* clones grown in a largescale plantation. **Tree Physiology**. v. 18, p. 653–658, 1998.

TUDELA, D.; PRIMO-MILLO, E. 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Transported from Roots to Shoots Promotes Leaf Abscission in Cleopatra Mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) Seedlings Rehydrated after Water Stress 1. **Plant Physiology**, v.100 (1), p. 131-137, 1992.

TUTEJA, N.; SOPORY, S.K. Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, p.525–536, 2008.

TYERMAN, S. D.; NIEMIETZ, C. M.; BRAMLEY, H. Plant aquaporines: multifunctional water and solute channels with expanding roles. **Plant Cell Environmental**, v. 25, p. 173-194, 2002.

UEHLEIN, N.; LOVISOLO, C.; SIEFRITZ, F.; KALDENHOFF, R. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ transporter with physiological functions. **Nature**, v. 425, p. 734-737, 2003.

UMEZAWA, T.; NAKASHIMA, K.; MIYAKAWA, T.; KUROMORI, T.; TANOKURA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular basis of the core regulatory network in abscisic acid responses: sensing, signaling, and transport. **Plant Cell Physiology**, v.51, p.1821–1839, 2010.

VAUGHN, K. C.; LAX, A. R.; DUKE, S. O. Polyphenol oxidase: The chloroplast oxidase with no established function. **Physiologia Plantarum**. v.72, n.3, p. 659–665, 1988.

VELOSO, C.A.C. et al . Influência do manganês sobre a nutrição mineral e crescimento da pimenteira do reino (*Piper nigrum*, L.). **Scientia agrícola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, 1995.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. Associação entre caracteres. In: VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto : Sociedade Brasileira de Genética, 1992. p. 335-486.

VERA-ESTRELLA, R.; BARKLA, B. J.; BOHNERT, H. J.; PANTOJA, O. Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. **Plant Physiology**. v. 135, p. 2318-2329, 2004.

VELLO F.; MARIANO A.H.; GARCIA J. R.; NASCIMENTO I.F.; MAGALHÃES W.S. O programa de melhoramento genético do cacau na Bahia. In: International Cocoa Research Conference, 2, Proceedings. CEPLAC, Salvador/Itabuna, p. 43-56, 1969.

WANG, Y.; WU, W-H. Plant sensing and signaling in response to k⁺- deficiency. **Molecular Plant**, v. 3 , n.2, p. 280–287, 2010.

WARAICH, E. A.; AMAD, R.; ASHRAF, M. Y.; SAIFULLA, H.; AHMAD, M . Improving agricultural water use efficiency by nutrient management. **Acta Agri Scandi – Soil & Plant Science**, v.61(4), p. 291-304. 2011.

WARD, J. H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **J. Am. Statist. Assoc.** v.58, p. 236-244, 1963.

WHITE, P.J.; BROADLEY, M.R. Calcium in plants. **Annals. Botany**, (Lond.) v. 92, p. 487–511. 2003.

WILKINSON, S.; DAVIES, W. J. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p. 195–210, 2002.

XIAO, X.; XU, X.; YANG, F. Adaptive responses to progressive drought stress in two *Populus cathayana* populations. **Silva Fennica**, v.42(5), p. 705–719. 2008.

XIONG, L.; LEE, H.; ISHITANI, M.; ZHU, J. Regulation of Osmotic Stress-responsive Gene Expression by the *LOS6/ABA1* Locus in *Arabidopsis*. The **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 10, pp. 8588–8596, 2002.

XUE, T.; WANG, D.; ZHANG, S.; EHLTING, J.; NI, F.; JAKAB, S.; ZHENG, C.; ZHONG, Y. Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and *Arabidopsis*. **BMC Genomics**, v.9, 550, 2008.

YANG, Y.; YAO, Y.; XU, G.; LI, C. Growth and physiological responses to drought and elevated ultraviolet-B in two contrasting populations of *Hippophae rhamnoides*. **Physiol. Plant**. v.124, p. 431–440, 2005.

YIN, C.; WANG, X.; DUAN, B. et al. Early growth, dry matter allocation and water use efficiency of two sympatric *Populus* species as affected by water stress. **Environ Exp Bot** , v. 53, p. 315–22, 2005.

ZHU, J K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 53, p. 247–273, 2002.

ZHANG, D; GARDINI, E. A.; MOTILAL, L. A.; BALIGAR, V; BAILEY, B; ZUÑIGA-CERNADES, L; AREVALO-AREVALO, C. E.; MEINHARDT, L. Dissecting Genetic Structure in Farmer Selections of Theobroma Cacao in the Peruvian Amazon: Implications for on Farm Conservation and Rehabilitation. **Tropical Plant Biol.** 2011.

ZOBEL, R. W.; KINRAIDE, T. K.; BALIGAR, V. B. Fine root diameters can change in response to changes in nutrient concentrations. **Plant Soil**, v.297, p.243–254, 2007.

APÊNDICE

Apêndice A- Matriz das distâncias Euclidianas entre 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias, a partir da diferença entre os tratamentos controle e seca, para as variáveis de crescimento, estresse oxidativo (POD e PPO) e composição química.

Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
AMZ -15.1	1																									
BE-08	2	9,1																								
C. SUL-3	3	7,3	6,72																							
C. SUL-4	4	8,9	9,51	8,31																						
CA-1	5	7,0	7,41	5,76	10,4																					
CA-3	6	7,1	9,39	8,53	10,6	5,6																				
CAB-139	7	7,7	8,97	7,19	4,4	8,6	9,3																			
CAB-274	8	8,0	6,55	4,30	8,5	5,9	8,0	7,6																		
CAT	9	9,1	7,09	7,28	9,9	7,8	9,0	9,0	6,22																	
CC- 40	10	7,2	8,96	7,44	6,2	7,4	7,7	4,9	7,54	7,8																
EET-103	11	5,8	7,49	7,41	8,2	7,2	7,5	7,0	5,79	6,0	7,3															
EET-53	12	10,0	5,95	6,45	10,9	7,3	9,7	9,7	5,13	5,7	10,1	6,78														
EQX-107	13	9,0	8,42	4,44	8,8	7,8	9,9	8,3	6,31	9,8	9,6	8,95	8,1													
GU-114	14	8,0	7,77	4,15	7,4	7,6	8,9	6,0	5,95	8,6	7,6	7,67	7,8	5,4												
ICS-9	15	10,5	8,44	8,12	10,8	8,7	9,9	10,7	6,98	6,1	9,9	8,12	7,1	10,1	8,79											
ICS-98	16	7,3	7,89	5,11	9,2	6,1	7,5	7,8	5,78	6,2	7,3	6,37	7,0	7,8	6,12	6,8										
IMC-27	17	8,6	6,14	4,52	9,1	6,6	8,8	7,7	3,83	6,7	8,4	6,60	5,5	5,3	5,36	8,0	6,55									
IMC-76	18	8,3	8,76	6,64	6,8	9,2	9,7	7,1	8,37	9,7	7,8	8,98	10,4	6,7	7,28	10,5	8,46	7,65								
MA-14	19	8,6	7,09	4,61	9,9	6,9	10,3	8,9	4,24	6,5	9,2	6,73	4,6	6,5	6,85	7,8	6,79	4,89	9,4							
MA-15	20	7,9	6,93	6,40	10,5	6,8	8,2	9,6	5,58	4,7	9,3	5,38	5,6	8,2	7,57	6,4	5,79	5,69	9,9	5,4						
MO-20	21	8,6	7,40	5,53	9,7	7,4	9,9	8,3	5,16	6,3	9,1	6,27	5,6	7,4	5,70	7,1	6,66	5,11	9,9	4,3	4,6					
MOC-2	22	8,5	8,60	6,54	8,8	6,6	8,1	8,1	7,40	10,1	8,6	8,51	9,8	6,6	6,32	9,0	7,66	7,10	7,9	8,5	8,2	7,54				
OC-77	23	8,4	8,20	6,43	12,1	5,5	8,6	10,4	6,20	6,5	9,6	7,28	5,7	8,7	8,32	8,8	6,88	6,51	11,2	5,0	5,1	5,91	9,6			
PA-13	24	10,8	8,71	7,89	10,7	9,3	10,3	10,2	6,29	4,8	10,0	7,09	6,0	9,4	8,48	6,1	7,44	6,63	10,7	6,8	4,6	5,54	10,2	7,4		
PA-150	25	9,9	5,58	6,08	10,2	6,4	7,8	9,6	5,25	5,7	8,8	7,73	5,0	7,8	7,27	6,0	5,82	5,96	9,5	6,5	5,6	6,82	8,0	7,0	6,7	

Continua...

Apêndice A- Continuação...

Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
PS-1319	26	9,2	7,66	7,69	9,8	8,6	8,9	9,2	6,53	4,9	9,1	5,88	6,6	9,2	8,05	6,6	5,94	6,74	9,4	6,9	4,5	6,33	8,9	7,7	5,5	5,6
RB-39	27	8,9	7,90	6,32	12,1	5,3	8,3	10,4	6,11	7,7	9,6	7,78	6,6	7,9	7,33	8,5	7,17	5,66	11,0	5,7	5,6	5,75	7,7	4,3	8,0	6,4
RB-48	28	8,1	6,45	5,27	8,7	5,2	6,9	7,4	5,88	9,1	7,2	8,15	7,9	6,1	6,44	10,2	6,74	5,96	7,3	8,0	8,8	8,82	7,0	8,4	10,5	6,6
RIM-6	29	9,2	7,49	7,17	10,2	6,8	7,9	8,9	6,43	6,4	8,9	6,72	6,6	8,6	7,13	8,0	6,62	5,99	9,7	6,8	5,0	6,05	8,0	6,3	6,5	5,9
SCA-6	30	10,0	6,85	7,78	8,7	8,3	8,9	7,6	7,34	5,3	7,1	7,41	7,8	9,3	8,27	8,3	6,82	6,58	8,2	8,8	7,2	7,92	8,9	9,3	7,2	6,5
SIAL-169	31	8,6	5,57	3,80	10,1	6,4	9,0	9,2	4,97	6,5	8,8	7,59	5,7	5,8	6,00	7,5	5,74	4,09	7,5	5,2	5,7	6,00	7,6	6,2	7,0	5,0
SIC-17	32	7,9	7,85	6,90	7,1	7,6	8,5	5,5	7,38	7,7	5,5	7,08	8,7	7,6	6,88	9,8	7,19	6,87	6,4	8,1	8,6	8,19	7,7	9,3	9,5	7,7
SIC-2	33	7,6	5,85	6,08	6,5	6,2	7,2	6,1	5,56	7,2	5,0	6,72	7,6	7,8	6,37	7,6	6,63	6,54	7,6	7,9	7,7	7,52	7,1	8,7	8,5	6,4
SPA-5	34	7,6	5,97	6,47	10,4	4,8	6,1	9,1	5,94	5,9	8,4	5,88	5,4	8,1	7,35	6,5	5,21	6,12	9,5	6,7	4,4	6,45	7,4	5,6	7,1	4,2
TSA-792	35	7,2	6,15	4,31	7,5	6,3	7,6	6,9	3,63	5,4	7,0	4,96	5,9	5,9	4,90	6,5	4,81	3,73	6,8	5,1	4,4	4,51	6,1	6,6	5,6	5,3
TSH-1188	36	9,9	4,72	6,61	10,6	6,0	7,8	9,6	6,37	7,4	9,5	8,14	5,9	8,2	7,33	7,7	6,92	5,93	10,0	7,5	6,1	7,20	7,6	7,3	7,9	4,3

Continua...

Apêndice A- Continuação...

Genótipos	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
PS-1319	26										
RB-39	27	7,87									
RB-48	28	9,42	7,7								
RIM-6	29	4,91	5,8	8,1							
SCA-6	30	6,46	9,3	7,7	7,1						
SIAL-169	31	6,90	5,7	5,9	6,7	7,05					
SIC-17	32	7,32	8,7	6,7	7,2	6,37	7,6				
SIC-2	33	8,38	8,3	5,4	8,0	6,38	6,9	6,55			
SPA-5	34	5,71	5,3	6,6	4,9	6,88	5,5	7,61	6,24		
TSA-792	35	4,78	6,2	6,3	5,0	5,88	4,6	6,02	5,52	5,3	
TSH-1188	36	7,58	6,5	6,2	6,4	7,01	5,6	8,88	6,31	4,4	6,34

Apêndice B- Matriz das distâncias Euclidianas entre 36 genótipos de *Theobroma cacao* L. submetidos à deficiência hídrica no solo por 60 dias, a partir da diferença entre os tratamentos controle e seca, para as variáveis não colineares AFP, BPA, BT, TCR, AR, N, Ca e Mg.

Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
AMZ -15.1	1																									
BE-08	2	4,34																								
C. SUL-3	3	3,11	3,93																							
C. SUL-4	4	3,95	6,61	5,35																						
CA-1	5	3,61	3,19	2,89	6,50																					
CA-3	6	3,09	2,83	3,76	6,21	1,74																				
CAB-139	7	3,62	6,59	5,15	2,39	5,74	5,49																			
CAB-274	8	3,74	3,11	2,26	5,59	2,66	3,36	5,10																		
CAT	9	4,63	2,89	3,23	6,16	3,23	3,74	5,72	1,32																	
CC- 40	10	2,68	5,22	3,74	2,37	4,59	4,42	2,13	4,12	4,67																
EET-103	11	3,92	4,05	4,73	5,07	4,51	3,89	4,20	3,22	3,23	4,08															
EET-53	12	5,46	2,88	4,33	7,71	3,35	3,70	7,03	2,57	1,99	6,16	3,85														
EQX-107	13	2,39	3,02	2,05	4,95	3,39	3,38	5,17	2,89	3,65	3,69	4,25	4,52													
GU-114	14	3,01	4,36	2,05	4,54	3,50	3,96	3,80	2,17	2,93	2,90	3,46	4,24	2,92												
ICS-9	15	5,19	3,27	3,68	6,54	3,08	3,88	6,08	1,99	1,33	5,01	4,05	2,38	4,34	3,63											
ICS-98	16	3,63	4,10	1,29	5,37	3,35	4,18	5,03	1,67	2,52	3,89	4,18	3,85	2,71	1,53	3,19										
IMC-27	17	3,53	2,59	3,01	5,58	3,15	3,08	5,01	1,78	1,78	4,04	2,41	2,50	2,83	2,30	2,83	2,55									
IMC-76	18	3,29	5,34	4,75	2,79	5,89	5,33	4,12	5,46	5,91	2,71	5,24	7,25	3,63	4,60	6,42	5,20	5,04								
MA-14	19	4,46	3,57	2,23	6,50	2,94	3,93	5,97	1,23	1,67	4,89	4,14	2,55	3,34	2,50	2,29	1,52	2,31	6,21							
MA-15	20	5,12	2,80	3,45	7,38	3,11	3,72	6,85	2,08	1,57	5,71	4,09	1,33	3,86	3,66	2,22	2,99	2,27	6,74	1,66						
MO-20	21	4,79	4,21	3,62	6,61	2,93	3,74	5,47	1,96	2,08	4,93	3,53	2,46	4,57	2,91	2,17	2,94	2,61	6,82	2,11	2,52					
MOC-2	22	2,39	3,80	3,47	4,56	2,49	2,09	3,81	3,45	4,02	2,67	3,85	4,81	3,32	3,28	4,04	3,94	3,41	4,09	4,26	4,63	3,95				
OC-77	23	5,81	4,52	3,94	8,26	3,55	4,55	7,47	3,24	3,22	6,57	5,44	2,71	5,03	4,14	3,38	3,49	3,64	7,95	2,45	2,52	2,77	5,42			
PA-13	24	6,17	4,12	4,78	7,51	4,71	5,10	6,86	2,99	1,92	6,08	3,83	2,21	5,25	4,11	2,58	3,86	2,82	7,37	2,83	2,19	2,71	5,58	3,49		
PA-150	25	5,44	2,46	3,64	7,64	3,25	3,99	7,50	2,64	2,43	6,18	5,03	2,28	3,79	4,51	2,52	3,57	3,27	6,81	2,47	1,76	3,63	4,92	3,37	3,51	

Continua...

Apêndice B- Continuação...

Genótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
PS-1319	26	5,09	3,08	3,58	6,56	4,02	4,41	6,29	2,00	1,06	5,21	3,54	2,17	3,84	3,30	2,20	2,77	1,96	6,16	1,97	1,62	2,82	4,82	3,34	1,62	2,57
RB-39	27	5,54	3,50	3,97	8,26	3,30	3,87	7,51	3,26	2,96	6,37	4,95	2,14	4,50	4,20	3,41	3,73	2,99	7,43	2,60	1,67	3,12	5,06	2,11	3,09	2,87
RB-48	28	1,98	2,60	2,44	4,92	2,76	2,45	4,91	2,82	3,55	3,52	3,85	4,23	1,06	3,04	4,09	3,08	2,64	3,70	3,47	3,80	4,26	2,51	4,95	5,21	3,75
RIM-6	29	6,10	4,41	4,40	7,89	4,12	4,78	7,04	3,36	2,61	6,01	4,78	2,77	5,29	3,96	2,90	3,75	3,19	7,50	2,77	2,32	2,70	5,28	2,75	2,07	3,77
SCA-6	30	3,61	3,03	3,91	4,41	3,61	3,26	4,09	2,66	2,55	3,12	2,29	3,77	3,51	3,16	2,87	3,66	2,30	4,24	3,70	3,75	3,41	2,67	5,23	3,87	4,17
SIAL-169	31	4,54	2,71	2,84	6,51	3,94	4,31	6,55	2,31	2,31	5,25	4,22	2,97	2,65	3,32	3,31	2,50	2,24	5,60	2,15	2,14	3,81	4,83	3,70	3,31	2,34
SIC-17	32	2,48	3,91	3,98	3,34	4,57	3,83	3,75	4,18	4,49	2,26	3,72	5,64	2,85	3,53	5,06	4,25	3,44	1,85	4,98	5,29	5,35	2,86	6,53	5,86	5,58
SIC-2	33	2,56	3,18	3,41	4,11	2,91	2,47	3,86	3,13	3,51	2,53	3,48	4,51	2,97	3,18	3,60	3,72	2,97	3,56	4,06	4,36	3,97	1,26	5,37	5,13	4,51
SPA-5	34	4,73	2,19	3,67	7,29	2,54	2,84	6,69	2,28	1,99	5,62	3,81	1,05	3,75	3,86	2,40	3,46	2,17	6,58	2,32	1,18	2,59	4,09	2,76	2,83	1,93
TSA-792	35	3,39	2,80	2,48	5,06	3,00	3,19	4,64	1,53	1,58	3,39	2,82	3,00	2,65	1,84	2,45	2,04	1,06	4,58	2,10	2,46	2,61	3,05	3,78	3,00	3,28
TSH-1188	36	5,03	2,11	3,78	7,63	2,46	3,01	7,17	2,64	2,51	5,99	4,56	1,69	3,83	4,39	2,56	3,80	2,91	6,80	2,66	1,69	3,15	4,28	3,10	3,54	1,37

Continua...

Apêndice B- Continuação...

Genótipos	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
RB-39	27	2,94									
RB-48	28	3,94	4,39								
RIM-6	29	2,63	2,18	5,23							
SCA-6	30	3,18	4,77	3,03	4,45						
SIAL-169	31	1,84	3,12	3,09	3,76	3,79					
SIC-17	32	4,78	5,90	2,61	5,99	2,74	4,48				
SIC-2	33	4,22	5,03	2,23	5,13	1,82	4,27	2,19			
SPA-5	34	2,31	1,86	3,39	2,93	3,46	2,63	5,00	3,87		
TSA-792	35	1,98	3,31	2,56	3,14	1,99	2,35	3,11	2,54	2,58	
TSH-1188	36	2,90	2,34	3,47	3,57	3,88	2,88	5,36	4,07	1,04	3,15