

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



**RESPOSTAS MOLECULARES E MORFOFISIOLÓGICAS AO ESTRESSE POR
IRRADIÂNCIA EM *Theobroma cacao*: O PAPEL DAS ANTOCIANINAS**

ROMÁRIA PEREIRA DE ARAÚJO

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL

Março de 2012

ROMÁRIA PEREIRA DE ARAÚJO

**RESPOSTAS MOLECULARES E MORFOFISIOLÓGICAS AO ESTRESSE POR
IRRADIÂNCIA EM *Theobroma cacao*: O PAPEL DAS ANTOCIANINAS**

**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**

**Orientador: Prof. Dr. Alex-Alan
Furtado de Almeida**

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

ROMÁRIA PEREIRA DE ARAÚJO

**RESPOSTAS MOLECULARES E MORFOFISIOLÓGICAS AO ESTRESSE POR
IRRADIÂNCIA EM *Theobroma cacao*: O PAPEL DAS ANTOCIANINAS**

**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**

**Orientador: Prof. Dr. Alex-Alan
Furtado de Almeida.**

APROVADA: 16 de Março de 2012

**Prof. Dr. Rogério Ferreira Ribas
UFRB**

**Prof. Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa
UESC**

**Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani
UESC**

**Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida
UESC - Orientador**

A663

Araújo, Romária Pereira de.

Respostas moleculares e morfofisiológicas ao estresse por irradiância em *Theobroma cacao*: o papel das antocianinas / Romária Pereira de Araújo. – Ilhéus, BA: UESC, 2012.
xvii, 77f. : 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.

1. Plantas – Efeito da sombra. 2. Cacau – Melhoramento genético. 3. Antioxidante. 4. Fotossíntese. I. Título.

CDD 581.3

DEDICATÓRIA

À fonte dos meus melhores sentimentos, minha família, pai e mãe, Francisco e Rosália, meus amados irmãos, Fabíola, Fabrício e Ruan, e meus sobrinhos, Didigo e Malu, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela concessão à vida, e por todos os aprendizados proporcionados por ela.

A minha família, meus pais, Francisco e Rosália, meus irmãos, Fá, Bio e Ian, por estarem sempre ao meu lado, mesmo quando a distância física se faz necessário (muitas vezes), auxiliando na minha caminhada da melhor forma possível, e meus sobrinhos, que me apresentam a beleza da renovação da vida e muitas outras coisas belas.

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

Ao Professor Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida, pela qualidade da orientação recebida, transmitindo conhecimentos, não apenas científico, e pela enorme dedicação.

Ao professor Dr. Fábio Pinto Gomes, pela co-orientação, pela orientação na iniciação científica, e pela dedicação em ajudar sempre.

Ao Professor Dr. Dário Ahnert, pela co-orientação e ajuda.

À Professora Rosilene, pela ajuda com os flavonoides e antocianinas e pelos grandes ensinamentos, além dos metodológicos.

Ao Professor Carlos Pirovani, pela paciência em tirar dúvidas no CBG, ou nos corredores, ou na hora do almoço.

À Professora Delmira, ex-orientadora, e a Augusto, pelo auxílio nas análises anatômicas.

À Graci e Ilana, mais que amigas, sempre presentes em minhas alegrias e chateações, não só acadêmicas.

A todos os colegas de orientação, principalmente Ivanildes e Vânia, me ajudaram muito.

À Fabrícia, secretária do colegiado e pessoa espetacular, por sua compreensão e por fazer tudo ao seu alcance para me ajudar.

Aos alunos de iniciação científica, Yasmine e Alessandro, com a ajuda no campo.

Ao grupo *Jatropha*, orientando do Professor Fábio, que me ajudaram muito, principalmente nas diversões.

Aos colegas e amigos do Centro de Biotecnologia e Genética pelo apoio, paciência, fornecimento de materiais e momentos de descontração em meio ao trabalho.

A tios, tias, primos, primas, avós, que de forma direta e indireta contribuíram para o meu crescimento.

A Victor, meu namorado, que facilitou a conclusão deste trabalho com a sua presença.

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

ÍNDICE

EXTRATO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE FIGURAS	i
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.2. Theobroma cacao L.....	3
2.1.1. Características gerais.....	3
2.1.2. Histórico e Produção.....	4
2.1.3. Formas de cultivo.....	5
2.2. Estresse por irradiância	6
2.2.1. Efeitos da irradiância na anatomia foliar	7
2.2.2. Pigmentos cloroplastídicos.....	8
2.2.3. Fotossíntese.....	9
2.2.4. Estresse oxidativo induzido por irradiância	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	1
3.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	18
3.2. Trocas gasosas foliares.....	20
3.3. Fluorescência da clorofila	21
3.4. Anatomia foliar.....	21
3.5. Pigmentos cloroplastídicos	22
3.6. Flavonoides totais e Antocianinas	23
3.7. Peroxidases do Guaiacol.....	24
3.8. Expressão gênica	25
3.10. Análise estatística.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Trocas gasosas foliares.....	28
4.2. Emissão de fluorescência.....	30
4.2.1- Durante o estresse.....	30
4.2.2- Em folhas aclimatadas.....	32
4.3. Anatomia foliar.....	34

4.4. Pigmentos cloroplastídicos	36
4.5. Flavonoides totais e Antocianinas	40
4.6. Peroxidases do Guaiacol	44
4.7. Expressão gênica	47
5. DISCUSSÃO	55
5.1. Respostas durante o estresse	55
5.2. Plasticidade fenotípica e respostas moleculares no pós-estresse ..	58
6. CONCLUSÕES	67
7. REFERÊNCIAS.....	68

EXTRATO

ARAÚJO, Romária, P., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, março de 2012. **Respostas moleculares e morfofisiológicas ao estresse por irradiância em *Theobroma cacao*: o papel das antocianinas.** Orientador: Alex-Alan Furtado de Almeida. Co-orientador: Fábio Pinto Gomes. Co-orientador: Dário Ahnert.

A espécie *Theobroma cacao* L. é cultivada sob sombra em sistemas de 'Cabruca', agroflorestais e a pleno sol. A luz age isolada ou conjuntamente para controlar o desenvolvimento e a diferenciação durante a morfogênese, induzindo as plantas a desenvolver mecanismos de aclimação. Além disso, as plantas desenvolveram mecanismos de proteção enzimática e não-enzimática contra estresse por irradiância. Para determinadas espécies vegetais, o acúmulo de antocianinas em nível foliar protege este órgão contra a radiação UV-B em condições de alta irradiância. Objetivou-se, no presente trabalho, avaliar os efeitos do estresse por irradiância em três genótipos clonais de cacau ('Catongo', SCA-6 e SJ-02), contrastantes para os teores de antocianinas em nível foliar, por meio de avaliações da emissão de fluorescência da clorofila *a*, das trocas gasosas, da atividade de peroxidases, dos teores de flavonoides e de pigmentos cloroplastídicos e vacuolares (antocianinas), e de análises anatômica e de expressão gênica em nível foliar. Houve redução na assimilação de CO₂ em todos os genótipos clonais de cacau transferidos do ambiente de 50% para o de 95% de sombreamento, ao passo que a transferência de 50% de sombreamento para pleno sol não alterou de forma significativa ($P < 0,05$), a taxa fotossintética líquida do genótipo 'Catongo'. Entretanto, a transferência para o ambiente a pleno sol provocou fotoinibição em todos os genótipos de *T. cacao*, mas com menor intensidade para o genótipo SJ-02, que apresentou um aumento na atividade da peroxidase do guaiacol, demonstrando que este genótipo apresenta um sistema antioxidante mais eficiente. Verificaram-se, para os três genótipos de *T. cacao*, uma maior plasticidade fenotípica para as folhas lançadas no ambiente de 95% de sombreamento, quando comparado com o ambiente a pleno sol. Os teores de clorofila (*Chl a*), clorofila *b* (*Chl b*), clorofila total e de carotenoides foram significativamente ($P < 0,05$) maiores nos genótipos cultivados em 95% de sombreamento. Neste nível de sombreamento, o genótipo SCA-6 apresentou os menores teores de pigmentos cloroplastídicos. Em contrapartida, para o genótipo SJ-02, verificou-se, a pleno sol, uma redução destes pigmentos foliares. Não houve diferença inter e intragenotípica para a razão *Chl a/b* com a variação da disponibilidade de luz, ao contrário dos teores de flavonoides e antocianinas que apresentaram alterações com a variação da irradiância. Observou-se um aumento no teor de flavonoides e uma redução no de antocianinas a pleno sol. A expressão dos genes *PsbA* e *PsbO* apresentou a mesma tendência a pleno sol e a 95% de sombreamento, ao passo que para o 'Catongo' houve uma superexpressão do gene *PsbA*. Por outro lado, os genes *ans* e *ufgt* não apresentaram correlação positiva com o acúmulo de antocianinas em nível foliar, provavelmente porque a proteína *UFGT* tem afinidade por outros substratos, enquanto que o gene *hsp70* só aumentou a expressão no SCA-6. Em suma, para os genótipos clonais de *T. cacao* avaliados em condições de estresse por irradiância, (i) as diferenças nos teores de antocianinas em nível foliar não conferiram proteção contra a fotoinibição e promoveu alterações na assimilação de carbono; (ii) os genótipos 'Catongo' e SJ-02 apresentaram maior plasticidade fenotípica para a morfologia e para os teores de pigmentos cloroplastídicos em nível foliar, enquanto que o genótipo SCA-6 investiu mais nos teores de flavonoides e na expressão gênica da proteína cloroplastídica do choque térmico *hsp70*; (iii) o sistema de proteção antioxidante não-enzimático foi mais eficiente, por meio do aumento do teor de flavonoides, do que o sistema enzimático de peroxidases; (iv) as respostas da expressão dos genes *PsbA* e *PsbO*, responsáveis pela biossíntese da proteína D1 e por uma das proteínas envolvidas na evolução de O₂ no fotossistema 2, da fase fotoquímica da

fotossíntese, respectivamente; bem como dos genes *ans* e *ufgt*, envolvidos na biossíntese de antocianinas, não permitiram diferenciar os genótipos na condição de estresse por irradiância.

Palavras-chave: fotossíntese, plasticidade fenotípica, sombreamento, sistema antioxidante, cacau.

ABSTRACT

ARAUJO, Romária Pereira, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, March 2012. **Molecular and morphophysiological responses to stress by irradiance in *Theobroma cacao*: the role of anthocyanins.** Advisor: Alex-Alan Furtado de Almeida. Co-advisors: Fabio Gomes Pinto and Dario Ahnert.

The *Theobroma cacao* L. species is grown under shade in 'Cabruca' and agroforestry systems and full sun. The light acts alone or in combination to control development and differentiation during morphogenesis, inducing the plants to develop mechanisms of acclimation. Furthermore, plants have developed enzymatic and non-enzymatic mechanisms to protect against stress caused by irradiance. For certain plant species, the accumulation of anthocyanins in leaf level protects against UV-B radiation under conditions of high irradiance. The aim of the present study was to evaluate the effects of stress by irradiance in three clonal genotypes of cacao ('Catongo' SCA-6 and SJ-02), contrasting for the anthocyanins content in leaf level, through of the evaluations of chlorophyll fluorescence emission, gas exchange, peroxidase activity, flavonoids content, chloroplastidic and vacuolar (anthocyanins) pigments content, anatomical analysis and gene expression in leaf level. There were reductions in the CO₂ assimilation for all clonal genotypes of *T. cacao* transferred from the environment of 50% to 95% shading, while the transfer of 50% shading to full sunlight not changed, significantly, the net photosynthetic rate of the 'Catongo' genotype. However, the transfer to the environment in full sunlight caused photoinhibition for all *T. cacao* genotypes, but with less intensity for SJ-02 genotype, which showed an increase in guaiacol peroxidase activity, indicating that this genotype has a more efficient antioxidant system. There were, for the three *T. cacao* genotypes, greater phenotypic plasticity to the leaves flushed and grown in the environment of 95% shading, compared to sunlight. The chlorophyll *a* (*Chl a*), chlorophyll *b* (*Chl b*), total chlorophyll and carotenoids contents were significantly higher in the genotypes grown in 95% shading. At this level of shading, SCA-6 genotype showed lower pigment contents. In contrast, for SJ-02 genotype, it was found a reduction of leaf pigments in full sun. There was no intragenotypic difference between *Chl a/b* ratio and variation in available light, while the anthocyanins and flavonoids contents changed with variation in the irradiance. There was an increase in the flavonoids content and a reduction in the anthocyanins content to full sunlight. The expression of *PsbA* and *PsbO* genes showed the same tendency in full sun and 95% shading, while for the 'Catongo' there was an overexpression of *PsbA* gene. Moreover, the *ans* and *ufgt* genes showed no correlation with the anthocyanin accumulation in leaf level, probably because the UFGT protein has affinity for other substrates, while the *hsp70* gene expression only increased in SCA-6. In conclusion, for the clonal genotypes of *T. cacao* assessed, in irradiance stress conditions, (i) the differences in the anthocyanins contents in leaf level did not provide protection against photoinhibition and promoted changes in carbon assimilation; (ii) the 'Catongo' and SJ-02 genotypes showed greater phenotypic plasticity in morphology and pigment contents in leaf level, while the SCA-6 genotype invested more in flavonoids and gene expression of chloroplastidic heat shock protein *hsp70*; (iii) the system of non-enzymatic antioxidant protection was more efficient, by increasing the flavonoids content, than the peroxidase enzymes system; (iv) the responses of *PsbA*

and *PsbO* genes expression, responsible by D1 protein biosynthesis and for a protein involved in the O₂ evolution in photosystem 2, of the photosynthesis photochemical phase, respectively, as well as the *ans* and *ufgt* genes involved in anthocyanin biosynthesis, did not vary between genotypes in the stress condition for irradiance.

Keywords: photosynthesis, phenotypic plasticity, shading, antioxidant system, cocoa.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Genótipos clonais de *Theobroma cacao* L., com sete meses de idade, apresentando os lançamentos foliares desprovidos de antocianinas [(A), 'Catongo', mutante e cultivado], com antocianinas em baixas [(B), SCA-6, tipo selvagem, pouco cultivado] e altas [(C), SJ-02, cultivado e altamente produtivo] concentrações em nível vacuolar..... 19
- Figura 2.** Radiação fotossinteticamente ativa (RFA) monitorada nos ambientes de sombra e a pleno sol durante o período experimental..... 20
- Figura 3.** Taxa fotossintética líquida (A), (A) (B) (C), condutância estomática ao vapor de água (gs) (D) (E) (F), taxa transpiratória (E), (G), (H), (I) em folhas maduras de três genótipos clonais de *T. cacao* ['Catongo' (CAT); SCA-6 e SJ-02], crescidos em 50% de sombreamento e transferidos para pleno sol (0%) e 95% de sombreamento por 24 e 48h. RFA = 800 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Valores médios de quatro repetições (\pm EP). A significância estatística entre os dois ambientes (0% e 95%) foi obtida por meio do teste-t (* $P < 0,05$)..... 29
- Figura 4.** Fluorescência inicial (F_0), (A) (B) (C), fluorescência máxima (F_m) (D) (E) (F), eficiência quântica máxima de FS II (F_v/F_m) (G), (H), (I) em folhas maduras de três genótipos clonais de *T. cacao* ['Catongo' (CAT), SCA-6 e SJ-02], crescidos em 50% de sombreamento e transferidos para pleno sol (0%) e 95% de sombreamento por 24 e 48 h. Valores médios de quatro repetições (\pm EP). A significância estatística entre os dois ambientes (0% e 95%) foi obtida por meio do teste-t (* $P < 0,05$)..... 31

Figura 5. Fluorescência inicial (F_o), (A), fluorescência máxima (F_m) (B), eficiência quântica máxima de FS II (F_v/F_m) (C) em folhas maduras de três genótipos clonais de *T. cacao* ['*Catongo*' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol e a 50% e 95% de sombreamento. Valores médios de quatro repetições (\pm EP). Letras minúsculas indicam comparação entre tratamentos e maiúsculas entre genótipos, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 33

Figura 6. Espessura (μm) das epidermes adaxial (EAB) (A) e abaxial (EAD) (B), dos parênquimas paliçádico (PP) (C) e lacunoso (PL) (D), do mesofilo (EM) (E) e da lâmina foliar (ETF) (F) em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['*Catongo*' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol e a 50% e 95% de sombreamento. Valores médios de quatro repetições (\pm EP). Letras minúsculas indicam comparação entre tratamentos e maiúsculas entre genótipos, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 35

Figura 7. Teores de clorofila *a* (*Chl a*) (A), clorofila *b* (*Chl b*) (B), clorofila total (*a+b*) (*Chl T*) (C) e carotenoides (*Car*) (D), razão clorofila *a/b* (*Chl a/b*) (E) e razão Clorofila total/carotenoides (*ChlT/Car*) (F), expressos em biomassa fresca, em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['*Catongo*' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol (0%) e a 50% e 95% de sombreamento. Valores médios de cinco repetições (\pm EP). Letras minúsculas indicam comparação entre tratamentos e maiúsculas entre genótipos, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 38

Figura 8. Teores de clorofila *a* (*Chl a*) (A), clorofila *b* (*Chl b*) (B), clorofila total (*a+b*) (*Chl T*) (C) e carotenoides (*Car*) (D),

razão clorofila *a/b* (*Chl a/b*) (E) e razão Clorofila total/carotenoides (*ChlT/Car*) (F), expressos em área, em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['*Catongo*' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol (0%) e a 50% e 95% de sombreamento. Valores médios de cinco repetições (\pm EP). Letras minúsculas indicam comparação entre tratamentos e maiúsculas entre genótipos, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 39

Figura 9. Teores de flavonoides (A) e antocianinas (B) em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['*Catongo*' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol (0%) e a 50% e 95% de sombreamento. Valores médios de cinco repetições (\pm EP). Letras minúsculas indicam comparação entre tratamentos e maiúsculas entre genótipos, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 42

Figura 10. Teores de flavonoides (A) e antocianinas (B) em folhas jovens e maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['*Catongo*' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a 50% de sombreamento. Valores médios de cinco repetições (\pm EP). Letras minúsculas indicam comparação entre tratamentos e maiúsculas entre genótipos, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 43

Figura 11. Atividade de peroxidases do guaiacol (PODs) em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['*Catongo*' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a 50% de sombreamento e transferidas para pleno sol e 95% de sombreamento em diferentes intervalos de tempo. Valores médios de cinco repetições (\pm EP). A significância estatística entre os diferentes níveis de irradiância foi obtida por meio do teste de Tukey (* $P < 0,05$)..... 45

- Figura 12.** Atividade de peroxidases do guaiacol (PODs) em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['*Catongo*' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol e a 50% e 95% de sombreamento. Valores médios de cinco repetições (\pm EP). Letras minúsculas indicam comparação entre tratamentos e maiúsculas entre genótipos, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)..... 46
- Figura 13.** Expressão dos genes *PsbA* em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['*Catongo*' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol e a 50% e 95% de sombreamento. Valores médios de cinco repetições (\pm EP)..... 47
- Figura 14.** Expressão dos genes *PsbO* em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['*Catongo*' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol e a 50% e 95% de sombreamento. Valores médios de cinco repetições (\pm EP)..... 48
- Figura 15.** Expressão dos genes *ans* e *ufgt* em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['*Catongo*' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol e a 50% e 95% de sombreamento. Valores médios de cinco repetições (\pm EP)..... 49
- Figura 16.** Expressão dos genes *ans* e *ufgt* em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['*Catongo*' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol e a 50% e 95% de sombreamento, utilizando como controle o genótipo '*Catongo*' para cada ambiente. Valores médios de cinco repetições (\pm EP)..... 50
- Figura 17.** Expressão do gene *hsp70* em folhas maduras, de três

genótipos clonais de *T. cacao* [*Catongo* (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol e a 50% e 95% de sombreamento, utilizando como controle o ambientes de 50% de sombreamento. Valores médios de cinco repetições (\pm EP)..... 51

1. INTRODUÇÃO

O cacau, *Theobroma cacao* L., é uma importante *commoditi* agrícola de exportação no mundo, sendo cultivado, principalmente, para a produção de chocolate (ALMEIDA e VALLE, 2007). O Brasil, na década de 80, ocupou a segunda posição no *ranking* da produção; entretanto, dois principais fatores foram responsáveis pela mudança neste cenário, a redução dos preços no mercado internacional e o aparecimento da doença vassoura-de-bruxa. Com a chegada do fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da vassoura-de-bruxa, nas lavouras da Bahia em 1989, houve uma grande mudança na condição social da população local com perdas de até 100% na produção em algumas fazendas (PEREIRA *et al.*, 1989), comprometendo a produção nacional, já que este estado era e ainda é o principal produtor (REF). Mesmo adotando os métodos tradicionais de controle, houve pouca eficiência no processo devido às condições climáticas favoráveis para a disseminação rápida da doença, fazendo com que muitos agricultores abandonassem suas fazendas, provocando demissões em massa e migrações de pessoas da zona rural para a zona urbana (TREVIZAN, 1996). Atualmente, o Brasil é o sexto maior país produtor de cacau, atrás de Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Nigéria e Camarões (ICCO, 2011).

No Brasil, o cacau é cultivado principalmente sob sombra, pelo sistema agroflorestal conhecido como 'Cabruca', que utiliza, após eliminação da vegetação do sub-bosque, os dosséis de árvores da Mata Atlântica para oferecer o sombreamento aos cacauzeiros; ou associado a outros cultivos de espécies que tenham portes maiores, como *Areca catechu*, *Cocos nucifera*, *Hevea brasiliensis* e *Erythrina fusca* (HEBBAR *et al.*, 2011; ALMEIDA e VALLE, 2007). Além disso, formas de cultivo alternativas têm garantido bons resultados, a exemplo do cultivo de cacau em monocultivo a pleno sol que aumenta a produtividade em relação aos cultivos mantidos em condições de sombra, desde que haja fertirrigação suplementar (ALMEIDA e VALLE, 2007, 2010; BELSKY e SIEBERT, 2002).

A luz solar é a fonte de energia para as reações fotossintéticas da planta; em contrapartida, o seu excesso pode causar danos, ao passo que sua carência pode limitar o crescimento e desenvolvimento da planta (LAMBERS *et al.*, 1998).

Entretanto, as plantas desenvolveram sofisticados mecanismos de respostas ao estresse por irradiância. Baixos níveis de luz podem ocasionar estresses nas plantas, promovidos pela diminuição da taxa de assimilação de Dióxido de Carbono (CO₂), decréscimo na produção de carboidratos e diminuição no crescimento e desenvolvimento; enquanto níveis elevados de luz podem danificar o maquinário fotossintético (LAMBERS et al., 1998), de forma, às vezes, irreversível.

As plantas desenvolveram várias estratégias para enfrentar condições adversas, como a plasticidade de aclimatação às condições de sol e sombra, e mecanismos de fotoproteção para dissipação de excessos de energia (DEMMIG-ADAMS e ADAMS, 2006). Diferenças na morfologia, anatomia e fisiologia da folha têm sido documentadas para espécies adaptadas a ambientes sombreados ou a pleno sol (BOARDMAN, 1977; BJÖRKMAN, 1981; GIVNISH, 1988). As mudanças estruturais da folha podem também ser adaptáveis, por exemplo, à inativação do centro de reação do fotossistema II (FS II) (ÖQUIST *et al.*, 1992). As alterações na fisiologia da folha já existente e a produção de novas folhas com morfologia e fisiologia apropriadas ao ambiente de luz são componentes de resposta à aclimatação (WIKA *et al.*, 2007). Além disso, as plantas desenvolveram mecanismos de proteção enzimática e não-enzimática em respostas ao estresse oxidativo, desencadeado pela irradiância. O mecanismo não-enzimático inclui compostos como as antocianinas e os outros tipos de flavonoides (MARCHESE *et al.*, 2008; PIETRINI *et al.*, 2002); enquanto que o enzimático, de acordo com Apel e Hirt (2004), é composto pela dismutase do superóxido, que age na linha de frente, transformando espécies ativas de oxigênio em Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂), e por catalases e peroxidases, que agem subsequentemente na desintoxicação de H₂O₂.

A espécie *T. cacao*, por se tratar de uma espécie preferencialmente alógama, apresenta uma variedade muito grande de genótipos, com diferenças fenotípicas marcantes. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do estresse por irradiância em três genótipos clonais de cacau ('*Catongo*', SCA-6 e SJ-02), contrastantes para a presença de antocianinas em nível foliar, por meio de avaliações da emissão de fluorescência da clorofila *a*, das trocas gasosas, da atividade de peroxidases, dos teores de pigmentos cloroplastídicos e vacuolares (antocianinas), dos teores de flavonoides e de análises anatômica e expressão gênica em nível foliar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Theobroma cacao* L.

2.1.1. Características gerais

A espécie *Theobroma cacao* L., conhecida vulgarmente como cacau, tem um alto valor econômico agregado às sementes por causa da produção de chocolate, embora este não seja o único produto comercial extraído desta planta, sendo utilizada também em indústrias de cosméticos e gêneros alimentícios, como geléias, bebidas e sorvetes (ALMEIDA; VALLE, 2007, 2010). É uma espécie lenhosa típica de clima tropical, diploide ($2n = 20$), preferencialmente alógama, perene, nativa da região de floresta úmida da América do Sul e a única, dentre as 22 espécies do gênero, explorada comercialmente em larga escala. Pertencia anteriormente à família Sterculiaceae, foi reclassificada e inserida na família Malvaceae (ALVERSON et al., 1999). A família Malvaceae Juss. contém cerca de 75 gêneros e, aproximadamente, 1.500 espécies, possui distribuição cosmopolita, predominando nos trópicos (CRONQUIST, 1981), e compreendem plantas de grande importância econômica.

O gênero *Theobroma* é considerado como de origem exclusivamente neotropical com dispersão natural em florestas úmidas, estendendo-se da bacia amazônica até o sul do México, entre as latitudes 18° N e 15°S (CUATRECASAS, 1964). Do seu provável centro de origem, na região do alto Amazonas (CHEESMAN, 1944), espalhou-se em duas principais direções, o que resultou nos dois principais grupos raciais: o '*Crioulo*', cultivado na Venezuela, na Colômbia, no Equador, no norte da América Central e no México; e o '*Forasteiro*', no norte do Brasil e nas Guianas (ALMEIDA; VALLE, 2007). Um terceiro grupo denominado '*Trinitário*', também é apresentado por alguns autores como originário de um cruzamento natural entre '*Crioulo*' e '*Forasteiro*' (ALMEIDA; VALLE, 2007, 2010). A maior parte (85%) da produção mundial de cacau provém do grupo '*Forasteiro*', sendo este predominante também nas plantações brasileiras. O cacau foi introduzido na Bahia em 1746, procedente do estado do Pará, passando a ser cultivado inicialmente no município de Canavieiras e, posteriormente, em vários outros municípios do sul do

estado, onde esses materiais genéticos receberam a denominação de ‘*Cacau Comum*’ da Bahia (LEAL, 2004).

2.1.2. Histórico e Produção

Os registros demonstram que o cacau, inicialmente, foi cultivado pelos Astecas e Maias. Para estas civilizações, as sementes desta espécie possuíam alto valor comercial e divino (KUFER *et al.*, 2006; BERGMANN, 1959). Quando utilizadas no comércio, serviam como pagamento de impostos, compra de escravos, entre outras relações. Religiosamente, uma bebida feita com estas sementes era servida às vítimas que seriam sacrificadas em cultos, porque acreditavam que este ato os aproximaria da divindade (KUFER *et al.*, 2006). A denominação da espécie, *Theobroma cacao* L., que significa “manjar dos deuses”, realizada por Lineu, parece ser uma referência a este valor sagrado que as antigas civilizações denotavam a planta (KUFER *et al.*, 2006). Após a chegada dos europeus, estas sementes foram disseminadas para o mundo, fixando-se em regiões da África e Ásia (BERGMANN, 1959). Foi na Europa que o produto sintetizado pelo cacau se aproximou do chocolate propriamente dito, devido ao acréscimo de açúcar, agregando maior valor ao cacau (HEBBAR *et al.*, 2011).

A produção de cacau possui grande relevância na economia mundial, envolvendo muitos países no cultivo, comercialização e consumo. Os países produtores de cacau estão concentrados principalmente nas regiões tropicais dos continentes da África, América Central e do Sul, Ásia e Oceania (ICCO, 2011). Em 2009/2010, a África foi responsável por 68% da produção mundial, enquanto a Ásia e a Oceania por 18% e as Américas por 14% (ICCO, 2011). Atualmente, no ranking dos países que cultivam cacau, encontra-se a Costa do Marfim como o principal produtor, que contribuiu com 34% da produção mundial, em seguida tem-se Gana (17,5%), Indonésia (14,8%), Nigéria (6,6%) e Camarões (5,3%) (ICCO, 2011). O Brasil se posicionou no sexto lugar, onde produziu 161 mil toneladas, o que representa 4,4% do total (ICCO, 2011).

No Brasil, as regiões Norte e Nordeste são as principais regiões de produção de cacau. Em 2009, responderam por 90% da produção total. Esta concentração da produção deve-se principalmente ao estado baiano, que desde a introdução da

cultura cacauera, na região sul da Bahia, encontrou condições favoráveis ao seu desenvolvimento e permitiu que este estado viesse a se tornar o maior produtor nacional desde então (SENA, 2011). Na década de 80, o Brasil ocupava a segunda posição como maior produtor de cacau, atingindo valores próximos a 450 mil toneladas de amêndoas (SENA, 2011). Entretanto, no fim desta década, foi detectada a doença intitulada como vassoura-de-bruxa no sul da Bahia, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* que reduziu drasticamente a produção, provocando, em alguns casos, a perda total de fazendas, devido à disseminação rápida do fungo em locais com umidade elevada (PEREIRA *et al.*, 1989). Desde então, várias medidas vêm sendo tomadas para restabelecer a produtividade de outrora, como seleção de materiais resistentes ou mesmo tolerantes à infecção, manejo e controle fitossanitário.

2.1.3. Formas de cultivo

O cacau, tradicionalmente, é cultivado sob sombras, desde épocas pré-colombianas (ALMEIDA; VALLE, 2007, 2010). Este sombreamento é obtido por florestas raleadas ('*Cabruca*'), florestas clareadas e associado a outros cultivos que tenham portes maiores que o cacauero, como as espécies *Areca catechu*, *Cocos nucifera*, *Hevea brasiliensis* e *Erythrina fusca* (HEBBAR *et al.*, 2011; ALMEIDA; VALLE, 2007). Entretanto, a produtividade de cultivo de cacau a pleno sol é, normalmente, maior do que cultivo sombreado (BELSKY; SIEBERT, 2002), principalmente quando fertirrigado (ALMEIDA; VALLE, 2007, 2010).

O sistema agroflorestal que tem maior relevância no sul da Bahia, Brasil, é localmente conhecido como '*Cabruca*', nome que tem origem na prática adotada, explicado pelo fato de "cacau brocar", porque o plantio do cacau é feito sob a floresta atlântica, onde as espécies do sub-bosque são suprimidas e a densidade dos indivíduos do dossel é reduzida, permitindo a entrada de maior intensidade de luz (LOBÃO *et al.*, 2007). Além de oferecer sombreamento ao cacauero, a '*Cabruca*' ainda é questionada sobre a importância de interferir positivamente ou negativamente na conservação da biodiversidade. Por um lado, este sistema apresenta maior capacidade de conservar espécies de pássaros, antas e outras espécies selvagens do que outros sistemas de cultivo, como milho e cereais (RICE e

GREENBERG, 2000). Entretanto, o manejo da 'Cabruca' reduz a diversidade de espécies da floresta local e vem alterando a sequência sucessional das árvores (ASARE, 2006).

Há, ainda, os sistemas agroflorestais que utilizam mais de uma espécie com valor econômico, o chamado intercultivo. Nestes casos, a intensidade de luz que atinge os cacauzeiros é maior que os sistemas que utilizam dossel de florestas para sombreá-los, como consequência, aumentam a produtividade (DEHEUVELS *et al.*, 2012). Outra vantagem do intercultivo é a recuperação de solos degradados e o suporte econômico e social ao produtor, uma vez que gera renda e condições dignas para a manutenção e fixação do homem no campo. Porém, a competição por nutrientes e água pode ser um fator desvantajoso para o cultivo do cacau, embora o uso de bananeiras nos estágios tenha garantido boa produção (HEBBAR *et al.*, 2011).

A cacauicultura pode ser realizada sem sombreamento, como monocultivo a pleno sol, desde que haja irrigação e fertilização (ALMEIDA; VALLE, 2007). Deheuvels *et al.* (2012) demonstraram que o cultivo do cacau a pleno sol, na África, Ásia e América Latina, apresentou produtividade maior que sistemas agroflorestais sombreados. Várias pesquisas desenvolvidas recentemente têm indicado a monocultura tecnificada como desvantajosa, dentre as justificativas estão a maior evapotranspiração, que resulta no estresse hídrico (OFORI-FRIMPONG *et al.*, 2010); o empobrecimento do solo, diferente do cultivo sob sombras, que mantêm o solo fértil (SIEBERT, 2002); e a maior susceptibilidade a insetos e doenças, que pode reduzir a produção ou diminuir a qualidade dos frutos (BELSKY; SIEBERT, 2003). Entretanto, no Brasil, o cultivo do cacau a pleno sol tem reduzido as perdas na produção causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, já que as regiões utilizadas para tal fim apresentam umidade relativa menor que as regiões de produção tradicionais (LEITE; VALLE, 2000).

2.2. Estresse por irradiância

Estresse é a presença de qualquer fator externo que confira desvantagens a um determinado organismo (TAIZ; ZEIGER, 2009). As plantas superiores são organismos sésseis, e, desta forma, são mais susceptíveis a diferentes estresses

ambientais (bióticos e abióticos); por adaptação, as plantas desenvolveram sofisticados mecanismos moleculares e fisiológicos para responder as condições estressantes (RAO *et al.*, 2006).

Dentre os fatores abióticos que afetam as plantas, tem-se a luz, que embora seja a fonte de energia para a fotossíntese, limita o crescimento e o desenvolvimento da planta em condições de intensidade baixa ou excessiva (VALLADARES; NIINEMETS, 2008; REDDY; RAGHAVENDRA, 2006).

2.2.1. Plasticidade fenotípica foliar

A folha é um dos principais órgãos envolvidos na realização da fotossíntese e, conseqüentemente, necessita se adaptar às diferentes condições de luminosidade. As alterações morfofisiológicas que acontecem na anatomia foliar é resultado da plasticidade fenotípica da espécie, que aumenta a eficiência na captura da luz e no processo fotossintético, resultando em um melhor desempenho da planta (VALLADARES; NIINEMETS, 2008).

Em baixas irradiâncias, as folhas apresentam maior área, espessura menor do mesofilo, parênquimas paliçádicos com uma única camada e mais espaços intercelulares no parênquima lacunoso. Estas características conferem uma menor razão de massa foliar por unidade de área e uma fração maior de massa foliar por planta (VALLADARES; NIINEMETS, 2008); ao passo que em altas irradiâncias, as folhas possuem áreas menores e são mais espessas (VALLADARES e NIINEMETS, 2008; PEARCY, 2000).

A RUBISCO, enzima responsável pela assimilação de CO₂ em plantas, apresenta baixa afinidade pelo seu substrato, cuja reação pode ser competitivamente inibida pelo oxigênio (O₂). Por outro lado, o CO₂ apresenta baixa difusão no interior das células em meio aquoso (TERASHIMA *et al.*, 2006). Desta forma, quando há um maior *input* de energia, a taxa fotossintética é limitada pela concentração de CO₂, e os fótons excedentes podem prejudicar o maquinário fotossintético (TERASHIMA *et al.*, 2006; DEMMIG-ADAMS; ADAMS, 2006). Para impedir esta situação, as folhas investem na espessura do mesofilo, aumentando os espaços intercelulares, facilitando a condutância de CO₂ do ambiente externo ao estroma do cloroplasto (TERASHIMA *et al.*, 2006). Além disso, os cloroplastos de

folhas de sol, normalmente, se posicionam próximos às paredes celulares anticlinais para facilitar a assimilação de CO₂ e também como mecanismo de minimizar a interceptação excessiva da luz (PEARCY, 2000).

Terashima et al. (2005) demonstraram que, embora as folhas de sol apresentem maior espessura, o número de células não varia muito, visto que há um maior investimento no volume celular durante a expansão foliar. Segundo estes autores, uma das hipóteses sugere que células menores exigiriam um gasto maior de nutrientes essenciais como N e P, em ácidos nucleicos e proteínas, o que resultaria em um decréscimo na taxa fotossintética.

2.2.2. Pigmentos cloroplastídicos

As clorofilas e os carotenoides são os pigmentos cloroplastídicos responsáveis pela absorção da radiação fotossinteticamente ativa (RFA), que varia de 400–700 nm, indispensáveis no processo fotossintético em plantas superiores. A concentração destes pigmentos nos cloroplastos depende da irradiância e do local onde as folhas e as plantas são desenvolvidas (BOARDMAN et al. 1975, LICHTENTHALER, 1982; BAIG et al. 2005). Normalmente, folhas de sol apresentam maiores teores de clorofila (*Chl*) total, quando se utiliza a área foliar como base; em contrapartida, se for usada a massa foliar como base, as folhas de sombra apresentam teores superiores em relação às de sol (LICHTENTHALER, 2009).

A razão *Chl a/b* é maior para folhas expostas ao sol que à sombra, porque as folhas de sol apresentam uma menor quantidade de complexo coletor de luz e uma maior quantidade de centro de reação, já as folhas de sombra investem mais energia na coleta de luz, otimizando a absorção de luz que chega à folha (LICHTENTHALER, 2009). Para a razão clorofila total/carotenoides (*Chl T/Car*), as folhas de sombra apresentam maiores valores em relação às de sol, devido à maior concentração de carotenoides encontrada em folhas de sol. As xantofilas, um tipo de carotenóide, conferem fotoproteção ao dissiparem o excesso de energia na forma de calor, por meio da interconversão de violaxantina, anteraxantina e zeaxantina (YOUNG et al., 1997; FORSTER et al., 2009).

2.2.3. Fotossíntese

Folhas de sol e de sombra utilizam a luz na fotossíntese de forma significativamente diferente. Ambas buscam uma maneira de maximizar a interceptação da luz para a fotossíntese e minimizar o efeito prejudicial do excesso de energia ao maquinário fotossintético (TAIZ; ZEIGER, 2009). Enquanto folhas adaptadas ou aclimatadas à sombra utilizam quase que toda a luz absorvida na fotossíntese, as folhas de sol utilizam aproximadamente 10% (ORTOIDE; DURING, 2001). Normalmente, folhas de sombra investem mais na fase fotoquímica da fotossíntese e nos complexos coletores de luz, além de alocar mais nitrogênio em pigmentos cloroplastídicos; ao passo que as folhas de sol investem mais na fase bioquímica, aumentam o número de centros de reação e alocando mais nitrogênio em enzimas, principalmente na *Rubisco*, uma vez que esta enzima carboxilativa possui relação direta entre a sua concentração e a capacidade fotossintética (BOARDMAN, 1977; BJÖRKMAN, 1981).

Sob baixos níveis de luz, as plantas apresentam valores reduzidos para taxas fotossintéticas, condutância estomática ao vapor de água (g_s) e transpiração (E) foliar. Nesta condição, a taxa fotossintética é limitada pela luz, e a redução de g_s pode ser justificada pela menor densidade de estômatos por área foliar em ambientes sombreados; enquanto que altos níveis proporcionam taxas fotossintéticas elevadas, desde que não haja danos no maquinário fotossintético, causado por absorção de fótons excedentes (BAKER, 2008).

É possível avaliar a plasticidade fisiológica das plantas ao ambiente luminoso por meio de curvas de respostas à luz, extraindo informações sobre propriedades fotossintéticas. Assim, baixos valores para taxa de respiração no escuro (R_d), irradiâncias de compensação (I_c) e saturação (I_s) indicam aclimatação à sombra (STRAUSS-DEBENEDETTI; BAZZAZ, 1996). Porque, I_c é a intensidade de luz que a assimilação de CO_2 se iguala à sua liberação na respiração; sendo assim, um baixo valor de I_c representa uma menor taxa de R_d , garantindo a sobrevivência da planta (TAIZ; ZEIGER, 2009). Já I_s representa a intensidade de luz em que a assimilação de CO_2 não aumenta com o acréscimo de fótons, momento em que a luz não afeta mais a fotossíntese, e que outros fatores estão sendo limitantes, como taxa de transporte de elétrons, atividade da *Rubisco* ou o metabolismo das trioses fosfato

(TAIZ; ZEIGER, 2009). Esta variável é determinada pelos valores máximos de luz que a folha foi exposta durante o seu desenvolvimento, sem que haja fotoinibição.

Outra ferramenta útil para delinear a resposta da planta a estresses ambientais é fornecida pela emissão de fluorescência da clorofila *a*. A energia luminosa absorvida pelas moléculas de clorofila podem seguir três vias diferentes: (i) pode ser utilizada na fotossíntese; (ii) o excesso de energia pode ser dissipado na forma de calor; e (iii) pode ser re-emitida como luz, em comprimentos de onda maiores do que o absorvido, conhecido como fluorescência da clorofila (BAKER, 2008). Estes três processos ocorrem em competição, de forma que o aumento na eficiência de um resultará no decréscimo dos outros dois. Desta forma, é possível obter informações sobre a eficiência fotoquímica e a dissipação de calor por meio de medidas da emissão de fluorescência da clorofila (MAXWELL; JOHNSON, 2000; BAKER, 2008). Os métodos atuais fornecem informações rápidas não destrutivas acerca da conversão, transferência e dissipação da energia luminosa em nível de fotossistema II (FS II) (BAKER, 2008), sob condições de laboratório, controladas e em campo.

Uma das formas utilizadas para estudar a fotoquímica de FS II é pelo chamado estado de adaptação ao escuro, onde a folha é condicionada ao escuro, permitindo a oxidação total do acceptor de elétrons primário, tornando-os disponíveis para a redução com um pulso de luz; por isso, refere-se a este estado como centro de reação do FS II aberto (BAKER, 2008). Nestas condições, é possível estimar a fluorescência inicial (F_0) fornecendo luz em baixa intensidade ($0,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), também conhecida como nível mínimo de fluorescência; já com um pulso de luz saturante, estima-se a fluorescência máxima (F_m), estado em que reduz todos os aceptores primários e o centro de reação do FS II é dito fechado (BAKER, 2008). A fluorescência variável (F_v) é a diferença entre F_m e F_0 e demonstra a capacidade do maquinário fotossintético direcionar os fótons de energia para a via fotoquímica (BAKER, 2008). Entretanto, é a razão F_v/F_m que estima a eficiência quântica máxima do FS II, sendo quase constante para a maioria das espécies vegetais sob condições não limitantes, com valores próximos a 0,832 (BJÖRKMAN E DEMMIG, 1987). Porém, quando expostas a algum tipo de estresse abiótico ou biótico, esta razão decresce. Embora as causas que alteram F_v/F_m sejam complexas, esta razão é um forte indicativo para monitorar estresses, como a fotoinibição.

O decréscimo na eficiência fotossintética causada pelo excesso de luz é denominado como fotoinibição, e pode ser dividido em dois tipos: fotoinibição dinâmica, em que o excesso de energia luminosa é extinta, e fotoinibição crônica, causada por danos na proteína D1 de FS II (KYLE et al., 1984). A fotoinibição dinâmica apresenta uma redução em F_v/F_m reversível, sendo acompanhada por um significativo aumento da dissipação térmica do excesso de energia absorvida, indicando que o decréscimo da eficiência fotoquímica deve-se, em parte, a mecanismos fotoprotetores e não a danos oxidativos à maquinaria fotossintética (ADAMS et al., 1994; DEMMIG-ADAMS et al., 1996; THIELE et al., 1998). Já a fotoinibição crônica ocorre quando o excesso de luz absorvida gera uma série de intermediários de oxigênio altamente reativos (IORs) que podem causar sérios problemas ao maquinário fotossintético (MITTLER, 2002), com danos aos lipídeos constituintes de membranas, pigmentos cofatores críticos e subunidades protéicas, especialmente a proteína D1, resultando na completa inativação foto-oxidativa do centro de reação (APEL; HIRT, 2004). Estes danos, se não reparados, acarretam um decréscimo da eficiência fotoquímica, que pode ser caracterizada por uma redução irreversível da razão F_v/F_m (HIDEG; MURATA, 1997).

O FS II é um complexo proteico com múltiplas subunidades, integrado às membranas dos tilacoides, onde as proteínas hidrofóbicas D1 e D2 constituem o núcleo do centro de reação e une os componentes necessários para as reações de oxi-redução dos elétrons através da membrana (KETTUNEN, 1996; CHOQUET; VALLON, 2000). Durante a fotoinibição crônica, o transporte de elétrons é interrompido, e, conseqüentemente, o processo fotossintético é inativado; ocasionando excesso de energia e uma grande redução nos aceptores de elétrons do FS II; além de gerar clorofilas *triplet* e IORs, que modificam a estrutura da proteína D1 (KYLE et al., 1984; MELIS, 1999). Para evitar a inibição permanente da fotossíntese, ocorre um processo altamente organizado dentro do cloroplasto, aumentando a síntese da proteína D1, resultado de um incremento nos transcritos e na tradução do gene *PsbA*, responsável por codificar a proteína D1, inserido as novas cópias sintetizadas nas membranas tilacoidais, enquanto as proteínas danificadas são removidas por proteases (LINDAHL et al., 2000).

O sítio catalítico de FS II, que oxida a molécula de água, possui quatro átomos de manganês (Mn), e contém várias subunidades extrínsecas que desempenham um papel importante em manter o sítio de Mn ativo (BRICKER; FRANKEL, 1998).

Dentre as quais, encontra-se a proteína PSB O, codificada pelo gene nuclear *psb O*, que tem como função estabilizar o grupo de Mn, que é essencial para que a evolução de oxigênio aconteça de forma eficaz (BRICKER; FRANKEL, 1998; SEIDLER, 1996). Além disso, a PSB O também demonstrou ser importante na estabilidade de PSB A e na montagem de outras proteínas extrínsecas, comprovando que a alteração de sua concentração pode afetar a eficiência quântica do FS II, a exemplo do aumento da razão F_v/F_m com o incremento nos níveis desta proteína (MURAKAMI *et al.*, 2005).

2.2.4. Estresse oxidativo induzido por irradiância

Uma das principais características reveladas recentemente sobre aspectos da fotoinibição é a ação dos intermediários de oxigênio reativos (IORs). O surgimento dos IORs é consequência da vida aeróbica e são formadas por redução parcial das moléculas de oxigênio, dando origem a moléculas como oxigênio singleto (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila ($\cdot OH$) (VRANOVÁ *et al.*, 2002). Entretanto, quando as plantas são submetidas a estresse abiótico ou biótico ocorre uma ‘*explosão*’ oxidativa que desencadeia uma série de respostas na maquinaria antioxidante e na regulação da expressão gênica (GIL; TUTEJA, 2010).

Os IORs são sintetizados de forma contínua como produtos secundários de muitas rotas bioquímicas em diferentes compartimentos celulares, como mitocôndrios, cloroplastos e peroxissomos (NAVROT *et al.*, 2007). Em plantas superiores, na presença de luz, os cloroplastos e peroxissomos são os principais organelos ou orgânulos celulares responsáveis pela origem dos IORs, já no escuro, os mitocôndrios assumem este papel (GIL; TUTEJA, 2010). Nos cloroplastos, o FS II, presente nas membranas tilacoides, é o componente mais sensível ao estresse fotooxidativo, causando danos à proteína D1 e, ou interferindo no reparo do FS II (KRIEGER-LISZKAY, 2005; NISHIYAMA *et al.*, 2011). O 1O_2 é gerado a partir da absorção de luz pelo oxigênio molecular, por transferência de energia de excitação, resultando na saída do elétron externo; além disso, possui uma vida-média curta em células, de apenas 200 ns, mas reage imediatamente com moléculas vizinhas, como

pigmentos, proteínas e lipídios, sendo por isso considerado um dos principais IORs responsáveis pelo prejuízo de FS II, causado pelo excesso de luz (KRIEGER-LISZKAY, 2005; KIM *et al.*, 2008). O H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ e $\cdot\text{OH}$ são produzidos pela adição de elétrons ao O_2 , como resultado do transporte de elétrons fotossintéticos (NISHIYAMA *et al.*, 2011). O H_2O_2 é moderadamente reativo e possui uma vida-média relativamente longa, cerca de 1 ms; em baixas concentrações atua como molécula sinalizadora, permitindo a aclimação em diferentes tipos de estresse; ao passo que em altas concentrações induz morte celular programada (GIL; TUTEJA, 2010). Aproximadamente 1 a 2% do O_2 consumido pelos tecidos vegetais origina-se em $\text{O}_2^{\cdot-}$, que também é moderadamente reativo, e a sua origem pode desencadear a formação de outros IORs, como o $\cdot\text{OH}$; que, por sua vez, pode reagir com todas as moléculas biológicas, como DNA, proteínas, lipídios e quase todos os constituintes da célula; e cujo excesso causa morte celular, devido a ausência de mecanismos enzimáticos que eliminem este IORs altamente reativo (FOYER; NOCTOR, 2003).

Os níveis intracelulares dos IORs dependem do balanço entre a taxa de produção e a taxa da remoção ou detoxificação dos mesmos. Sob estresse oxidativo, as plantas reduzem a taxa fotossintética e diminuem o crescimento da planta (MITTLER *et al.*, 2011). Nestas condições, para manter a produtividade, as células dispõem de eficientes mecanismos para eliminar os IORs (MITTLER *et al.*, 2011). Os mecanismos de proteção contra IORs têm sido desenvolvidos pelas plantas como processo evolutivo para controlar os níveis dessas moléculas e anular a toxicidade (LOGAN *et al.*, 2006); os quais podem ser enzimáticos, composto por antioxidantes como a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT) e as peroxidases (POX), dentre outros; e, ou não enzimáticos, caracterizados por metabólitos de baixo peso molecular (MITTLER *et al.*, 2004).

2.2.4.1. Mecanismo enzimático

Dismutase do superóxido (SOD)

A SOD é responsável pela remoção de $O_2^{\cdot-}$, por catalisar a reação que o reduz a H_2O_2 , e, assim, diminuir a concentração de $\cdot OH$ (MITTLER *et al.*, 2011). Além disso, é uma metaloenzima que possui diferentes metais como cofatores, sendo esta característica que permite a classificação desta enzima em três tipos conhecidos: (i) Fe - SOD, que é encontrada no cloroplasto; (ii) Mn - SOD, presente nos mitocôndrios e peroxissomos; e (iii) Cu/Zn - SOD, localizada no cloroplasto e no citosol (GIL; TUTEJA, 2010). Além disso, é descrita por atuar na linha de frente na defesa contra o efeito tóxico dos IORs, em diferentes tipos de estresses enfrentados pelas plantas, sendo importante na tolerância (GIL; TUTEJA, 2010).

Catalase (CAT)

A CAT é responsável pela conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2 e é indispensável na remoção de IORs (MITTLER *et al.*, 2011). CAT apresenta uma das maiores taxas de recuperação de todas as enzimas, sendo capaz de converter aproximadamente 6 000.000 (seis milhões) de moléculas de H_2O_2 em H_2O e O_2 por minuto (GIL; TUTEJA, 2010). As plantas apresentam várias isoformas de catalase, que podem responder diferencialmente à luz (GIL; TUTEJA, 2010; BREUSEGEM, 2001). Vários trabalhos demonstram que o aumento na atividade desta enzima tem conferido tolerância às plantas quando submetidas a estresses abióticos, como estresse por metal, temperatura, seca, excesso de luz, entre outros (YANG *et al.*, 2008).

Peroxidases (PODs ou POXs)

As PODs catalisam a oxidação de H_2O_2 , gerando H_2O , utilizando um substrato como redutor (GIL; TUTEJA, 2010). As peroxidases do ascorbato (APX) utilizam o ascorbato como receptor de elétrons e possuem importância relevante na proteção de células de plantas superiores, algas, euglenas e outros organismos (MITTLER *et al.*, 2011). APX possui cinco isoformas conhecidas, dentre as quais, existem formas presentes em membranas tilacoides do cloroplasto e em membranas dos glioxissomos; e formas solúveis no estroma do cloroplasto (HONG *et al.*, 2007; LOGAN *et al.* 2006). Já as peroxidases do guaiacol (GPOX) utilizam receptores de elétrons aromáticos, como o guaiacol ou pirogalol, e possuem papel importante na

biossíntese de lignina e na defesa contra estresse biótico (GIL; TUTEJA, 2010; ASADA, 1999).

2.2.4.2. Mecanismos não-enzimáticos

Os antioxidantes não enzimáticos, importantes na proteção das células vegetais contra os IORs, são representados pelo ácido ascórbico (vitamina C), pela glutatona, pela prolina, pelo α -tocoferol (vitamina E) e pelos flavonoides (MITTLER *et al.*, 2004). Dentre os quais, os flavonoides têm sido descritos como os metabólitos antioxidantes mais sensíveis ao estresse por irradiância (GIL; TUTEJA, 2010; HERNÁNDEZ *et al.*, 2008;).

Flavonoides

Os flavonoides são uma família de metabólitos secundários em plantas, possuindo mais de 9000 tipos de moléculas, encontrados em todos tecidos e órgãos vegetais. Por causa disso, estão envolvidos em muitas funções, como pigmentação de flores, frutos e sementes; interações planta-patógeno; proteção contra a luz ultravioleta; além de possuírem grande relevância como antioxidante (BUER *et al.*, 2010). Estes compostos polifenólicos são caracterizados por dois anéis aromáticos cíclicos, ligados a um heterocíclico (WINKEL-SHIRLEY, 2002). Além disso, são classificados pelo grau de oxidação do anel heterocíclico, sendo as principais classes conhecidas como: (i) flavononas, que servem como precursoras para a maioria dos outros flavonoides; (ii) isoflavonas, que são sintetizadas apenas em legumes, importantes na sobrevivência e reprodução; (iii) flavonas; (iv) flavonóis, que apresentam em maiores concentrações, quando a planta é exposta a luz UV; e (v) antocianinas, que são pigmentos vacuolares que conferem fotoproteção as plantas (CHEMLER *et al.*, 2008). Estas moléculas podem sofrer modificações nos anéis aromáticos, incluindo hidroxilação, metilações, glicosilações, acilações, entre outros, conferindo a diversidade dentro de cada classe (WINKEL-SHIRLEY, 2002).

Os Flavonoides e outros compostos fenólicos absorvem luz nos comprimentos de onda na região do UV, assim, plantas mutantes para esta rota biossintética são mais sensíveis à alta irradiância UV (GIL; TUTEJA, 2010). Muitos genes biossintéticos dos flavonoides são induzidos sob condições de estresse (GIL;

TUTEJA, 2010). A função dos flavonoides como extintores de IORs está relacionada com a capacidade de localizarem e neutralizarem radicais livres, doando elétrons ou átomos de hidrogênio, impedindo que provoquem danos às biomoléculas (HERNANDÉZ *et al.*, 2008). Entretanto, os flavonoides podem desenvolver esta ação em conjunto com o mecanismo enzimático, pois enzimas como as peroxidases e a oxidase do polifenol utilizam os flavonoides como doadores de elétrons durante a eliminação de H₂O₂ (POURCEL *et al.*, 2006).

Embora os flavonoides sejam sintetizados principalmente no citosol, podem ser transportados para diferentes compartimentos celulares, desenvolvendo diferentes funções (HERNANDÉZ *et al.*, 2008). Flavonoides glicosilados estão presentes nos cloroplastos, devido à grande quantidade de IORs. Neste orgânulo celular, há um aumento nos níveis de flavonóis quando folhas são expostas a alta irradiância (AGATI *et al.*, 2007; HERNANDÉZ *et al.*, 2008). Há relatos também de flavonoides presentes no núcleo, o que pode conferir proteção ao DNA; e no meio extracelular, que se relacionam mais com a fotoproteção (HERNANDÉZ *et al.*, 2008). Já os flavonoides encontrados nos vacúolos merecem uma atenção especial, pois são representados principalmente pelas antocianinas, que, além de outras funções, protegem o maquinário fotossintético contra radiação UV-B (HERNANDÉZ *et al.*, 2008).

Antocianinas

São pigmentos hidrossolúveis, encontrados nos vacúolos celulares, que absorvem comprimentos de onda variando de 500-550 nm, na região verde da luz visível, fornecendo as cores do vermelho ao azul em flores, frutos e folhas de acordo com o pH vacuolar (HARBORNE, 1988). A expressão de antocianinas em folhas é bastante variada, pois, em algumas espécies, está presente em todas as folhas, ao passo que em outras aparecem em momentos específicos do ano, ou mesmo em estágio únicos de desenvolvimento foliar (STEYN *et al.*, 2002). A produção de antocianinas pode ser influenciada também pelas condições ambientais, como qualidade e intensidade da luz, temperatura, estresse osmótico, ataque de patógenos e outros. Além disso, podem estar em diferentes tecidos foliares, como na epiderme abaxial e, ou adaxial, bem como no mesofilo (GOULD *et al.*, 2000).

Gould *et al.* (2000) demonstraram que a função das antocianinas está diretamente associada aos tecidos onde são armazenadas. As antocianinas atuam

como fotoprotetores, porque alteram a intensidade e a qualidade da luz que atinge o cloroplasto (STEYN *et al.*, 2002). Em *Zea mays*, foi demonstrado que a presença destes pigmentos reduziu o risco de fotoinibição, sem que houvesse limitação na fotossíntese (PIETRINI *et al.*, 2002). Além disso, as antocianinas atuam também na prevenção do estresse oxidativo, atuando indiretamente como antioxidante (GOULD, *et al.* 2008) e diretamente na eliminação de EROs (HERNANDÉZ *et al.*, 2008). No pH citosólico as antocianinas se apresentam incolores, e, ao serem transportadas para o vacúolo, adquirem cor vermelha (GOULD *et al.* 2008). Foi demonstrado que estas duas formas, citosólicas e vacuolares, são capazes de removerem O_2^- , entretanto, os tautômeros presentes no citosol são mais ativos na detoxificação das IORs, porque os níveis de H_2O_2 se mantêm baixos no vacúolo, devido a barreira física que os separa dos principais orgânulos que originam os IORs (HERNANDÉZ *et al.*, 2008). Desta forma, a função dos flavonoides vacuolares como antioxidantes pode ser considerada em situações que provoquem injúrias mecânicas nos tecidos foliares, como a herbivoria (HERNANDÉZ *et al.*, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Material vegetal e condições de cultivo*

O experimento foi conduzido no período de setembro/2010 a novembro/2011 no *Campus* da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), localizado no município de Ilhéus, BA, Brasil (14°47' S, 39°10' W), utilizando-se três genótipos clonais de cacau ('*Catongo*', SCA-6 e SJ-02). O genótipo '*Catongo*', é um mutante natural para antocianinas, com herança monogênica ou qualitativa para este caráter, considerado autocompatível e produtivo; logo, se apresenta com as folhas jovens, os frutos e as sementes desprovidos deste pigmento vacuolar, cujas sementes são brancas; além de ser intolerante a doença vassoura-de-bruxa (BARTLEY, 2005). Em contrapartida, o SCA-6, considerado como genótipo selvagem, autoincompatível e de baixa produtividade; têm as folhas jovens, os frutos e as sementes levemente avermelhados pela presença de antocianinas vacuolares, além de possuir alelos para tolerância à vassoura-de-bruxa (BARTLEY, 2005). Já o genótipo SJ-02, considerado como autocompatível e de alta produtividade, possui as folhas jovens, os frutos e as sementes com coloração vermelha intensa, em virtude da alta concentração de antocianinas vacuolares nas células constituintes de seus tecidos e órgãos (BARTLEY, 2005) (Figura 1 A, B e C).

Os três genótipos clonais de cacau foram obtidos a partir do enraizamento de estacas de caule de extremidades de ramos plagiotrópicos, retirados de plantas matrizes com 5 a 10 anos de idade, no Instituto Biofábrica de Cacau. Após o enraizamento (quatro a cinco meses de idade), as mudas clonais foram cultivadas em vasos plásticos com capacidade de 16 L, contendo solo como substrato, e crescidas a 50% de sombreamento, em condições de viveiro. A irrigação foi realizada diariamente com água de torneira, de maneira que a umidade do solo fosse mantida próxima à capacidade de campo. A adubação foi feita levando em consideração a análise química do solo e as exigências nutricionais do cacauzeiro na fase inicial de crescimento (SOUZA JÚNIOR, 2007).

Após sete meses de idade, no momento de implantação dos tratamentos, parte das mudas clonais, dos diversos genótipos estudados, foi transferida para dois diferentes níveis de sombreamento [0% (pleno sol) e 95%], e parte foi mantida em 50% de sombreamento (tratamento controle).

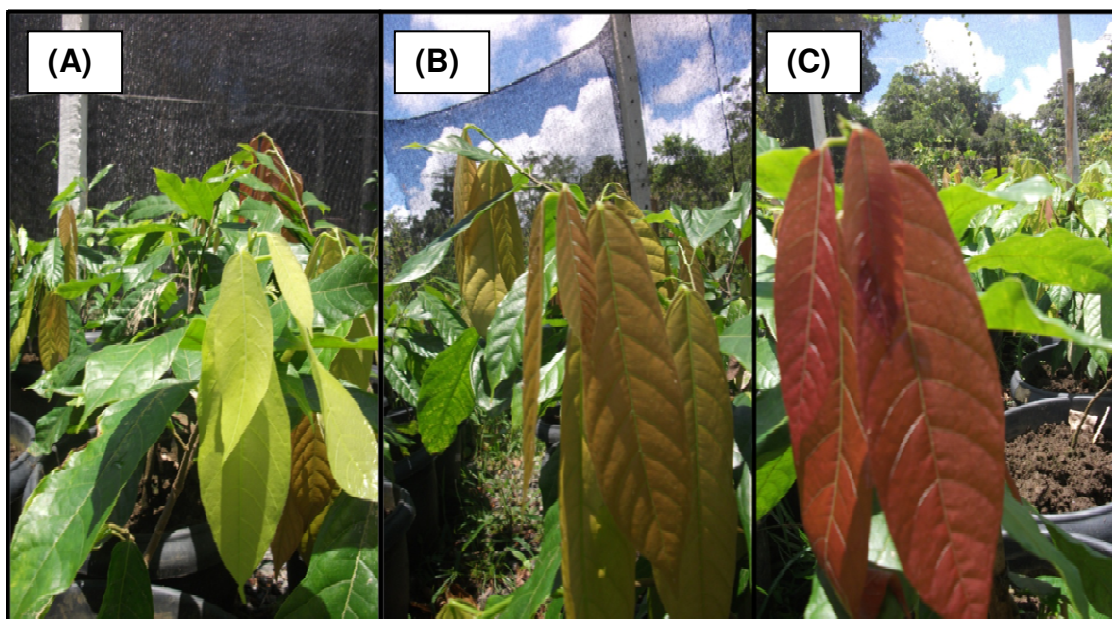


Figura 1 – Genótipos clonais de *Theobroma cacao* L., com sete meses de idade, apresentando os lançamentos foliares desprovidos de antocianinas [(A), ‘Catongo’, mutante e cultivado], com antocianinas em baixas [(B), SCA-6, tipo selvagem, pouco cultivado] e altas [(C), SJ-02, cultivado e altamente produtivo] concentrações em nível vacuolar.

Os níveis de sombreamento artificial foram implementados com utilização de telas plásticas pretas de 50 e 95% de atenuação da radiação global, fixadas tanto no topo como nas laterais, com a utilização de arame galvanizado, em estruturas construídas com estacas de concreto de 2 m de altura, espaçadas de 5 x 5 m, de forma a permitir a criação de dois ambientes de sombra com dimensões de 5 x 5 x 2 m e um a pleno sol com as mesmas dimensões.

Durante o período experimental, a radiação fotossinteticamente ativa (RFA) foi monitorada, ao nível da extremidade superior das mudas clonais, com a utilização de um sensor de radiação luminosa *S-LIA-M003* acoplado a uma estação climatológica *Hobo Micro Station Data Logger* (*Onset, EUA*) (Figura 2). A estação foi programada para coletar dados a cada 5 min. de RFA, temperatura e umidade relativa do ar no interior de cada estrutura de sombreamento e ao pleno sol, entre 6:00 às 18:00h. A precipitação pluviométrica foi monitorada com o uso de um pluviômetro. Os valores médios (\pm EP) da temperatura e umidade relativa do ar e da precipitação pluviométrica obtidos durante o período experimental foram de $24,1 \pm 0,4$ °C, $87,8 \pm 1,6\%$ e $457,8 \pm 12,5$ mm, respectivamente.

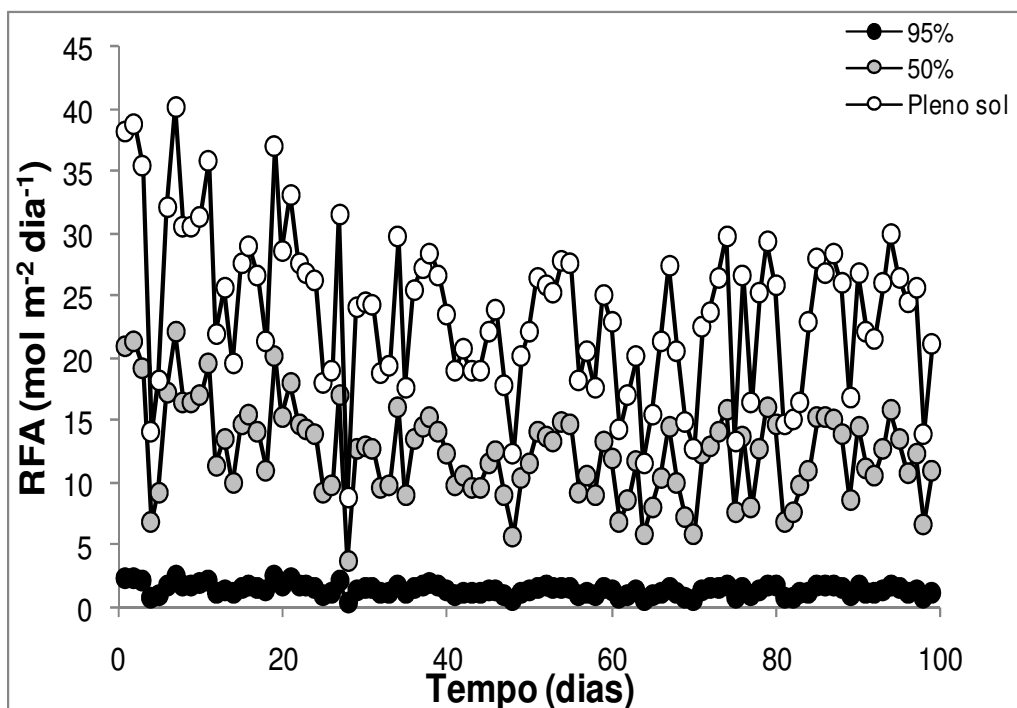


Figura 2 - Radiação fossinteticamente ativa (RFA) monitorada nos ambientes de sombra e a pleno sol durante o período experimental.

3.2 . Trocas gasosas foliares

Inicialmente, as medições de trocas gasosas foram efetuadas em folhas maduras do último lançamento, as 24 e 48 h após a transferência das mudas clonais dos diferentes genótipos do ambiente de 50% de sombreamento para os ambientes de 95% de sombreamento e pleno sol, utilizando o medidor de fotossíntese portátil modelo Li-6400 (Li-Cor Biosciences Inc., Lincoln, NE, USA), equipado com uma fonte de luz artificial 6400-02B *RedBlue*. Posteriormente, 45 dias após a transferência, fez-se novas medições pontuais em folhas maduras do último lançamento, dos diferentes genótipos clonais, crescidas e desenvolvidas nos diversos ambientes [50% (controle), 95% e a pleno sol] entre 8:00 a.m. e 12:00 a.m.

Durante as medições, a fonte de luz artificial foi ajustada para prover um RFA de 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, acima da irradiância de saturação para espécie *T. cacao*, sem provocar fotoinibição. As leituras foram registradas em intervalos de 1-2 min., quando o coeficiente de variação atingisse valores inferiores a 0,3% ($\text{CV} < 0,3\%$). O fluxo de CO_2 foi ajustado para manter uma concentração de 380 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ no

interior da câmara e a temperatura da câmara foliar foi mantida constante em 26 °C. As taxas de fotossíntese líquida por unidade de área foliar (A), a condutância estomática ao vapor de água (gs), a taxa transpiratória foliar (E) foram estimadas a partir dos valores da variação de CO₂ e da umidade do ar no interior da câmara, determinados pelo analisador de gases a infravermelho do referido aparelho.

3.3. *Fluorescência da clorofila*

As medições de fluorescência da clorofila 'a' foram efetuadas simultaneamente com as medições de trocas gasosas foliares, usando o mesmo equipamento portátil de medição de fotossíntese (LI-COR, Inc. Lincoln, Nebraska, USA), modelo Li-6400, com câmara Li-6400-40. Em cada medição, um *clip* foliar foi colocado na folha madura do último lançamento por 30 min. para a reflexão da radiação solar, o decréscimo da temperatura foliar e a oxidação de todo o sistema de transporte fotossintético de elétrons. Os sinais de fluorescência foram registrados no sistema de aquisição de dados do Li-6400, que forneceu automaticamente as fluorescências mínima (F_o), máxima (F_m) e o rendimento quântico potencial máximo de FS II (F_v/F_m). A exemplo das trocas gasosas foliares, as medições foram efetuadas em folhas maduras, as 24 e 48 h após a transferência das mudas dos genótipos clonais para os diferentes ambientes de luz, e em folhas maduras emitidas nos ambientes após 45 dias de transferência.

3.4 . *Anatomia foliar*

Aos 45 dias após a transferência das mudas dos genótipos clonais para os diferentes ambientes, quando já haviam emitidas e amadurecidas novas folhas, coletaram-se para as análises anatômicas três folhas de cada genótipo em cada tratamento. Logo após, retiraram-se amostras do limbo, na região mediana de folhas maduras de 'Catongo', SCA-6 e SJ-02 para a realização de cortes anatômicos transversais. O material coletado foi fixado em glutaraldeído a 1,5% e em tampão cacodilato de sódio a 0,1 mol L⁻¹. Para os estudos pormenorizados, foram feitos cortes histológicos em micrótomo rotativo, a partir de material desidratado em série etanólica e incluído em historesina (Leica®). Posteriormente, os cortes foram

submetidos ao processo de coloração com azul de toluidina a 1% (KRAUS; ARDUIN, 1997). As análises dos cortes transversais foram feitas em microscópio óptico e a documentação dos resultados obtidos em fotomicroscópio *Olympus BX40*. A espessura da lâmina foliar, da epiderme nas faces abaxial e adaxial, e dos parênquimas paliçádico e lacunoso, para os três genótipos clonais de *T. cacao* aclimatados nos três níveis de irradiância (pleno sol, 50% e 95% de sombreamento), foram calculadas com auxílio do programa computacional *Sigma Scan®*.

3.5 . Pigmentos cloroplastídicos

Os teores de clorofila *a* (*Chl a*), clorofila *b* (*Chl b*) e carotenoides (*Car*) foram determinados em folhas maduras do último lançamento, em cinco mudas clonais de cada genótipo, nos dois níveis de sombreamento (50% e 95%) e a pleno sol, aos 45 dias após a transferência das mudas para os diferentes ambientes, quando já haviam emitidas e amadurecidas novas folhas.

Inicialmente, coletaram-se as folhas que, imediatamente após, foram colocadas em sacos plásticos fechados, contendo algodão umedecido com água, para minimizar a transpiração durante o seu transporte até o laboratório. Imediatamente após, três discos foliares internervais, com 5 mm de diâmetro e biomassa fresca conhecida, foram retirados de cada repetição e incubados em tubos de penicilina, recobertos com papel alumínio, contendo 4 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com CaCO₃ (HISCOX e ISRAELSTAM, 1979), por 14 h em temperatura ambiente. Logo em seguida, a absorvância dos extratos foi lida em espectrofotômetro de microplacas (*VERSAmax*) nos comprimentos de onda correspondes a 649 nm, 665 nm e 480 nm. Posteriormente, determinaram-se os teores *Chl a*, *Chl b* e *Car* de acordo a metodologia descrita por Wellburn (1997), usando as equações abaixo e expressando os teores estimados em função da biomassa fresca e da área foliar.

Equações de teor de pigmentos em $\mu\text{g mL}^{-1}$:

$$\text{Chl } a = (12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649}).$$

$$\text{Chl } b = (25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665}).$$

$$\text{Car} = ((1000 \times A_{480}) - (1,63 \times \text{Chl } a) - (53,78 \times \text{Chl } b))/220.$$

3.6. Flavonoides totais e Antocianinas

Determinou-se o teor de flavonoides totais e de antocianinas em folhas maduras, do último lançamento, de três mudas clonais de cada genótipo, nos dois níveis de sombreamento (50% e 95%) e a pleno sol, aos 45 dias após a transferência das mudas para os diferentes ambientes, quando já haviam emitidas e amadurecidas novas folhas, seguindo os procedimentos metodológicos descritos por Lees e Francis (1972). Além disso, determinaram-se também estes mesmos compostos em folhas jovens dos três genótipos clonais, mas apenas para o ambiente controle (50% de sombreamento).

As folhas coletadas foram cobertas com papel alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas. Posteriormente, procedeu-se a homogeneização da amostra e, em seguida, retirou-se 0,5 g de cada amostra macerada e adicionou 30 mL da solução extratora contendo etanol a 95% e HCl $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ (85:15), onde permaneceu por 12 h a 4°C . Após este período, filtrou-se a amostra digerida em papel de filtro (Whatman), coletou-se o filtrado e completou o volume para 100 mL com a solução extratora. Logo após, fez-se a leitura da absorbância, usando um espectrômetro de microplacas (*VERSAmax*), nos comprimentos de onda correspondentes a 535 nm e 370 nm para a determinação dos teores de antocianinas e flavonoides totais, respectivamente. Os resultados foram expressos em mg de quercetina g^{-1} de biomassa seca (BS), utilizando a seguinte equação:

$$\text{Teor de antocianinas totais ou flavonoides} = A \times Fd \times \frac{1}{\bar{E}} \text{ (mg quercetina g}^{-1} \text{ BS)}$$

Onde, A = absorvância de 535 nm ou 374 nm;

Fd = Fator de diluição;

\bar{E} = Coeficiente de extinção molar para a quercetina, nos respectivos comprimentos de onda.

3.7. Peroxidases do Guaiacol

Para análise da atividade de peroxidases (PODs), as folhas maduras do último lançamento foram coletadas de cinco mudas clonais de cada genótipo e tratamento nos tempos correspondentes a 0; 2; 4; 8; 24; 48 e 96 h após a transferência dos genótipos clonais de 50% de sombreamento para 95% de sombreamento e para pleno sol. Posteriormente, 45 dias após a transferência das mudas clonais, fez-se uma nova coleta de folhas maduras emitidas nos diferentes genótipos nos ambientes de 95% de sombreamento e a pleno sol.

Durante as coletas, as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C até o momento da liofilização. Posteriormente, após a liofilização, macerou-se aproximadamente 200 mg de tecido de cada amostra foliar em nitrogênio líquido. Logo após, adicionou-se tampão fosfato (50 mmol L^{-1} , pH 6,0) na proporção 4:1 (tampão:biomassa seca) e procedeu-se a ultrasonicação das amostras (*Ultrasonic processor Gex 130*, 130 W) em gelo até o rompimento total dos tecidos, com pulsos de 8 s, a intervalos de 10 s, e amplitude de 70%, repetindo o procedimento com uma amplitude de 80%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 min. a 14.000 rpm. Imediatamente após, coletou-se uma alíquota de 200 μL da fase aquosa, que foi diluída em 800 μL de tampão fosfato (50 mmol L^{-1} , pH 6,0) e armazenada, temporariamente, em gelo.

Para o ensaio enzimático, preparou-se microplacas de 96 poços contendo 140 μL de tampão de reação POD 2x [40 mmol L^{-1} de guaiacol, H_2O_2 a 0,06% e fosfato de sódio (20 mmol L^{-1} , pH 6.0)], 139 μL de tampão fosfato (50 mmol L^{-1} , pH 6,0) e 1 μL de extrato enzimático, que foi previamente diluído. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (*VERSAmax*), em comprimento de onda de 470 nm. A atividade de peroxidases foi expressa com o aumento do

consumo de guaiacol em $\mu\text{mol s}^{-1} \text{g}^{-1}$ de biomassa liofilizada. A conversão dos dados obtidos em valores de absorvância a $470 \text{ nm min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de matéria seca para consumo de guaiacol em $\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de matéria seca foi feita com o uso da equação $y=0.1284x + 0.0189$ ($R^2=0.99$) originada a partir de uma curva padrão para POD-guaiacol (REHEM *et al.*, 2011).

3.8 . Expressão gênica

Para as análises de expressão gênica, via *Real Time qRT-PCR*, foram utilizados *primers* gene-específicos de (i) *psbA* e *psbO*, associados a biossíntese das proteínas PSBA e PSBO do FS II da fase fotoquímica da fotossíntese; (ii) *ans* e *ufgt*, associados a rota biossintética das antocianinas; e (iii) *hsp70* associado a biossíntese da chaperona cloroplastídica. As coletas de folhas maduras do último lançamento, dos três genótipos clonais avaliados, foram realizadas aos 45 dias após a transferência das mudas clonais do ambiente de 50% de sombreamento para os ambientes de 95% de sombreamento e pleno sol. Inicialmente, as amostras foliares foram congeladas em nitrogênio líquido, armazenadas em ultrafreezer a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e, posteriormente, liofilizadas e armazenadas em freezer a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

A extração de RNA das amostras foliares foi realizada utilizando o *kit RNAqueous* (Ambion[®]), segundo as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras de RNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%. As amostras de RNA foram utilizadas para a síntese do cDNA com o *Revertaid H-Minus Reverse Transcriptase* (Fermentas), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando *primers* oligo d(T)15. As reações foram incubadas a $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min., $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min., $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 min. e $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min.

A PCR em tempo real quantitativa relativa (qPCR) foi realizada em um termociclador “Real Time PCR” (*Applied Biosystems*, modelo 7500), usando sequência de detecção (fluoróforo) não específica *SYBR Green I*. A abundância de transcritos foi analisada por meio de *primers* específicos conforme a Tabela 1, desenhados a partir da análise das seqüências de genes conhecidas da biblioteca de *T. cacao*. Para testar a qualidade desses *primers*, a especificidade e a identidade dos produtos da transcrição reversa, os produtos da qPCR foram monitorados após cada PCR por uma curva de análise de produtos da reação, capaz de distinguir

produtos de PCR gene-específico daqueles não-específico. A temperatura dos produtos de PCR foi elevada de 55 para 99°C a uma taxa de 1°C/5 s, e os dados resultantes foram analisados usando o *software LightCycler*. Somente uma única banda, com um ponto de fusão característico, foi observada para cada amostra, indicando que a qPCR produziu um produto específico para os *primers* utilizados. Para confirmar que a qPCR produziu somente genes de interesse, os produtos da PCR foram separados e visualizados em gel de agarose a 1%..

Valores para o Ciclo *Threshold* (C_T) foram determinados usando o *software LightCycler*. Números da expressão relativa dos genes foram calculados como uma porcentagem das mudas clonais controle utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) com o gene da β -Tubulina (Tabela 1) como endógeno (referencial), a fim de detectar alterações na abundância de transcritos.

Tabela 1. Pares de *primers* gene-específicos que foram utilizados nas análises de qRT-PCR.

Gene	Primer
<i>PsbA</i>	Forward; 5'-GGTTTGCACCTTTTACCCGA-3' Reverse; 5'-CTCATAAGGACCGCCATT-3'
<i>PsbO</i>	Forward; 5'-GCAAACGCTGAAGGAGTT-3' Reverse; 5'-GGCTTGAAGGCAAATGAGTC-3'
<i>ans</i>	Forward; 5' TTCTACGAAGGCAAGTGGATCA 3' Reverse; 5' ATCTCGACGGTGTCAACCAATG 3'
<i>ufgt</i>	Forward; 5' TCTTCAGCACTGCACAATCCA 3' Reverse; 5' TCCGGCACTCCATCTGGTA 3'
<i>hsp70</i>	Forward; 5' CGATGGCTGCCCTCAATC 3' Reverse; 5' GATGAATCTGAAGGCCCACTTT 3'
β -Tubulina	Forward; 5'-TGCAACCATGAGTGGTGTTC- 3' Reverse; 5'-CAGACGAGGGAAGGGAATGA- 3'

3.9. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 15 tratamentos, em esquema fatorial 3 x 3 (3 níveis de irradiância e 3 genótipos clonais de *T. cacao*), 3 a 5 repetições e 10 mudas clonais por unidade experimental. Foram realizadas análises de variância (ANOVA) e teste F, e, posteriormente, comparações entre as médias dos tratamentos por meio do teste Tukey ($P < 0,05$). Para a anatomia foliar e teores de flavonoides e antocianinas utilizou-se três repetições.

4. RESULTADOS

4.1. Trocas gasosas foliares

A transferência para o pleno sol reduziu a taxa fotossintética líquida por unidade de área foliar (A) dos genótipos SCA-6 e SJ-02 em 36% e 46%, e 37% e 22%, após 24 e 48 h, respectivamente, em relação aos seus respectivos controle (50% de sombreamento); ao passo que para o genótipo 'Catongo', o aumento na disponibilidade de luz não provocou reduções significativas ($P < 0,05$) de A (Figura 3, A, B, C).

Observou-se, também, que após 24 h de exposição ao pleno sol, houve redução na condutância estomática ao vapor de água (g_s), 43%, 63% e 54% para os genótipos 'Catongo', SCA-6 e SJ-02, respectivamente (Figura 3, D, E, F). Entretanto, após 48 h não se verificou diferenças significativas ($P < 0,05$) para os genótipos e os seus respectivos controles (Figura 3, D, E, F). A taxa transpiratória foliar (E) apresentou tendência similar a g_s , com reduções de 30% para 'Catongo', 58% para SCA-6 e 33% para SJ-02. Porém, após 48h, o genótipo 'Catongo' aumentou E em 37%, e SJ-02, embora não tenha sido significativamente diferente ($P < 0,05$), apresentou valores de E um pouco maior (Figura 3, G, H, I).

O sombreamento denso (95%) diminuiu a assimilação de CO_2 do 'Catongo' de forma considerável, cujas reduções de A , após 24 e 48 h da transferência das mudas clonais, foram de 41% e 44%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 3, A). Por outro lado, para o genótipo SJ-02, houve diferença significativa ($P < 0,05$) somente após 48 h, com redução de 27% comparado ao controle (Figura 3, C). Em contrapartida, o SCA-6 aumentou os valores de A em 40% após 24 h e não apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) após 48 h (Figura 3, B). As variáveis g_s e E , nesta mesma condição, seguiram os padrões de A , para cada genótipo. Sendo que para o genótipo SJ-02, g_s e E se comportaram de forma inversa à condição de pleno sol, após 24 h os valores foram similares ao controle e reduziram-se após 48h (Figura 3, D, E, F, G, H, I). Após 24h, para g_s e E , SJ-02 não apresentou diferença significativa ($P < 0,05$), SCA-6 aumentou em 50% e 51%, e 'Catongo' reduziu em 30% e 38%, respectivamente. Após 48h, houve redução para todos os genótipos, para g_s e E , 'Catongo' reduziu em 59% e 56%; SCA-6 reduziu em 43% e 63%; e SJ-02, 58% e 60%.

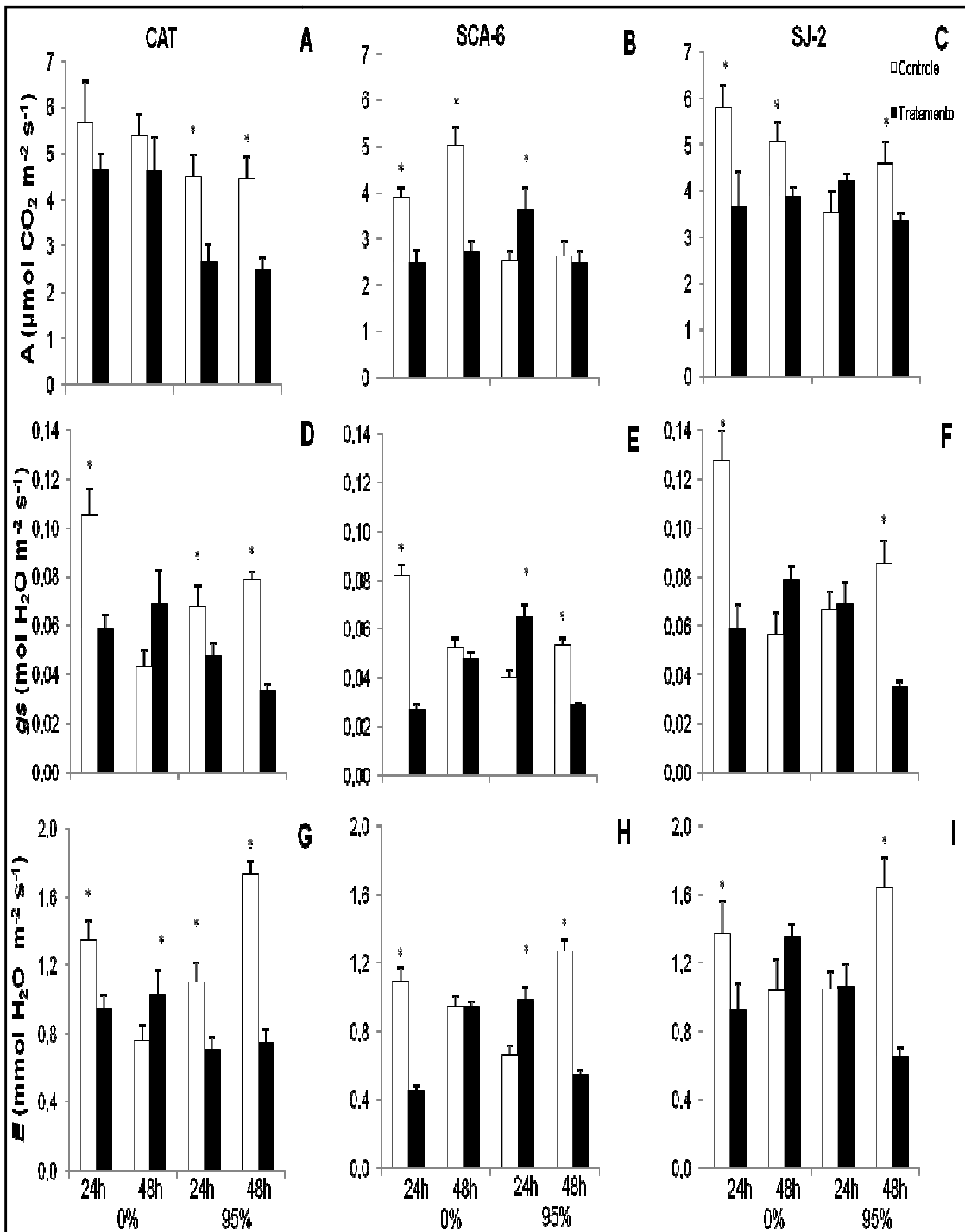


Figura 3 - Taxa fotossintética líquida (A), (A) (B) (C), condutância estomática ao vapor de água (g_s) (D) (E) (F), taxa transpiratória (E), (G), (H), (I) em folhas maduras de três genótipos clonais de *T. cacao* [*'Catongo'* (CAT); SCA-6 e SJ-02], crescidos em 50% de sombreamento e transferidos para pleno sol (0%) e 95% de sombreamento por 24 e 48h. RFA = 800 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Valores médios de quatro repetições (\pm EP). A significância estatística entre os dois ambientes (0% e 95%) foi obtida por meio do teste-t (* $P < 0,05$).

4.2– Emissão de fluorescência

4.2.1- Emissão de fluorescência durante o estresse

Verificou-se que os valores da razão F_v/F_m alteraram-se de forma significativa ($P < 0,05$) para todos os genótipos de *T. cacao* avaliados (Figura 4).

A transferência das mudas clonais para o pleno sol reduziu os valores de F_v/F_m , enquanto que o sombreamento mais denso (95%) proporcionou um incremento nestes mesmos valores, em relação ao controle, cujos de F_v/F_m variaram entre 0,75 - 0,80 (Figura 4, G, H, I). Os genótipos 'Catongo', SCA-6 e SJ-02, 24 h expostos a pleno sol (0%), reduziram-se os valores de F_v/F_m em 25%, 20% e 15%, respectivamente (Figura 4, G, H, I). Neste mesmo ambiente, o SCA-6, após 48 h de exposição ao sol, apresentou um dano maior no maquinário fotossintético, com redução de 24% nos valores de F_v/F_m , ao passo que 'Catongo' apresentou uma redução menor (16%) (Figura 4, G, H, I). Já o SJ-02 não diferiu significativamente do controle ($P < 0,05$) (Figura 4, G, H, I). Estas reduções são justificadas pelo aumento da fluorescência inicial (F_0) e pela redução da fluorescência máxima (F_m). Para 'Catongo' e SCA-6, o aumento de F_0 , após 24 e 48 h de exposição a pleno sol, foi de 42% e 16%, e de 30% e 28%, respectivamente, enquanto para SJ-02, o aumento no valor de F_0 foi significativo ($P < 0,05$) somente após 24 h de exposição solar, e correspondeu a 29% (Figura 4, A, B, C).

Em condições de baixa disponibilidade de luz (95% de sombreamento), após 24 e 48 h de exposição das mudas clonais, o valor de F_v/F_m se manteve com valores em torno de 0,81, para todos os genótipos de *T. cacao* avaliados, em consequência da redução de F_0 e aumento de F_m (Figura 4). No caso específico do 'Catongo', o aumento de F_v/F_m resultou do incremento de F_m , uma vez que F_0 se manteve constante, enquanto que para o SCA-6 e o SJ-02 houve alterações tanto em F_0 quanto em F_m , diferindo significativamente ($P < 0,05$) do controle (Figura 4, A, B, C, D, E, F).

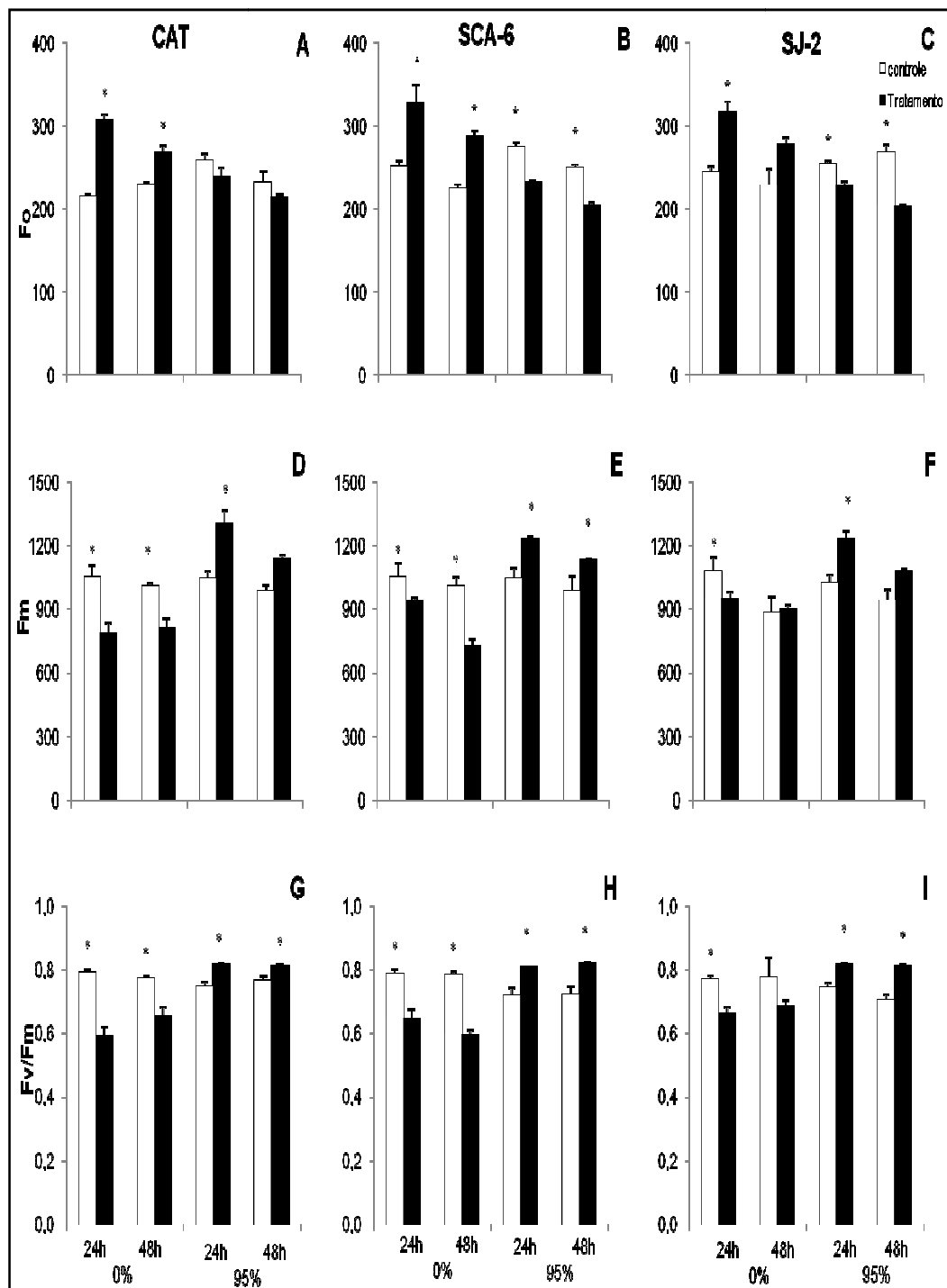


Figura 4 - Fluorescência inicial (F_o), (A) (B) (C), fluorescência máxima (F_m) (D) (E) (F), eficiência quântica máxima de FS II (F_v/F_m) (G), (H), (I) em folhas maduras de três genótipos clonais de *T. cacao* ['Catongo' (CAT), SCA-6 e SJ-02], crescidos em 50% de sombreamento e transferidos para pleno sol (0%) e 95% de sombreamento por 24 e 48 h. Valores médios de quatro repetições (\pm EP). A significância estatística entre os dois ambientes (0% e 95%) foi obtida por meio do teste-t (* $P < 0,05$).

4.2.2- Em folhas aclimatadas

Ao avaliar a emissão de fluorescência da clorofila em folhas maduras, emitidas e crescidas a pleno sol e a 50% e 95% de sombreamento, observou-se, para a razão F_v/F_m , que não houve diferença significativa ($P < 0,05$) para o SCA-6 e o SJ-02 a pleno sol, quando comparado com seus respectivos controle (50%); a exceção do 'Catongo', que diferiu significativamente dos demais genótipos (Figura 5, C). Além disso, verificou-se também que os valores de F_v/F_m foram menores a pleno sol em relação ao ambiente de 95% de sombreamento (Figura 5, C). De modo geral, pôde-se observar que F_0 não apresentou diferenças inter e intragenotípica significativas ($P < 0,05$); ao passo que F_m mostrou a mesma tendência da razão F_v/F_m para os genótipos 'Catongo' e SCA-6 (Figura 5). Em contrapartida, o SJ-02, assim como o 'Catongo', apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) entre os dois ambientes (0% e 95% de sombreamento) quando comparado com seus respectivos controle (50%) (Figura 5).

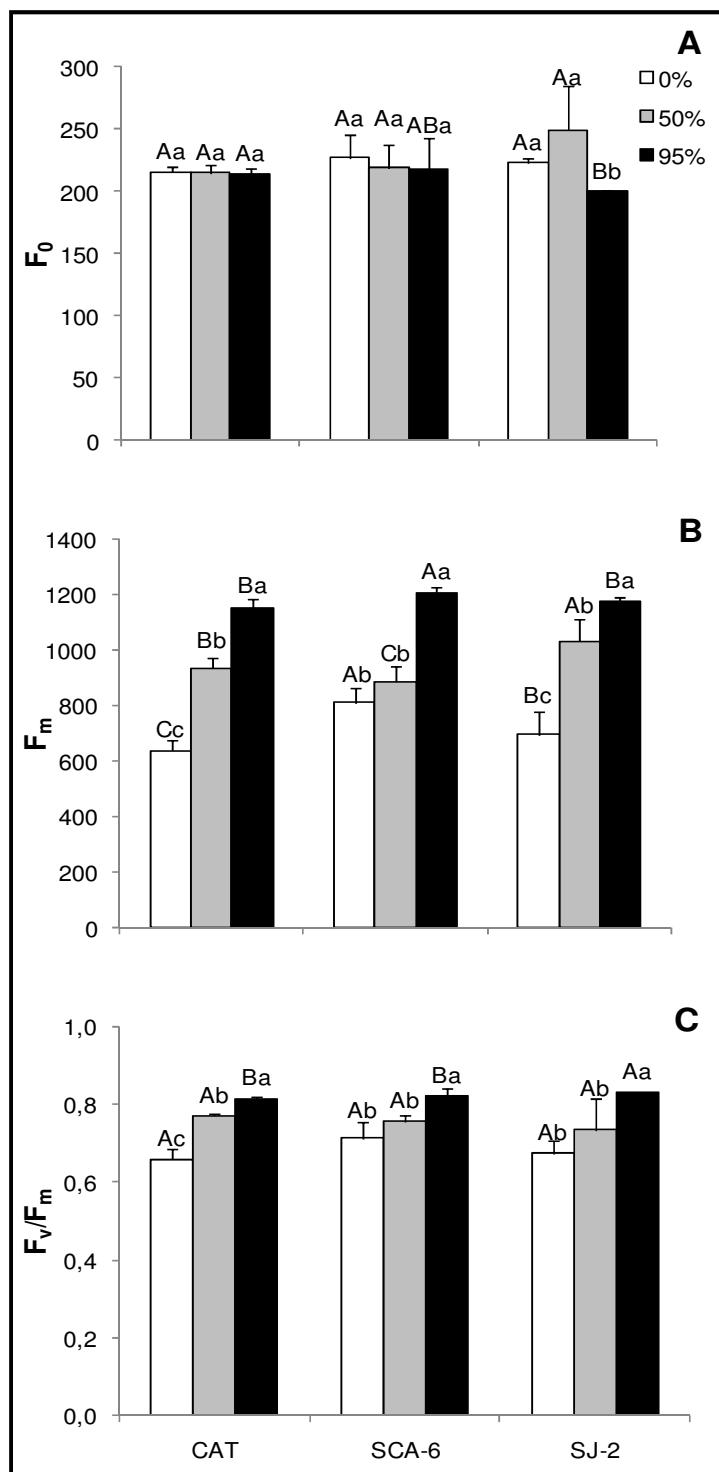


Figura 5 - Fluorescência inicial (F_o), (A), fluorescência máxima (F_m) (B), eficiência quântica máxima de FS II (F_v/F_m) (C) em folhas maduras de três genótipos clonais de *T. cacao* [*'Catongo'* (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol e a 50% e 95% de sombreamento. Valores médios de quatro repetições (\pm EP). Letras minúsculas indicam comparação entre tratamentos e maiúsculas entre genótipos, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.3 . Anatomia foliar

Ao avaliar a anatomia de folhas maduras, emitidas e crescidas a pleno sol e a 50% e 95% de sombreamento, observou-se que a espessura total da lâmina foliar (ETF), do mesofilo (EM), dos parênquimas paliçádico (PP) e lacunoso (PL) seguiu o mesmo padrão intragenotípico nos três ambientes de luz (Figura 6, C, D, E, F). O genótipo '*Catongo*' não apresentou diferença significativa ($P < 0,05$), para ETF, EM, PP e PL nos ambientes a pleno sol e a 50% de sombreamento. Em contrapartida, para o '*Catongo*', houve redução de 24,5%, 23%, 21% e 20% em ETF, EM, PP e PL, respectivamente, em 95% de sombreamento (Figura 6, C, D, E, F). Por outro lado, o SCA-6 não sofreu alterações significativas ($P < 0,05$) para ETF, EM, PP e PL nos três ambientes de luz. Observou-se, para o genótipo SJ-02, que ETF, EM, PP e PL foram maiores no ambiente de 50% de sombreamento, enquanto que a pleno sol e a 95% de sombreamento apresentou valores de ETF e EM reduzidos e não significativamente ($P < 0,05$) diferentes entre si (Figura 6, C, D, E, F).

Ao comparar os diferentes ambientes de luz, verificou-se a existência de pouca diferença intergenotípica. Observou-se, em relação a ETF, diferença significativa ($P < 0,05$) apenas no sombreamento mais denso (95%), onde o '*Catongo*' apresentou menor valor de ETF (Figura 6, F). Por outro lado, o '*Catongo*' a pleno sol apresentou EM significativamente maior do que os genótipos SCA-6 e SJ-02, cujos valores foram de 43 μm , 36 μm e 35 μm , respectivamente (Figura 6, E). Além disso, pôde-se observar que as alterações apresentadas em EM e ETF foram consequências, principalmente, do efeito da luz nos parênquimas paliçádico e lacunoso, já que as epidermes adaxiais e abaxiais foram pouco modificadas nos diferentes regimes de luz.

Para as espessuras da face adaxial da epiderme (EAD) não houve diferença significativa intragenotípica, nos diferentes níveis de irradiância, para os três genótipos clonais avaliados. Entretanto, observou-se que ocorreu diferença intergenotípica, de maneira que o genótipo SCA-6 apresentou EAD maior que os outros dois genótipos clonais avaliados (Figura 6, A). Já as espessuras da face abaxial da epiderme (EAB), SCA-6 e SJ-02 não apresentaram diferença intragenotípica significativa, enquanto que o genótipo '*Catongo*', não apresentou diferença significativa entre o ambiente de 50% e 95% de sombreamento, mas houve um aumento de 18% na EAB a pleno sol (Figura 6, B).

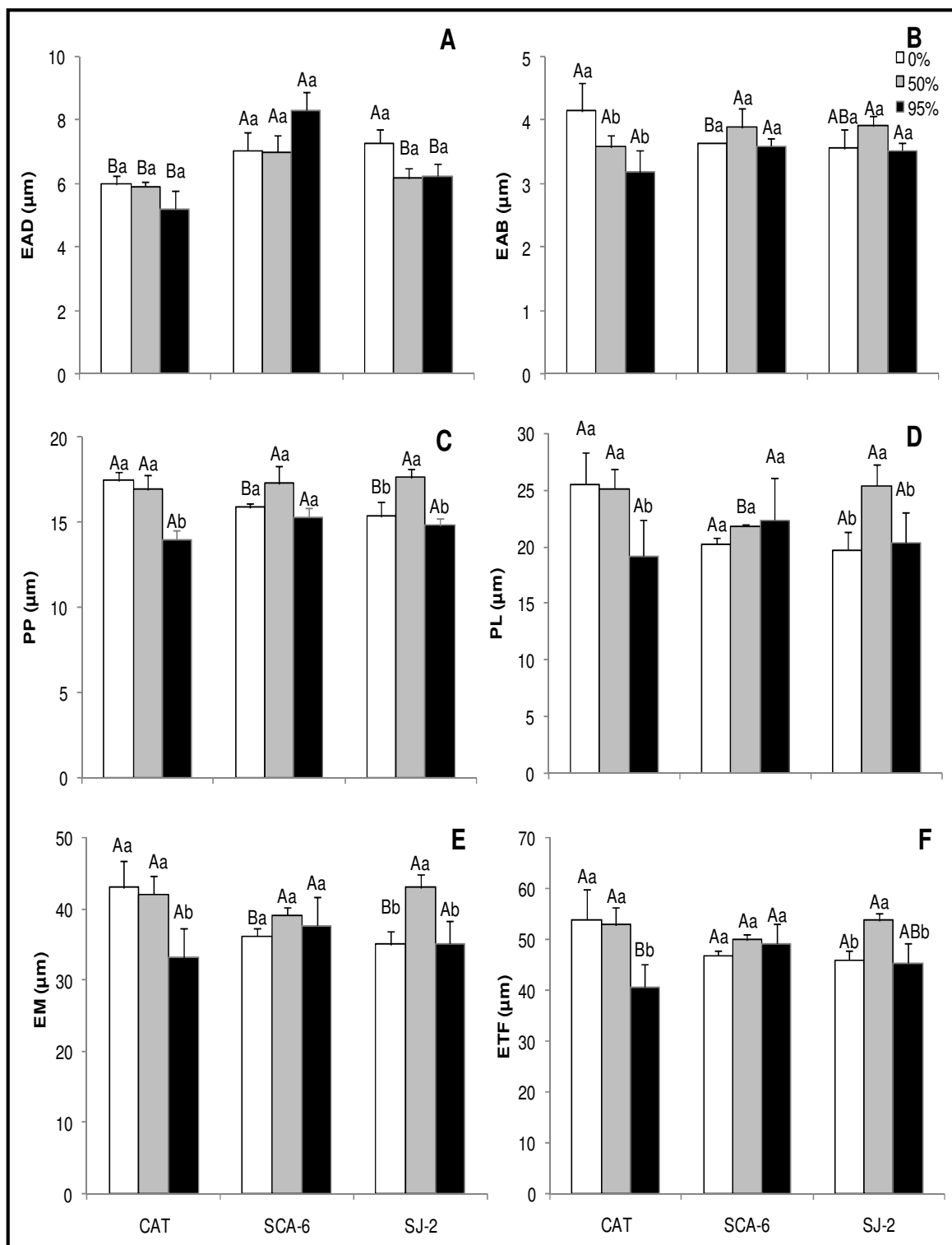


Figura 6 - Espessura (μm) das epidermes adaxial (EAD) (A) e abaxial (EAB) (B), dos parênquimas paliçádico (PP) (C) e lacunoso (PL) (D), do mesófilo (EM) (E) e da lâmina foliar (ETF) (F) em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* [*'Catongo'* (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol e a 50% e 95% de sombreamento. Valores médios de quatro repetições (\pm EP). Letras minúsculas indicam comparação entre tratamentos e maiúsculas entre genótipos, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.4 – Pigmentos cloroplastídicos

Os teores de clorofila *a* (*Chl a*), clorofila *b* (*Chl b*), clorofila total (*Chl T*) e carotenoides (*Car*) foram expressos em função de biomassa fresca e de área foliar (Figuras 7 e 8). As concentrações de pigmentos cloroplastídicos, expressos tanto em biomassa quanto em área foliar, foram significativamente ($P < 0,05$) maiores, para os três genótipos de *T. cacao* avaliados, em folha cuja ontogenia ocorreu em condições de maior sombreamento (95%) (Figuras 7 e 8). No entanto, os teores de pigmentos não estabeleceram a mesma proporção quando expressos em biomassa fresca, pois os teores de *Chl a*, *Chl b* e *Chl T*, no ambiente com 95% de sombreamento, foram 69, 72 e 79% maiores, respectivamente, do que os teores a pleno sol, para Catongo, SCA-6 e SJ-02, respectivamente (Figura 7, A, B, C). Por outro lado, quando os teores de *Chl a*, *Chl b* e *Chl T* foram expressos em área foliar, estes incrementos foram de 56, 65 e 71%, respectivamente (Figura 8, A, B, C). Além disso, pôde-se observar também a mesma diferença nos teores de carotenoides para o 'Catongo' (44 e 41), SCA-6 (60 e 50) e SJ-02 (68 e 53), quando expressos em biomassa fresca e área foliar, respectivamente (Figura 8, D e Figura 9, D).

Os teores foliares de *Chl a* e *Chl T*, para os genótipos 'Catongo' (2,0 e 2,89 mg g⁻¹) e SJ-02 (2,4 e 3,5 mg g⁻¹), foram similares no ambiente mais sombreado, ao passo que nestas condições o SCA-6 apresentou redução de aproximadamente 40% nas concentrações destes pigmentos em relação ao SJ-02 (Figura 7, A, C). Por outro lado, verificou-se, para o SJ-02, que o teor de *Chl b* foi maior que o de 'Catongo' e SCA-6, no ambiente mais sombreado (Figura 7, B). Embora os três genótipos tenham apresentado valores médios menores, para os pigmentos cloroplastídicos avaliados em condições de pleno sol, os valores apresentados pelo 'Catongo' e SCA-6 neste ambiente não diferiram do ambiente de 50% de sombreamento, ao passo que para o SJ-02 houve diferença nos teores de *Chl a*, *Chl T* e *Car* a pleno sol (Figura 7, A, C, D). Além disso, os teores de pigmentos cloroplastídicos foliares avaliados nos três genótipos de *T. cacao* não diferiram significativamente ($P < 0,05$) em condições de pleno sol e 50% de sombreamento.

Para os genótipos 'Catongo' e SCA-6, a razão *Chl a/b* foi similar em todos os ambientes de luz, ao passo que para o SJ-02 houve maior razão *Chl a/b* no ambiente de 50% de sombreamento, enquanto que a pleno sol e a 95% de sombreamento não se verificou diferença significativa ($P < 0,05$) (Figura 7, E). Este

fato foi justificado pelo aumento do teor de *Chl a*, pois o teor de *Chl b* se manteve praticamente constante, na mesma condição. Já a razão *Car/ChlT* reduziu de acordo com a irradiância, sendo menor no sombreamento de 95% e maior a pleno sol (Figura 7, F). Para os genótipos SCA-6 e SJ-02, a razão *Car/ChlT* diferiu significativamente ($P < 0,05$) nos três ambientes de luz, ao passo que para o 'Catongo' a razão se manteve constante a pleno sol e no sombreamento de 50% (Figura 7, F).

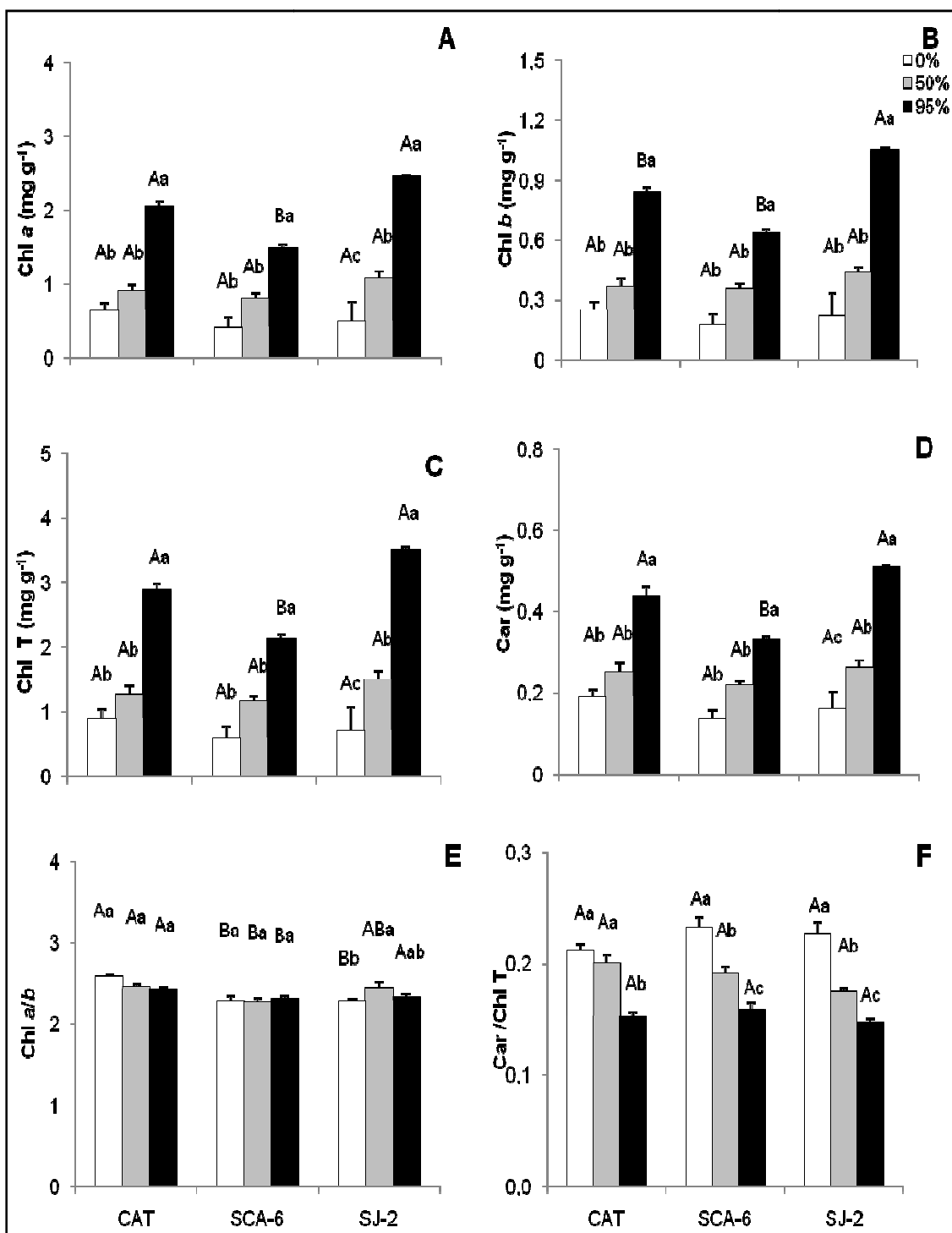


Figura 7 - Teores de clorofila *a* (*Chl a*) (A), clorofila *b* (*Chl b*) (B), clorofila total (*a+b*) (*Chl T*) (C) e carotenoides (*Car*) (D), razão clorofila *a/b* (*Chl a/b*) (E) e razão Clorofila total/carotenoides (*ChlT/Car*) (F), expressos em biomassa fresca, em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['Catongo' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol (0%) e a 50% e 95% de sombreamento. Valores médios de cinco repetições (\pm EP). Letras minúsculas indicam comparação entre tratamentos e maiúsculas entre genótipos, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

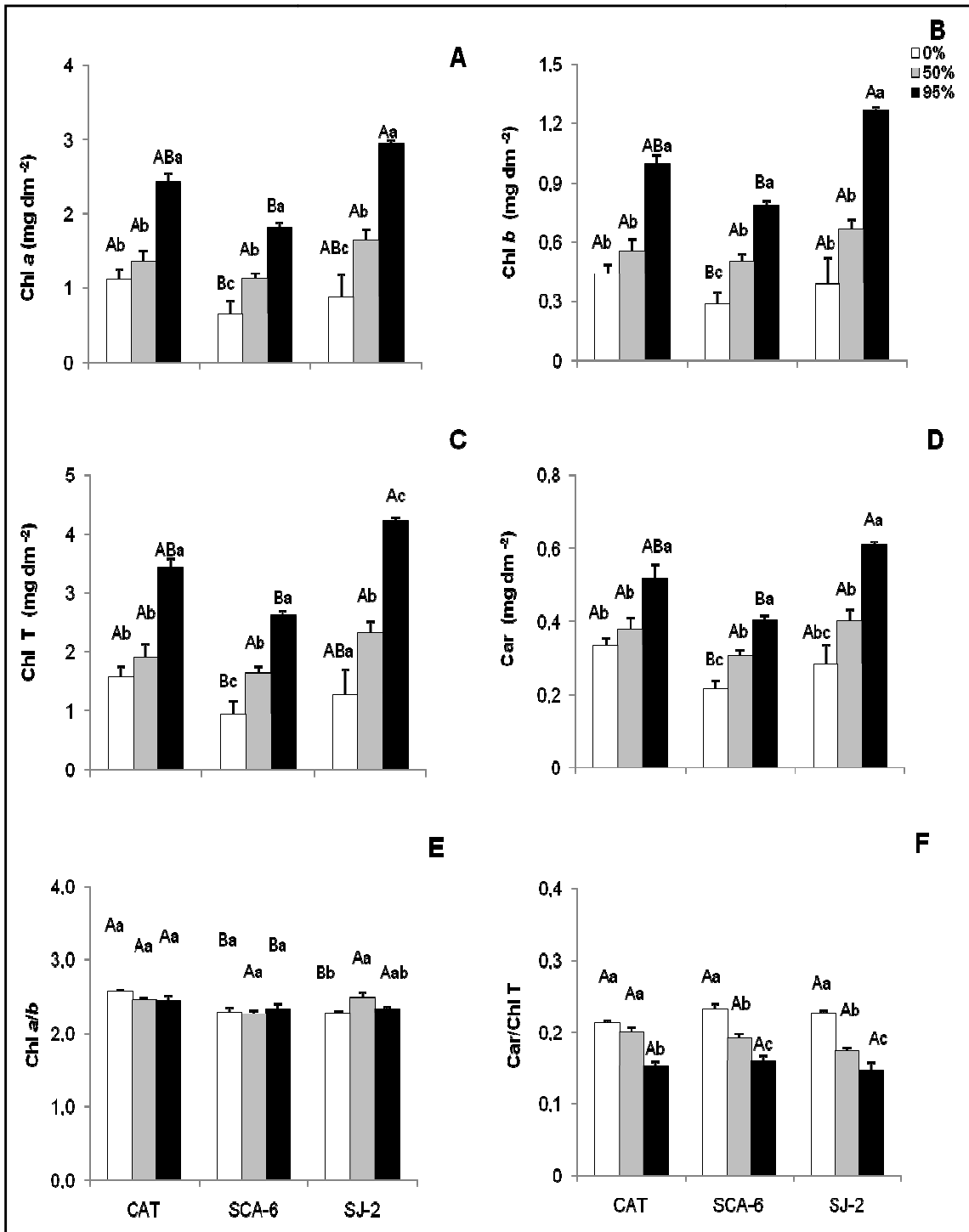


Figura 8 - Teores de clorofila *a* (*Chl a*) (A), clorofila *b* (*Chl b*) (B), clorofila total (*a+b*) (*Chl T*) (C) e carotenoides (*Car*) (D), razão clorofila *a/b* (*Chl a/b*) (E) e razão Clorofila total/carotenoides (*ChlT/Car*) (F), expressos em área, em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['Catongo' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol (0%) e a 50% e 95% de sombreamento. Valores médios de cinco repetições (\pm EP). Letras minúsculas indicam comparação entre tratamentos e maiúsculas entre genótipos, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.5 . Flavonoides totais e Antocianinas

Os teores foliares de flavonoides foram diretamente influenciados pela irradiância, para os três genótipos clonais de *T. cacao* avaliados. As folhas, cuja ontogenia ocorreu a pleno sol, apresentaram os maiores teores de flavonoides, enquanto que os menores teores foram encontrados no ambiente correspondente a 95% de sombreamento. Os teores de flavonoides encontrados em folhas maduras emitidas e crescidas a pleno sol e em 95% de sombreamento variaram de 26,4 – 33,71 e 9,36 – 11,38 mg g⁻¹ de quercetina, respectivamente (Figura 9, A).

Verificou-se, em condições de pleno sol, que o genótipo SCA-6 apresentou os maiores teores de flavonoides foliares; ao passo que nos genótipos ‘*Catongo*’ e SJ-02 os teores não diferenciaram significativamente entre si ($P < 0,05$). Observou-se, no ambiente de 50% de sombreamento, o mesmo padrão apresentado a pleno sol para os três genótipos de *T. cacao*. Entretanto, houve reduções nos teores de flavonoides de 34% para ‘*Catongo*’ e SCA-6 e de 31% para SJ-02. No ambiente mais sombreado (95%), as reduções, em relação ao pleno sol, foram de 57, 72 e 61% para os genótipos ‘*Catongo*’, SCA-6 e SJ-02, respectivamente. Já em relação ao ambiente de 50%, as respectivas reduções foram de 38, 58 e 44%. Por outro lado, não houve diferença intergenotípica significativa ($P < 0,05$) para os teores de flavonoides no ambiente de 95% de sombreamento (Figura 9, A).

Observou-se que as folhas maduras apresentaram baixos teores de antocianinas, diferindo do teor de flavonoides (Figura 9, B). Os maiores teores de antocianinas foram apresentados no ambiente de maior sombreamento. Nos diferentes níveis de irradiância, os teores de antocianinas variaram de 0,8 – 1,59 mg g⁻¹ de quercetina, sendo o menor teor apresentado pelo ‘*Catongo*’ a pleno sol, e o maior pelo genótipo SJ-02, no ambiente de 95% de sombreamento. Além disso, nas três irradiâncias, os maiores teores de antocianinas foram encontrados no SJ-02, embora não foram significativamente ($P < 0,05$) diferentes de ‘*Catongo*’ no ambiente de 50%. Por outro lado, houve diferença significativa entre os três ambientes para o genótipo ‘*Catongo*’. Em contrapartida, SCA-6 e SJ-02 não sofreram alterações significativas entre o ambiente de 50% e o pleno sol (Figura 9, B).

Verificou-se, nas análises realizadas em folhas jovens e folhas maduras emitidas no ambiente de 50%, que os teores de flavonóides, assim como os teores de antocianinas, apresentaram diferenças significativas (Figura 10, A). Observou-se,

nas diferentes irradiâncias e nos dois estádios de desenvolvimento foliar, que o genótipo SCA-6 apresentou os maiores teores de flavonoides. Entretanto, pôde-se constatar que os menores teores de flavonoides foram encontrados em folhas jovens, cujos valores foram 19, 20 e 22% inferiores para os genótipos 'Catongo', SCA-6 e SJ-02, respectivamente, quando comparados com as folhas maduras (Figura 10, A).

A variação intergenotípica e a idade das folhas foram determinantes para os teores de antocianinas em nível foliar. Enquanto o '*Catongo*' (considerado como mutante para este carácter) apresentou teor igual a 0,4 mg g⁻¹ de quercetina em folhas jovens a pleno sol, o SJ-02, nesta mesma condição, apresentou teor igual a 22,6 mg g⁻¹ de quercetina. Além disso, as folhas jovens de SCA-6 e SJ-02 apresentaram teores de antocianinas maiores (85 e 95%, respectivamente) do que as folhas maduras emitidas e crescidas em 50% de sombreamento. O mesmo fato não foi observado para '*Catongo*', onde os teores de antocianinas em folhas maduras foram maiores do que em folhas jovens (62%) (Figura 10, B).

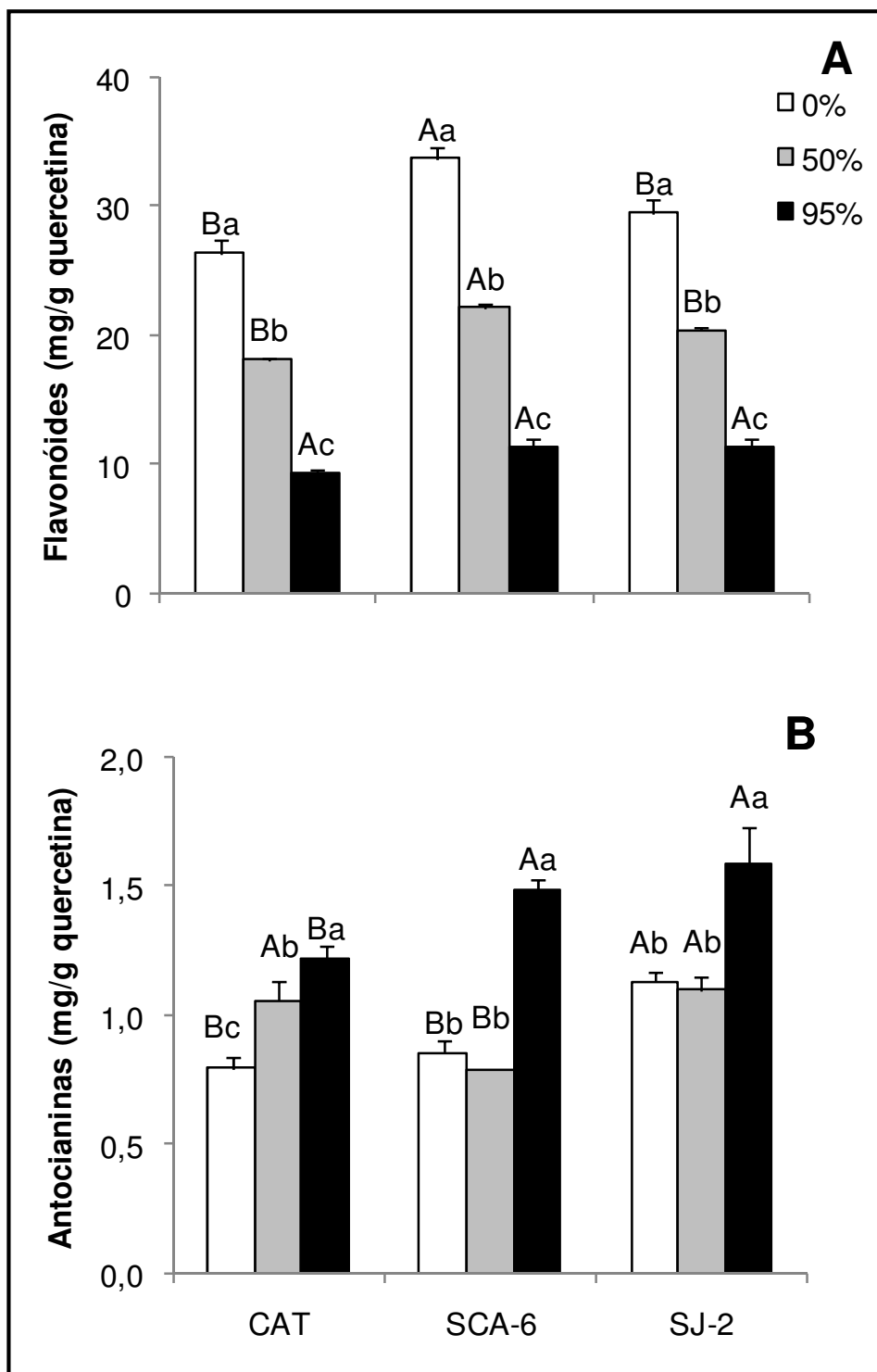


Figura 9 -Teores de flavonoides (A) e antocianinas (B) em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['Catongo' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol (0%) e a 50% e 95% de sombreamento. Valores médios de três repetições (\pm EP). Letras minúsculas indicam comparação entre tratamentos e maiúsculas entre genótipos, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

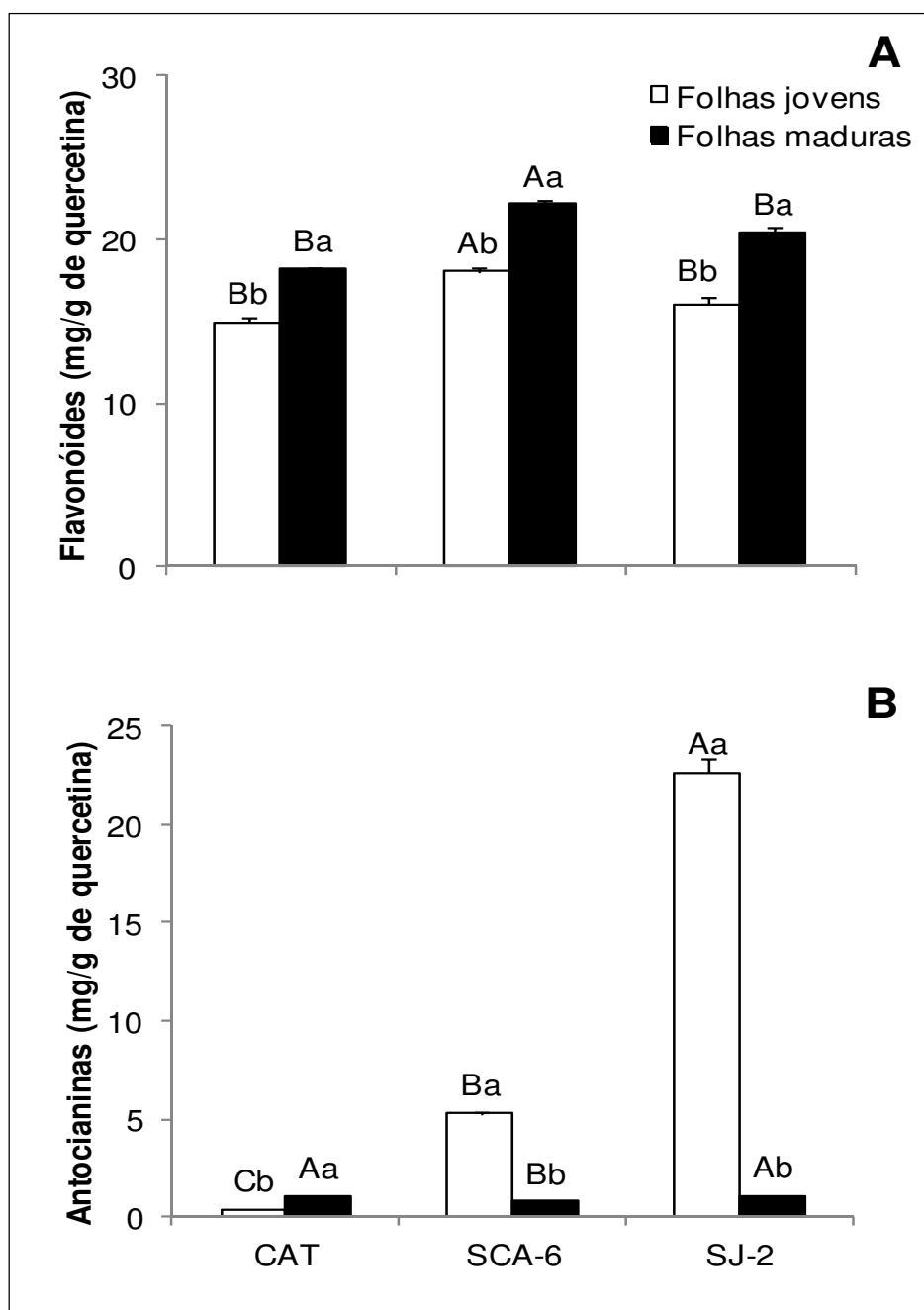


Figura 10 - Teores de flavonoides (A) e antocianinas (B) em folhas jovens e maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['*Catongo*' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a 50% de sombreamento. Valores médios de três repetições (\pm EP). Letras minúsculas indicam comparação entre tratamentos e maiúsculas entre genótipos, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.6 . Peroxidases do Guaiacol

Houve diferença significativa ($P < 0,05$) na atividade de peroxidases do guaiacol (PODs), em nível foliar, após a transferência das mudas clonais, dos diferentes genótipos de *T. cacao*, do ambiente controle (50%) para o pleno sol e para o ambiente mais sombreado (95%) (Figura 11). Para o 'Catongo', nas primeiras horas de exposição às duas diferentes irradiâncias, observou-se um incremento na atividade de PODs a pleno sol, 36%, e um declínio no ambiente de 95% de sombreamento, 62 (Figura 11, A). Por outro lado, após 48 e 96 h de exposição, verificou-se um incremento expressivo na atividade enzimática no ambiente de 95% (105% e 100%, respectivamente), e após 96h, uma redução de 41% a pleno sol (Figura 11, A). Já para o SCA-6, a atividade de PODs foi mais acentuada a pleno sol e se manteve relativamente constante por 96 h de exposição, em contrapartida, para o ambiente de 95%, após 2h e 8h, este genótipo apresentou decréscimos de 79% e 66%, respectivamente (Figura 11, B). Por outro lado, para o genótipo SJ-02, após 2 h de exposição das mudas clonais a 95% de sombreamento, houve um decréscimo acentuado na atividade de PODs em relação ao controle (70%), enquanto que após 48h, houve um incremento de 50% no pleno sol em relação ao controle (Figura 11, C).

Ao analisar as folhas maduras emitidas nos diferentes ambientes, observou-se que a atividade de PODs foi maior no ambiente mais sombreado (95%), para todos os genótipos clonais avaliados, 'Catongo' (39%), SCA-6 (52%) e SJ-02 (26,5%) (Figura 11). Por outro lado, o genótipo 'Catongo' apresentou um incremento de 25% na atividade de PODs a pleno sol, quando comparado ao controle, ao passo que o SCA-6 a pleno sol não diferenciou estatisticamente do controle. Entretanto, o SJ-02 apresentou a atividade de PODs inferior ao controle quando em pleno sol (33%) (Figura 12).

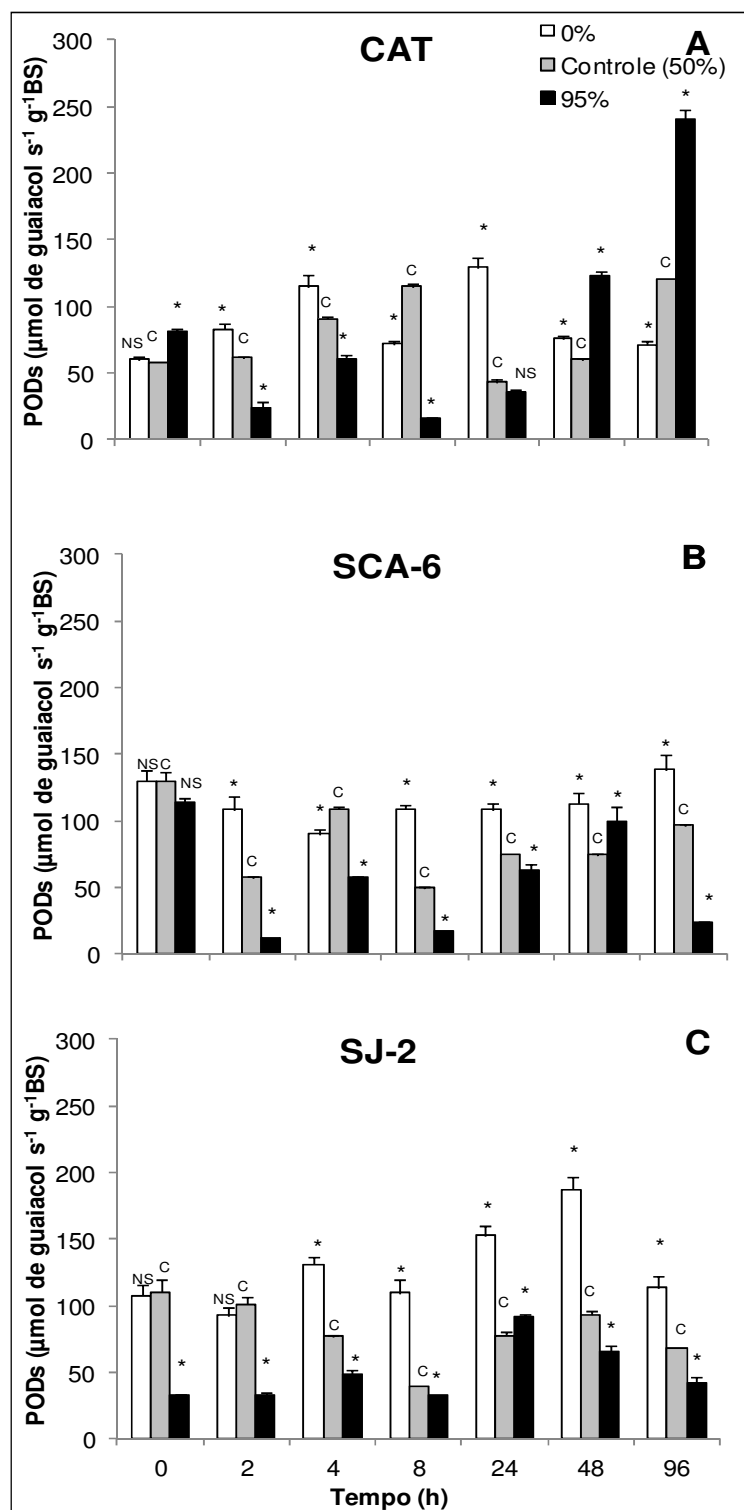


Figura 11 - Atividade de peroxidases do guaiacol (PODs) em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* [*Catongo* (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a 50% de sombreamento e transferidas para pleno sol e 95% de sombreamento em diferentes intervalos de tempo. Valores médios de cinco repetições (\pm EP). A significância estatística entre os diferentes níveis de irradiância foi obtida por meio do teste t (* $P < 0,05$).

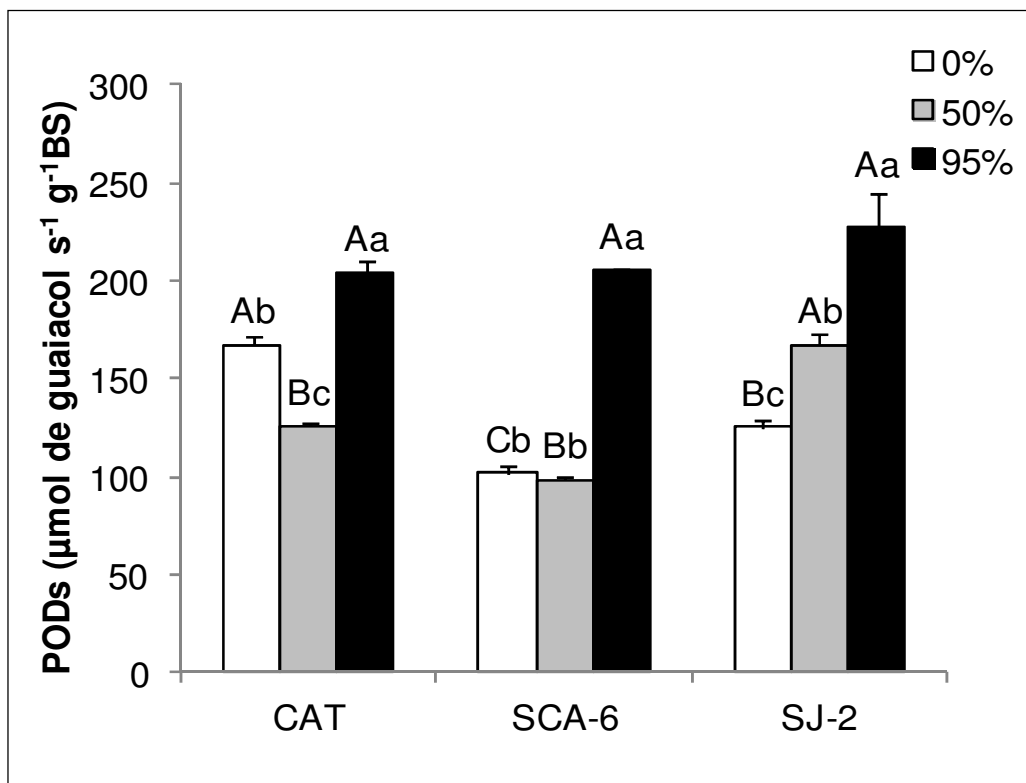


Figura 12 - Atividade de peroxidases do guaiacol (PODs) em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['Catongo' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol e a 50% e 95% de sombreamento. Valores médios de cinco repetições (\pm EP). Letras minúsculas indicam comparação entre tratamentos e maiúsculas entre genótipos, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.7 – Expressão gênica

Houve alterações significativas ($P < 0,05$) na expressão dos genes avaliados (*psbA*, *psbO*, *ans*, *ufgt* e *hsp70*), sob as diferentes condições de irradiância, para os três genótipos de *T. cacao* (Figuras 13,14, 15 e 16). A expressão dos genes *psbA* e *psbO*, responsáveis por proteínas de FS II da fase fotoquímica da fotossíntese, apresentaram tendência similar para ambos os genótipos, embora em proporções diferentes (Figura 13 e 14). Para o 'Catongo', houve um incremento expressivo na expressão de *psbA* e de *psbO* a pleno sol e a 95% de sombreamento, quando comparado ao controle (50% de sombreamento), cujos aumentos foram de 200 e 100 vezes e de 8 a 5 vezes, respectivamente (Figura 13 e 14). Entretanto, para o SJ-02 verificou-se uma leve aumento na expressão de *psbA*, 2 vezes a pleno sol e 2,5 vezes a 95% de sombreamento; e um aumento de *psbO* a pleno sol (3 vezes) e a 95% de sombreamento (5 vezes), em relação ao controle; ao passo que para o SCA-6 houve repressão de *psbA* em 95% de sombreamento, e um aumento de 2 vezes a pleno sol, e uma leve expressão de *psbO* no pleno sol (Figura 13 e 14).

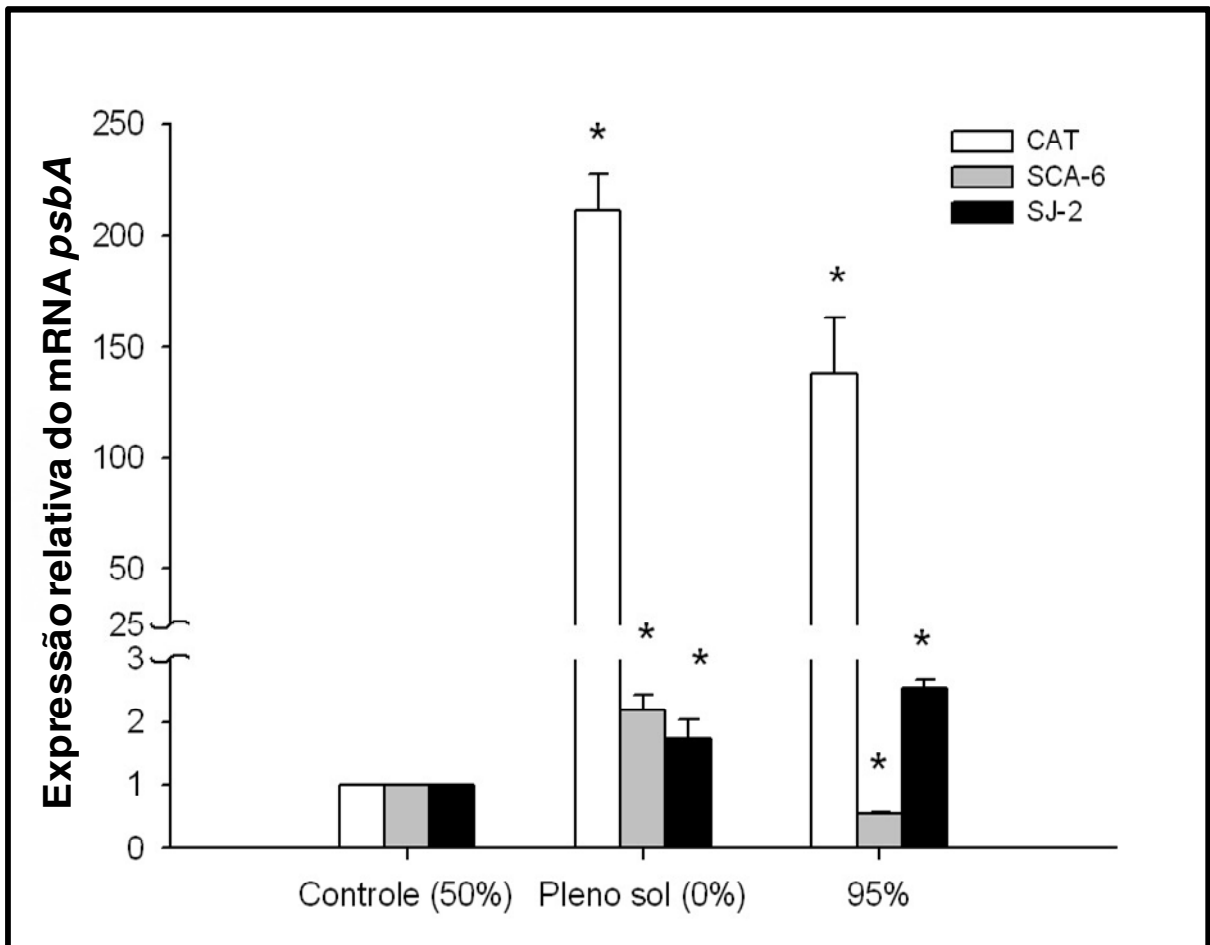


Figura 13 – Expressão relativa do gene *PsbA* em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* [*'Catongo'* (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol e a 50% e 95% de sombreamento. Valores médios de cinco repetições (\pm EP).

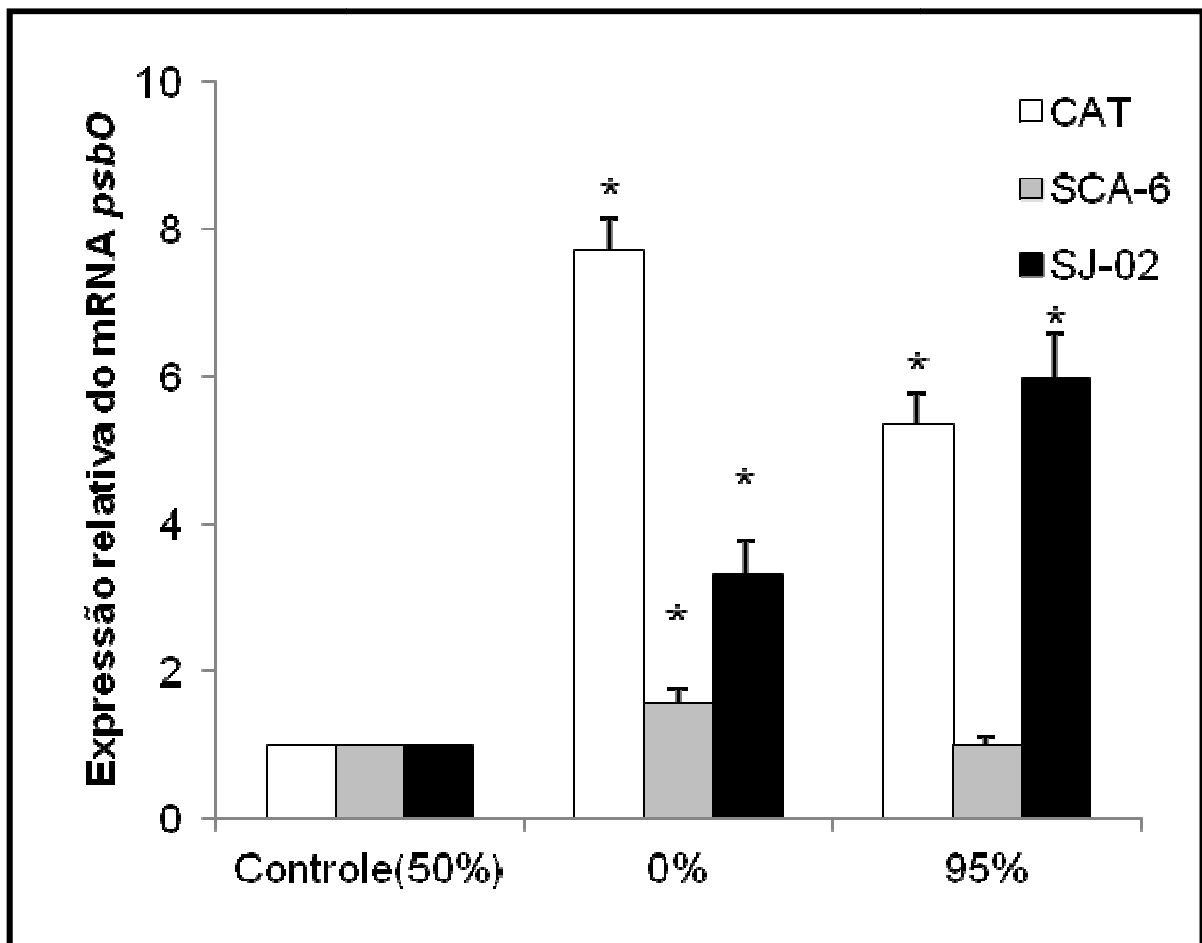


Figura 14 – Expressão relativa do gene *PsbO* em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['Catongo' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol e a 50% e 95% de sombreamento. Valores médios de cinco repetições (\pm EP).

A expressão dos genes *ans* e *ufgt*, envolvidos com a biossíntese de antocianinas, foi analisada de duas formas: (i) utilizando o ambiente de 50% de sombreamento como calibrador (Figura 15) e (ii) o genótipo 'Catongo' como controle para SCA-6 e SJ-02, em cada ambiente (Figura 16).

Na primeira análise, observou-se, para o genótipo 'Catongo', que houve um declínio na expressão do gene *ans* no ambiente de 95% de sombreamento (Figura 15, A). Em contrapartida, para o SCA-6, verificou-se um aumento de quase 8 vezes na expressão de *ans* a pleno sol e de 3 vezes no ambiente de 95% de sombreamento (Figura 15, A). Entretanto, para SJ-02, observou-se um aumento deste gene a pleno sol e uma repressão no ambiente com menor disponibilidade de irradiância (95%) (Figura 15, A). Por outro lado, para o gene *ufgt*, houve um aumento na expressão para 'Catongo' e SCA-6 a pleno sol e a 95% de sombreamento, principalmente a pleno sol, ao passo que para SJ-02 observou uma repressão deste gene em proporções similares a pleno sol e no ambiente de 95% de sombreamento (Figura 15, B).

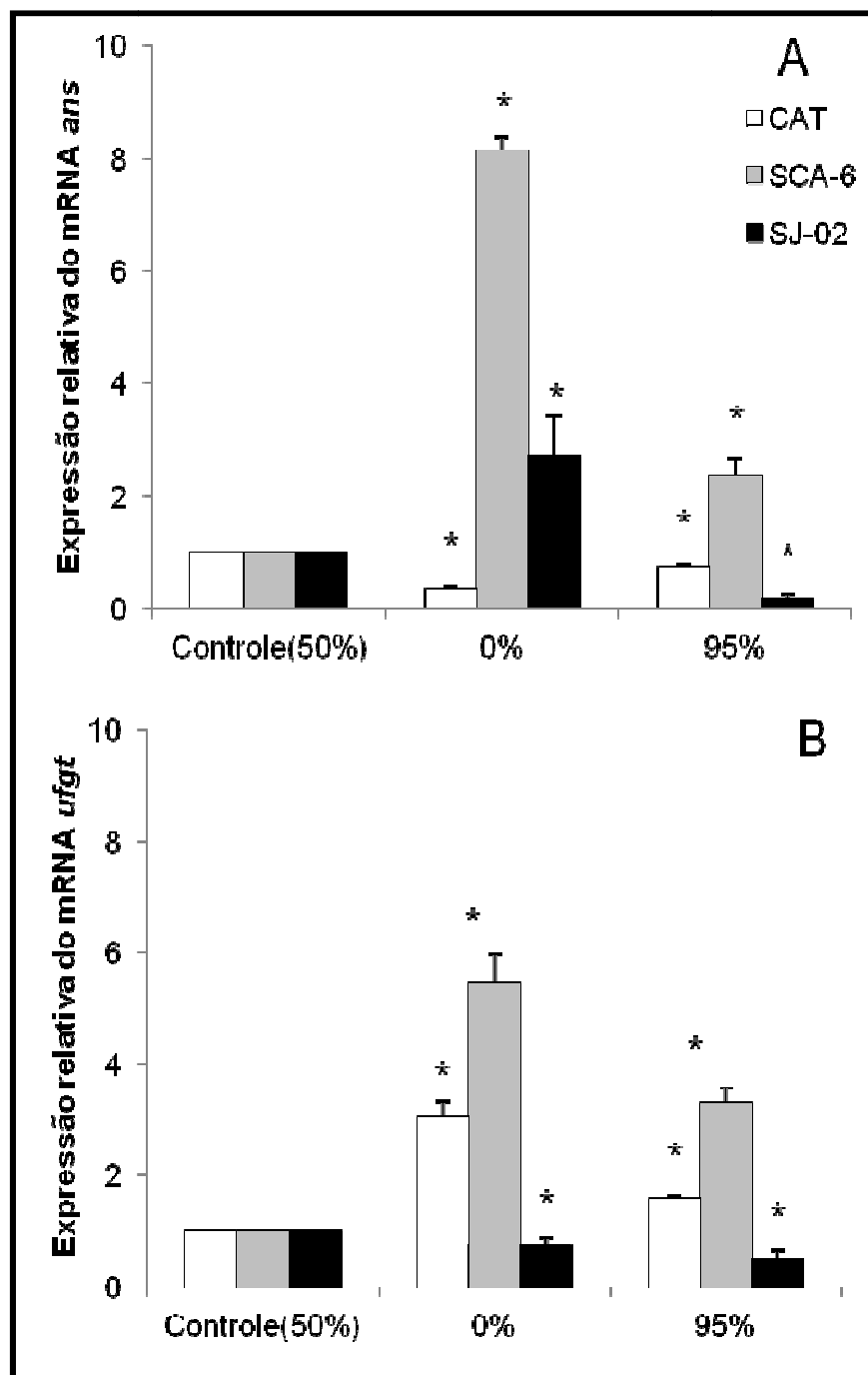


Figura 15 - Expressão relativa dos genes *ans* e *ufgt* em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['*Catongo*' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol e a 50% e 95% de sombreamento. Valores médios de cinco repetições (\pm EP).

Utilizando o 'Catongo' como controle, verificou-se, para o gene *ans*, nos ambientes de 50% e 95% de sombreamento, que houve repressão nos genótipos SCA-6 e SJ-02; ao passo que a pleno sol, apenas o SCA-6 apresentou incremento na sua expressão (Figura 16, A). Por outro lado, para o gene *ufgt*, observou-se que não houve diferença significativa em sua expressão para SJ-02 a pleno sol, entretanto houve repressão para SCA-6 (Figura 16, B). Verificou-se, no ambiente de 50% de sombreamento, uma repressão de *ufgt* para SCA-6 e SJ-02, principalmente para o SJ-02, ao passo que no ambiente de 95% houve somente repressão para SJ-02 (Figura 16, B).

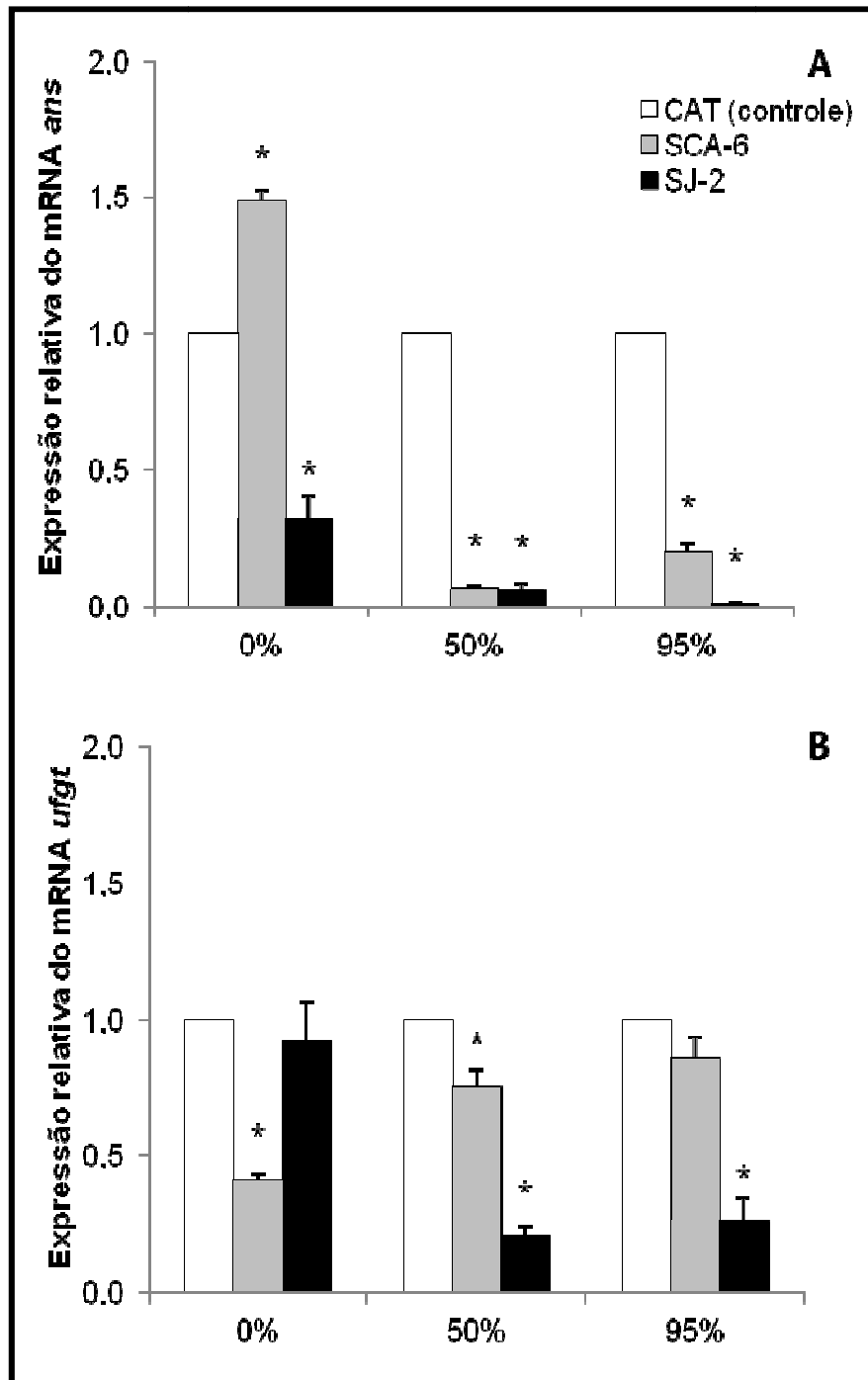


Figura 16 - Expressão relativa dos genes *ans* e *ufgt* em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['*Catongo*' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol e a 50% e 95% de sombreamento, utilizando como controle o genótipo '*Catongo*' para cada ambiente. Valores médios de cinco repetições (\pm EP).

Para a análise de expressão do gene *hsp70*, o ambiente de 50% foi o calibrador. Desta forma, os genótipos 'Catongo' e SJ-02 reprimiram a expressão deste gene a pleno sol, ao passo que o genótipo SCA-6 apresentou um leve incremento em sua expressão. Por outro lado, no ambiente de 95% de sombreamento, o 'Catongo' reduziu a expressão deste gene, enquanto que o SJ-02 não apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle; entretanto, para o SCA-6 houve um incremento em sua expressão (Figura 17).

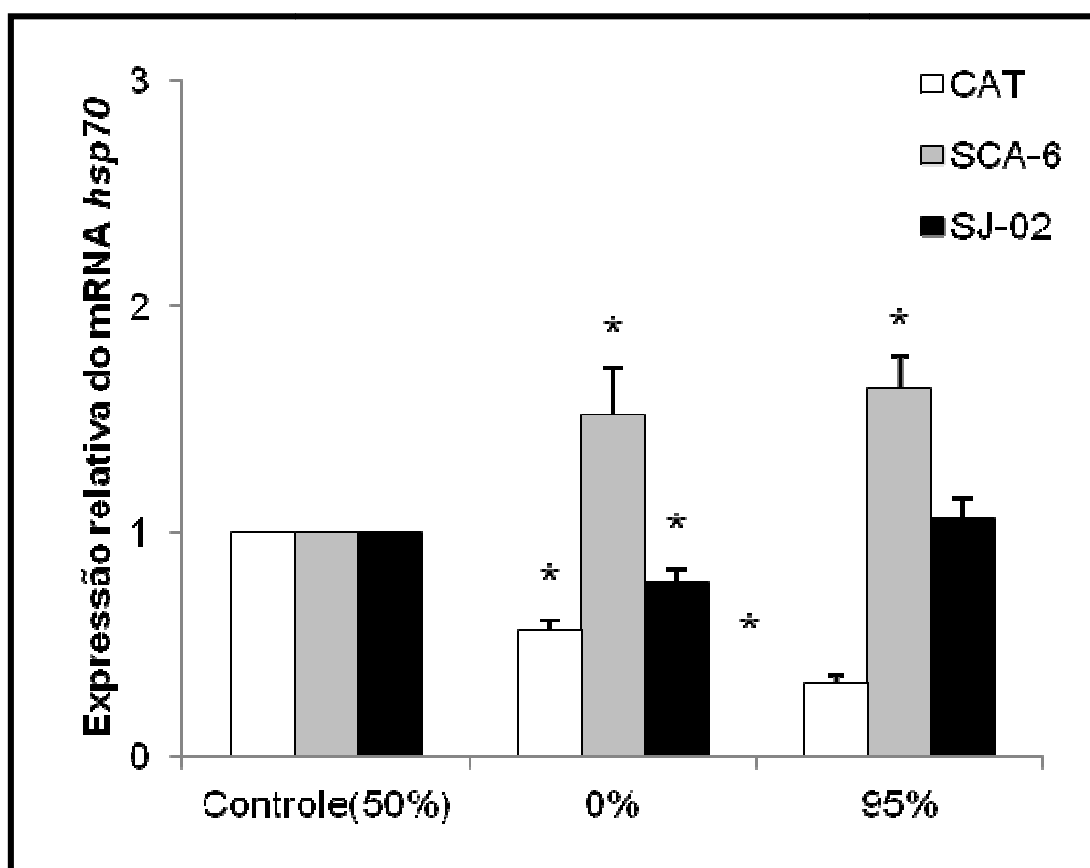


Figura 17 - Expressão do gene *hsp70* em folhas maduras, de três genótipos clonais de *T. cacao* ['Catongo' (CAT), SCA-6 e SJ-02], emitidas e crescidas a pleno sol e a 50% e 95% de sombreamento, utilizando como controle o ambientes de 50% de sombreamento. Valores médios de cinco repetições (\pm EP).

5. DISCUSSÃO

5.1 – Respostas durante o estresse

As plantas, sendo organismos sésseis, exibem capacidade marcante de alterar sua morfologia e fisiologia por aclimatação para se ajustarem a diferentes condições de irradiância, permitindo a otimização de seu uso, evitando que haja danos celulares pelo excesso de fótons, ou pela ausência de energia, para o crescimento e desenvolvimento, em condições de baixa disponibilidade de luz, ajuste este conhecido como plasticidade fenotípica (VALLADARES; NIINEMETS, 2008; DELAGRANGE *et al.*, 2004; BJÖRKMAN, 1981).

A variabilidade das características fotossintéticas determina a adaptação do cultivo a uma determinada condição de crescimento. Além disso, o conhecimento dos fatores limitantes da fotossíntese (estomático e não-estomático) é relevante para o entendimento da variação genotípica em resposta aos estresses ambientais (DAYMOND *et al.*, 2011).

A transferência súbita das mudas clonais dos genótipos de *T. cacao* avaliados, para pleno sol e para o ambiente mais sombreado (95%), provocou alterações significativas na fotossíntese. A redução na taxa fotossintética líquida (A) observada para os genótipos SCA-6 e SJ-02, após a transferência para a condição de pleno sol, ocorreu devido, principalmente, à menor condutância estomática ao vapor de água (g_s). Embora a disponibilidade de fótons fosse maior nesta condição, o que resultaria em uma maior conversão de energia luminosa em energia química, com a assimilação de CO_2 (TERASHIMA, *et al.*, 2001), as mudanças nas condições ambientais induziram o fechamento estomático.

A diminuição de g_s pode restringir a taxa de fixação de CO_2 , com a consequente diminuição de sua concentração nas cavidades subestomáticas e nos espaços intercelulares (DALEY *et al.*, 1989). O genótipo 'Catongo', mesmo com a redução em g_s , não diminuiu a assimilação de CO_2 ; provavelmente, este fato se deveu à concentração interna de CO_2 , que se manteve estável, ou às alterações bioquímicas (TANG; LIANG, 2000). Por outro lado, o aumento de g_s , para os três genótipos clonais avaliados, após 48h de exposição a pleno sol está em acordo com

Pearcy (2000), pois estômatos de folhas intactas normalmente se abrem em resposta ao aumento de RFA, demonstrando que ocorreu aclimação fisiológica.

A baixa disponibilidade de luz provocou reduções em *A*. Entretanto, esta característica foi apresentada somente para os genótipos SCA-6 e SJ-02, 48 h após a transferência de 50% para 95% de sombreamento, de forma que nas primeiras horas estes genótipos conseguiram manter altas taxas de assimilação CO₂. Isto se deve, em parte, ao fato de que a espécie *T. cacao* apresenta uma baixa irradiância de saturação (BALIGAR *et al.*, 2008; RAJA HARUM; HARDWICK, 1988). Em contrapartida, para o genótipo 'Catongo', a diminuição de *A* ocorreu imediatamente após 24 h e foi acompanhada pela redução de *gs*. Além disso, as folhas destes genótipos, aclimatadas em 50% de sombreamento, foram transferidas para uma condição de menor irradiância (95% de sombreamento). Desta forma, estas folhas não apresentavam estruturas otimizadas para captação de energia luminosa, em condições de baixa irradiância, tornando a luz um fator limitante para a assimilação de CO₂ (CHAZDON *et al.*, 1996).

Ao analisar a emissão de fluorescência da clorofila *a* em nível foliar, verificou-se, após a transferência das mudas clonais do ambiente de 50% de sombreamento para pleno sol, um aumento de F_0 e um decréscimo de F_m em todos os genótipos de *T. cacao* avaliados. Estas alterações ocorrem devido às perdas de centros de reação de FS II causadas pelo excesso de luz, que induz o estresse oxidativo, gerando intermediários de oxigênio reativos (IORs); que, por sua vez, reagem com as proteínas do sistema fotossintético, provocando danos maiores, principalmente quando afetam a proteína D1 do FS II (BAKER, 2008).

As alterações observadas para as variáveis F_0 e F_m , após a transferência do ambiente de 50 para 95% de sombreamento, corroboraram com a evidência de que o excesso de luz estava de fato provocando fotoinibição dinâmica e/ou crônica nos genótipos clonais a pleno sol, já que os genótipos expostos a baixa irradiância apresentaram valores menores de F_0 e maiores de F_m . Embora os valores de F_0 e F_m foram diferentes estatisticamente do tratamento controle (50% de sombreamento), isto não foi indicativo de fotoinibição no ambiente controle, pois a razão F_v/F_m , que informa a eficiência quântica máxima de FS II, permaneceu entre 0,75 e 0,85, o que demonstra eficiente conversão da energia luminosa em nível de FSII (TAIZ; ZEIGER, 2009), indicando a ausência de danos nas reações fotoquímicas.

A variação da razão F_v/F_m , observada para os genótipos clonais avaliados, nas diferentes condições de irradiância, foram consequência das variações de F_0 e F_m . No ambiente mais sombreado, todos os genótipos apresentaram valores de F_v/F_m próximos a 0,82, o que demonstra ausência de sinais fotoinibitórios e de danos em nível de FS II (MAXWELL ; JOHNSON, 2000); ao passo que a pleno sol houve redução de F_v/F_m , cujos valores variaram de 0,59 – 0,70, um indicativo de danos fotoinibitórios provocado pelo excesso de luz (CRITCHLEY,1998).

A fotoinibição é caracterizada por danos causados pela luz excedente à capacidade fotossintética de determinada folha (DEMMIG-ADAMS; ADAMS, 1992), podendo ser dinâmica ou crônica (OSMOND, 1994). A fotoinibição apresentada pelos genótipos analisados foi consequência de danos observados em nível de proteínas associadas ao FS II, caracterizada como fotoinibição crônica. Resultados semelhantes foram encontrados por Cai et al. (2005), em espécies lenhosas; e por Matos *et al.*, 2009 em *Coffea arabica*; ao transferirem as plantas de baixa irradiância para pleno sol, cujos sinais fotoinibitórios permaneceram por vários dias.

O ‘*Catongo*’ e o SCA-6 apresentaram valores de F_v/F_m mais baixos em relação ao SJ-02, quando expostos a pleno sol, demonstrando que estes dois genótipos são menos tolerantes aos grandes *inputs* de energia. Existem diversas maneiras de as plantas atenuarem os danos provocados pelo excesso de luz em nível foliar. Um dos processos de atenuação ocorre por meio de extinção do excesso de energia via o ciclo da xantofila; um processo dependente de luz, que ao converter violaxantina em anteraxantina, e, em seguida, em zeaxantina, reduz a disponibilidade de luz para os centros de reação dos fotossistemas 1 (FS I) e 2 (FS II) (MATSUBARA *et al.*, 2007; DEMMIG-ADAMS; ADAMS,1992).

Além do processo de fotoinibição, o estresse provocado por alta irradiância desencadeia também o estresse oxidativo, representado por intermediários de oxigênio reativos (IORs), que danificam proteínas, membranas e até mesmo as moléculas de DNA, induzindo, conseqüentemente, à morte celular programada (MTTLER, 2002). Para evitar que IORs prejudiquem o maquinário fotossintético, de forma irreversível, existem moléculas enzimáticas e não enzimáticas que atuam na eliminação de IORs (GIL; TUTEJA, 2010). O genótipo SJ-02 possui um melhor controle sobre estas alterações bioquímicas, o que o torna mais tolerante, ao estresse por alta irradiância, em relação aos genótipos SCA-6 e ‘*Catongo*’.

As alterações observadas na atividade de peroxidases (PODs), enzimas que atuam na eliminação de H_2O_2 (MULLINEAUX *et al.*, 2006), um tipo de IORs, demonstraram que o genótipo SJ-02 apresentou uma resposta mais rápida ao excesso de irradiância. Pois, após 48 h de transferência das mudas clonais do ambiente de 50% de sombreamento para pleno sol, verificou-se um aumento da atividade de PODs, que coincidiu com o momento em que a razão F_v/F_m não se diferenciou do controle, o que indica que houve atenuação dos efeitos de IORs sobre as proteínas de FS II, reduzindo, desta forma, os danos fotoinibitórios em nível foliar.

5.2 – Plasticidade fenotípica e respostas moleculares ao estresse por irradiância

As respostas fenotípicas encontradas para a anatomia foliar do genótipo 'Catongo' estão de acordo os resultados apresentados por diversos autores (BOARDMAN, 1977; BJORKMAN, 1981; LAMBERS *et al.*, 1998; BERLYN; CHO, 2000), uma vez que folhas de sol se apresentaram mais espessas em relação as de sombra. Em contrapartida, o genótipo SCA-6 apresentou uma plasticidade fenotípica menor em relação aos outros dois genótipos. O genótipo 'Catongo' não apresentou diferença significativa na espessura da folha nos ambientes de pleno sol e 50% de sombreamento. Entretanto, a sua espessura foliar foi maior do que a dos outros genótipos avaliados, que aumentaram a espessura da folha em condições de maior irradiância. Este aumento foi proporcionado principalmente pelo maior espessamento dos parênquimas paliçádico (PP) e lacunoso (PL), em decorrência do maior alongamento celular, uma vez que o número de camadas destes tecidos permaneceu constante.

O aumento da espessura foliar traduz em alto custo energético para as plantas e reflete na elevação da taxa fotossintética líquida; por causa da disponibilidade de CO_2 , que se torna maior nas lacunas do mesófilo, e dos cloroplastos que se aproximam da superfície celular, facilitando a carboxilação pela Rubisco, uma vez que a difusão do CO_2 em meio líquido é mais baixa (OGUCHI *et al.*, 2005; TERASHIMA *et al.*, 2006). Além disso, o aumento na espessura foliar, observado para o genótipo 'Catongo', também tem o papel de diminuir os efeitos fotooxidativos, aumentando a área de dissipação de energia (WIKI *et al.*, 2007).

As folhas dos genótipos 'Catongo' e SJ-02, lançadas no ambiente de 95% de sombreamento, foram menos espessas e apresentaram maior área foliar (dados não mostrados), para otimizarem a interceptação de luz e reduzir os custos energéticos (TERASHIMA *et al.*, 2001). Estas folhas também podem aquecer com mais facilidade em irradiâncias maiores, uma justificativa para o aumento da espessura foliar em ambientes com alta irradiância (TERASHIMA *et al.*, 2001).

Os teores de pigmentos cloroplastídicos foliares, determinados nos três genótipos clonais de *T. cacao*, nos diferentes níveis de irradiância, foram expressos em área e em biomassa fresca. Foi possível demonstrar que os teores destes pigmentos foram superestimados quando expressos em área foliar. Esta superestimativa ocorre em virtude da relação inversa existente entre radiação fotossinteticamente ativa (RFA) e área foliar (BOARDMAN, 1977; BJÖRKMAN, 1981; GIVNISH, 1988), que resulta em maior ou menor espessura foliar. Fato observado no presente estudo da anatomia foliar dos genótipos avaliados. Logo, os teores de pigmentos cloroplastídicos, em nível foliar, devem ser expressos em biomassa, quando estão sendo avaliadas as respostas das plantas em relação às variações da irradiância.

Para os três genótipos clonais de *T. cacao* avaliados, as variações nos teores de pigmentos cloroplastídicos foliares apresentaram as mesmas tendências a pleno sol e a 50% de sombreamento. Em contrapartida, no ambiente mais sombreado (95%), encontraram-se maiores teores de pigmentos cloroplastídicos. Este fato é atribuído ao aumento no número e tamanho dos cloroplastos e, conseqüentemente, maior desenvolvimento dos *grana* (BOARDMAN, 1977; ATANOSA *et al.*, 2003; BAIG *et al.*, 2005; SARIVEJA *et al.*, 2006).

De acordo com Björkman (1981), esperava-se que os genótipos de *T. cacao* investissem mais no teor de *Chl b*, que absorve comprimentos de onda de menor energia, em detrimento da *Chl a*, com o aumento do sombreamento. Entretanto, isto não se confirmou, devido ao aumento proporcional nos teores de *Chl a* e *Chl b*. Desta forma, para todos os genótipos avaliados, não se observou a tendência de decréscimo na razão *Chl a/b* com o aumento do sombreamento. Para os genótipos 'Catongo' e SCA-6, a razão *Chl a/b* foi similar em todas as irradiâncias. No entanto, para o SJ-02, observou-se um incremento na razão *Chl a/b* no ambiente de 50% de sombreamento, ao passo que a pleno sol e no ambiente mais sombreado (95%) não houve diferença significativa ($P < 0,05$) para esta variável. Este fato se justifica pelo

aumento no teor de *Chl a*, que não foi acompanhado pelo teor de *Chl b*, na mesma irradiância. Um dos fatores que pode interferir no aumento expressivo do teor de *Chl b*, além da intensidade de luz, é a qualidade da luz que está chegando à superfície foliar. Pois, há relatos demonstrando que a luz azul da origem a cloroplastos *sun type*, ao passo que a luz vermelha a cloroplastos *shade type* (ESKINS *et al.*, 1989). Desta forma, no presente experimento, é possível que, mesmo em baixas irradiâncias, não tenha havido alterações na qualidade da luz, com a utilização de telas plásticas pretas para atenuação da radiação global.

A razão *Car/ChIT* reduziu, para os três genótipos de *T. cacao* avaliados, de acordo com a irradiância, sendo menor a 95% de sombreamento e maior a pleno sol. Nos ambientes expostos a maiores irradiâncias, as plantas utilizam o ciclo das xantofilas (carotenoides) como extintor não-fotoquímico (DEMMING-ADAMS; ADAMS, 1992). Embora o teor de carotenoides tenha aumentado nos ambientes sombreados, a proporção não foi igual ao incremento no teor de *Chl T*, justificando as maiores razões de *Car/ChIT* a pleno sol (DEMMING-ADAMS; ADAMS, 1992; ATANOSA *et al.*, 2003). Além disso, plantas sombreadas reduzem seus gastos energéticos, devido à carência de energia luminosa para a conversão em energia química. Desta forma, um alto investimento em carotenoides, que são pigmentos acessórios durante a fase fotoquímica da fotossíntese, responsáveis pela absorção de comprimentos de onda de maior energia, não ofereceria maiores vantagens.

A partir dos valores da eficiência quântica de FS II (F_v/F_m) obtidos em folhas maduras, emitidas e crescidas nos diferentes ambientes de luz, pôde-se observar a existência de fotoinibição nos três genótipos de *T. cacao* a pleno sol, evidenciada pelo decréscimo nos valores de F_v/F_m , entretanto, a fotoinibição pode ser dinâmica, que ocorre devido a ativação de mecanismos de fotoproteção, onde dissipam calor, ou crônica, sendo que esta é consequência de danos, promovidos pelo excesso de luz, no centro de reação de FS II, composto por clorofilas e proteínas, a exemplo da proteína D1, que é a mais afetada (BAKER, 2008). Em contrapartida, a razão F_v/F_m foi superior no ambiente mais sombreado, fato não surpreendente, já que mesmo durante o estresse, momento em que não havia alterações morfofisiológicas, os genótipos demonstraram maior eficiência da conversão de energia luminosa em energia química.

Nas plantas, os cloroplastos, quando expostos ao excesso de luz, são os principais orgânulos celulares responsáveis pela produção de intermediários de

oxigênio reativos (IORs), juntamente com os mitocôndrios (GIL; TUTTEJA, 2010). As plantas eliminam os IORs, gerados no estresse oxidativo, através de mecanismo enzimático e não-enzimático. Para os genótipos de *T. cacao* avaliados, os teores de flavonoides foliares, pertencentes à via não-enzimática, apresentaram foram maiores em condições de maior luminosidade. Resultados semelhantes foram encontrados por Tattini *et al.* (2005) trabalhando com a espécie *Phillyrea latifolia*, que apresentou teores de flavonoides foliares não significativos em condições de baixa irradiância e significativos a pleno sol. Além disso, Fini *et al.* (2011) demonstraram que o excesso de luz, independente da proporção dos comprimentos de onda, regula a biossíntese dos flavonoides, evidenciando o seu papel como fotoprotetor.

Experimentos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a função dos flavonoides como extintores e/ou inibidores de IORs (AGATI *et al.*, 2007). Este papel se torna mais evidente pela variedade de classes existentes na família de flavonoides, tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas, o que permite que os mesmos possam ser encontrados em diversos compartimentos celulares, como membranas, citosol, vacúolos e cloroplastos (HERNANDÉZ *et al.*, 2008). Quando presentes nos cloroplastos, os flavonoides atuam como excelentes removedores de superóxidos gerados pelo maquinário fotossintético (AGATI *et al.*, 2007). Entretanto, as outras formas, como as citosólicas, desempenham também funções importantes, porque as EROs atravessam as membranas dos organelos, onde foram geradas, a exemplo do H₂O₂, em direção ao citosol, utilizando os canais de aquaporinas (MITTLER *et al.*, 2011).

Adicionalmente, os flavonoides beneficiam as plantas, sob o excesso de luz, por absorverem comprimentos de onda curtos, como raios UV, altamente prejudiciais às biomoléculas (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Além disso, estão envolvidos com o aumento de tricomas e de células epiteliais especializadas, que atenuam o efeito da luz (GOU *et al.*, 2011); além de atuarem, junto ao sistema enzimático, na remoção de EROs, como substratos para peroxidases e oxidase do polifenol (AGATI; TATTINI, 2010). Desta forma, o genótipo SCA-6, considerado como selvagem, possui uma proteção maior do que o 'Catongo' e o SJ-02, embora estes dois genótipos também tenham apresentado aumentos no teor deste metabólito a pleno sol.

As principais formas de flavonoides vacuolares são as antocianinas, que, para os genótipos de *T. cacao* avaliados, apresentaram uma relação negativa com a

disponibilidade de luz. Os teores de antocianinas, em folhas maduras, foram superiores sob condições de maior sombreamento (95%). Entretanto, a biossíntese deste pigmento vacuolar é determinada por mudanças ambientais, tais como combinação de baixa temperatura e excesso de luz (NIELSEN; SIMONSEN, 2011; GOULD *et al.*, 2008; PIETRINI *et al.*, 2002).

As antocianinas atuam como moléculas fotoprotetoras por dois motivos principais, absorve comprimentos de onda na região verde do espectro da luz visível, fato já observado em várias espécies, como *Zea mays* (PIETRINI *et al.*, 2002), *Quercus coccifera* (KARAGEORGOU; MANETAS, 2006), *Oxalis triangularis* (NIELSEN; SIMONSEN, 2011), entre outras (GOULD *et al.*, 2008), e por possuir características antioxidantes na eliminação de EROs (HERNANDÉZ *et al.*, 2008). Em contrapartida, folhas de sombra são extremamente sensíveis a intensidade e a qualidade de luz, devido a alta capacidade de absorver fótons, por apresentarem, dentre outras características, maior área foliar e com menor espessura (DEMMIG-ADAMS; ADAMS, 1992, BJÖRKMAN, 1981). Por esta razão, Gould *et al.* (1995) sugeriram que teores mais elevados de antocianinas, em folhas de sombra, evitam a fotoinibição, já que estes pigmentos vacuolares afetam a qualidade da luz que chega aos cloroplastos. Uma outra justificativa foi proposta por Lee *et al.* (1979), onde as antocianinas absorvem os comprimentos de onda que não são percebidos pelas clorofilas e refletem em comprimentos de onda mais longos, na região do vermelho, e, por dispersão no mesofilo foliar, são absorvidos pelas clorofilas, aumentando o uso da energia disponível.

A análise de pigmentos vacuolares, nas folhas maduras dos genótipos clonais de *T. cacao* avaliados, apresentou diferenças nítidas entre os níveis de irradiância. Entretanto, não foi possível observar as diferenças intergenotípicas que eram esperadas, a partir do julgamento fenotípico das folhas jovens, cujos teores de antocianinas diferenciam os três genótipos estudados. Para tanto, foi comparado os teores de antocianinas e flavonoides em folhas jovens e maduras do ambiente de 50% de sombreamento. Constatou-se que as folhas jovens de 'Catongo' apresentaram teores não significativos de antocianinas, considerado como genótipo mutante para este caracter; ao passo que os teores encontrados em SCA-6 e SJ-02 foram superiores aos de folhas maduras.

As folhas jovens possuem uma sensibilidade maior ao excesso de energia luminosa, devido à imaturidade do maquinário fotossintético, cuja presença de

antocianinas minimiza os efeitos da luz (STEINS *et al.*, 2002). Além disso, as antocianinas são produtos finais de uma rota bioquímica que envolve a síntese de vários metabólitos importantes contra a herbivoria; e a cor vermelha destes pigmentos vacuolares pode ser uma adaptação evolutiva, que indica a presença de compostos fenólicos, para repelir insetos (GOULD *et al.*, 2008). Contudo, foi verificado neste estudo que as folhas jovens dos três genótipos de *T. cacao* apresentaram menor teor de flavonoides totais do que as folhas maduras; indicando que estas folhas podem apenas mimetizar um perigo, ou que a principal função dos flavonoides seja de antioxidantes. Karageorgou e Manetas (2006) verificaram, para *Quercus coccífera*, que folhas jovens verdes foram mais agredidas por insetos do que as vermelhas. Desta forma, ao contrário do 'Catongo', o genótipo SCA-6 e, principalmente, o SJ-02 apresentam uma proteção ao excesso de luz e contra herbivoria por insetos.

A atividade de peroxidases do guaiacol (POD, EC 1.11.1.7) foi maior no ambiente mais sombreado (95%) nos genótipos avaliados. Entretanto, o estresse oxidativo é maior sob o excesso de luz, por causa da cadeia de transporte de elétrons dos cloroplastos e dos mitocôndrios que são mais ativadas (GIL; TUTTEJA, 2010). Contudo, há relatos de que as enzimas do estresse oxidativo diminuem suas atividades em estresse severo por excesso de luz, como foi visto para as peroxidases do ascorbato e para a dismutase do superóxido na espécie *Ligustrum vulgare* (FINI *et al.*, 2011). Além disso, nossos resultados estão de acordo com o trabalho de NOJOSA *et al.* (2002), desenvolvido com clones de *T. cacao*, que demonstrou uma correlação negativa entre a atividade de PODs e o teor de fenóis. Observou-se, no presente trabalho, no sombreado mais intenso (95%), uma redução dos teores de flavonoides (compostos fenólicos), acompanhado do aumento da atividade de PODs.

A expressão relativa do gene *psbA* foi diferente entre os genótipos de *T. cacao* avaliados. O genótipo SCA-6 apresentou maior expressão deste gene a pleno sol e reprimiu sua expressão no ambiente mais sombreado (95% de sombreado), ao passo que o SJ-02 aumentou a expressão nos dois ambientes de luz, pleno sol e 95% de sombreado, e o 'Catongo' teve uma super expressão. Entretanto, a regulação da expressão deste gene pela luz acontece principalmente em níveis pós-transcricionais e traducionais, de maneira que os cloroplastos mantêm um *pool* estável de RNA_m de *psbA* (DWIVEDI; BHARDWAJ, 1994). Já um trabalho

desenvolvido com *Pisum sativum*, demonstrou que a luz regula tanto no nível transcricional, quanto traducional (KETTUNEM *et al.*, 1997).

O gene *psbA* pertence ao genoma cloroplastídico (herança citoplasmática) e seu produto é a proteína D1 de FS II, responsável pela redução da plastoquinona e pelo complexo de evolução do oxigênio (NIXON *et al.*, 1991). A fotoinibição crônica é o desequilíbrio existente entre degradação e síntese da proteína D1, sob excesso de luz; cuja vida média desta proteína é de aproximadamente 2 h (GOH *et al.*, 2011). Concomitantemente, com o estresse por irradiância, há um excesso de produção de EROs, caracterizando o estresse oxidativo; que em última análise, inibem a síntese de novas proteínas D1, atuando no processo traducional (GOH *et al.*, 2011), aumentando, assim, os danos fotooxidativos. Desta forma, estudos proteômicos futuros podem ser úteis para explicar os resultados dos transcritos de *psbA* observados em folhas de 'Catongo'.

Os genótipos 'Catongo' e SCA-6 apresentaram maior expressão do gene *psbO* sob pleno sol, sendo que o produto deste gene é uma proteína extrínseca de FS II, que é de importância considerável para a evolução de oxigênio durante a fase fotoquímica da fotossíntese (POPELKOVA; YOCUM, 2011; SEIDLER, 1996). Além disso, a proteína PSBO, juntamente com a FSbP e PsbQ, têm demonstrado importância no acúmulo de centro de reação de FS II, podendo estar envolvidas como fatores de montagem/estabilidade deste fotossistema (BRICKER; FRANKEL, 2011). A proteína PSBO pode desempenhar esta função por meio de sua capacidade de fosforilar a proteína D1, que aumenta a estabilidade em condições de estresse, a exemplo do excesso de luz, justificando, assim, o aumento ocorrido na expressão do gene *psbO* (BRICKER; FRANKEL, 2011). Em contrapartida, o genótipo SJ-02 apresentou incremento maior na expressão de *psbO* sob menor disponibilidade de luz, demonstrando uma regulação diferenciada, ou deficiência pós-transcricional.

A expressão do gene *hsp70*, cujo produto é uma proteína cloroplastídica associada ao choque térmico, foi reprimida nos genótipos 'Catongo' e SJ-02, sob diferentes condições de irradiância, enquanto que no SCA-6 ocorreu aumento destes transcritos. As proteínas do choque térmico são também conhecidas como proteínas do estresse, porque são ativadas em diversas situações limitantes (AL-WHAIBI, 2010). As funções das proteínas HSP70 são de (i) evitar que proteínas se

agreguem; (ii) remodelar as que perderam a configuração sob condições de estresse (SCARPECI *et al.*, 2008); (iii) e regular a expressão gênica de outras HSFS, inclusive as *small HSP*, que quando localizadas no cloroplasto reduzem danos fotooxidativos (ÅKERFELT *et al.*, 2010). Assim, o genótipo SCA-6, embora não tenha apresentado muitas mudanças morfofisiológicas, demonstrou importantes respostas contra o estresse por irradiância, inclusive a produção de antioxidantes, como o teor elevado de flavonoides; e o incremento na expressão de *hsp70*, já que o H₂O₂ também ativa a sua expressão (SCARPECI *et al.*, 2008).

A expressão gênica de *ans* e de *ufgt*, relativo ao ambiente de 50% de sombreamento, não apresentou uma correlação positiva com o produto da via metabólica, as antocianinas. Isto é possível porque a correlação do transcrito com o nível do metabólito depende da vida média do transcrito, da proteína e do metabólito. Os genes *ans* e *ufgt* codificam as duas últimas enzimas da rota biossintética de antocianinas, a enzima ANS (sintetase de antocianidina) que sintetiza a antocianidina, utilizando a leucoantocianina como substrato; ao passo que a enzima UFGT (Flavonóide 3-O-glicosiltransferase) glicosila a antocianidina, atingindo a forma final das antocianinas vacuolares (WEI *et al.*, 2011).

Em pleno sol, os genótipos SCA-6 e SJ-02 aumentaram a expressão do gene *ans*, enquanto o 'Catongo' reprimiu a expressão deste gene tanto em condições de pleno sol quanto em 95% de sombreamento. Esperava-se um aumento na expressão gênica de *ans* sob excesso de luz, pois o acúmulo de antocianinas, juntamente a outras mudanças como o aumento da espessura foliar, são respostas de aclimatação para um maior *input* de energia (XIE *et al.*, 2011). No entanto, os maiores teores de antocianinas, em folhas maduras, foram encontrados sob sombreamento denso (95%) e a expressão de *ans* foi menor nesta mesma condição. Além disso, os teores de antocianinas em folhas maduras foram baixos, quando comparados aos teores observados nas folhas jovens.

O gene *ufgt* apresentou maior expressão nos genótipos 'Catongo' e SCA-6, para as condições de pleno sol e de maior sombreamento (95%). Xie *et al.* (2011) relataram que os níveis de transcritos de *ufgt* foram elevados mesmo na ausência de pigmentos, por causa da afinidade que a enzima, produto deste gene, possui pelo grupo 3-hidroxila, tanto de flavonoides quanto de antocianinas. Logo, isto seria uma possível justificativa para um maior número de transcritos de *ufgt*, já que em pleno

sol houve um maior teor de flavonoides, que podem estar sendo glicosilados por esta enzima.

Devido à ausência de antocianinas em folhas jovens de 'Catongo', a expressão dos genes *ans* e *ufgt*, para os genótipos SCA-6 e SJ-02, foi quantificada em relação ao 'Catongo'. Verificou-se que as diferenças de expressão foram maiores para o gene *ans*. Isto, provavelmente, se deve ao fato de que a enzima *UFGT* tem afinidade por outro tipo de substrato (XIE *et al.*, 2011). Observou-se, nos ambientes de 50% e 95% de sombreamento, que o gene *ans* foi reprimido nos genótipos SCA-6 e SJ-02, em relação ao 'Catongo'. É provável que a deficiência de antocianinas em 'Catongo' seja pós-transcricional.

6. CONCLUSÕES

Para os genótipos clonais 'Catongo', SCA-6 e SJ-02, as diferenças nos teores de antocianinas em nível foliar não conferiram maior tolerância ao estresse por irradiância.

As folhas dos genótipos clonais de *T. cacao* crescidas em condições de sombra e expostas imediatamente a pleno sol, bem como àquelas crescidas somente em pleno sol, apresentaram fotoinibição, independentemente dos teores de antocianinas.

O estresse por irradiância promoveu alterações na assimilação de carbono nos genótipos clonais de *T. cacao* contrastantes para os teores de antocianinas.

Os genótipos 'Catongo' e SJ-02, sob estresse por irradiância, apresentaram maior plasticidade fenotípica para a anatomia e para os teores de pigmentos cloroplastídicos em nível foliar; enquanto que o genótipo SCA-6 investiu mais nos teores de flavonoides e na expressão gênica da proteína cloroplastídica do choque térmico hsp70, pertencente à classe HSP70.

Na condição de estresse por irradiância, os genótipos 'Catongo', SCA-6 e SJ-02 apresentaram um sistema de proteção antioxidante não-enzimático mais eficiente, por meio do aumento do teor de flavonoides, do que o sistema enzimático de peroxidases.

As respostas da expressão dos genes *PsbA* e *PsbO*, responsáveis pela biossíntese da proteína D1 e por uma das proteínas envolvidas na evolução de O₂ no fotossistema 2, da fase fotoquímica da fotossíntese, respectivamente; bem como dos genes *ans* e *ufgt*, envolvidos na biossíntese de antocianinas no citoplasma, não permitiram diferenciar os genótipos de *T. cacao* avaliados na condição de estresse por irradiância.

7. REFERÊNCIAS

- ADAMS III, W.W., DEMMIG-ADAMS, B., VERHOEVEN, A.S., BARKER, D.H. Photoinhibition during winter stress: involvement of sustained xanthophyll cycle-dependent energy dissipation. **Australian Journal of Plant Physiology**. n. 22, pp. 261-276, 1994.
- AGATI, G., MATTEINI, P., GOTI, A., TATIINI, M. Chloroplast-located flavonoid scan scavenge singlet oxygen. **New Phytol.**, n. 174, pp. 77–89, 2007.
- AGATI, G., TATIINI, M. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. **New Phytol.**, n. 186, pp. 786–793, 2010.
- AKERFELT, M.; MORIMOTO, R. I.; SISTONEN, L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. **Nature**, n.11, pp. 545 – 555, 2010.
- ALMEIDA, A-A.F., VALLE, R.R.,. Cacao: Ecophysiology of Growth and Production. In: DaMATTA, FM (Ed.), Ecophysiology of Tropical Tree CroFS. Hauppauge, Nova Science Publishers Inc., pp. 37-70. 2010.
- ALMEIDA, A-A. F., VALLE, R. R. Ecophysiology of the cacao tree. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 19, n. 4, p. 425-448, 2007.
- ALVERSON WS, WHITLOCK BA, NYFFELER R, BAYER C, BAUM DA. Phylogeny of the core Malvales: evidence from ndhF sequence data. *Am. J. Bot.* 86:1474-1486, 1999.
- AL-WHAIBI, M. H. Plant heat-shock proteins: A mini review. **J. King Saud University**, n. 23, pp.139–150, 2011.
- APEL, K., HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plan. Biol.**, n. 55, pp. 373-399, 2004
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of reactive oxygens and dissipation of excess photons. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, n. 50, pp. 601- 639, 1999.
- ASARE, R. A review on cocoa agroforestry as a means for biodiversity Conservation. **Forest and Landscape Denmark**. 2006.
- BAIG, M. J.; ANAND, A., MANDAL, P.K., BHATT, R.K. Irradiance influences contents of photosynthetic pigments and proteins in tropical grasses and legumes. **Photosynthetica**, n. 43, pp. 47-53, 2005.
- BAKER, N.R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. **Annu. Rev. Plant Biol.** n. 59, pp.89–113, 2008

- BALIGAR, V.C., BUNCE, J.A., MACHADO, R.C.R., ELSON, M.K. Photosynthetic photon flux density, carbon dioxide concentration and vapor pressure deficit effects on photosynthesis in cacao seedlings. – **Photosynthetica**, n. 46, pp. 216-221, 2008.
- BARTLEY, B.G.D. The Genetic Diversity of Cacao and its Utilization. – CABI Publishing, Cambridge, 2005.
- BELSKY, J. M.; SIEBERT, S. F. Cultivating cacao: Implications of sun-grown cacao on local food security and environmental sustainability. **Agriculture and Human Values**. n. 20, p. 277–285, 2003.
- BERGMANN, J. F. The distribution of cacao cultivation in Pre-Columbian America. **Annals of the Association of American Geographers**. n. 59, pp. 85-96. 1959
- BERLYN, G. P.; CHO, J. Light, Moisture, and nutrient use by plants. In: Ashton, M.S., Montagnini, F. (Eds.) **The Silvicultural basis for agroforestry systems**. Boca Raton: CRC Press, p. 9-39. 2000.
- BJÖRKMAN, O.. Responses to different quantum flux densities. In: Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. I. New Series. Eds. O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond and H. Ziegler. **Springer-Verlag**, Berlin, 57107.1981.
- BOARDMAN, N. K.. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, 28: 355-377. 1977.
- BONGERS, F.; POPMA, J. (1990). Leaf dynamics of seedlings of rain forest species in relation to canopy gap fraction. **Oecologia**, 82: 122-127.
- BREUSEGEM, F.V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J.F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant transduction. **Plant Science**, n. 161, pp. 405-414, 2001.
- BRICKER, T. M., FRANKEL, L. K. Auxiliary functions of the PsbO, FsbP and PsbQ proteins of higher plant Photosystem II: A critical analysis. **J. Photochem. Photobiol.** n. 104, pp. 165–178, 2011.
- BRICKER, T. M., FRANKEL, L. K. The structure and function of the 33kDa extrinsic protein of photosystem II: a critical assessment. **Photosynth Res.**, n. 56, pp.157–173, 1998.
- BUER, C.S., IMIN, N., DJORDJEVIC, M.A. Flavonoids: New roles for old molecules. **J.Integr.Plant Biol.**, n. 52, pp. 98–111, 2010.
- CAI, Z-Q., RIJKERS, T., BONGERS, F. Photosynthetic acclimation to light changes in tropical monsoon forest woody species differing in adult stature. **Tree physiology**, n. 25, pp. 1023 – 1031, 2005.
- CHAZDON, R.L, PEARCY, R.W., LEE, D.W., FETCHER, N. Photosynthetic responses of tropical forest plants to contrasting light environments. In: Mulkey, S.S.,

- CHAZDON, R.L., SMITH, A.P. (Eds.), **Tropical Forest Plant Ecophysiology**, pp. 5-55, 1996.
- CHEESMAN, E.E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. *Tropical Agriculture*. v. 2, p.144-159, 1944.
- CHEMLER, J. A., LEONARD, E., KOFFAS, M. A. G. Flavonoid Biotransformations in Microorganisms. **Anthocyanins Biosynthesis, Functions and Applications** pp.191-255, 2008
- CHOQUET, Y., VALLON, O. Synthesis, assembly and degradation of thylakoid membrane proteins. **Biochimie**, n. 82, pp.615–634, 2000.
- CRITCHLEY, C. Photoinhibition. In: RAGHAVENDRA, A.S. (Ed.). *Photosynthesis: A comprehensive treatise*. **Cambridge: Cambridge University Press**. p.264-272. 1998.
- CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. New York, Columbia Univ. Press.,1262p. 1981
- CUATRECASAS, J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions from the United States National Herbarium**. v.35, p. 379-614, 1964
- DALEY, P.F.; RASCHKE, K.; BALL, J.Y.; BERRY, J.A. Topography of photosynthetic activity of leaves obtained from video images of chlorophyll fluorescence. **Plant Physiology**, n. 90, p. 1233-1238, 1989.
- DAYMOND, A.J; TRICKER, P.J.; HADLEY, P. Genotypic variation in photosynthesis in cacao is correlated with stomatal conductance and leaf nitrogen. **Biol. Plant.**, 55 (1): 99 - 104, 2011
- DEHEULVES, O.; AVELINO, J.; SOMARRIBA, E.; MALAZIEUX, E. Vegetation structure and productivity in cocoa-based agroforestry systems in Talamanca, Costa Rica. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, n. 149, pp. 181-188, 2012.
- DELAGRANGE, S., MESSIER, C., LECHOWICZ, M. J., DIZENGREME, L. P. Physiological, morphological and allocational plasticity in understory deciduous trees: importance of plant size and light availability. **Tree Physiol.** n. 22, pp.775–784, 2004.
- DEMMIG-ADAMS, B., ADAMS III, W.W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, n. 43, pp. 599-626, 1992.
- DWIVEDI, U., BHARDWAJ, R. D1 protein of photosystem II: The light sensor in chloroplasts. **J. Biosci.**, n.1, pp. 35–47, 1995.

ESKINS, K., WESTHOFF, P., BEREMAND, P.D., Light Quality and Irradiance Level Interaction in the Control of Expression of Light-Harvesting Complex of Photosystem 11. **Plant Physiol.** n.91, pp. 163-169, 1989.

FARQUHAR, G.D.; SHARKEY, T.D. Stomatal conductance and photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 33, p. 317-345, 1982.

FINI, A., BRUNETTI, C., DI FERDINANDO, M., FERRINI, F., TATTINI, M. Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. **Plant Signaling & Behavior**, n. 6, pp. 709-711, 2011.

FORSTER, B.; OSMOND, C. B. e POGSON, B. J. De novo synthesis and degradation of lx and v cycle pigments during shade and sun acclimation in avocado leaves. **Plant Physiology**, n. 149, pp.1179–1195, 2009.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria, **Physiol.Plant.** n.119, pp. 355 - 364, 2003.

GIVNISH, T. J. Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 63-92, 1988.

GOU, G –H., KO, S-K., KOH, S., KIM, Y-J., BAE, H-J. Photosynthesis and Environments: Photoinhibition and Repair Mechanisms in Plants. **J.Plant Biol.** DOI10.1007, 2011

GOULD, K., DAVIES, K., WINEFIELD, C. Anthocyanins: Biosynthesis, Functions and Applications. **Springer**, 2008.

GOULD, K.S., KUHN, D.N., LEE, D.W., Oberbauer SF. Why leaves are sometimes red. **Nature**, n. 378, pp. 241–242, 1995.

GOULD, K.S., MARKHAM, K.R., SMITH, R.H., GORIS, J. Functional role of anthocyanins in the leaves of *Quintilia serrata*. **A.Cunn. Journal of Experimental Botany**, n. 51, pp. 1107–1115, 2000.

GIL, S. S., TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, n. 48, pp. 909 – 930, 2010.

HARBORNE, J. B. The flavonoids: recent advances. In Goodwin, T. W., ed. **Plant pigments**. pp. 299-343, 1988.

HARBORNE, J.B., WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, n. 55, pp. 481–504, 2000.

HEBBAR, P., BITTENBENDER, H.C., O'DOHERTY, D. Farm and forestry production and marketing profile for cacao (*Theobroma cacao*). In: Elevelitch, C.R. (ed.). Specialty

croFS for Pacific Island agroforestry. **Permanent Agriculture Resources (PAR), Holualoa, Hawai'i**. <http://agroforestry.net/scFS>. 2011 (revised)

HERNÁNDEZ, I., ALEGRE, L., BREUSEGEM, F. V., MUNNÉ -BOSCH, S. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? **Trends Plant Sci**, n. 3, pp. 125 – 132, 2008.

HIDEG, E., MURATA, N. The irreversible photoinhibition of the photosystem II complex in leaves of *Vicia faba* under strong light. **Plant Science**, n. 130, pp. 151-158, 1997.

HISCOX, J.D., ISRAELSTAM, G. F. Different methods of chlorophyll extraction. *Can. J. Bot.*, 57: 1332-1332, 1979.

HONG, C.Y.; HSU, Y. T.; TSAI, C.; KAO, C.H. Expression of ASCORBATE PEROXIDASE 8 in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in response to NaCl. **J.Exp.Bot.**, n.58, pp. 3273-3283, 2007.

ICCO, INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. **Quarterly Bulletin of Cocoa Statistic**. Londres, ICCO, Vol XXXVII, n. 1, Cocoa year 2010/11.

KARAGEORGOU, P., MANETAS, Y. The importance of being red when young: anthocyanins and the protection of young leaves of *Quercus coccifera* from insect herbivory and excess light. **Tree Physiology**, n. 26, pp.613–621, 2006.

KETTUNEN, R., TYYSTJARVI, E., ARO, E-M. Degradation pattern of photosystem II reaction center protein D1 in intact leaves. **Plant Physiol.**, n. 111, pp. 1183-1190, 2000.

KETTUNEN, R., PURSIHEIMO, S., RINTAMAKI, E., VAN WIJK2, K-J., ARO, E-M. Transcriptional and translational adjustments of PsbA gene expression in mature chloroplasts during photoinhibition and subsequent repair of photosystem II. **Eur. J. Biochem.**, n. 247, pp.441-448, 1997.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica, RJ: EDUR,198 p. 1997

KRIEGER-LISZKAY, A. Singlet oxygen production in photosynthesis. **Journ. Experim. Bot.**, n. 411, pp. 337-346, 2004.

KYLE, D.J., OHA, I., ARNTZEN, C.J. Membrane-protein damage and repair - selective loss of a quinone-protein function in chloroplast membranes. – **PNAS-Biological Sciences**, n. 81, pp. 4070 - 4074, 1984.

KUFER, J., GRUBE, N., HEINRICH, M. Cacao in eastern Guatemala-a sacred tree with ecological significance. **Environ. Dev. Sustain.**, n. 8, pp. 597 – 608, 2006.

LAMBERS, H.; CHAPIN III, F. S.; PONS, T. L. Plant physiological ecology. **Springer Verlag**, N.Y., New York, USA, 1998.

LEAL, J. B. Diversidade genética de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) resistentes à vassoura-de-bruxa com base em marcadores RAPD e microssatélites. **Dissertação (Mestrado em Genética e biologia Molecular)**, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2004. 61p.

LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **HortScience**, v.7, p. 83-84, 1972.

LEE D.W., LOWRY, J. B., STONE, B.C. Abaxial anthocyanin layer in leaves of tropical rain forest plants: enhancer of light capture in deep shade. **Biotropica**, n.11, pp. 70–77. 1979.

LEITE, J. DE O. VALLE, R. R . Relações entre precipitação, lençol freático e a produção do cacau na Bahia. Ilhéus, BA, **Revista Agrotrópica** n.12, pp.67-74.2000.

LICHTENTHALER, H. K. Biosynthesis and Accumulation of Isoprenoid Carotenoids and Chlorophylls and Emission of Isoprene by Leaf Chloroplasts. **Bull. Georg. Natl. Acad. Sci.**, n. 3, pp. 81 - 94, 2009.

LICHTENTHALER, H.K.; BURKART, S.; SCHLINDER, C.; STOBER, F. Changes in photosynthetic pigments and in vivo chlorophyll fluorescence parameters under photoinhibitory growth conditions. *Photosynthetica*, v. 27, p. 343-353, 1982.

LINDAHL, M., SPETEA, C., HUNDAL, T., OPPENHEIM, A. B., ADAM, Z., ANDERSSON, B. The thylakoid ftsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. **The Plant Cell**, n. 12, pp. 419–431, 2000.

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

LOBÃO, D.E., SETENTA, W. C., LOBÃO, E. S. P., CURVELO, K., VALLE, R. R. Cacau cabruca: sistema agrossilvicultural tropical. In: Valle RR (ed), **Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacauzeiro**, Gráfica e Editora Vital Ltda, Ilhéus. pp. 290-323, 2007.

LOGAN, B. A., KORNIEYEV, D., HARDISON, J., HOLADAY, A.S. The role of antioxidant enzymes in photoprotection. **Photosynthesis Research.**, n. 88, pp.119–132, 2010.

MARCHESE, J.A.; MATTANA R.S; MING, L.C; BROETTO, F.; VENDRAMINI, P.F.; MORAES, R.M Irradiance stress responses of gas exchange and antioxidant enzyme contents in pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] plants. **Photosynthetica** 46: 501-505, 2008.

MATOS, F. S.; WOLFGRAMM, R.; GONÇALVES, F. V.; CAVATTE, P. C.; VENTRELLA, M.C. DAMATTA, F. M. Phenotypic plasticity in response to light in

- the coffee tree. **Environmental and Experimental Botany**, n.67, pp. 421–427, 2009.
- MATSUBARA, S., MOROSINOTTO, T., OSMOND, C. B., BASSI, R. Short - and Long -Term Operation of the Lutein – Epoxide Cycle in Light-Harvesting Antenna Complexes. **Plant Physiology**, n. 144, pp.926–941, 2007.
- MAXWELL, K., JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, n. 51. pp. 659-668, 2000.
- MELIS, A. Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: What modulates the rate of photodamage? **Trends Plant Sci.**, n. 4, pp. 130–135, 1999.
- MULLINEAUX, P. M., KARPINSKI, S., BAKER, N. R. Spatial dependence for hydrogen peroxide-directed signaling in light-stressed plants. **Plant Physiology**, n. 141, pp. 346–350, 2006.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**. v. 7, n. 9, PP. 405-410, 2002.
- MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., GOLLERY, M., VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene net work of plants. **Trends in Plant Science.**, n. 9, pp. 490 – 498, 2004.
- MITTLER, R., VANDERAUWERA, S, SUZUKI, N., MILLER, G., TOGNETTI, V. B., VANDEPOELE, K., GOLLERY, M., SHULAEV, V., VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave? **Trends in Plant Science**, n.6, pp. 300-309 2011.
- MURAKAMI, R., IFUKU, K., TAKABAYASHI, A., SHIKANAI, T., ENDO, T., SATO, F. Functional dissection of two Arabidopsis PsbO proteins PsbO 1 and PsbO 2. **FEBS Journal**, n. 272, pp. 2165–2175, 2005.
- NAVROT, N., ROUHIER, N., GELHAYE, E., JAQUOT, J.P. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. **Physiolgia Plantarum.**, n. 129, pp.185 -195, 2007.
- NIELSEN, S.L., SIMONSEN, A.-M. Photosynthesis and photoinhibition in two differently coloured varieties of *Oxalis triangularis* – the effect of anthocyanin content. **Photosynthetica**, n. 3, pp. 346-352, 2011.
- NISHIYAMA, Y., ALLAKHVERDIEV, S.I., MURATA, N. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. **Physiolgia Plantarum**, n. 142, pp. 35–46, 2011.
- NIXON, P. J., ROGNER, M., DINER, B. A. Expression of a higher plant *PsbA* gene in *Synechocystis* 6803 yields functional hybrid photosystem II reaction center complex. **The Plant Cell**, n.3., pp. 383-395, 1991.

NOJOSA, G., B., A., RESENDE, M. L., AGUILAR, M. A., BEZERRA, K. M. T., ANHERT, D. E. Componentes Fenólicos e Enzimas Oxidativas em Clones de *Theobroma cacao* Resistentes e Suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatol. bras.** n. 28, pp. 148 – 154, 2003.

OFORI-FRIMPONG, K., AFRIFA, A. A., ACQUAYE, S. Impact of shade and cocoa plant densities on soil organic carbon sequestration rates in a cocoa growing soil of Ghana. **African Journal of Environmental Science and Technology**, n.9, pp. 621-624, 2010.

ORTOIDEZE, T., DURING, H. Light utilization and thermal dissipation in light – and shade – adapted leaves of *Vitis* genotype. **Vitis**, n. 40, pp. 131-136, 2001.

OSMOND, C.B. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: Baker, N.R., Bowyer, J.R. (Eds.), Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field. **BIOS Scientific, Oxford**, pp 1-24, 1994.

ÖQUIST, G.; CHOW, W.S.; ANDERSON, J.M. Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for the long-term regulation of FSII. **Planta**, v. 186, p. 450-463, 1992.

PEARCY, R. W. Acclimation to sun and shade. **Photosynthesis**, Cambridge University Press, pp.250-263, 2000.

PEREIRA, J. L. M.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M.; ALMEIDA, L. C. C. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotropica**, v.1, p.79-81, 1989.

PIETRINI, F., IANNELLI, M. A., MASSACCI, A. Anthocyanin accumulation in the illuminated surface of maize leaves enhances protection from photo inhibitory risks at low temperature, without further limitation to photosynthesis. **Plant, Cell and Environment**, n. 25, pp. 1251–1259, 2002.

POPELKOVA, H., YOCUM, C.F. PsbO, the manganese-stabilizing protein: Analysis of the structure–function relations that provide insights into its role in photosystem II. **Journal of Photochemical. and Photobiology**. n. 104, pp. 179–190, 2011.

POURCEL, L., ROUTABOUL, J-M., CHEYNIER, V., LEPINIEC, L., DEBEAUJON, I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. **Trends in Plant Sciencei.**, 2006

RAJA HARUN, R.M., HARDWICK, K. The effects of prolonged exposure to different light intensities on the photosynthesis of cocoa leaves. – In: **10th Inter. Cocoa Res. Conf.** pp. 205-209, 1988.

RAO, M.K.V., RAGHAVENDRA, A.S., REDDY, K. J. **Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants**. Springer, 346 p., 2006.

- REHEM, B. C.; ALMEIDA, A-A. F.; SANTOS, I. C.; GOMES, F. P.; PIROVANI, C. P.; ROMERO, P.; BOTÍA, P. Daily and seasonal patterns of leaf water relations and gas exchange of regulated deficit-irrigated almond trees under semiarid conditions. **Environ. Exp. Bot.**, 56: 158-173, 2011.
- RICE, R.A.; GREENBERG, R. Cacao cultivation and the conservation of biological diversity. **Ambio**, n. 29, p. 81-87, 2000.
- SCARPECI, T. E., ZANOR, M. I., VALLE, E. M. Investigating the role of plant heat shock proteins during oxidative stress. **Plant Signaling & Behavior**, n. 10, pp. 856-857, 2008.
- SEIDLER, A. The extrinsic polypeptide of photosystem II. **Biochim Biophys Acta**, n. 1277, pp. 35–60, 1996.
- SENA, J. V. C. Produção e efetivo do cacau no nordeste. **Informe Rural Etene**. n. 2, 2011.
- SIEBERT, S. F. From shade-to sun-grown perennial croFS in Sulawesi, Indonesia: implications for biodiversity conservation and soil fertility. **Biodiversity and Conservation**, n. 11, pp. 1889–1902, 2002.
- SOUZA Jr. J.O. Substratos e adubação para mudas clonais de cacauero. Piracicaba, Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, DSc. **Thesis**. 2007.
- STEYN, W. J., WAND1, S. J. E., HOLCROFT, D. M., JACOBS, G. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. **New Phytologist**, n. 155, pp. 349–361, 2002.
- STRAUS-DEBENEDETTI, S., BAZZAZ, F.A., Photosynthetic characteristics of tropical trees along successional gradients. In: S.S. MULKEY, R.L., CHAZDON, A.P. SMITH. **Tropical forest plant ecophysiology**. (eds.) Chapman Hall, New York, p.162-186, 1996.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E., 2009. Fisiologia vegetal. 4. ed. Piracicaba, Artmed. 720p
- TANG, Y. e LIANG, N. Characterization of the photosynthetic induction response in a *Populus* species with stomata barely responding to light changes. **Tree Physiology**, n. 20, pp.969–976, 2000.
- TATTINI, M., GUIDI, L., MORASSI-BONZI, L., PINELLI, P., REMORINI, D., DEGL'INNOCENTI, E., GIORDANO, C., MASSAI, R., AGATI, G. On the role of flavonoids in the integrated mechanisms of response of *Ligustrum vulgare* and *Phillyrea latifolia* to high solar radiation. **New Phytologist**, n. 2, pp. 457–470, 2005.

- TERASHIMA, I.; HANBA, Y. T.; TAZOE, Y.; VYAS, P.; YANO, S. Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO₂ diffusion. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, p. 343–354, 2006.
- TERASHIMA, I., MIYAZAWA, S-I., HANBA, Y. T. Why are sun leaves thicker than shade leaves? Consideration based on analyses of CO₂ diffusion in the leaf. **Journal of Plant Research**. n. 114, 93–105. 2001
- TREVIZAN, S. D. P. Mudanças no sul da Bahia associada a vassoura-de-bruxa do cacau. *In: International Cocoa Research Conference*, 12, Salvador. 1996. Proceeding, Lagos: Cocoa Producers Alliance, p. 1109 – 1116, 1996.
- THIELE, A., KRAUSE, G.H., WINTER, K.,. In situ study of photoinhibition of photosynthesis and xanthophyll cycle activity in plants growing in natural gaFS of the tropical forest. **Australian Journal of Plant Physiology**. n. 25, pp. 189-195, 1998.
- VALLADARES, F. NIINEMETS, U. Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. **Annu.Rev.Ecol.Evol.Syst**. n. 39, pp. 237–257, 2008.
- VRANOVÁ, E., INZÉ, D., BREUSEGEM, F.V. Signal transduction during oxidative stress. **Journ.Experim. Bot.**, n. 372, pp. 1227-1236.
- WEI, Y. Z, HUF, C., HUG, B., LIX, J., HUANG, X. M. Differential expression of anthocyanin biosynthetic genes in relation to anthocyanin accumulation in the pericarp of *Litchi chinensis* . **Sonn. PLoSONE**, n. 6e19455.doi:10.1371, 2011
- WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v.144, p.307-314, 1994.
- WYKA, T.; ROBAKOWSKY, P.; YTKOWIAK, R. Acclimation of leaves to contrasting irradiance in juvenile trees differing in shade tolerance. **Tree Physiology**, v. 27, p. 1293 – 1306, 2007
- WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin.Plant Biol.*, n. 5, pp. 218 – 223, 2002.
- XIE, R., ZHENG, L., HE, S., ZHENG, Y., YI, S., DENG, L. Anthocyanin biosynthesis in fruit tree croFS: Genes and their regulation. **African Journal of Biotechnology**, n. 86, pp. 19890-19897, 2011.
- YOUNG, A. J.; PHILLIP, D.; RUBAN, A. V.; HORTON, P. e FRANK, H. A. The xanthophyll cycle and carotenoid-mediated dissipation of excess excitation energy in photosynthesis. **Pure &Appl. Chern.**, n. 10, pp. 2125-2130, 1997.
- YANG, Y., HAN, C., LIU, Q., LIN, B., WANG, J. Effect of drought and low light on growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperata* seedlings, **Acta Physiol. Plant.**, n. 30, pp. 433 - 440, 2008.

