

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



**RESPOSTAS MOLECULARES, BIOQUÍMICAS, MORFOLÓGICAS
E ULTRAESTRUTURAIS DE PLÂNTULAS DE CACAU À
TOXIDAZ DE ALUMÍNIO (Al³⁺)**

Nicolle Moreira de Almeida

**ILHÉUS- BAHIA- BRASIL
Dezembro de 2012**

Nicolle Moreira de Almeida

**RESPOSTAS MOLECULARES, BIOQUÍMICAS, MORFOLÓGICAS
E ULTRAESTRUTURAS DE PLÂNTULAS DE CACAU À
TOXIDEZ DE ALUMÍNIO (Al^{+3})**

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

Área de concentração em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida.

**ILHÉUS- BAHIA- BRASIL
Dezembro de 2012**

A447 Almeida, Nicolle Moreira de.
Respostas moleculares, bioquímicas, morfológicas e ultraestruturais de
plântulas de cacau à toxidez de alumínio (Al^{+3}) / Nicolle Moreira de
Almeida.– Ilhéus, BA : UESC, 2012.
xvi, 66 f. : il.

Orientador: Alex-Alan Furtado de Almeida.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Genética
e Biologia Molecular.
Referências: f. 53-66.

1. Cacau. 2. Alumínio – Toxicologia. 3. Microscopia ele-
trônica – Técnica. 4. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD 633.74

Nicolle Moreira de Almeida

**RESPOSTAS MOLECULARES, BIOQUÍMICAS, MORFOLÓGICAS
E ULTRAESTRUTURAIS DE PLÂNTULAS DE CACAU À
TOXIDEZ DE ALUMÍNIO (Al⁺³)**

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

Área de concentração em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida.

APROVADA: 17 de dezembro de 2012.

Prof. Dr. Marco Antonio Galeas
Aguilar.

CEPLAC – Linhares.

Prof. Dr. Pedro Antonio Oliveira
Mangabeira.

UESC

Prof. Dr. Marcio Gilberto Cardoso
Costa.

UESC

Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida.

UESC - Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua presença constante em minha vida, sem que eu precise pedir, pelo auxílio nas minhas escolhas e por me confortar nas horas mais difíceis.

À minha família, meus pais Gilson e Neuza, minhas irmãs, Rebecca e Giovanna, pelo amor incondicional. Em especial, aos amores de minha vida, meus sobrinhos, Jú, Lipe, Gabi e Guigo, por me proporcionarem tanta alegria.

A Gilliano, meu namorado e amigo, pelo incentivo e por estar sempre ao meu lado, em todos os momentos, me ajudando a superar os momentos difíceis e a celebrar os de felicidade.

A tios e tias, primos e primas, minha avó Jenny, e em especial ao meu tio Henrique Almeida pelo incentivo, sempre.

Ao meu orientador, Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida, pelos ensinamentos e excelente orientação, sempre disponível em ajudar.

Às amigas do grupo Fisiologia Vegetal, Andressa, Ivanildes, Márcia, Romária, Priscila, especialmente a Graci, pela companhia diária no laboratório e trabalhos nos finais de semana, sempre com seus pensamentos positivos de que tudo vai dar certo.

Aos alunos de iniciação científica, Jadiel e Alessandro, pela colaboração.

A todos os colegas do Centro de Biotecnologia e Genética (CBG) pela amizade, apoio, troca de informações e empréstimo de materiais.

Aos professores do Centro de Microscopia Eletrônica, Dr. Pedro Antonio Oliveira Mangabeira e Dra. Delmira da Costa Silva pela dedicação e atenção em me ajudar nas análises de microscopia, fundamentais para o meu trabalho. Ao professor Dr. Raildo Mota de Jesus, pela contribuição. Aos funcionários, Dona Jaci, Edilane e ao técnico José, sempre prestativos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPG-GBM) e a todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À Fabrícia, secretária do PPG-GBM, muito dedicada e sempre disposta a resolver todos os problemas que estão ao seu alcance.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

EXTRATO.....	viii
ABSTRACT.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Hipóteses.....	3
1.2. Objetivo Geral.....	3
1.3. Objetivos Específicos.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. A espécie <i>Theobroma cacao</i> L.....	5
2.2. O Al ³⁺ no solo.....	7
2.3. O Al ³⁺ na planta.....	8
2.3.1. Rotas de absorção de Al ³⁺	9
2.3.2. Danos na raiz.....	9
2.3.3. Danos na parte aérea.....	12
2.3.4. Mecanismos de tolerância ao Al ³⁺	12
2.3.4.1. Exsudação de ácidos orgânicos.....	13
2.3.4.2. Aumento do pH da rizosfera pelas raízes.....	14
2.3.4.3. Síntese de mucilagem no ápice radicular.....	15
2.3.4.4. Ação de fitoquelatinas (PCs).....	15
2.3.4.5. Ação de metalotioneínas (MTs).....	17
2.3.4.6. Enzimas do metabolismo antioxidativo.....	17
2.3.4.7. Compartimentalização de Al ³⁺	19
2.4. Controle da toxidez de Al ³⁺	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	21
3.2. Enzimas do estresse oxidativo.....	22
3.2.1. Obtenção do extrato enzimático.....	22

3.2.2. Peroxidases do guaiacol (PODs).....	22
3.3. Microscopia fotônica.....	23
3.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	23
3.5. Macro e micronutrientes minerais.....	24
3.6. Expressão gênica.....	25
3.7. Análise estatística.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Peroxidases do guaiacol (PODs).....	28
4.2. Análises anatômicas.....	29
4.3. Análises ultraestruturais.....	30
4.4. Macro e micronutrientes minerais.....	36
4.5. Expressão gênica.....	40
5. DISCUSSÃO.....	45
5.1. Peroxidases do guaiacol (PODs).....	45
5.2. Análises anatômicas.....	46
5.3. Análises ultraestruturais.....	47
5.4. Macro e micronutrientes minerais.....	48
5.5. Expressão gênica.....	49
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERÊNCIAS.....	53

EXTRATO

ALMEIDA, Nicolle, M. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, dezembro de 2012. **Respostas moleculares, bioquímicas, morfológicas e ultraestruturais de plântulas de cacau à toxidez de alumínio (Al^{3+}).** Orientador: Alex-Alan Furtado de Almeida. Co-orientador: Carlos Priminho Pirovani.

O alumínio (Al), quando presente em altas concentrações em solos ácidos, especialmente na forma de íon Al^{3+} ($pH < 5$), torna-se altamente tóxico para as plantas, limitando o crescimento e a produtividade. O excesso de Al^{3+} na solução do solo causa alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares em plantas de muitas espécies cultivadas, cujos efeitos variam entre espécies e cultivares. A toxicidade de Al^{3+} é o principal fator limitante para a sustentabilidade de *T. cacao* em muitos solos ácidos altamente intemperizados do Brasil. Entretanto, há falta de informações sobre os efeitos da toxicidade de Al^{3+} em *T. cacao* em níveis fisiológicos, bioquímicos e moleculares. O presente trabalho teve como objetivos principais: (i) determinar a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo [peroxidases do guaiacol (PODs)]; (ii) avaliar as alterações anatômicas e ultraestruturais em níveis tissular e celular, respectivamente, em folhas e raízes, (iii) analisar a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo em níveis radicular e foliar; (iv) e determinar o teor de macro e micronutrientes minerais em raízes, caules e folhas em plântulas de progênies de *T. cacao* ('*Catongo*' x '*Catongo*' - intolerante e CCN-10 x SCA-6 - tolerante ao Al^{3+}). Verificou-se aumento na atividade de PODs em folhas e raízes de plântulas oriundas da germinação de sementes imersas por 24 h em doses crescentes de Al^{3+} , em ambas as progênies de *T. cacao* avaliadas. O '*Catongo*' x '*Catongo*' apresentou maior atividade de PODs em folhas, ao passo que para a progênie CCN-10 x SCA-6 a maior atividade foi verificada em raízes. Com o aumento de Al^{3+} , ambas as progênies avaliadas apresentaram respostas diferenciais em relação à absorção de macro e micronutrientes minerais, cujos maiores teores foram observados em caules e folhas. O incremento de Al^{3+} resultou em acúmulo de P e K em caules e de K em raízes de '*Catongo*' x '*Catongo*', ao passo que para a progênie CCN-10 x SCA-6, observou-se maior acúmulo de Mg, P e S em folhas, K em caules e Fe em raízes, e redução de Mg em raízes. Análises anatômicas do mesófilo foliar demonstraram que não houve efeitos intraprogênies significativos de doses de Al^{3+} sobre a espessura da epiderme, nas faces adaxial (Ead) e abaxial (Eab); dos parênquimas paliçádico (PP) e lacunoso (PL); e do mesófilo (M), pois as diferenças foram apenas interprogênies. A progênie CCN-10 x SCA-6 apresentou os maiores valores para as espessuras de Ead, PP, PL e M em relação ao '*Catongo*' x '*Catongo*'. O incremento de Al^{3+} via seminal, promoveu alterações, em nível ultraestrutural, em ambas as progênies de *T. cacao*. Observaram-se ruptura da membrana nuclear das células do mesófilo foliar; deformação das células da epiderme radicular e depósitos de materiais eletrodensos nas células do parênquima do xilema e na endoderme. Além disso, para o '*Catongo*' x '*Catongo*' houve ruptura da membrana plasmática e retração do vacúolo das células do parênquima cortical (PC), ao passo que para o CCN-10 x SCA-6

evidenciou-se somente ruptura das paredes celulares de PC. Em suma, a atividade de peroxidases em folhas e raízes de plântulas de *T. cacao* desempenhou um papel importante na proteção destes órgãos contra o aumento das espécies reativas de oxigênio sob estresse de Al^{3+} . O aumento das doses de Al^{3+} via seminal promoveu maiores alterações ultraestruturais nos tecidos radiculares, principalmente para o 'Catongo' x 'Catongo'. As mudanças ultraestruturais, em nível radicular, alteraram a absorção e a translocação de nutrientes minerais da raiz para parte aérea, em função do rompimento de membranas celulares e de modificações na endoderme, interferindo, conseqüentemente, na seletividade iônica. O aumento da expressão de SOD_{cyt} contribuiu para a tolerância de CCN-10 x SCA-6 ao incremento do estresse oxidativo promovido pelo Al^{3+} tóxico. Embora tenha sido detectado aumento da expressão do gene *PER-1* apenas na dose 30 mg Al^{3+} L⁻¹ em folhas de 'Catongo' x 'Catongo', aos 60 dias após a germinação das sementes, o incremento da atividade de PODs, enzimas codificadas por este gene, pode ter sido decorrente de expressão deste gene em épocas anteriores ao período de coleta de material vegetal para análise. A progênie CCN-10 x SCA-6 mostrou-se mais tolerante ao Al^{3+} em relação ao 'Catongo' x 'Catongo'.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*, alumínio tóxico, estresse abiótico, microscopia eletrônica, estresse oxidativo.

ABSTRACT

ALMEIDA, Nicolle, M. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, December 2012. **Molecular, biochemical, morphological and ultrastructural responses of cacao seedlings to aluminum toxicity (Al^{3+})**. Advisor: Alex-Alan Furtado de Almeida. Co-supervisor: Carlos Priminho Pirovani.

Aluminum (Al) when present in high concentrations in acidic soils, especially in the form of Al^{3+} ions ($pH < 5$), becomes highly toxic to plants, limiting the growth and productivity. Excess of Al^{3+} in the soil solution causes morphological, physiological, biochemical and molecular changes in cultivated plants of many species, whose effects vary among species and cultivars. Al^{3+} toxicity is the main limiting factor for the sustainability of *T. cacao* in many highly weathered acid soils in Brazil. However, there is not sufficient information about the effects of Al^{3+} toxicity in *T. cacao* in at physiological, biochemical and molecular levels. The present study aimed to: (i) determine the enzymatic activities involved in antioxidative metabolism [guaiacol peroxidases (PODs)], (ii) access the anatomical and ultrastructural characteristics in tissue and cell levels, respectively, of leaf and root, (iii) analyze the gene expression related to oxidative stress in root and leaf levels, and (iv) determine the macro and micronutrients minerals contents in roots, stems and leaves of seedlings of two *T. cacao* progenies obtained from the crosses '*Catongo*' x '*Catongo*' - intolerant and CCN-10 x SCA-6 - tolerant, contrasting to Al^{3+} tolerance. Results showed an increase in the PODs activity in leaves and roots of seedlings obtained from seeds germinated immersed initially during 24 h in increasing doses of Al^{3+} in both progenies. The '*Catongo*' x '*Catongo*' progeny showed higher activity of PODs in leaves, while CCN-10 x SCA-6 progeny showed highest activity in roots. With the increase of Al^{3+} concentration, the two *T. cacao* progenies showed differential responses in relation to the absorption of macro and micronutrients minerals, whose highest values were observed in stems and leaves. The increase of Al^{3+} resulted in accumulation of P and K in stems and K in roots of '*Catongo*' x '*Catongo*', while CCN-10 x SCA-6 progeny showed higher accumulation of Mg, P and S in leaves, K in stems and Fe in roots, and reduction of Mg in roots. Anatomical analysis of leaf mesophyll showed that there were no significant intraprogeny effects for Al^{3+} concentrations on the upper (UE) and lower (LE) epidermis thickness; palisade (PP) and spongy (PS) parenchymas and leaf mesophyll (M), because the differences were only related to interprogeny level. The CCN-10 x SCA-6 progeny showed the highest thicknesses values for UE, PP, PS and M compared to '*Catongo*' x '*Catongo*' progeny. The increment of Al^{3+} concentrations via seeds promotes ultrastructural changes in both *T. cacao* progenies. Disruption of the nuclear membrane of the leaf mesophyll cells; deformation of the root epidermal cells and electrodeposited material deposits in the cells of the xylem parenchyma and endoderm were observed. Furthermore, for the '*Catongo*' x '*Catongo*' progeny was observed rupture of the plasma membrane and vacuole retraction of cortical parenchyma cells (PC), while for the CCN-10 x SCA-6 progeny showed only rupture on the walls of PC cells. In summary, the peroxidase activity in leaves and roots of *T. cacao* seedlings played an important role in protecting these organs against the increase of reactive oxygen species under Al^{3+} stress.

The increase of Al^{3+} concentrations via seed promoted major ultrastructural changes in the root tissue, especially for the 'Catongo' x 'Catongo' progeny. The ultrastructural changes in root level, altered the absorption and translocation of mineral nutrients from the roots to the shoots, due to disruption of cell membranes and changes in endoderm, interfering thus in ion selectivity. Furthermore, the increased *SODcyt* expression contributed to the tolerance of CCN-10 x SCA-6 progeny to increased oxidative stress promoted by toxic Al^{3+} . Although detected increased gene expression *PER-1* only at a dose $30 \text{ mg Al}^{3+} \text{ L}^{-1}$ in leaves of 'Catongo' x 'Catongo' progeny, 60 days after seed germination, increased activity of PODs, enzymes encoded by this gene, may have been due to the expression of this gene in earlier times the period of collection of plant material for analysis. Progeny CCN-10 x SCA-6 was more tolerant to Al^{3+} in relation to 'Catongo' x 'Catongo'.

Keywords: *Theobroma cacao*, aluminum toxicity, abiotic stress, electron microscopy, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Atividades relativas das espécies de Al mononucleares assumindo a ausência de Al polinuclear e outros ligantes de Al, exceto OH⁻. Nota-se que a curva para o Al (OH)₃⁰ está estreitamente relacionada com a razão {Al³⁺} / {H⁺}³ e o inverso da solubilidade da fase sólida Al(OH)₃. A curva é um gráfico de {Al (OH)₃⁰} / ∑ {Al_{mono}}, que é igual a (K₃/∑ {Al_{mono}}) ({Al³⁺} / {H⁺}³) onde K₃ é a terceira constante de hidrólise. Fonte: Kinraide (1991)..... 08
- Figura 2.** Atividade de peroxidases do guaiacol (PODs) em folhas (A) e raízes (B) de plântulas de progênies de *T. cacao* submetidas a doses crescentes de Al³⁺, aplicadas via seminal, 60 dias após a germinação. A significância estatística interprogênies foi obtida pelo t-test. (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001; (ns) não significativo. Médias intraprogênies seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Valores médios de quatro repetições (± EP)..... 29
- Figura 3.** Análises ultraestruturais de células do mesofilo foliar de progênies de 'Catongo' x 'Catongo' controle (A - B) e submetidas à dose de 60 mg Al³⁺ L⁻¹ (C - D), aplicada via seminal, 60 dias após a germinação. (A) membrana do mitocôndrio e do cloroplasto intacta, presença de grãos de amido e plastoglóbulos. (B) membrana do núcleo intacta. (C) membrana do cloroplasto intacta, presença de grãos de amido e plastoglóbulos. (D) membrana do mitocôndrio intacta, ruptura da membrana do núcleo..... 31
- Figura 4.** Análises ultraestruturais de células do mesofilo foliar de progênies de CCN-10 x SCA-6 controle (A - B) e submetidas

à dose de 60 mg Al³⁺ L⁻¹ (C - D), aplicada via seminal, 60 dias após a germinação. (A) membrana do mitocôndrio e cloroplasto intacta, presença de plastoglóbulos. (B) membrana do cloroplasto e membrana do núcleo intacta, presença de plastoglóbulos. (C) membrana do cloroplasto intacta, presença de grãos de amido e plastoglóbulos. (D) membrana do mitocôndrio e do cloroplasto intacta, presença de grãos de amido e plastoglóbulos, ruptura da membrana do núcleo..... 32

Figura 5. Análises ultraestruturais em células de tecidos radiculares de progênies de 'Catongo' x 'Catongo' controle (A - E) e submetidas à dose de 60 mg Al³⁺ L⁻¹ (F - J), aplicada via seminal, 60 dias após a germinação. (A) membrana plasmática intacta. (B) parênquima do xilema com ausência de material eletrodenso. (C) células da epiderme radicular de tamanho e forma normais. (D) vacúolo de tamanho normal. (E) células da endoderme de forma normal e ausência de material eletrodenso. (F) ruptura da membrana plasmática. (G) presença de material eletrodenso no parênquima do xilema. (H) rompimento das células da epiderme radicular. (I) retração do vacúolo. (J) deformação das células da endoderme e presença de material eletrodenso..... 34

Figura 6. Análises ultraestruturais em células de tecidos radiculares de progênies de CCN-10 x SCA-6 controle (A - D) e submetidas à dose de 60 mg Al³⁺ L⁻¹ (E - H), aplicada via seminal, 60 dias após a germinação. (A) parede celular intacta. (B) parênquima do xilema com ausência de material eletrodenso. (C) células da endoderme de forma normal e ausência de material eletrodenso. (D) células da epiderme radicular de forma normal. (E) ruptura da parede celular. (F) presença de material eletrodenso no parênquima do xilema. (G)

deformação das células da endoderme e presença de material eletrodense. (H) rompimento das células da epiderme radicular..... 35

Figura 7. Acúmulo de macronutrientes minerais em folhas (□), caules (Δ) e raízes (●) de progênies de *T. cacao* ['Catongo' x 'Catongo' (A - E) e CCN-10 x SCA-6 (F - J)] submetidas a doses crescentes de Al³⁺, via seminal, 60 dias após a germinação. Valores médios de nove repetições (± EP). A ausência de barras de erro indica que o tamanho do erro não excedeu o tamanho do símbolo. Equações das curvas de regressão na Tabela 3..... 38

Figura 8. Acúmulo de micronutrientes minerais em folhas (□), caules (Δ) e raízes (●) de progênies de *T. cacao* ['Catongo' x 'Catongo' (A - D) e CCN-10 x SCA-6 (E - H)] submetidas a doses crescentes de Al³⁺, via seminal, 60 dias após a germinação. Valores médios de nove repetições (± EP). A ausência de barras de erro indica que o tamanho do erro não excedeu o tamanho do símbolo. Equações das curvas de regressão na Tabela 3..... 39

Figura 9. Expressão relativa do gene *PER-1* em folhas (A) e raízes (B) de plântulas de progênies de *T. cacao* submetidas a doses crescentes de Al³⁺, aplicadas via seminal, 60 dias após a germinação. A significância estatística interprogênies foi obtida pelo *t*-test. (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001; (ns) não significativo. Médias intraprogênies seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Valores médios de seis repetições (± EP)..... 42

Figura 10. Expressão relativa do gene *SOD_{Cyt}* em folhas (A) e raízes (B) de plântulas de progênies de *T. cacao* submetidas a

doses crescentes de Al^{3+} , aplicadas via seminal, 60 dias após a germinação. A significância estatística interprogênies foi obtida pelo *t*-test. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (ns) não significativo. Médias intraprogênies seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Valores médios de seis repetições (\pm EP)..... 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pares de <i>primers</i> gene-específicos utilizados nas análises de qRT-PCR.....	26
Tabela 2. Análise anatômica do mesofilo foliar de plântulas de progênies de <i>T. cacao</i> submetidas a doses crescentes de Al^{3+} , aplicadas via seminal, 60 dias após a germinação.....	30
Tabela 3. Equações de regressão para o teor de macro e micronutrientes minerais em folha, caule e raiz de progênies de <i>T. cacao</i> submetidas a doses crescentes de Al^{3+} , aplicadas via seminal, 60 dias após a germinação.....	40

1. INTRODUÇÃO

Theobroma cacao é uma espécie lenhosa de grande importância econômica mundial, cultivada quase que exclusivamente para fabricação de chocolate (ALMEIDA e VALLE, 2007). Popular no mundo inteiro, o chocolate e seus derivados são produzidos a partir de amêndoas de cacau. Dois dos principais produtos comerciais, obtidos a partir do cacau, são o licor de cacau e a manteiga de cacau, que são misturados com outros ingredientes, tais como o açúcar e o leite para a produção de chocolate. A partir desses dois produtos principais, outros derivados são produzidos para serem utilizados em indústrias de cosméticos e gêneros alimentícios (geleias, sucos, sorvetes, etc.) (HEBBAR *et al.*, 2011). Atualmente, no *ranking* dos países que cultivam o cacau, encontra-se a Costa do Marfim como o principal produtor, que contribui com 34% da produção mundial; seguido por Gana (17,5%), Indonésia (14,8%), Nigéria (6,6%) e Camarões (5,3%). O Brasil é hoje o sexto principal produtor, participando com 4,4% da produção mundial, o que corresponde a 161 mil toneladas de cacau (ICCO, 2011).

Mais de 50% dos solos potencialmente agricultáveis no mundo são ácidos (von UEXKÜLL e MUTERT, 1995). A acidez é um processo de ocorrência natural (lixiviação), mas pode ser intensificada pela ação antrópica, devido à utilização inadequada de fertilizantes nitrogenados (KOCHIAN *et al.*, 2002). O alumínio (Al), quando presente em altas concentrações em solos ácidos, especialmente na forma de íon Al^{3+} ($pH < 5$), torna-se altamente tóxico para as plantas, limitando o crescimento (FOY, 1984; FAGERIA e BALIGAR, 2003) e a produtividade (SANTANA e CABALA-ROSAND, 1984; NAKAYAMA *et al.*, 1987). O excesso de Al^{3+} na solução do solo, causa alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares em plantas de muitas culturas, cujos efeitos variam entre espécies e cultivares (KINRAIDE, 1991). As maiores concentrações de Al^{3+} são verificadas em raízes, seguida pelas folhas e caules, sendo que o acúmulo de Al^{3+} no sistema radicular pode ser de dezenas a centenas de vezes maiores quando comparado à parte aérea (FOY *et al.*, 1978).

A inibição do crescimento da raiz é o sintoma mais visível da toxicidade de Al^{3+} em plantas. Por isso, a maioria dos estudos realizados com Al^{3+} é

focada no sistema radicular, devido ao acúmulo do metal ser principalmente nas células do córtex (HODSON e WILKINS, 1991) e na epiderme radicular (DELHAIZE *et al.*, 1993). Poucos relatos tratam de alterações em folhas (MOUSTAKAS *et al.*, 1996, 1997; KONARSKA, 2010; LI e XING, 2011), devido a baixa mobilidade do metal para a parte aérea. A translocação de Al^{3+} para a parte aérea da planta é uma consequência dos danos causados pelo Al^{3+} no sistema radicular (MATSUMOTO *et al.*, 1976).

Além de inibir o crescimento da raiz, o excesso de Al^{3+} interfere nas reações enzimáticas e induz o estresse oxidativo, levando a oxidação de biomoléculas como lipídios e proteínas (TAMÁS *et al.*, 2006). O melhoramento vegetal para a tolerância ao Al^{3+} é considerado de grande importância para aumentar o desempenho de plantas cultivadas em solos ácidos (FOY, 1988). Desta forma, um melhor entendimento dos mecanismos de tolerância ao Al^{3+} tóxico e a identificação de genes que conferem essa tolerância (KOCHIAN *et al.*, 2002) vem sendo enfatizado por pesquisadores nos últimos anos, a fim de melhor compreender estes mecanismos e poder utilizar estas informações no desenvolvimento de genótipos mais resistentes (HARTWIG *et al.*, 2007). Entre os mecanismos de tolerância de Al^{3+} , pode-se citar o eficiente sistema antioxidante, que aumenta a capacidade de tolerância das plantas a diversos tipos de estresses abióticos, devido a redução de espécies reativas de oxigênio (EROs), responsáveis, principalmente, pela peroxidação de lipídios na membrana plasmática. Além disso, o acúmulo de EROs tem se mostrado crucial para a indução de genes responsáveis pela biossíntese de enzimas do metabolismo antioxidativo, capazes de detoxificar EROs em células vegetais na presença de Al^{3+} (GILL e TUTEJA, 2010).

O cacauero muitas vezes é cultivado em solos lixiviados, ácidos e com baixo teor de nutrientes minerais essenciais (HARDY, 1960; SMYTH, 1966). No sul da Bahia, Brasil, dentre os vários tipos de solos existentes utilizados para o cultivo do *T. cacao*, encontram-se o *ultisol*, que, apesar das boas características físicas, apresenta acentuado grau de acidez expresso em altos índices de saturação de Al^{3+} no complexo de troca; e os oxissolos que apresentam teores de Al^{3+} relativamente elevados (CABALA-ROSAND e SANTANA, 1983). Devido à escassez de informações científicas relativas à toxicidade de Al^{3+} em *T. cacao* e de programas de melhoramento genético a fim de

se obter genótipos mais tolerantes e permitir o cultivo desta espécie em áreas com níveis tóxicos de Al^{3+} , faz-se necessário avaliar os efeitos de Al^{3+} nesta espécie de interesse mundial.

1.1. Hipóteses:

Altas concentrações de Al^{3+} , fornecido via seminal, aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo; altera a expressão de genes em plântulas de *T. cacao*; e promove mudanças morfológicas e ultraestruturais, principalmente em nível radicular, interferindo na absorção de nutrientes minerais.

1.2. Objetivo Geral:

Avaliar as respostas moleculares, bioquímicas, morfológicas e ultraestruturais em progênies de *T. cacao*, contrastantes para tolerância ao Al^{3+} e oriundas do cruzamento entre 'Catongo' x 'Catongo' (intolerante) e entre CCN-10 x SCA-6 (tolerante), submetidas a diferentes doses de Al^{3+} via seminal.

1.3. Objetivos Específicos:

- ☞ Determinar a atividade de enzimas peroxidases do guaiacol (PODs), envolvidas no metabolismo antioxidativo, em raízes e folhas de plântulas de progênies de *T. cacao*, contrastantes para a tolerância ao Al^{3+} , submetidas a diferentes doses de Al^{3+} via seminal.
- ☞ Avaliar as alterações anatômicas e ultraestruturais em níveis tissular e celular, respectivamente, em folhas e raízes de progênies de *T. cacao*, contrastantes para a tolerância ao Al^{3+} , submetidas a diferentes doses de Al^{3+} via seminal.
- ☞ Determinar o teor de macro e micronutrientes minerais em raízes, caules e folhas de plântulas de progênies de *T. cacao* contrastantes

para a tolerância ao Al^{3+} , submetidas a diferentes doses de Al^{3+} via seminal.

- 📁 Analisar a expressão de genes envolvidos no metabolismo antioxidativo, em níveis radicular e foliar, de progênies de *T. cacao* contrastantes para a tolerância ao Al^{3+} , submetidas a diferentes doses de Al^{3+} via seminal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A espécie *Theobroma cacao* L

O cacauero é uma espécie lenhosa, nativa da América do Sul, anteriormente classificada na família Sterculiaceae e recentemente reclassificada na família Malvaceae (ALVERSON *et al.*, 1999), que compreende os gêneros *Herranea*, *Guazuma*, *Cola* e *Theobroma* (APG II, 2003). O gênero *Theobroma* é formado por 22 espécies, sendo o *T. cacao* o representante mais importante (KENNEDY, 1995). É uma espécie de grande importância econômica mundial, cultivada quase que exclusivamente para fabricação de chocolate. No entanto, seus derivados podem ser também utilizados em indústrias de cosméticos e gêneros alimentícios, como geléias, sucos, sorvetes, etc. (ALMEIDA e VALLE, 2007). Os produtos derivados do cacau são consumidos pelo mundo todo (HEBBAR *et al.*, 2011). 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, a região sul da Bahia é a principal produtora de cacau, porém sua capacidade produtiva foi reduzida em até 60% com o advento da vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo fitopatogênico *Moniliophthora perniciosa* (LOCKWOOD, 2003).

O cacauero é tradicionalmente cultivado sob sombra de árvores de florestas e também como policultura, consorciado a outros cultivos de valor econômico, como as espécies *Areca catechu*, *Cocos nucifera*, *Hevea brasiliensis* e *Erythrina fusca* (ALMEIDA e VALLE, 2007). Entretanto, o cacauero também pode ser cultivado como monocultivo a pleno sol, tendo como exemplos os cultivos realizados em Gana e Costa do Marfim (HEBBAR *et al.*, 2011) e no Brasil, na região de Mucugê, BA (ALMEIDA e VALLE, 2007).

T. cacao é uma espécie perene, eudicotiledônea e diplóide ($2n=20$) (FIGUEIRA *et al.*, 1994). Em condições naturais a árvore pode atingir 20 a 25 m de altura (LACHENAUD *et al.*, 1997), enquanto que sob cultivo varia de 3 a 5 m (ALMEIDA e VALLE, 2007). Possui dois períodos de produção: temporão (março a agosto) e safra (setembro a fevereiro). Sua propagação pode ser realizada por meio de sementes (sexuada) ou vegetativa (assexuada) (MONTEIRO e AHNERT, 2012). Os frutos apresentam grande variabilidade

genética para tamanho, forma, cor, semente, porte e resistência a doenças (MONTEIRO e AHNERT, 2012). A forma dos frutos varia de arredondado a alongado, pesando entre 100 a 2000 g e a cor pode variar de amarelo a alaranjado quando maduro. As sementes podem apresentar coloração variando entre o branco e roxo e seu peso pode variar de 0,5 a 6 g (BARTLEY, 2005). Apresenta taxas de cruzamento natural entre 50 e 100% (TOXOPEUS, 1972) e requer a presença de agentes polinizadores, em visita às flores em busca do néctar (SORIA *et al.*, 1975). O cacauero é considerado uma planta preferencialmente alógama, ou seja, predomina a fecundação cruzada, porém a taxa de autofecundação também pode ser relativamente alta. Na população de cacaueros existem genótipos autocompatíveis (fertilizam-se com pólen da mesma flor), genótipos autoincompatíveis (incapazes de se autofertilizar) e, portanto, precisam de pólen de flores de outras plantas que sejam compatíveis, e também, genótipos interincompatíveis, quando não há fecundação no cruzamento entre flores de uma planta com outra e, conseqüentemente, não há produção de frutos. Essa incompatibilidade gamética se deve a um mecanismo genético evolutivo (MONTEIRO e AHNERT, 2012).

De acordo com a morfologia, características genéticas e localização geográfica a espécie *T. cacao* foi dividida em 3 grupos: '*Crioulo*', '*Forasteiro*' e '*Trinitário*', dos quais derivaram as culturas existentes no mundo todo (Bartley, 2005). O grupo '*Crioulo*' é cultivado na Venezuela, Colômbia, Equador, norte da América Central e México (ALMEIDA e VALLE, 2007). Acredita-se que foram as primeiras árvores de *T. cacao* domesticadas pela civilização maia (HEBBAR *et al.*, 2011). Possui frutos roxos ou amarelos quando maduros e suas sementes são grandes e arredondadas. Alguns frutos, dentro deste grupo, apresentam amêndoas de alta qualidade para produção de chocolate, devido à excelente propriedade organoléptica, com menor acidez e amargor (MONTEIRO e AHNERT, 2012). No entanto, este grupo é raramente cultivado devido a sua alta susceptibilidade à doenças (SORIA, 1970). Por outro lado, o grupo '*Forasteiro*' ou Amazônico é cultivado no norte do Brasil e nas Guianas (ALMEIDA e VALLE, 2007), e é subdividido em '*Forasteiros*' do Alto e Baixo Amazonas. Possui frutos de coloração verde, quanto imaturos, e sementes pigmentadas. Entre os 3 grupos, estes são considerados os mais vigorosos e resistentes a pragas e doenças (MONTEIRO e AHNERT, 2012; HEBBAR *et al.*,

2011), além de ser responsável por cerca de 80% da produção mundial de amêndoas de *T. cacao* (MARITA *et al.*, 2001). Já o grupo 'Trinitário' apresenta características bastante distintas, devido ao cruzamento natural entre os grupos 'Crioulo' e 'Forasteiro' (MONTEIRO e AHNERT, 2012).

2.2. O Al^{3+} no solo

Os solos tropicais e subtropicais são normalmente ácidos, devido à grande quantidade de chuvas que, conseqüentemente, promove a lixiviação de boa parte das bases presentes nas camadas superficiais do solo. Cerca de 30% da área da crosta terrestre é composta de solos ácidos ($pH \leq 5,5$), o que corresponde a mais de 50% dos solos potencialmente agricultáveis no mundo (von UEXKULL e MUTERT, 1995). Algumas práticas agrícolas, como uso inadequado de fertilizantes nitrogenados, podem aumentar ainda mais a acidificação dos solos (KOCHIAN *et al.*, 2002).

O cacaueteiro muitas vezes é cultivado em solos lixiviados, ácidos e com baixo teor de Ca, Mg, N, P e outros nutrientes minerais essenciais (HARDY, 1960; SMYTH, 1966). Níveis tóxicos de Al^{3+} e deficiência de nutrientes essenciais (Ca, Mg, N, P) e micronutrientes (Fe e Zn) são os principais fatores responsáveis pela baixa produtividade do cacaueteiro em solos tropicais ácidos (SANTANA e CABALA-ROSAND, 1984; NAKAYAMA *et al.*, 1987), limitando o crescimento radicular (FOY, 1984; FAGERIA e BALIGAR, 2003).

O Al^{3+} é um metal que representa até 7% da crosta terrestre e é o terceiro elemento mais abundante, depois do O_2 e Si (MA *et al.*, 2001). A maioria do Al presente no solo não é tóxico para os organismos vivos, são os chamados aluminossilicatos (MAY e NORDSTROM, 1991). No entanto, a hidrólise de Al em Al^{3+} , em solos acidificados, limita a produção e produtividade das plantas (FOY, 1988). A concentração de íons Al^{3+} presente na solução do solo é baixa, porém com a diminuição do pH abaixo de 5,0 (FOY *et al.*, 1978) o Al^{3+} torna-se cada vez mais solúvel e pode ser altamente tóxico para as plantas (FOY, 1988). Este metal ocorre em solos ácidos sob as formas $Al(OH)^{2+}$, $Al(OH)_2^+$ e $Al(H_2O)_6^{3+}$, sendo esta última, conhecida como Al^{3+} , a forma mais tóxica para as plantas (KINRAIDE, 1991) (Figura 1). No entanto, o ponto crítico em que o Al^{3+} torna-se solúvel e trocável depende de muitos fatores do solo e

da planta. Entretanto, sabe-se que a transferência do Al^{3+} tóxico para a cadeia alimentar é pequena (KOPITTKÉ *et al.*, 2009).

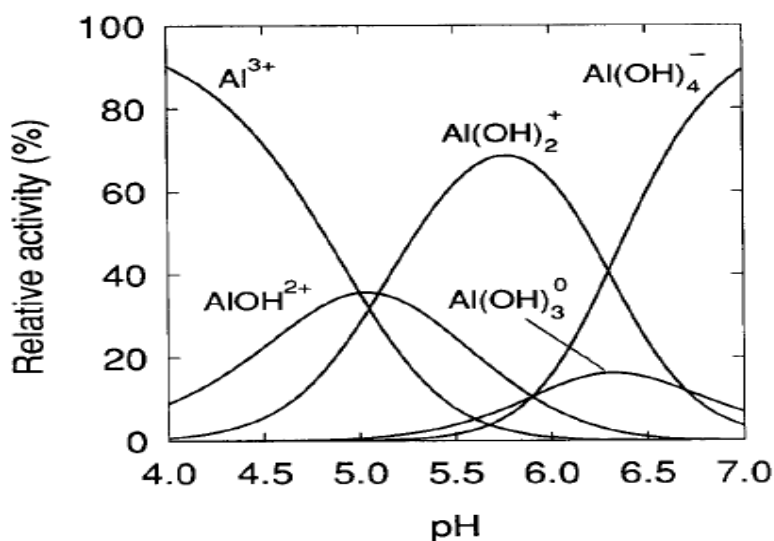


Figura 1 - Atividades relativas das espécies de Al mononucleares assumindo a ausência de Al polinuclear e outros ligantes de Al, exceto OH^- . Nota-se que a curva para o Al(OH)_3^0 está estreitamente relacionada com a razão $\{\text{Al}^{3+}\} / \{\text{H}^+\}^3$ e o inverso da solubilidade da fase sólida Al(OH)_3 . A curva é um gráfico de $\{\text{Al(OH)}_3^0\} / \sum \{\text{Al}_{\text{mono}}\}$, que é igual a $(K_3 / \sum \{\text{Al}_{\text{mono}}\}) (\{\text{Al}^{3+}\} / \{\text{H}^+\}^3)$ onde K_3 é a terceira constante de hidrólise. Fonte: Kinraide (1991).

2.3. O Al^{3+} na planta

Devido à natureza química de Al^{3+} , os seus mecanismos de fitotoxicidade e tolerância são complexos, e dependente de interações com outros nutrientes e propriedades do solo (ZHENG *et al.*, 2007; MARON *et al.*, 2008). O excesso de Al^{3+} na solução do solo, causa alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, ultraestruturais e moleculares em plantas de muitas culturas, cujos efeitos variam entre espécies e cultivares. Devido à complexidade química do metal, é muito difícil estudar os vários processos relacionados ao Al^{3+} nas plantas (KINRAIDE, 1991).

Maiores concentrações de Al^{3+} são verificadas em raízes, seguida pelas folhas e caules, respectivamente, sendo o acúmulo na planta proporcional à dose de Al^{3+} aplicada. O acúmulo de Al^{3+} pode ser de dezenas a centenas de vezes maiores em raízes, quando comparado à parte aérea (FOY *et al.*, 1978).

A maior concentração de Al^{3+} no sistema radicular está relacionada às rotas de absorção do metal.

2.3.1. Rotas de absorção de Al^{3+}

Da epiderme até a endoderme da raiz o Al^{3+} pode percorrer três rotas: (i) rota apoplástica, (ii) transmembrana e (iii) simplástica. Na rota apoplástica o metal move-se livremente sem nenhuma restrição. A translocação neste espaço é rápida e não envolve nenhuma membrana biológica; na rota transmembrana o metal atravessa pelo menos duas membranas de cada célula (a membrana plasmática na entrada e na saída) e na rota simplástica o metal é translocado de uma célula para outra via plasmodesmos. O Al^{3+} percorre certa distância no apoplasto, por ser uma rota sem resistência ao transporte, mas é barrado pela endoderme do cilindro central. Na endoderme, a translocação do Al^{3+} através do apoplasto é obstruída pelas estrias de *Casparry*, que quebra a continuidade da rota apoplástica, forçando o metal a cruzar a endoderme via membrana plasmática (TAIZ e ZEIGER, 2006). A endoderme funciona como uma barreira física que bloqueia a entrada de Al^{3+} e de outros elementos, promovendo o acúmulo desse metal nas células do córtex radicular (HODSON e WILKINS, 1991) ou na epiderme radicular (DELHAIZE *et al.*, 1993). Em conjunto, esses fatores criam uma barreira que previne a translocação do Al^{3+} das raízes para a parte aérea através do cilindro central. Porém, se o Al^{3+} encontrar um sítio de absorção disponível, ele penetra na rota simplástica (via plasmodesmos) ou transmembrana (via membrana plasmática), move-se até o xilema e é translocado para a parte aérea da planta (BONATO *et al.*, 1998).

2.3.2. Danos na raiz

A fitotoxicidade de Al^{3+} resulta primeiramente em uma inibição do crescimento radicular (SCHMOHL e HORST, 2002) e depois a divisão celular também passa a ser inibida (KOCHIAN, 1995; MATSUMOTO, 2000), sendo o ápice radicular o principal local da lesão induzida por Al^{3+} (SIVAGURU e HORST, 1998; VA'ZQUEZ *et al.*, 1999). Normalmente, pequena quantidade de

Al^{3+} é translocada para a parte aérea, mostrando uma baixa mobilidade do metal na planta (MATSUMOTO *et al.*, 1976; LONDOÑO e VALÊNCIA, 1983).

A exposição de Al^{3+} ao sistema radicular das plantas também pode provocar o engrossamento do ápice radicular, formação de raízes curtas, quebradiças e escuras devido à oxidação de compostos fenólicos. Também pode ocorrer a formação de raízes superficiais e de baixa densidade, dificultando a capacidade das plantas em explorar um volume suficiente de solo para melhor aproveitamento da água e obtenção dos nutrientes essenciais necessários para seu crescimento (FOY, 1984; BALIGAR e FAGERIA, 1997). O Al^{3+} aparentemente não interfere na germinação de sementes, mas prejudica o crescimento de novas raízes e o estabelecimento de plântulas, sendo as mudas jovens mais susceptíveis ao metal do que mudas velhas (NOSKO *et al.*, 1988). Além disso, a exposição de raízes ao metal acarreta na desintegração dos tecidos da epiderme e do córtex radicular, tornando as células colapsadas. Pode ocorrer também redução no tamanho da coifa e desarranjo do tecido meristemático (FOY, 1974; BEN *et al.*, 1976; CODOGNOTTO *et al.*, 2002).

O mecanismo exato que causa redução do crescimento radicular ainda não foi identificado (PANDA, 2007). Liu *et al.* (2008) e Taylor *et al.* (2000) relataram que a maior associação de Al^{3+} com a raiz ocorre no apoplasto (30-90% do total de Al^{3+} absorvido) e uma pequena fração deste elemento metálico entra e interage rapidamente no simplasto. A ligação primária de Al^{3+} no apoplasto é provavelmente a matriz de pectina, com suas cargas negativas dos grupos carboxílicos (SCHMOHL e HORST, 2000; CHANG *et al.*, 1999). A ligação de Al^{3+} na parede celular dos tecidos radiculares libera o Ca^{2+} ligado às pectinas, alterando as propriedades físicas da parede, incluindo extensibilidade, rigidez e permeabilidade (RENGEL e ZHANG, 2003). Entretanto, ainda existem dúvidas se o sítio primário de Al^{3+} (e de outros metais) é simplástico (dentro da célula) ou apoplástico (na parede celular) (KOPITKE *et al.*, 2007). Outro dano causado pelo Al^{3+} na raiz é a deposição de calose, uma β -1,3-glucano, sintetizada pelas plantas em resposta a ferimentos, patógeno, infecção ou estresse fisiológico (SIVAGURU *et al.*, 2000).

A liberação de Ca^{2+} da parede celular pelo Al^{3+} é devido à ligação muito mais forte de Al^{3+} às cargas negativas da matriz pectínica da parede celular,

comparado ao Ca^{+2} . Logo, o aumento da concentração de Ca^{2+} citossólico, em resposta ao Al^{3+} , está relacionado ao sinal de danos celulares e também é considerado pré-requisito para a indução da síntese de calose, ativando a 1,3- β -glucano sintase, enzima responsável pela síntese da β -1,3-glucano (BHUJA *et al.*, 2004).

Células da parte distal da zona de transição (entre a zona meristemática e alongamento) do ápice radicular de *Zea mays* são as mais sensíveis à toxidez causada por Al^{3+} , devido à alta proporção de pectina na parede celular desta zona radicular, fazendo com que Al^{3+} acumule mais rapidamente neste local. Conseqüentemente, essa região é o local de maior acúmulo de calose e coincide com o pico de inibição do alongamento celular (SIVAGURU e HORST, 1998). Estudos recentes realizados com *Triticum spp* e *Secale cereale*, têm relatado que o acúmulo de calose não ocorre apenas nas regiões meristemáticas e de alongamento da raiz, mas também em zonas maduras (SILVA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2011). A deposição de calose na raiz tem como consequência o bloqueio da conexão entre células adjacentes, devido ao bloqueio dos plasmodesmas, impedindo o transporte do Al^{3+} via simplasma e, conseqüentemente, evitando lesões induzidas pelo metal (SIVAGURU *et al.*, 2000).

O acúmulo de calose é observado em maior proporção em raízes de genótipo intolerante comparado ao tolerante (HORST, 1997; ETICHA *et al.*, 2005). Em genótipos intolerantes, a calose pode levar a rigidez da parede celular (JONES *et al.*, 2006), limitando o seu crescimento. A síntese desse polissacarídeo, especialmente no ápice da raiz (SIVAGURU *et al.*, 2006), é um indicador de intolerância e um parâmetro confiável para a classificação de genótipos de milho (HORST *et al.*, 1997; COLLET *et al.*, 2002) e soja (HORST *et al.*, 1992), com relação à resistência ao Al^{3+} . A maioria dos estudos realizados com Al^{3+} e a sua relação com as plantas são focados no sistema radicular, sendo este o primeiro sítio de inibição de transporte do Al^{3+} para a parte aérea.

2.3.3. Danos na parte aérea

A redução do crescimento e do desenvolvimento da parte aérea, promovido por Al^{3+} , ocorre num momento posterior (JONES e KOCHIAN, 1995), o que parece ser uma consequência dos danos causados inicialmente na raiz (MATSUMOTO *et al.*, 1976).

Na parte aérea, modificações celulares e ultraestruturais podem ser observadas, tais como (i) necrose e clorose foliar, devido à interferência do metal na biossíntese de clorofila (VITORELLO *et al.*, 2005); (ii) redução no tamanho e número de folhas; (iii) enrolamento das folhas jovens; (iv) diminuição na biomassa da parte aérea (THORNTON *et al.*, 1986); (v) alterações na forma dos cloroplastos e disposição do granum (MOUSTAKAS *et al.*, 1997); (vi) redução da abertura estomática e diminuição da atividade fotossintética (VITORELLO *et al.*, 2005); redução da eficiência fotoquímica do fotossistema II (MOUSTAKAS e OUZOUNIDOU, 1994); e (vii) danos na membrana externa dos cloroplastos (HAMPP e SCHNABI, 1975). Além disso, os danos causados por Al^{3+} podem reduzir a absorção de nutrientes e, conseqüentemente, induzir deficiências de minerais na parte aérea (TAYLOR, 1988).

2.3.4. Mecanismos de tolerância ao Al^{3+}

Espécies e genótipos dentro da mesma espécie diferem grandemente na tolerância ao Al^{3+} para o cultivo em solos ácidos. Plantas Al -intolerantes absorvem mais Al^{3+} do que as plantas Al -tolerantes (YANG *et al.*, 2004). A tolerância ao Al^{3+} é classicamente explicada por dois grupos de mecanismos: (i) mecanismos de exclusão, que impedem que o Al^{3+} alcance os sítios de toxidez na planta; e (ii) mecanismos internos (de reparo), que possibilitam a penetração de Al^{3+} no interior da célula, mas têm sua ação fitotóxica neutralizada, ou seja, grandes quantidades de Al^{3+} pode ser acumulado nos tecidos da planta (CANÇADO *et al.*, 1999; KOCHIAN, 1995). Segundo estes autores, no caso da exclusão, pode-se citar: (i) exsudação radicular de moléculas quelantes (ácidos orgânicos) que complexam Al^{3+} ; (ii) elevação do pH da rizosfera pelas raízes; e (iii) síntese de mucilagem no ápice radicular. No

caso da tolerância interna, são citadas: (i) ação de polipeptídeos (fitoquelatinas e metalotioneínas) do citoplasma como moléculas quelantes; (ii) existência de enzimas antioxidantes; e (iii) eliminação de Al^{3+} do ambiente celular por compartimentalização no vacúolo.

2.3.4.1. Exsudação de ácidos orgânicos

Este mecanismo é considerado a principal estratégia relacionada à tolerância ao Al^{3+} na maioria das espécies vegetais (HARTWIG *et al.*, 2007). Consiste na liberação de ácidos orgânicos como citrato, oxalato e malato na rizosfera, em resposta ao estresse abiótico causado pela exposição ao Al^{3+} , formando complexos suficientemente fortes com o metal, tornando-o insolúvel e, conseqüentemente, protegendo o sistema radicular das plantas. Dentre os ácidos orgânicos, o ácido cítrico é o que apresenta maior poder de ligação ao Al^{3+} , seguido pelos ácidos oxálico e málico, respectivamente. Por ser um ânion tricarboxilado, o citrato consegue formar quelatos com o Al^{3+} muito mais estáveis, tornando-o insolúvel (MA *et al.*, 2001).

Seria impossível que todo Al^{3+} do solo fosse destoxificado por exsudados na raiz. O ápice radicular é particularmente sensível ao Al^{3+} , por isso, apenas os cátions que circundam as células apicais da raiz devem ser desintoxicados. Portanto, é sensato restringir a liberação de ácidos orgânicos apenas para esta zona apical, reduzindo, assim, o custo metabólico da planta (MA *et al.*, 2001).

De acordo com Ma *et al.* (2001), existem dois padrões de secreção de ácidos orgânicos: (i) Padrão I - plantas que liberam ácidos orgânicos imediatamente após o início do tratamento com Al^{3+} e (ii) Padrão II - a liberação de ácidos orgânicos inicia após uma fase de latência de várias horas. Isto sugere que no padrão I o mecanismo de liberação de ácidos orgânicos é expresso constitutivamente, ou seja, Al^{3+} ativa um mecanismo pré-existente e não é requerida a indução de novas proteínas. Em contrapartida, o atraso observado na secreção de ácidos orgânicos no Padrão II, pode ser uma indicação da necessidade de indução de novas proteínas. Estas proteínas induzidas em resposta ao Al^{3+} podem estar envolvidas no metabolismo do ácido orgânico ou no seu transporte através de canais aniônicos (MA *et al.*, 2001).

2.3.4.2. Aumento do pH da rizosfera pelas raízes

A capacidade das plantas de modificar o pH da rizosfera, depende da natureza específica de cada espécie ou cultivar, como também da nutrição nitrogenada (TISCHNER, 2000). Segundo este autor, quando o nitrogênio é fornecido na forma de N-NO_3^- , os vegetais apresentam uma tendência de aumentar o pH da rizosfera, uma que esta forma de N é absorvida por um mecanismo simporte do tipo $\text{H}^+/\text{N-NO}_3^-$ que tem por característica modificar o potencial hidrogeniônico ao retirar prótons do meio externo. Entretanto, quando o N é suprido na forma de N-NH_4^+ , este íon é absorvido sem a absorção concomitante de prótons e, portanto, resulta na diminuição do pH no meio externo (ANTUNES e NUNES, 1997).

Comprovando essa tendência, cultivares de *Oryza sativa* consomem mais prótons (H^+) com N na forma de N-NO_3^- . Dessa forma, a cultivar tolerante consegue ajustar, de maneira mais eficiente, o seu balanço de prótons, reduzindo a absorção de Al^{3+} e tolerando sua presença em solução nutritiva (MENDONÇA *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2006). Cultivares intolerantes da mesma espécie diminuem ou até não alteram o pH da solução nutritiva, ficando expostas a maiores concentrações do elemento químico em questão. Outra possível causa da redução do pH na rizosfera é a produção de CO_2 pela respiração radicular e hidrólise ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}_2\text{CO}_3 = \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) (FOY, 1974; NOLLA *et al.*, 2007).

Algumas cultivares de *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *O. sativa*, *Pisum sativum* e *Z. mays*, tolerantes à toxidez de Al^{3+} , aumentam o pH da solução nutritiva e, conseqüentemente, reduzem a solubilidade do metal (FERREIRA *et al.*, 2006). De acordo com estes autores, cultivares intolerantes dessas mesmas espécies diminuem, ou não alteram o pH da solução nutritiva, e ficam, portanto, expostas a maior concentração de Al^{3+} solúvel.

2.3.4.3. Síntese de mucilagem no ápice radicular

Uma das características de grande importância taxonômica e ecológica nos representantes da família Malvaceae é a presença de mucilagem produzida por estruturas secretoras diversas, principalmente idioblastos, canais, cavidades, superfícies epidérmicas, parênquima e tricomas (PIMENTEL *et al.*, 2011; GLÓRIA e GUERREIRO, 2006).

Na raiz, a mucilagem é exsudada pelas células da coifa e consiste principalmente de polissacarídeos de alto peso molecular contendo ácido poligalacturônico como componente (GLÓRIA e GUERREIRO, 2006). O ápice radicular é recoberto pela coifa, que reveste e protege o meristema apical e ajuda a raiz a penetrar no solo. A coifa é coberta por uma bainha viscosa ou mucilagem, que lubrifica a raiz durante sua penetração no solo (RAVEN *et al.*, 2007), reduzindo a impedância mecânica dos solos compactados sobre o ápice radicular e facilitando seu crescimento (IIJIMA *et al.*, 2004; SOMASUNDARAM *et al.*, 2008). Além disso, estas substâncias também podem desempenhar a função de redução da transpiração foliar devido à sua capacidade de retenção de água (PIMENTEL *et al.*, 2011).

A mucilagem também consiste em imobilizar íons metálicos tóxicos na rizosfera, devido à ligação do metal às cargas negativas presente no ácido poligalacturônico, protegendo assim o ápice radicular da toxidez de Al^{3+} (GENG *et al.*, 2011). Segundo estes autores, já foi demonstrado que a mucilagem pode ser responsável por reter até 35% de Al^{3+} presente no apoplasto. No entanto, ainda há controvérsias sobre o papel da mucilagem na toxicidade de Al^{3+} (KINRAIDE *et al.*, 2005; WATANABE *et al.*, 2008).

2.3.4.4. Ação de fitoquelatinas

A tolerância a elementos metálicos potencialmente tóxicos nos organismos vegetais pode ser definida como o resultado de um processo evolutivo que confere às plantas a capacidade de crescer e desenvolver em ambientes com concentrações elevadas de metais (INOUE, 2005). As plantas diferem na sua capacidade em absorver, acumular e tolerar metais tóxicos, podendo ocorrer diferenças marcantes entre as espécies, entre variedades de

uma mesma espécie e, também, nos tecidos da planta (SANTOS *et al.*, 2006). Diversas estratégias de sinalização são utilizadas pelas plantas para reconhecer e responder aos estresses ambientais. No entanto, as vias de sinalização que levam à síntese de fitoquelatinas e à percepção do estresse devido ao metal são pouco compreendidas (INOUE, 2005).

As fitoquelatinas (PCs) compreendem uma classe de pequenos peptídeos, formada por três aminoácidos, com uma estrutura geral de (γ -Glu-Cys)_n-Gly (EC 2.3.2.15), onde n = número de repetições da unidade de γ -Glu-Cys, que pode variar de 2 a 11 (mais comumente de 2 a 5) (GRILL, *et al.*, 1985). Esses peptídeos são sintetizados a partir da glutatona reduzida (GSH), em uma reação catalisada pela sintase da fitoquelatina, uma enzima ativada por metais tóxicos (INOUE, 2005). A síntese de PCs é induzida dentro de poucos minutos após a exposição a metais (GRILL *et al.* 1987).

As PCs são encontradas em plantas superiores, algas e alguns fungos expostos a níveis tóxicos de metais (ZENK, 1996). Atuam como quelantes, sendo capazes de se ligar ao metal mediante a interação com os grupos tióis (antioxidantes) das cisteínas, formando o complexo metal-PC, reduzindo sua concentração livre no citosol e transportando-o para compartimentos específicos, principalmente o vacúolo. Além disso, reduz os efeitos tóxicos de EROs, induzidas pela presença do metal (POLÉC-PAWLAK *et al.*, 2005). Entretanto, existem controvérsias se as fitoquelatinas estão diretamente relacionadas à tolerância ao metal em todas as plantas (ZHANG *et al.*, 2010). Assim, o papel específico das fitoquelatinas nos mecanismos de tolerância a metais em plantas ainda é incerto.

2.3.4.5. Ação de metalotioneínas

Alguns metais são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, mas, quando em excesso, podem se tornar altamente tóxicos. Plantas e animais se adaptaram a várias formas para manter a homeostase dos metais em nível celular. Embora as PCs tenham mostrado desempenhar um papel importante na desintoxicação de certos metais tóxicos em plantas e animais, o papel das metalotioneínas (MTs), nesse processo, não foi conclusivamente demonstrado em plantas (GRENNAN, 2011).

Assim como PCs, as MTs são uma família de proteínas de baixo peso molecular, contendo domínios ricos em cisteína (Cys) em suas regiões amino e carboxi terminal, e apresentam alta afinidade por metais tóxicos, sendo expressas em vários organismos diferentes. MTs são capazes de se ligar eficazmente a uma grande variedade de metais através de seus resíduos Cys (GRENNAN, 2011). A característica comum de todas as MTs é a ocorrência da sequência de tripeptídeos Cys-X-Cys, onde X representa um aminoácido diferente da cisteína. A organização / distribuição desses resíduos em nível celular confere a capacidade de se ligar e sequestrar metais tóxicos, promovendo assim a desintoxicação e homeostase da célula (GUO *et al.*, 2008).

Devido à forte correlação entre a expressão de MTs e a concentração de metais no ambiente, os níveis de MTs são usados para prever ou diagnosticar a exposição ao metal em uma ampla variedade de habitat. Além disso, MTs são altamente específicas e têm sensibilidade diferencial a metais (HAQ *et al.*, 2003).

2.3.4.6. Enzimas do metabolismo antioxidativo

Sob condições fisiológicas normais, as células produzem radicais livres por meio da redução do oxigênio molecular biológico, mas sob condições de estresse ambiental essa produção é aumentada. Esses radicais livres, também chamados de espécies reativas de oxigênio (EROs), possuem grande capacidade reativa, e afeta qualquer composto que esteja próximo para captar elétrons e promover sua estabilização (LAMB e DIXON, 1997).

O estresse oxidativo é descrito como um desequilíbrio entre EROs [representada predominantemente por ânion superóxido (O_2^-), peróxido hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^-) e oxigênio singlete (1O_2)] e os antioxidantes em sistemas biológicos, e pode ser desencadeada por uma formação avançada de EROs e, ou por uma redução da defesa do antioxidante (MUNNE-BOSCH *et al.*, 2001).

Os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos [dismutases do superóxido (SODs), peroxidases do ascorbato (APXs), peroxidases do guaiacol (PODs), catalases (CATs), peroxidases da glutatona (PXs), redutases

da glutatíon (GRs) e oxidase de polifenóis (PPOs)] e não enzimáticos (ácido ascórbico, glutatíon, cisteína, tocoferol, carotenóides, hidroquinonas e poliaminas) (APEL e HIRT, 2004; SHARMA e DUBEY, 2007; ARRUDA e AZEVEDO, 2009).

As SODs agem como primeira linha de defesa contra EROs, dismutando o O_2^- e produzindo o H_2O_2 , que é menos reativo. O H_2O_2 gerado também é tóxico e deve ser destoxificado pelas CATs e, ou peroxidases, gerando H_2O e O_2 (MITTLER *et al.*, 2011). Além disso, é uma metaloenzima que possui diferentes metais como cofatores, sendo, portanto, classificada em três isoformas, variando de acordo com o cofator metálico presente e sua localização em diferentes compartimentos celulares: (i) Cu/Zn - SOD, localizada no citosol e cloroplasto; (ii) Mn - SOD, presente nos mitocôndrios e peroxissomos; e (iii) Fe - SOD, que é encontrada no cloroplasto (GILL e TUTEJA, 2010).

As PODs catalisam a oxidação de H_2O_2 , gerando H_2O , utilizando um substrato como redutor (GILL e TUTEJA, 2010). As PODs utilizam receptores de elétrons aromáticos, como o guaiacol ou pirogalol, e possuem papel importante na biossíntese de lignina e na defesa da planta contra o estresse oxidativo (GILL e TUTEJA, 2010; ASADA, 1999).

Em condições não estressantes, o sistema de defesa antioxidante das células proporciona uma proteção adequada contra EROs pela ação de ambos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (ASADA, 1999). Estas enzimas reduzem eficazmente as EROs em condições normais, mas se a completa redução não ocorrer, o resultado pode ser um estado de estresse oxidativo, levando a oxidação de biomoléculas como os lipídios, proteínas e DNA, ou até mesmo morte celular.

Em plantas, EROs são produzidas principalmente em mitocôndrios e cloroplastos, como subprodutos da respiração e fotossíntese, respectivamente. Em mitocôndrios, o O_2 participa comoceptor final de elétrons na respiração aeróbica, sendo considerado o principal sítio de produção de EROs (APEL e HIRT, 2004). Nos cloroplastos, grande parte da redução do O_2 ocorre via ferredoxina reduzida, que transforma o oxigênio molecular (O_2) em O_2^- .

Vários estudos têm mostrado que o estresse por Al^{3+} pode aumentar a produção de EROs e ativar várias enzimas antioxidantes em células vegetais

(YAMAMOTO *et al.*, 2002; TAMÁS *et al.*, 2006,. MERIGA *et al.*, 2004.; SIMONOVICOVÁ *et al.*, 2004;. JONES *et al.*, 2006;. CORRALES *et al.*, 2008; YADAV e MOHANPURIA, 2009; GIANNAKOULAS *et al.*, 2010). Al^{3+} induz estresse oxidativo e, conseqüentemente, aumento na produção de EROs, que, por sua vez, promove, principalmente, a peroxidação de lípidios da membrana plasmática, resultando na alteração de sua fluidez e permeabilidade (YAMAMOTO *et al.*, 2001).

2.3.4.7. Compartimentalização de Al^{3+}

Cerca de 450 espécies de angiospermas foram identificadas até agora como hiperacumuladoras de metais, representando menos de 0,2% de todas as espécies conhecidas. Essas espécies vegetais são altamente tolerantes e podem acumular níveis bastante elevados de metais na parte aérea, sem demonstrar qualquer sintoma de toxicidade (RASCIO e NAVARI-IZZO, 2011). No entanto, alguns trabalhos têm relatado que muita das espécies hiperacumuladoras, cultivadas em solução nutritiva, ainda não foram identificadas na natureza como tal (ROBINSON *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2006; VENKATACHALAM *et al.*, 2009; KARIMI *et al.*, 2009). Por outro lado, algumas espécies classificadas como hiperacumuladoras, sob condições controladas, devem ser excluídas da lista, se esta característica não foi confirmada por experimentos de campo (MACNAIR, 2003).

A espécie *Hydrangea sepals* tem a capacidade de acumular cerca de 4000 mg Al^{3+} kg^{-1} de biomassa seca, cujas variações nas concentrações de Al^{3+} pode conferir diferentes colorações às sépalas, devido a ligação de Al^{3+} aos compostos orgânicos como a delphinidina 3-glicosídeo, promovendo a mudança da coloração de rosa para azul, com o aumento da concentração de Al^{3+} (MA *et al.*, 2001). De acordo com estes autores, cerca de 80% do total de Al^{3+} presente nas folhas desta espécie está na forma solúvel. Em adição, folhas de *Fagopyrum esculentum* pode acumular também cerca de 400 mg Al^{3+} kg^{-1} de biomassa seca, após curta exposição ao metal (cinco dias), e 15.000 mg Al^{3+} kg^{-1} de massa seca, quando cultivadas em solos ácidos (MA *et al.*, 2001).

2.4. Controle da toxidez de Al^{3+}

A aplicação de calcário ($\text{CaCO}_3 + \text{MgCO}_3$) no solo é uma medida que pode contornar o problema da toxidez de Al^{3+} , devido ao aumento do pH do solo, evitando a formação de espécies tóxicas e disponibilizando outros nutrientes essenciais para o crescimento vegetal (TAIZ e ZEIGER, 2006). Porém, a aplicação do calcário e a dificuldade de corrigir horizontes mais profundos, devido à baixa mobilidade dos produtos de sua reação no solo, acabam tornando limitante o seu uso (RAO *et al.*, 1993). Uma medida que tem sido utilizada para contornar esse problema é a utilização de cultivares tolerantes ao Al^{3+} , já que variedades e espécies vegetais diferem amplamente na tolerância ao excesso do metal (FOY, 1988). Desta forma, um melhor entendimento dos mecanismos de tolerância ao Al^{3+} tóxico vem sendo enfatizado pelos pesquisadores nos últimos anos, a fim de melhor compreender estes mecanismos e poder utilizar estas informações no desenvolvimento de genótipos tolerantes ao Al^{3+} (HARTWIG *et al.*, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Material vegetal e condições de cultivo*

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC. Foram utilizadas duas progênies de *T. cacao* contrastantes para a tolerância ao Al^{3+} , resultantes dos cruzamentos entre ‘*Catongo*’ x ‘*Catongo*’ (autocompatível e intolerante) e CCN-10 x SCA-6 [CCN 10 - autocompatível e tolerante) e SCA-6 (autoincompatível e tolerante)], realizados via polinização controlada no Banco Ativo de Germoplasma de Cacau do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC).

Sementes provenientes de frutos fisiologicamente maduros, resultantes de ambas as progênies, foram previamente limpas, friccionando a semente com pó de serra para eliminar a mucilagem; seguida da remoção do tegumento para que todos os seus tecidos ficassem expostos ao metal quando em solução. Em seguida, as sementes foram totalmente imersas, durante 24 h, em diferentes concentrações de Al^{3+} (15, 30, 45 e 60 mg L⁻¹) na forma de $Al_2(SO_4)_3 \cdot 16 H_2O$, juntamente com o tratamento controle (sem Al^{3+}), preparadas em solução tampão, composta de $MgSO_4$ a 0,1 mmol L⁻¹, KNO_3 a 0,1 mmol L⁻¹, NH_4NO_3 a 0,15 mmol L⁻¹ e $KHC_8H_4O_8$ a 8,0 mmol L⁻¹ (bifitalato de potássio), para manter o pH em torno de 4,0 durante a absorção do metal.

Após 24h de embebição das sementes [momento em que havia sido exaurido todo oxigênio dissolvido em solução (dados não mostrados), o que poderia desencadear a respiração anaeróbica ou fermentação e interferir nos resultados experimentais]; período em que já se observava a protrusão da raiz (cerca de 2 mm de comprimento), fez-se o transplântio para tubetes plásticos pretos cônicos de 235 cm³, contendo como substrato orgânico fibra de coco + casca de *Pinus* na proporção de 1:1. Durante o período experimental, as plântulas foram irrigadas diariamente e adubadas semanalmente, com macro e micronutrientes minerais, de acordo com as exigências nutricionais da cultura (SOUZA JÚNIOR, 2007).

Aos 60 dias após a germinação das sementes, época em que as reservas cotiledonares foram totalmente exauridas (e provavelmente todo Al^{3+}

absorvido no momento da embebição da semente) e inicia a queda dos cotilédones, foram coletadas raízes primárias, caule e 2ª ou 3ª folha madura a partir do ápice do eixo ortotrópico das plântulas de progênies de *T. cacao* avaliadas, nos diferentes tratamentos, para análise da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo; de alterações anatômicas e ultraestruturais, em níveis tissular e celular, respectivamente; de expressão gênica e de nutrientes minerais.

3.2. *Enzimas do estresse oxidativo*

3.2.1. *Obtenção do extrato enzimático*

Para a obtenção dos extratos enzimáticos, as folhas e raízes coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, armazenadas em ultrafreezer – 80°C e, posteriormente, liofilizadas e armazenadas em freezer - 20°C. Posteriormente, para obtenção do extrato enzimático, utilizou-se 200 mg de folhas e de raízes, liofilizadas e maceradas em almofariz com nitrogênio líquido, de todos os tratamentos. Imediatamente após, adicionou-se polivinilpirolidona (PVP) para evitar a oxidação das amostras. Em seguida, adicionou-se tampão fosfato de sódio (50 mmol L⁻¹, pH 6,0) na proporção 20:1, procedeu-se a ultrasonicação (Ultrasonic processor Gex 130, 130 W) das amostras em gelo, com pulsos de 5 s, a intervalos de 10 s e amplitudes de 70% e 80%, para que os tecidos da planta fossem totalmente rompidos. Logo após, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 10000 x g.

3.2.2. *Peroxidases do guaiacol (PODs, EC1.11.1.7)*

Para determinação da atividade de PODs, após a centrifugação das amostras, foi coletado 10 µL do sobrenadante e diluído em 190 µL de tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ e pH 6,0. Foram preparadas microplacas contendo 140 µL de tampão POD 2x (40 mmol L⁻¹ de guaiacol, 20 mM NaH₂PO₄ pH 6,0 e H₂O₂ a 0,6%, 120 µL de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 6,0) e 20 µL do extrato enzimático diluído (20:1). A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro com leitor de microplacas (VERSAmix™).

A conversão dos dados obtidos em valores de absorvância, a $470 \text{ nm s}^{-1} \text{ g}^{-1}$ MS, para consumo de guaiacol em $\text{umol s}^{-1} \text{ g}^{-1}$ MS, foi feita com o uso da equação $y = 0,1324 + 0,8382x$ ($R^2 = 0,99$), originada a partir de uma curva padrão para POD, de acordo com a metodologia descrita por Pirovani *et al.*, (2008).

3.3. *Microscopia Fotônica*

Para microscopia fotônica, foram retiradas amostras da região mediana da folha madura, nas plântulas de progênies de *T. cacao* oriundas de sementes controle e submetidas às concentrações de 30 e 60 $\text{mg Al}^{3+} \text{ L}^{-1}$. Imediatamente após, o material vegetal foi fixado em glutaraldeído a 3% e em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 6,9, durante 4h. Posteriormente, as amostras foram transferidas para álcool a 50% e estocadas a 4°C em geladeira. Amostras de folha foram desidratadas em série butanólica (70, 80, 90 e 100%), incluídas em parafina, seccionadas em micrótomo rotativo Leica RM 2145 (10 μm de espessura), montadas em lâminas de vidro com lamínulas e submetidas ao processo de coloração com safranina e azul de astra a 1%. As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio Leica DM 500, para posterior medição dos tecidos foliares (espessuras da epiderme nas faces abaxial e adaxial, dos parênquimas paliçádico e esponjoso, e do mesofilo) por meio do software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal, Anati Quanti, versão 2, disponibilizado pela Universidade Federal de Viçosa. Foram observadas secções de folhas de três plantas por tratamento e dez campos por repetição, totalizando trinta medições por tratamento.

3.4. *Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)*

Para microscopia eletrônica, foram retiradas amostras da região mediana de folhas maduras e de raízes primárias, nas plântulas de progênies de *T. cacao* oriundas de sementes controle e submetidas às concentrações de 30 e 60 $\text{mg Al}^{3+} \text{ L}^{-1}$. O material vegetal foi imediatamente fixado em glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 6,9). As amostras foram submetidas à lavagem 4x (10 min cada) no mesmo tampão (cacodilato

de sódio 0,1 M, pH 6,9), e pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1%, preparado no mesmo tampão durante 2 h, a 4°C. Em seguida, foi realizada uma nova lavagem 4x (10 min cada) e posterior desidratação em etanol (30, 50, 70, 80 e 90%, seguido por duas lavagens em etanol a 100%). Após a desidratação em etanol, as amostras foram embebidas em uma mistura contendo etanol/resina LR White (Sigma) nas seguintes proporções: 3:1 (2 h), 1:1 (2 h), 1:3 (*overnight*), seguido por duas trocas em resina LR White pura (2 h cada), mantendo as amostras sempre sob agitação lenta. Por fim, as amostras foram colocadas em cápsulas de gelatina, para evitar o contato com o ar impedindo a polimerização e embebidas em resina LR White pura para a análise ultraestrutural. A polimerização da resina foi completada em 24 h a 60°C.

Posteriormente, foram obtidas secções ultrafinas, com 70 nm de espessura, utilizando-se o ultramicrotomo Leica UC6 e depositadas em grades de Cu de 300 mesh. As secções foram contrastadas com acetato de uranila a 3%, durante 7 min, seguido por citrato de chumbo a 0,4%, durante 7 min. Em seguida, foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) Morgagni™ modelo 268 D, operando com voltagem de aceleração de 80 kV; microprocessado e controlado por meio de plataforma Windows, equipado com câmera CCD. Logo após, as grades de Cu contendo as amostras foram fotografadas e as imagens que apresentaram alterações ultraestruturais nas células do mesofilo foliar e do córtex e cilindro vascular da raiz foram selecionadas e analisadas.

3.5. *Macro e micronutrientes minerais*

Para a análise de nutrientes minerais, foram coletadas nove plantas de cada tratamento (controle, 15, 30, 45 e 60 mg Al³⁺ L⁻¹). Em seguida, as plântulas foram lavadas em água de torneira (1x), HCl a 3% (1x) e água destilada (2x) e separadas em raiz, caule e folha. Após o processo de lavagem, os três órgãos foram colocados separadamente em sacos de papel e secos a 75°C, em estufa com circulação forçada de ar, durante 72 h. Posteriormente, o material vegetal seco foi triturado em moinho tipo Willey e armazenado em frascos de vidro tampados, previamente descontaminados, para evitar absorção de umidade.

Para determinação dos nutrientes minerais, foram pesados 200 mg de cada amostra, com o uso de balança analítica. Logo após, as amostras foram colocadas em tubos de vidro (50 mL) e submetidas à digestão ácida em bloco digestor TECNAL, modelo TE-007MP. Para a digestão ácida, adicionou-se 4 mL de ácido nítrico concentrado, iniciando o aquecimento do bloco digestor e mantendo-se a temperatura a 50°C por 30 min. Posteriormente, aumentou-se a temperatura para 80°C, mantendo-a por 1 h. Após este período, a temperatura foi elevada e mantida a 130°C por 2 h, adicionando 1 mL de peróxido de hidrogênio (30%) a intervalos regulares de 20 min, totalizando mais 1 h. Ao final da digestão, o material digerido foi transferido para tubos falcon, previamente descontaminados, completando-se o volume para 15 mL com água Milli-Q. Logo após, procedeu-se a determinação da concentração de macro (P, K, Ca, Mg, S, Mn) e de micronutrientes minerais (Fe, Cu, Zn), utilizando-se a técnica de espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado (ICP OES, Varian, modelo 710 ES).

3.6. Expressão gênica

Para as análises de expressão gênica, via *Real Time qRT-PCR*, foram utilizados *primers* gene-específicos relacionados a enzimas do estresse oxidativo: (i) *PER-1*, associado à biossíntese de peroxidase da classe III; e (ii) *Cu-Zn-SODcyt*, associado com a biossíntese de SOD citosólico.

O RNA de folhas e de raízes liofilizadas, obtidas de plântulas dos tratamentos controle, 30 e 60 mg Al³⁺ L⁻¹, foi extraído utilizando-se o *kit RNAqueous* (Ambion®), segundo as instruções do fabricante. Inicialmente, a pureza e integridade do RNA foram testadas por eletroforese em gel de agarose a 1%. Em seguida, 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°C por 5 min, 37°C por 5 min, 42°C por 60 min e 70°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

(Tabela 1), desenhados a partir da análise das sequências de genes conhecidas na 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*. Apenas 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. Valores para o Ciclo *Threshold* (C_T) foram determinados usando o *software LightCycler*. Números da expressão relativa dos genes foram calculados como uma porcentagem do tratamento controle utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), usando 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 utilizados nas análises de qRT-PCR.

Gene	Primer
<i>PER-1</i>	Forward; 5' CAGGTGTCGTGGGATCAAGA 3' Reverse; 5' TGGAAAACTACGCCAAATATGC 3'
<i>Cu-Zn SOD_{Cyt}</i>	Forward; 5' GATGATGGCTGTGTGAGTTTCTCT 3' Reverse; 5' CAACAACAGCTCTTCCAATAATTGA 3'
β - <i>Tubulina</i>	Forward; 5'-TGCAACCATGAGTGGTGTTC A- 3' Reverse; 5'-CAGACGAGGGAAGGGAATGA- 3'

3.7. *Análise estatística*

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 10 tratamentos, em arranjo fatorial 2 x 5, correspondentes a 2 progênies de *T. cacao* ('*Catongo*' x '*Catongo*' e CCN-10 x SCA-6) e 4 concentrações de Al^{3+} (15, 30, 45 e 60 mg Al^{3+} L⁻¹) + tratamento controle (sem Al^{3+}) e com um número variável de repetições (quatro para análise de atividade enzimática, três para análises anatômicas e ultraestruturais, nove para determinação da concentração de macro e micronutrientes minerais e seis para análise de expressão gênica) e uma plântula por unidade experimental. Fez-se análise de variância (ANOVA) e comparação de médias entre os tratamentos usando o teste Tukey ($p < 0,05$) e teste-t ($p < 0,05$). Além disso, foram efetuadas análises de regressão para macro e micronutrientes minerais.

4. RESULTADOS

4.1. Peroxidases do guaiacol (PODs)

A progênie originária do cruzamento de 'Catongo' x 'Catongo' apresentou maior atividade de PODs em folhas (Figura 2A), ao passo que para a progênie CCN-10 x SCA-6 a maior atividade foi observada em raízes (Figura 2B). Verificaram-se, também, diferenças intraprogênie, com o aumento das doses de Al^{3+} aplicada via seminal, para atividade antioxidativa de PODs em folhas e raízes de ambas as progênie de *T. cacao* avaliadas (Figura 2 A e B). O incremento da atividade de PODs em folhas da progênie originada do cruzamento entre 'Catongo' x 'Catongo' ocorreu até a dose correspondente a $30 \text{ mg Al}^{3+} \text{ L}^{-1}$, que a partir do qual se manteve aproximadamente constante até $60 \text{ mg Al}^{3+} \text{ L}^{-1}$; ao passo que para CCN-10 x SCA-6 esse aumento crescente se verificou até $30 \text{ mg Al}^{3+} \text{ L}^{-1}$, decrescendo em seguida até $60 \text{ mg Al}^{3+} \text{ L}^{-1}$. O aumento da atividade de PODs, em nível foliar, para as progênie 'Catongo' x 'Catongo' e CCN-10 x SCA-6 foram de 307 e 317 %, respectivamente, em relação ao controle (Figura 2A).

Em contrapartida, em raiz houve um incremento da atividade de PODs da progênie originada do cruzamento de CCN-10 x SCA-6, cujo aumento crescente ocorreu até a dose correspondente a $30 \text{ mg Al}^{3+} \text{ L}^{-1}$, decrescendo em seguida até a dose $60 \text{ mg Al}^{3+} \text{ L}^{-1}$; ao passo que para o 'Catongo' x 'Catongo' o incremento se iniciou a partir da dose $45 \text{ mg Al}^{3+} \text{ L}^{-1}$. O aumento da atividade de PODs, em nível radicular, para as progênie CCN-10 x SCA-6 e 'Catongo' x 'Catongo' foram de 85 e 34 %, respectivamente, em relação ao controle (Figura 2B).

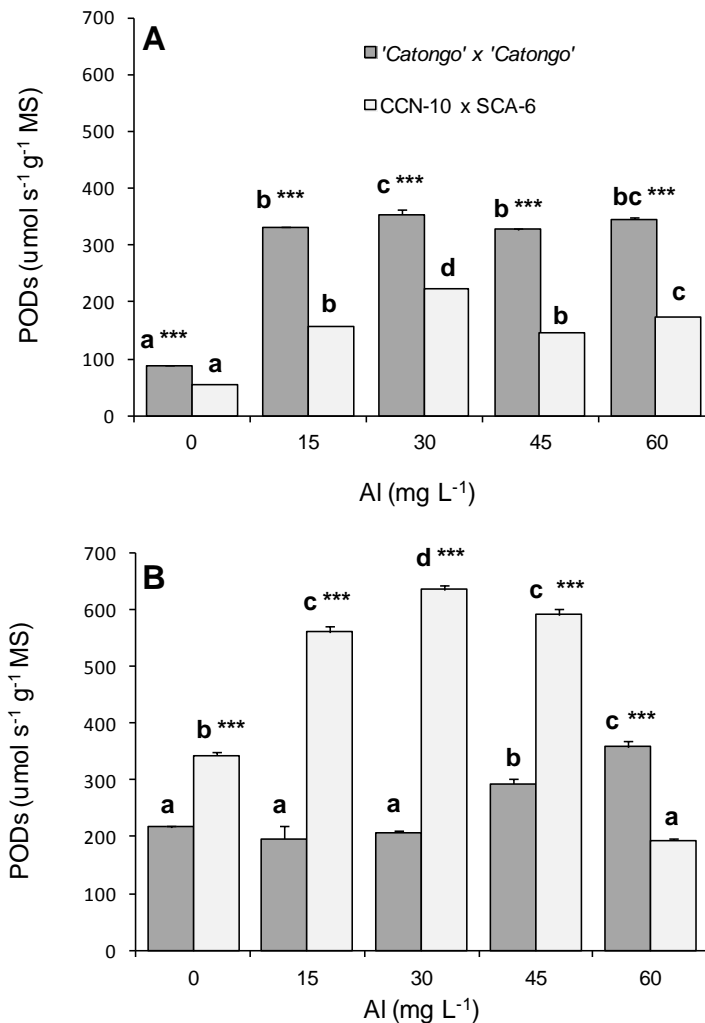


Figura 2. Atividade de peroxidases do guaiacol (PODs) em folhas (A) e raízes (B) de plântulas de progênies de *T. cacao* submetidas a doses crescentes de Al³⁺, aplicadas via seminal, 60 dias após a germinação. A significância estatística interprogênies foi obtida pelo *t*-test. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (ns) não significativo. Médias intraprogênies seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Valores médios de quatro repetições (\pm EP).

4.2. Análises anatômicas

Análises anatômicas do mesofilo foliar de plântulas de *T. cacao*, de ambos as progênies, demonstraram que não houve efeitos intraprogênies significativos ($p < 0,05$), com o aumento das doses de Al³⁺ aplicada via seminal, sobre a espessura da epiderme, nas faces adaxial (Ead) e abaxial (Eab); dos parênquimas paliçádico (PP) e lacunoso (PL); e do mesofilo (M). As diferenças significativas ($p < 0,05$) foram apenas interprogênie. A progênie CCN-10 x SCA-6 apresentou os maiores valores para as espessuras de Ead, PP, PL e M em

relação ao 'Catongo' x 'Catongo' (Tabela 2). Os percentuais correspondentes ao aumento das espessuras dos tecidos foliares da progênie CCN-10 x SCA-6, em relação ao 'Catongo' x 'Catongo', foram de 9% para a Ead, na dose correspondente a 60 mg Al³⁺ L⁻¹; de 11, 14 e 12% para PP, no controle, 30 e 60 mg Al³⁺ L⁻¹, respectivamente; de 18, 27 e 15% para PL, no controle, 30 e 60 mg Al³⁺ L⁻¹, respectivamente; e de 12 e 14% para M, no controle e 60 mg Al³⁺ L⁻¹, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Análise anatômica do mesofilo foliar de plântulas de progênies de *T. cacao* submetidas a doses crescentes de Al³⁺, aplicadas via seminal, 60 dias após a germinação.

Progênie	Al (mg L ⁻¹)	Ead (µm)	Eab (µm)	PP (µm)	PL (µm)	M (µm)
'Catongo' x 'Catongo'	Controle	21,5 ± 0,5 a (ns)	13,0 ± 0,43 a (ns)	18,3 ± 0,5 a *	31,7 ± 1,0 a**	85,2 ± 0,7 a***
	30	23,1 ± 0,7 a (ns)	13,1 ± 0,40 a (ns)	19,1 ± 0,6 a *	30,3 ± 1,9 a**	85,5 ± 3,6 a (ns)
	60	21,2 ± 0,5 a *	13,1 ± 0,39 a (ns)	18,0 ± 0,6 a *	32,4 ± 1,4 a*	83,1 ± 1,3 a***
CCN-10 x SCA-6	Controle	21,5 ± 0,6 a	12,6 ± 0,39 a	20,4 ± 0,7 a	37,4 ± 1,5 a	95,5 ± 2,7 a
	30	22,4 ± 1,1 a	12,9 ± 0,44 a	21,8 ± 0,9 a	38,4 ± 2,3 a	90,0 ± 1,3 a
	60	23,1 ± 0,7 a	12,5 ± 0,50 a	20,2 ± 0,6 a	37,1 ± 1,4 a	94,8 ± 1,7 a

Médias intraprogênies com as mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). A significância estatística interprogênie foi obtida pelo t-test. (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001; (ns) não significativo. Valores médios de três repetições (± EP).

Ead – epiderme na face adaxial, **Eab** – epiderme na face abaxial, **PP** – parênquima paliçádico, **PL** – parênquima lacunoso, **M** – mesofilo.

4.3. Análises ultraestruturais

Na ausência de Al³⁺, as progênies 'Catongo' x 'Catongo' e CCN-10 x SCA-6 apresentaram células do mesofilo foliar com aspecto normal, mantendo a integridade das membranas dos cloroplastos, mitocôndrios e do núcleo, sem evidências de alterações. Os cloroplastos apresentam formato alongado, com grãos de amido de diversos tamanhos e plastoglóbulos de formatos característicos. O núcleo apresentou formato oval, evidenciando regiões mais condensadas (heterocromatina) próximas à membrana nuclear (Figuras 3A e B; 4A e B). Em contrapartida, na dose correspondente a 60 mg Al³⁺ L⁻¹ (Figuras 3C e D e 4C e D), aplicada via seminal, houve alterações ultraestruturais no mesofilo foliar de ambas as progênies de *T. cacao*. Nesta dose de Al³⁺, o

rompimento da membrana nuclear pôde ser nitidamente verificado em ambas as progênies de *T. cacao* (Figuras 3D e 4D); ao passo que a integridade da membrana dos cloroplastos e mitocôndrios foi mantida. Além disso, observou-se ainda a presença de grãos de amido e plastoglóbulos no interior dos cloroplastos (Figuras 3C e 4C).

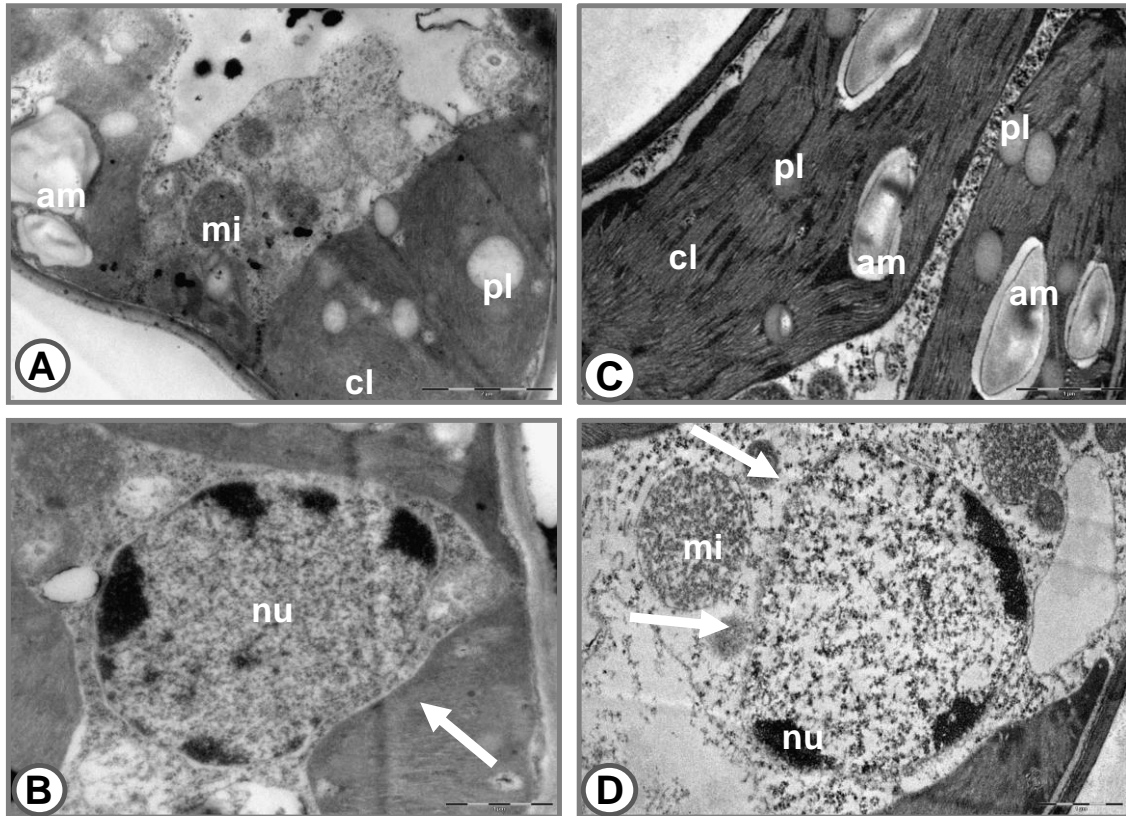


Figura 3. Análises ultraestruturais de células do mesófilo foliar da progênie ‘*Catongo*’ x ‘*Catongo*’ controle (A - B) e submetida à dose de $60 \text{ mg Al}^{3+} \text{ L}^{-1}$ (C - D), aplicada via seminal, aos 60 dias após a germinação. (A) membrana do mitocôndrio e do cloroplasto intacta, presença de grãos de amido e plastoglóbulos. (B) membrana do núcleo intacta. (C) membrana do cloroplasto intacta, presença de grãos de amido e plastoglóbulos. (D) membrana do mitocôndrio intacta, ruptura da membrana do núcleo.

cl - cloroplasto, **nu**- núcleo, **am** - grãos de amido, **pl** – plastoglóbulos, **mi** - mitocôndrio. Bars: 1 μm (B, C, D), 2 μm (A).

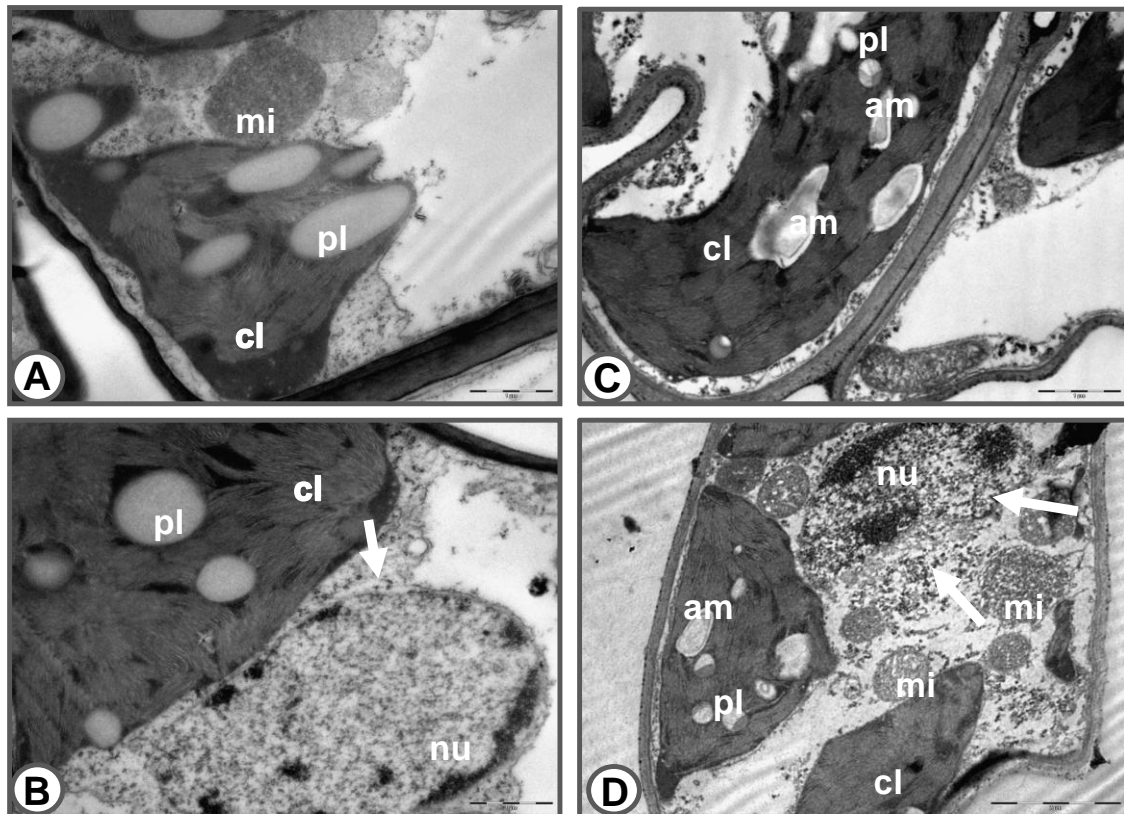


Figura 4. Análises ultraestruturais de células do mesofilo foliar da progênie CCN-10 x SCA-6 controle (**A - B**) e submetida à dose de 60 mg Al³⁺ L⁻¹ (**C - D**), aplicada via seminal, aos 60 dias após a germinação. (**A**) membrana do mitocôndrio e cloroplasto intacta, presença de plastoglóbulos. (**B**) membrana do cloroplasto e membrana do núcleo intacta, presença de plastoglóbulos. (**C**) membrana do cloroplasto intacta, presença de grãos de amido e plastoglóbulos. (**D**) membrana do mitocôndrio e do cloroplasto intacta, presença de grãos de amido e plastoglóbulos, ruptura da membrana do núcleo.

cl- cloroplasto, **nu** - núcleo, **am** - grãos de amido, **pl** – plastoglóbulos, **mi** – mitocôndrio. Bars: 1 µm (A, B, C), 2 µm (D).

Na ausência de Al³⁺, ambas as progênies avaliadas apresentaram células dos tecidos radiculares com características ultraestruturais normais (Figuras 5A – E e 6A - D). Por outro lado, foram observadas diversas alterações, para ambas as progênies, na dose correspondente a 60 mg Al³⁺ L⁻¹, como das células da epiderme radicular (Figuras 5H e 6H), depósitos de materiais eletrodensos nas células do parênquima do xilema (Figuras 5G e 6F) e na endoderme (Figuras 5J e 6G). Além disso, houve ruptura da membrana plasmática (Figura 5F) e retração do vacúolo nas células do parênquima

cortical de '*Catongo*' x '*Catongo*' (Figura 5I), ao passo que para o CCN-10 x SCA-6 evidenciou-se ruptura das paredes das células do parênquima cortical (Figura 6E).

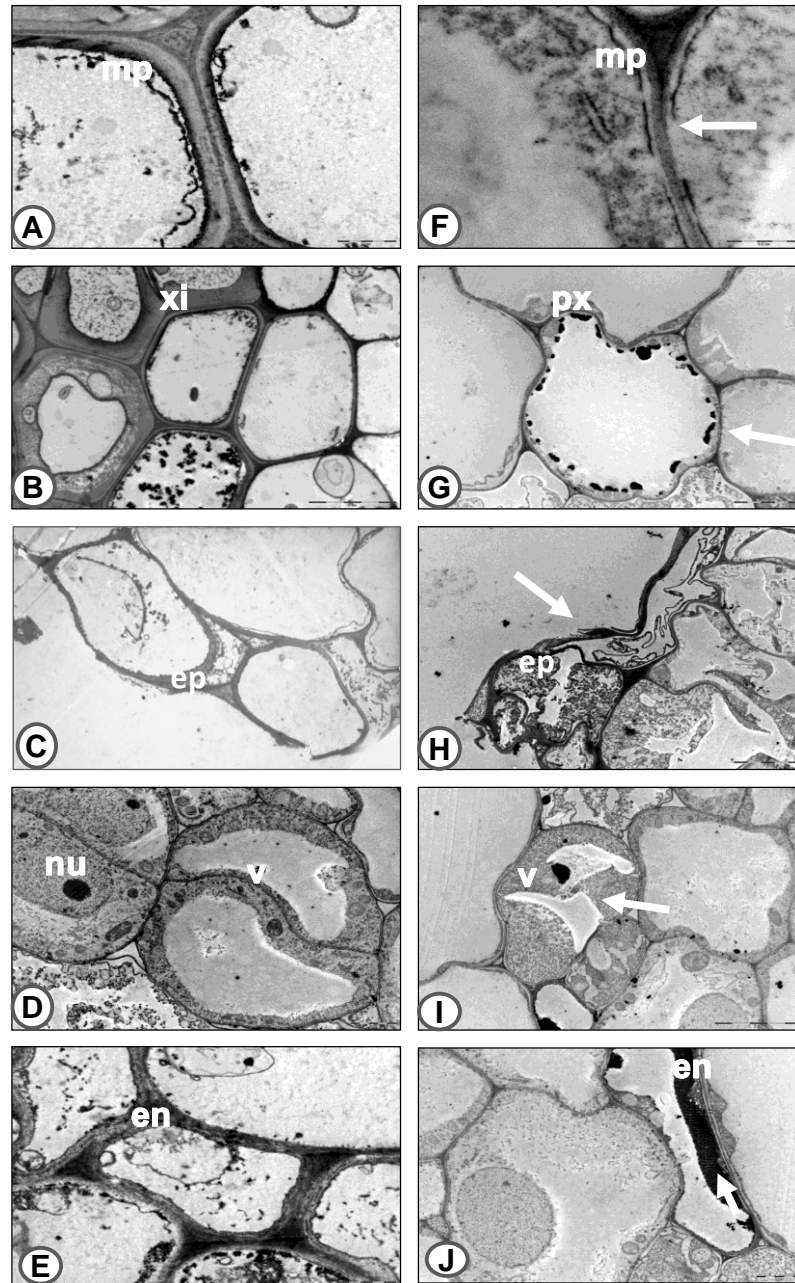


Figura 5. Análises ultraestruturais em células de tecidos radiculares da progênie ‘*Catongo*’ x ‘*Catongo*’ controle (A - E) e submetida à dose de 60 mg $\text{Al}^{3+} \text{L}^{-1}$ (F - J), aplicada via seminal, aos 60 dias após a germinação. (A) membrana plasmática intacta. (B) parênquima do xilema com ausência de material eletrodense. (C) células da epiderme radicular de tamanho e forma normais. (D) vacúolo de tamanho normal. (E) células da endoderme de forma normal e ausência de material eletrodense. (F) ruptura da membrana plasmática. (G) presença de material eletrodense no parênquima do xilema. (H) rompimento das células da epiderme radicular. (I) retração do vacúolo. (J) deformação das células da endoderme e presença de material eletrodense.

mp – membrana plasmática, **xi** – xilema, **ep** – epiderme, **px** – parênquima do xilema, **v** – vacúolo, **en** – endoderme, **nu** – núcleo. Bars: 0,5 μm (F), 1 μm (A, E), 2 μm (D, J), 5 μm (B, G, H, I), 10 μm (C).

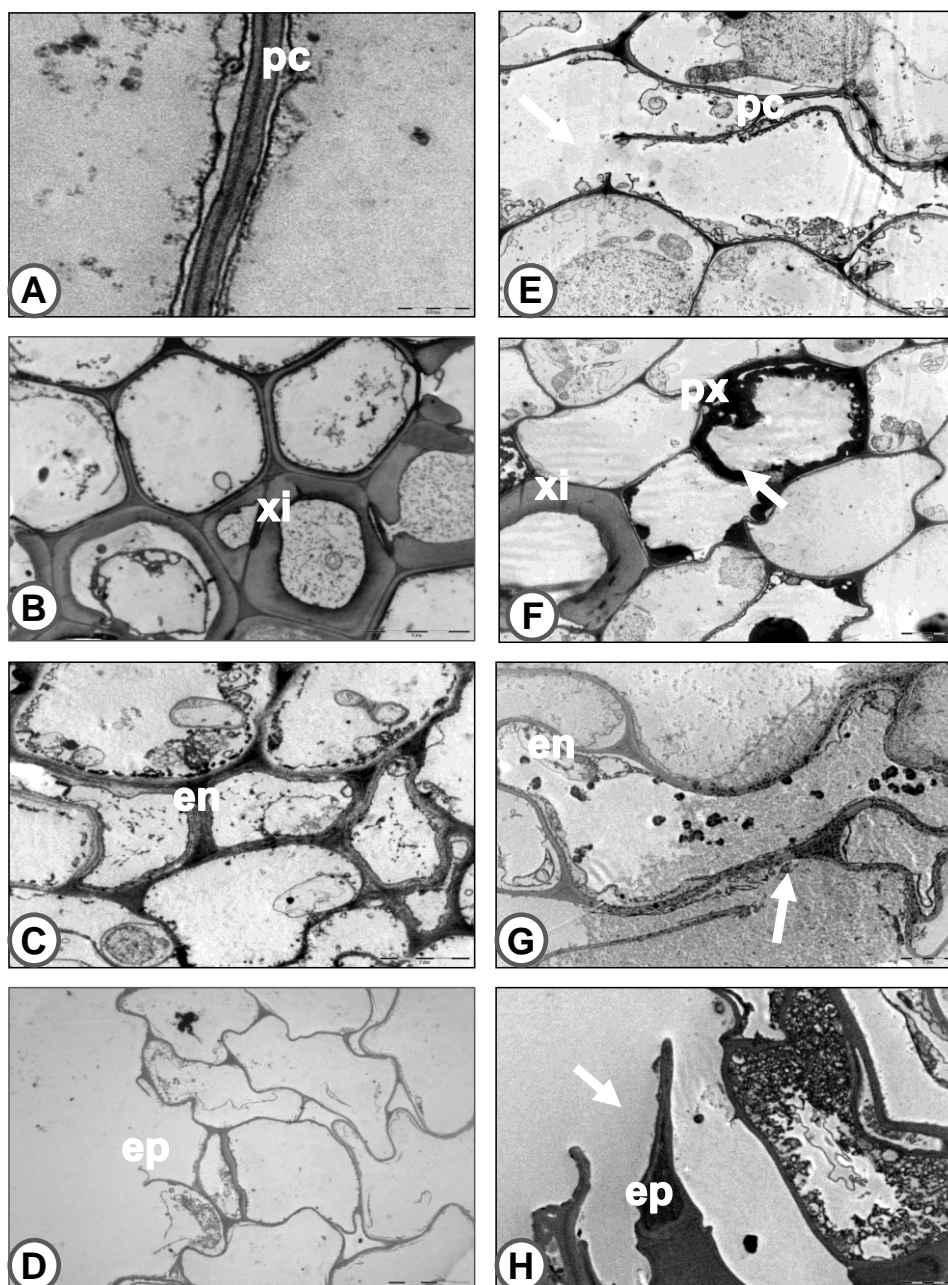


Figura 6. Análises ultraestruturais em células de tecidos radiculares da progênie CCN-10 x SCA-6 controle (A - D) e submetida à dose de $60 \text{ mg Al}^{3+} \text{ L}^{-1}$ (E - H), aplicada via seminal, aos 60 dias após a germinação. (A) parede celular intacta. (B) parênquima do xilema com ausência de material eletrodenso. (C) células da endoderme de forma normal e ausência de material eletrodenso. (D) células da epiderme radicular de forma normal. (E) ruptura da parede celular. (F) presença de material eletrodenso no parênquima do xilema. (G) deformação das células da endoderme e presença de material eletrodenso. (H) rompimento das células da epiderme radicular.

pc – parede celular, **xi** – xilema, **en** – endoderme, **ep** – epiderme, **px** – parênquima do xilema. Bars: $0,5\mu\text{m}$ (A), $2\mu\text{m}$ (C, E, F, G, H), $5\mu\text{m}$ (B), $10\mu\text{m}$ (D).

4.4. Macro e micronutrientes minerais

Ambas as progênies avaliadas apresentaram respostas diferenciais significativas ($p < 0,05$) em relação à absorção de macro e micronutrientes minerais, com aumento das doses de Al^{+3} , aplicadas via seminal. Houve um aumento linear de 7% na concentração de P no caule das plântulas da progênie originada do cruzamento de 'Catongo' x 'Catongo', proporcional ao aumento das doses de Al^{+3} aplicada via seminal. Entretanto, para a progênie CCN-10 x SCA-6, verificou-se um aumento linear da concentração de P para folhas e quadrático para o caule, que corresponderam a 43 e 29%, respectivamente, em relação ao controle. Em contrapartida, o incremento de Al^{+3} via seminal, não alterou as concentrações de P em folhas e raízes de 'Catongo' x 'Catongo' e em raízes de CCN-10 x SCA-6 (Figura 7A e F).

Houve aumento linear na concentração de K no caule e nas raízes de 'Catongo' x 'Catongo', com o incremento das doses de Al^{+3} aplicada via seminal, que corresponderam a 82 e 25%, respectivamente. Entretanto, para a progênie CCN-10 x SCA-6, verificou-se aumento linear de 83% na concentração de K no caule, comparado ao controle, semelhante ao percentual verificado em caule de 'Catongo' x 'Catongo'. Em contrapartida, o incremento de Al^{+3} via seminal não alterou as concentrações de K em folhas de 'Catongo' x 'Catongo' e em folhas e raízes de CCN-10 x SCA-6 (Figura 7B e G).

O aumento das doses de Al^{+3} via seminal não alterou as concentrações de Mg, S (Figura 7C e E), Fe, Zn e Mn (Figura 8A, B e D) em folhas, caule e raízes de 'Catongo' x 'Catongo'. O mesmo fato ocorreu com a concentração de Mn para a progênie CCN-10 x SCA-6 (Figura 8H). Entretanto, para a progênie CCN-10 x SCA-6, houve aumento linear da concentração de Mg para folhas e redução linear para raízes, que corresponderam a um aumento de 22% e redução de 27%, respectivamente, em relação ao controle. Porém, o incremento de Al^{+3} não alterou as concentrações de Mg em caule de CCN-10 x SCA-6 (Figura 7H).

Para a progênie CCN-10 x SCA-6, verificou-se um aumento linear de 26% de S em folhas, comparado ao controle, ao passo que não houve alterações na concentração de S em caule e raízes (Figura 7J). Além disso, para esta mesma progênie, verificou-se um aumento linear de 40% na

concentração de Fe para raízes, ao passo que não houve alterações na concentração de Fe em folhas e caule (Figura 8E). Ademais, observou-se, também para o CCN-10 x SCA-6, aumento quadrático de Zn para folhas e redução quadrática para raízes, que correspondem a um aumento de 29% e redução de 34%, respectivamente, em relação ao controle. Entretanto, o incremento de Al^{+3} via seminal não alterou as concentrações de Zn em caule desta progênie (Figura 8F).

Verificou-se uma redução quadrática de 58% na concentração de Ca em caule de '*Catongo*' x '*Catongo*', em resposta ao aumento das doses de Al^{+3} via seminal. Entretanto, para a progênie CCN-10 x SCA-6, houve um aumento quadrático de apenas 7% na concentração de Ca em folhas, em relação ao controle. Por outro lado, o incremento de Al^{+3} não alterou as concentrações de Ca em folhas e raízes de '*Catongo*' x '*Catongo*' e em caule e raízes de CCN-10 x SCA-6 (Figura 7D e I).

O incremento das doses de Al^{+3} aplicada via seminal, promoveu um aumento quadrático de 49% na concentração de Cu em folhas de '*Catongo*' x '*Catongo*' e linear de 19% para folhas de CCN-10 x SCA-6, em relação ao controle. Entretanto, o incremento de Al^{+3} não alterou os níveis de Cu em caules e raízes de ambas as progênies (Figura 8C e G).

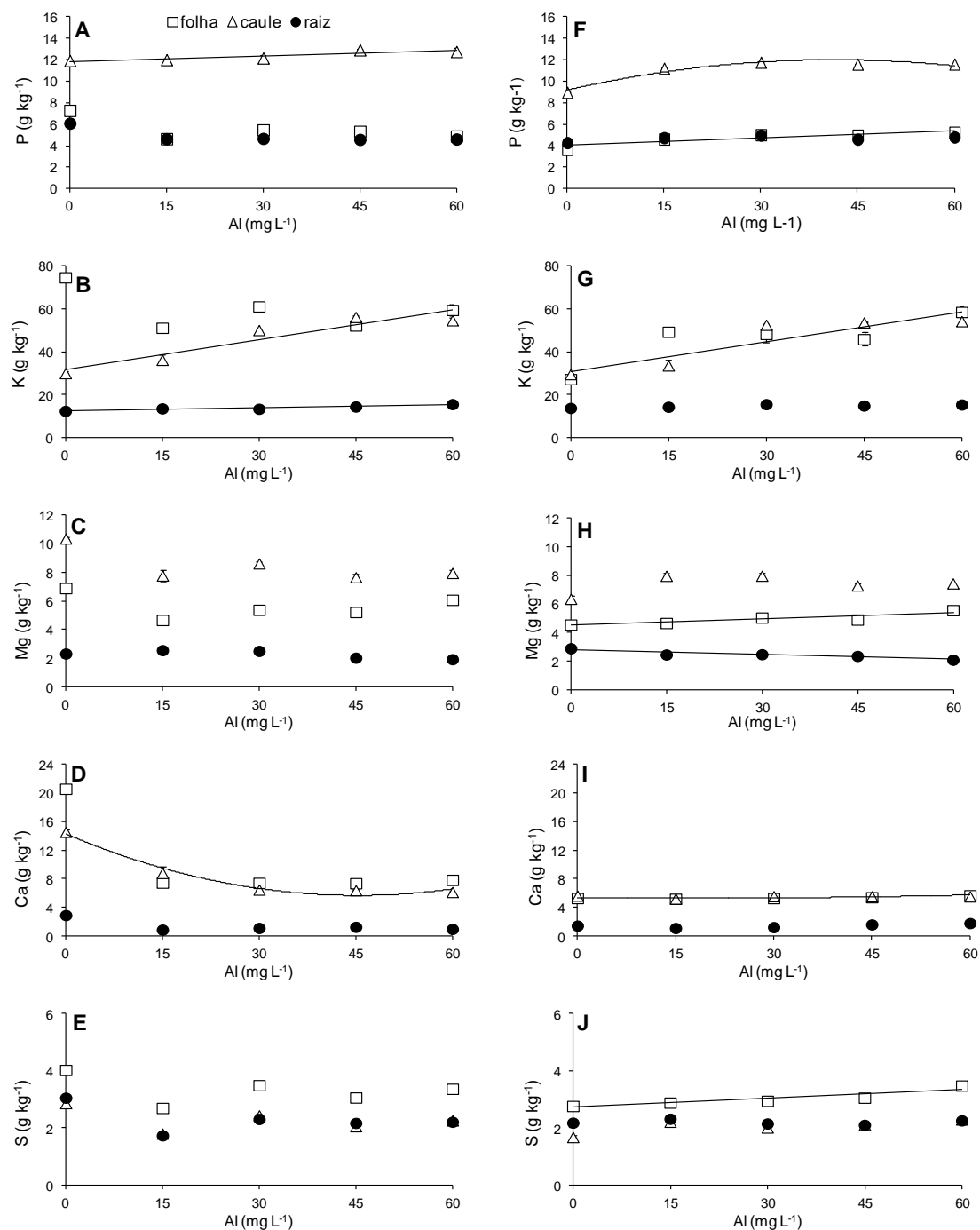


Figura 7. Acúmulo de macronutrientes minerais em folhas (□), caules (Δ) e raízes (●) de progênies de *T. cacao* ['Catongo' x 'Catongo' (A - E) e CCN-10 x SCA-6 (F - J)] submetidas a doses crescentes de Al³⁺, via seminal, 60 dias após a germinação. Valores médios de nove repetições (± EP). A ausência de barras de erro indica que o tamanho do erro não excedeu o tamanho do símbolo. Equações das curvas de regressão na Tabela 3.

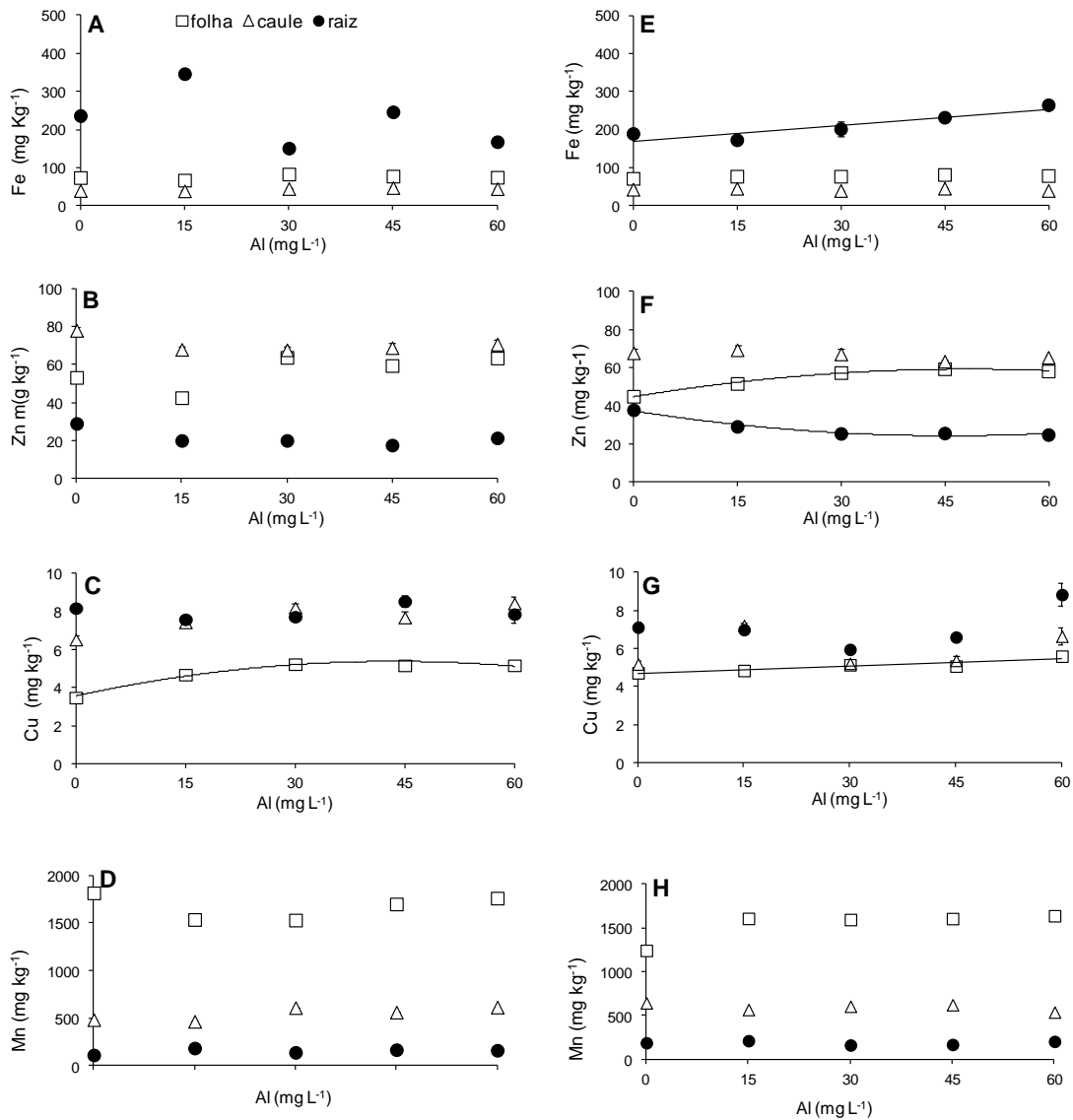


Figura 8. Acúmulo de micronutrientes minerais em folhas (□), caules (Δ) e raízes (●) de progênies de *T. cacao* [‘*Catongo*’ x ‘*Catongo*’ (A - D) e CCN-10 x SCA-6 (E - H)] submetidas a doses crescentes de Al³⁺, via seminal, 60 dias após a germinação. Valores médios de nove repetições (± EP). A ausência de barras de erro indica que o tamanho do erro não excedeu o tamanho do símbolo. Equações das curvas de regressão na Tabela 3.

Tabela 3. Equações de regressão para o teor de macro e micronutrientes minerais em folha, caule e raiz de progênies de *T. cacao* submetidas a doses crescentes de Al^{3+} , aplicadas via seminal, 60 dias após a germinação.

Nutriente	Órgão	Progênie	
		'Catongo' x 'Catongo'	CCN-10 x SCA-6
		Equação	
P	folha	$\hat{y} = 6,67$	$\hat{y} = 4,00 + 0,02*x (R^2 = 0,72)$
	caule	$\hat{y} = 11,85 + 0,02*x (R^2 = 0,74)$	$\hat{y} = 9,17 + 0,14x - 0,001*x^2 (R^2 = 0,87)$
	raiz	$\hat{y} = 5,40$	$\hat{y} = 4,35$
K	folha	$\hat{y} = 72,70$	$\hat{y} = 34,14$
	caule	$\hat{y} = 31,72 + 0,46*x (R^2 = 0,83)$	$\hat{y} = 30,97 + 0,46*x (R^2 = 0,76)$
	raiz	$\hat{y} = 12,61 + 0,05*x (R^2 = 0,83)$	$\hat{y} = 13,92$
Mg	folha	$\hat{y} = 6,64$	$\hat{y} = 4,82 + 0,004*x (R^2 = 0,75)$
	caule	$\hat{y} = 10,04$	$\hat{y} = 6,61$
	raiz	$\hat{y} = 2,56$	$\hat{y} = 2,82 - 0,01*x (R^2 = 0,82)$
Ca	folha	$\hat{y} = 19,16$	$\hat{y} = 5,34 - 0,008x + 0,0002*x^2 (R^2 = 0,97)$
	caule	$\hat{y} = 14,25 - 0,38*x + 0,004*x^2 (R^2 = 0,94)$	$\hat{y} = 5,59$
	raiz	$\hat{y} = 2,66$	$\hat{y} = 1,23$
S	folha	$\hat{y} = 3,53$	$\hat{y} = 2,72 + 0,01*x (R^2 = 0,64)$
	caule	$\hat{y} = 2,49$	$\hat{y} = 1,91$
	raiz	$\hat{y} = 2,56$	$\hat{y} = 2,22$
Mn	folha	$\hat{y} = 1,78$	$\hat{y} = 1,29$
	caule	$\hat{y} = 0,47$	$\hat{y} = 0,62$
	raiz	$\hat{y} = 0,14$	$\hat{y} = 0,63$
Fe	folha	$\hat{y} = 73,15$	$\hat{y} = 71,94$
	caule	$\hat{y} = 39,80$	$\hat{y} = 44,19$
	raiz	$\hat{y} = 277,50$	$\hat{y} = 170,44 + 1,40*x (R^2 = 0,76)$
Zn	folha	$\hat{y} = 49,00$	$\hat{y} = 44,77 + 0,60*x - 0,006*x^2 (R^2 = 0,99)$
	caule	$\hat{y} = 76,85$	$\hat{y} = 68,83$
	raiz	$\hat{y} = 28,46$	$\hat{y} = 37,37 - 0,57*x + 0,006x^2 (R^2 = 0,93)$
Cu	folha	$\hat{y} = 3,56 + 0,08*x - 0,001*x^2 (R^2 = 0,94)$	$\hat{y} = 4,69 + 0,01*x$
	caule	$\hat{y} = 6,85$	$\hat{y} = 5,72$
	raiz	$\hat{y} = 7,93$	$\hat{y} = 7,41$

4.5. Expressão gênica

A progênie originária do cruzamento entre 'Catongo' x 'Catongo' apresentou maior expressão de genes associado à biossíntese de peroxidases (*PER-1*) em folhas (Figura 9A), ao passo que para a progênie CCN-10 x SCA-6 a maior expressão de genes foi verificada em raízes (Figura 9B). Verificaram-se, também, diferenças intraprogênie, com o aumento das doses de Al^{3+} aplicada via seminal, para a expressão do gene *PER-1* (Figura 9A e B) em folhas e raízes de ambas as progênies de *T. cacao* avaliadas. Houve incremento significativo ($p < 0,05$) na expressão de *PER-1* em folhas de 'Catongo' x 'Catongo' apenas na dose correspondente a $30 \text{ mg } Al^{3+} \text{ L}^{-1}$, quando comparada ao controle, cujo aumento foi de 77%. Em contrapartida, para a

progênie CCN-10 x SCA-6, houve repressão significativa ($p < 0,05$) de *PER-1* em folhas na dose de $60 \text{ mg Al}^{3+} \text{ L}^{-1}$, cujo valor foi 70% em relação ao controle (Figura 9A). Por outro lado, não se observou expressão do gene *PER-1* no sistema radicular de ambas as progênies avaliadas, nas doses 30 e $60 \text{ mg Al}^{3+} \text{ L}^{-1}$, em comparação ao controle (Figura 9B).

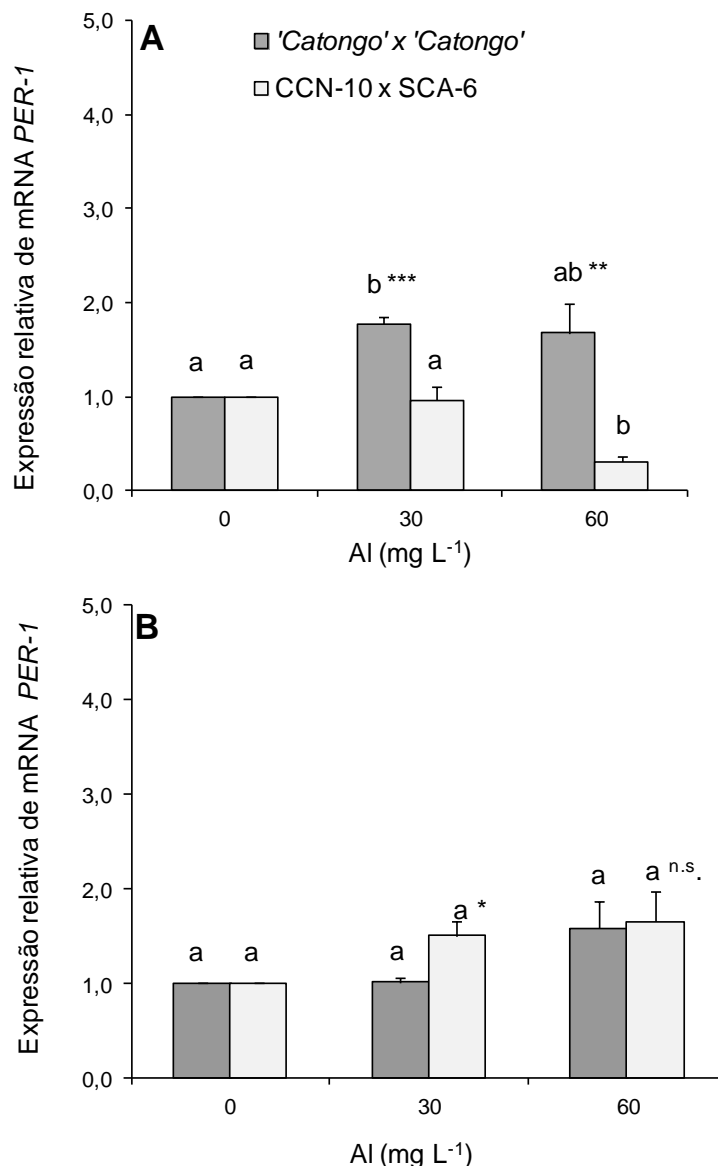


Figura 9. Expressão relativa do gene *PER-1* em folhas (A) e raízes (B) de plântulas de progênies de *T. cacao* submetidas a doses crescentes de Al^{3+} , aplicadas via seminal, 60 dias após a germinação. A significância estatística interprogênies foi obtida pelo *t*-test. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (ns) não significativo. Médias intraprogênies seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Valores médios de seis repetições (\pm EP).

A progênie originária do cruzamento entre CCN-10 x SCA-6 apresentou maior expressão de genes associados à biossíntese da dismutase do superóxido citoplasmática (*SODcyt*) em folhas (Figura 10A), ao passo que para a progênie 'Catongo' x 'Catongo' a maior expressão de genes foi verificada em raízes (Figura 10B). Observaram-se, também, diferenças intraprogênies, com o

aumento das doses de Al^{3+} aplicada via seminal, para a expressão do gene *SODcyt* (Figura 10A e B) em folhas e raízes das plântulas de ambas as progênies de *T. cacao* avaliadas. Houve incremento significativo ($p < 0,05$) na expressão de *SODcyt*, observado em folhas de plântulas de CCN-10 x SCA-6, quando comparado ao controle, com aumento de aproximadamente 6 e 13 vezes para as doses 30 e 60 $mg Al^{3+} L^{-1}$, respectivamente. Em contrapartida, em folhas da progênie 'Catongo' x 'Catongo', não houve incremento significativo na expressão de genes nas doses 30 e 60 $mg Al^{3+} L^{-1}$ (Figura 10A). Por outro lado, analisando-se o sistema radicular, houve incremento significativo ($p < 0,05$) na expressão de *SODcyt* para a progênie 'Catongo' x 'Catongo', apenas na dose correspondente a 30 $mg Al^{3+} L^{-1}$, cujo aumento foi de aproximadamente 5 vezes, quando comparado ao controle. Além disso, para a progênie CCN-10 x SCA-6, não foi verificado aumento significativo na expressão de *SODcyt* nas doses 30 e 60 $mg Al^{3+} L^{-1}$, em relação ao controle (Figura 10B).

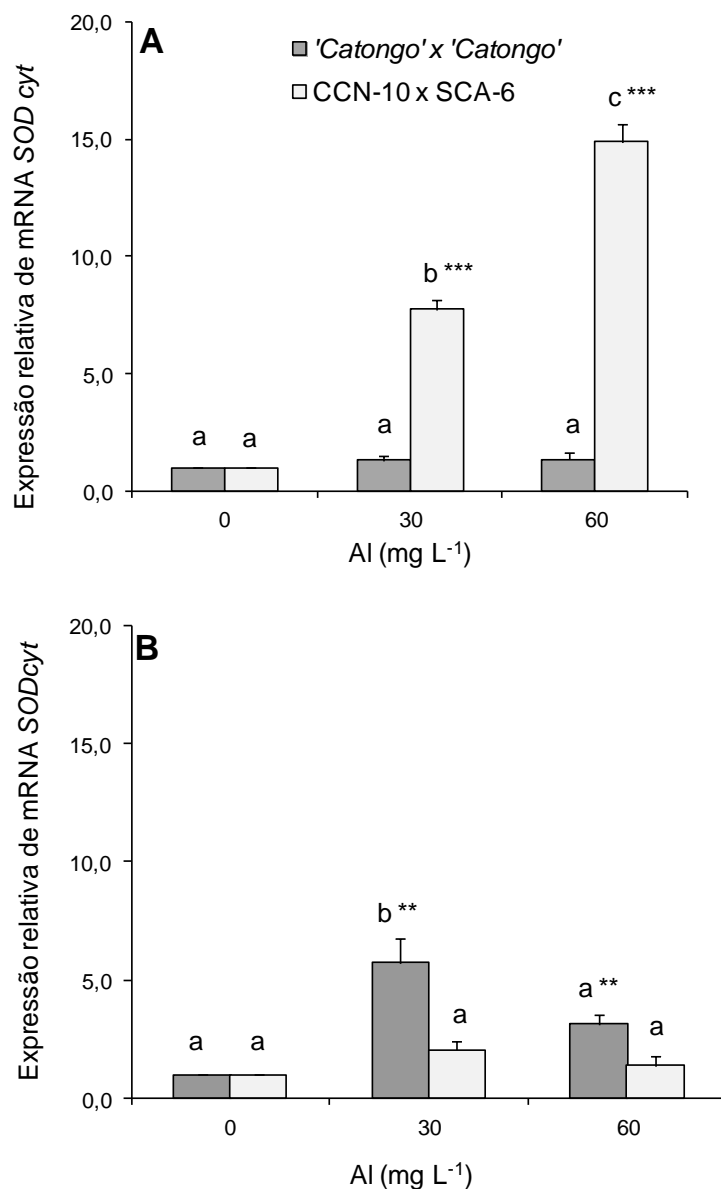


Figura 10. Expressão relativa do gene SOD_{Cyt} em folhas (A) e raízes (B) de plântulas de progênies de *T. cacao* submetidas a doses crescentes de Al^{3+} , aplicadas via seminal, 60 dias após a germinação. A significância estatística interprogênies foi obtida pelo *t*-test. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (ns) não significativo. Médias intraprogênies seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Valores médios de seis repetições (\pm EP).

5. DISCUSSÃO

5.1. Peroxidases do guaiacol (PODs)

Quando o Al^{3+} entra em contato com as células vegetais, promove o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Para evitar o acúmulo excessivo desses radicais livres, as plantas utilizam seu sistema de defesa antioxidante, envolvendo diversas enzimas antioxidativas. A capacidade da planta de tolerar o estresse oxidativo causado por Al^{3+} , é resultado da operação sincronizada de sistemas enzimáticos e não-enzimáticos. As PODs catalizam a decomposição de H_2O_2 em H_2O e O_2 (APEL e HIRT, 2004; MITTLER *et al.*, 2004; GILL e TUTEJA, 2010). O papel das EROs, incluindo H_2O_2 , tem sido bem documentado em células vegetais. EROs estão envolvidas na transdução de sinal, morte celular programada, estresse por ferimento, reações de defesa, metabolismo celular e estresse oxidativo (DAT *et al.*, 2000, MINIBAYEVA *et al.*, 2001, NEILL *et al.*, 2002).

O fator que determina o estresse oxidativo é a velocidade com que as plantas ativam suas reservas antioxidantes (RANIERE *et al.*, 1993). Assim, o Al^{3+} pode induzir estresse oxidativo em plantas, quando os níveis de acumulação de EROs excederem a capacidade de detoxificação pelo sistema antioxidante ou quando há inibição de enzimas que promovem a detoxificação de EROs. Diversos autores relataram o aumento da atividade de PODs em folhas e raízes de diferentes espécies vegetais na presença de Al^{3+} (MA *et al.*, 2012; ALI *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2012.; LI *et al.*, 2011; SUJKOWSKA-RYBKOWSKA, 2012; SIMONOVICOVÁ, 2004; BOSCOLO, *et al.*, 2003; KOVÁČIK, 2010, TAMÁS, *et al.*, 2002). O mesmo fato foi observado neste trabalho, cuja atividade de PODs aumentou significativamente ($p < 0,05$) sob estresse por Al^{3+} aplicado via seminal (Figura 2A e B), indicando sua capacidade para destoxificar o H_2O_2 . Os resultados indicaram que ambas as progênies de *T. cacao* ativaram vias enzimáticas para aliviar ou evitar o estresse oxidativo provocado pelo excesso de H_2O_2 . Entretanto, a progênie CCN-10 x SCA-6 apresentou maior capacidade de destoxificar o H_2O_2 no sistema radicular em relação ao 'Catongo' x 'Catongo'. Os resultados

apresentados no presente trabalho corroboram com os observados por Kováčik (2010) ao estudar a espécie *Matricaria chamomilla* cultivada em solução nutritiva, cuja maior atividade de PODs se verificou no sistema radicular de cultivares mais tolerantes em resposta ao Al^{3+} . Esse fato é atribuído à existência de um mecanismo enzimático de eliminação de radicais livres mais eficientes na cultivar tolerante do que na cultivar intolerante. Em contrapartida, Xu *et al.* (2012) e Tamás *et al.* (2002) observaram maior atividade de PODs no sistema radicular para o genótipo mais intolerante de *Triticum aestivum* e *Zea mays*, respectivamente. Peixoto (1999), trabalhando com duas cultivares de *Sorghum bicolor* submetidas a dois tratamentos de Al^{3+} em solução nutritiva, também relatou maior atividade de PODs no sistema radicular da cultivar intolerante, embora se observou também um aumento na atividade de PODs na parte aérea, entretanto em menor intensidade do que no sistema radicular. Estes resultados sugerem que a atividade de PODs depende não apenas da espécie vegetal e fase de desenvolvimento (SIEGEL, 1993), mas também do grau de toxicidade, que é geralmente mais elevado no sistema radicular (PEIXOTO, 1999), como foi verificado no presente trabalho. Embora a atividade de PODs em plântulas de *T. cacao* pode desempenhar um papel importante na proteção dos tecidos radiculares e foliares contra EROs, sob estresse de Al^{3+} , este não seria o único mecanismo de proteção contra esse tipo de estresse (LI *et al.*, 2011).

5.2. Análises anatômicas

Análises morfológicas revelaram que os tecidos do mesofilo foliar de plântulas de 'Catongo' x 'Catongo' e de CCN-10 x SCA-6, submetidas a diversas concentrações de Al^{3+} aplicada via seminal, apresentaram apenas diferenças interprogênes significativas ($p < 0,05$). Em contrapartida, alguns estudos têm mostrado que o tratamento de Al^{3+} promove o aumento da espessura da epiderme foliar nas faces adaxial (Ead) e abaxial (Eab) (GOMES *et al.*, 2011) e redução no tamanho das células do mesofilo (M) foliar (McQUATTIE e SCHIER, 1993; MALATHI *et al.*, 2001). O colapso das células dos parênquimas paliçádico (PP) e lacunoso (PL), com intensa vacuolização,

em resposta a metais tóxicos, também foi observado por Srighar *et al.* (2005) e Zhao *et al.* (2000).

No presente trabalho, a diferença interprogênie se deveu ao maior espessamento de Ead, PP e PL e de M para CCN-10 x SCA-6. Este maior espessamento, observado na progênie de *T. cacao* mais tolerante, deve-se ao fato de algumas espécies desenvolverem alterações morfológicas e anatômicas nos tecidos do mesofilo foliar, possibilitando uma ampla plasticidade fenotípica a diferentes condições de estresse (SRIGHAR *et al.*, 2005). A maior plasticidade fenotípica foliar de CCN-10 x SCA-6, considerado altamente heterozigoto, em relação ao 'Catongo' x 'Catongo', desempenhou um papel importante no seu processo de aclimação às condições de toxidez de Al^{3+} aplicado via seminal, já que cada uma das progênies apresenta características distintas. A maior compactação dos tecidos foliares observado em 'Catongo' x 'Catongo' pode acarretar em diminuição da capacidade fotossintética na presença de Al^{3+} , como já foi relatado por outros autores trabalhando com cádmio (CHUGH e SAWHNEY, 1999; DI CAGNO *et al.*, 1999). As espécies vegetais podem responder diferentemente quanto às modificações estruturais em nível foliar e são descritas como específicas para cada metal (SHI e CAIA, 2009).

5.3. Análises ultraestruturais

Os efeitos do excesso de Al^{3+} no sistema radicular já foram investigados em diferentes espécies vegetais. Porém, poucos trabalhos tratam de alterações ultraestruturais em nível foliar em plantas submetidas ao tratamento com Al^{3+} (MOUSTAKAS *et al.*, 1996, 1997; KONARSKA, 2010; LI e XING, 2011), devido a baixa mobilidade do metal para a parte aérea. No presente trabalho, a ruptura da membrana nuclear observada nas células do mesofilo foliar de ambas as progênies (Figuras 3D e 4D) e a ruptura da membrana plasmática das células do parênquima cortical da raiz de 'Catongo' x 'Catongo' (Figura 5F), estão relacionadas ao aumento da produção de EROs em resposta ao estresse oxidativo promovido pelo excesso de Al^{3+} nos tecidos. Vários estudos têm relatado que o aumento da produção de EROs acarreta, principalmente, na oxidação de biomoléculas, como lipídios e proteínas, componentes da

membrana plasmática, resultando na alteração de sua fluidez e permeabilidade e aumentando sua susceptibilidade à peroxidação (YAMAMOTO *et al.*, 2001). Depósitos de materiais eletrodensos na parede das células do parênquima do xilema de 'Catongo' x 'Catongo' e CCN-10 x SCA-6, respectivamente (Figura 5G e 6F); e também nas células da endoderme de ambas as progênies avaliadas (Figuras 5J e 6G), corroboram com os relatos de Konarska (2008), trabalhando com *Capsicum annuum*, que também verificou depósitos de material eletrodense em paredes de células do vacúolo. Nesta espécie, segundo este autor, os vacúolos apresentaram-se pequenos e numerosos, a exemplo do que foi verificado no presente trabalho (Figura 5I).

5.4. Macro e micronutrientes minerais

A espécie *T. cacao* é cultivada em uma grande variedade de tipos de solos, e a maioria desses solos são lixiviados, ácidos e inférteis. A toxicidade de Al^{3+} e as deficiências de macro e micronutrientes são limitantes na produção de cacaueiros cultivados em solos ácidos (WOOD e LASS, 2001). Os efeitos de Al^{3+} na nutrição mineral de plantas dependem, além das condições experimentais, da cultura e dos nutrientes envolvidos no estudo. Em trabalho de revisão, Foy (1974) afirmou que muitos pesquisadores associam a toxicidade de Al^{3+} com a diminuição na absorção de vários nutrientes minerais, principalmente P, Ca e Mg. Entretanto, não se sabe exatamente se estes efeitos estão intimamente associados ao mecanismo de toxicidade propriamente dito, ou se é consequência de um distúrbio anterior ocorrido em nível celular. Além disso, a maioria dos trabalhos que associam a toxicidade de Al^{3+} com a redução da absorção de nutrientes minerais, foi investigado em diversas espécies cultivadas em solução nutritiva (RIBEIRO, 2011; GIANNAKOULA *et al.*, 2008; MACEDO e JAN, 2008), onde os nutrientes estão totalmente disponíveis para as plantas.

No presente trabalho com *T. cacao*, a aplicação de Al^{3+} via seminal, mostrou respostas diferenciais em relação a outras espécies cultivadas em condições de solução nutritiva. A deformação das células da endoderme do tecido cortical da raiz, provocada pela toxidez de Al^{3+} , promoveu um aumento desequilibrado na absorção de nutrientes minerais em folhas, caules e raízes

para 'Catongo' x 'Catongo' e CCN-10 x SCA-6 (Figura 7A – J) e (Figura 8A – H), respectivamente. A endoderme funciona como uma barreira seletiva ao transporte via apoplasto, devido a presença das estrias de *Casparry* impregnada com lignina, uma substância cerosa e hidrofóbica (TAIZ e ZEIGER, 2006; HODSON and WILKINS, 1991; VAN FLEET, 1961). A deformação das células da endoderme do sistema radicular, em nível ultraestrutural, de ambas as progênies de *T. cacao* (Figuras 5J e 6G), acarretou em aumento significativo da absorção e translocação de nutrientes minerais da raiz para parte aérea, devido a perda da seletividade da endoderme, interferindo na seletividade iônica. Além disso, o rompimento da membrana plasmática (Figura 5F) das células do parênquima cortical, em resposta ao estresse oxidativo, observado em 'Catongo' x 'Catongo', também pode ter facilitado o aumento da absorção e translocação de nutrientes minerais da raiz para a parte aérea. Pois, para que o Al^{3+} possa romper a barreira endodérmica e ser translocado para parte aérea, necessita atravessar a membrana plasmática, via simplástica ou transmembrana (TAIZ e ZEIGER, 2006; HODSON and WILKINS, 1991; VAN FLEET, 1961). Logo, a ruptura da membrana plasmática facilitou a translocação desses nutrientes minerais para a parte aérea.

5.5. Expressão gênica

Estudos genéticos sobre tolerância ao Al^{3+} têm demonstrado que este metal induz a expressão de genes envolvidos em respostas ao estresse oxidativo, codificando enzimas responsáveis pela destoxificação de EROs (SNOWDEN e GARDNER, 1993). 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 (GILL e TUTEJA, 2010). Neste estudo, o Al^{3+} induziu o aumento da expressão relativa dos genes *PER-1* e *SODcyt* (Figuras 9 e 10), também envolvidos nas respostas ao estresse oxidativo. As *PERs-1* estão envolvidas na biossíntese de lignina e na defesa da planta contra o estresse oxidativo (GILL e TUTEJA, 2010; ASADA, 1999), enquanto as *SODcyt* constituem a primeira linha de defesa contra EROS nas células (MITTLER *et al.*, 2011). O aumento na expressão desses genes em folhas e raízes de *T.*

cacao foi um mecanismo de defesa da espécie em resposta ao estresse oxidativo promovido por Al^{3+} (SNOWDEN e GARDNER, 1993). Esses genes serão uma ferramenta valiosa para a melhor compreensão da tolerância ao Al^{3+} em *T. cacao*.

Os mecanismos de proteção contra EROs têm sido desenvolvidos pelas plantas como um processo evolutivo para controlar os níveis dessas moléculas e anular a sua toxicidade (LOGAN *et al.*, 2006). O aumento da expressão de genes que codificam para enzimas antioxidativas, em resposta ao Al^{3+} tóxico, tem sido descrito em diversas espécies vegetais (SNOWDEN e GARDNER, 1993; RICHARDS *et al.*, 1998; EZAKI, *et al.*, 2000; PANDA e MATSUMOTO, 2010), embora muito pouco se sabe a respeito desses genes relacionados a espécie *T. cacao*. Richards *et al.* (1998) relataram que Al^{3+} induz a expressão de genes (*PODs* e *SODcyt*) relacionados ao estresse oxidativo em *Arabidopsis thaliana*, evidenciando que o estresse causado por este metal está intimamente relacionada ao estresse oxidativo. No presente trabalho, a análise da expressão dos genes *PER-1* e *SODcyt*, em nível de transcrição, mostraram que os sistemas de defesa antioxidantes e a tolerância ao estresse abiótico em *T. cacao* foram estimuladas pelo excesso de Al^{3+} aplicado via seminal. O incremento da atividade de *PODs*, verificado em folhas de 'Catongo' x 'Catongo' (Figura 2A) e em raízes de CCN-10 x SCA-6 (Figura 2B), pode ser atribuído ao aumento da expressão relativa do gene *PER-1* (Figura 9A e B). Este gene codifica para a biossíntese de *PODs*, responsáveis pela degradação de H_2O_2 em H_2O e O_2 , que, por sua vez, contribui para a redução de EROs e, conseqüentemente, aliviando o estresse oxidativo provocado pelo Al^{3+} tóxico. Embora tenha sido detectado aumento da expressão do gene *PER-1* apenas na dose $30\text{ mg }Al^{3+}\text{ L}^{-1}$ em folhas de 'Catongo' x 'Catongo' (Figura 9A), aos 60 dias após a germinação, o aumento da atividade de *PODs* pode ter sido decorrente de expressão deste gene em épocas anteriores ao período de coleta de material vegetal.

A atividade de *PODs* ocorre principalmente na parede celular, onde estas enzimas podem estar associadas à modulação de sua rigidez e extensibilidade (WELINGER, 1992; MOHANTY, *et al.*, 2004; MA, *et al.*, 2004), reduzindo assim a taxa de difusão de Al^{3+} através da parede celular (HAMEL *et al.*, 1998). Em adição, em folhas da progênie CCN-10 x SCA-6 foi verificado um aumento

no expressão do gene *SODcyt* (Figura 10A), de, aproximadamente, 6 e 13 vezes em relação ao controle, nas doses 30 e 60 mg Al³⁺ L⁻¹, respectivamente. Estes resultados demonstram que o aumento na expressão deste gene, induzido por Al³⁺, contribui para a manutenção da atividade de enzimas do estresse oxidativo, conferindo tolerância ao metal (EZAKI *et al.*, 2000). O aumento na expressão de *SODcyt*, além de fazer parte do metabolismo enzimático antioxidativo, contribui com a sobrevivência das plantas sob condições de estresse abiótico (GILL e TUTEJA, 2010). Entretanto, em raízes de 'Catongo' x 'Catongo', não foi mantida o aumento da expressão do gene *SODcyt* com o incremento das doses de Al³⁺ via seminal (Figura 10B). Houve aumento na expressão do gene apenas na dose correspondente a 30 mg Al³⁺ L⁻¹, cujo incremento foi 5 vezes em relação ao controle, reduzindo, logo a seguida, em 2 vezes na dose 60 mg Al³⁺ L⁻¹. Logo, o 'Catongo' x 'Catongo' não foi capaz de manter o incremento na expressão do gene na dose 60 mg Al³⁺ L⁻¹, conferindo intolerância deste genótipo ao Al³⁺ tóxico.

6. CONCLUSÕES

A atividade de peroxidases do guaiacol em folhas e raízes de plântulas de *T. cacao*, obtidas a partir da germinação de sementes imersas por 24 h em soluções contendo Al^{3+} tóxico, desempenhou um papel importante na proteção dos tecidos foliares e radiculares contra o aumento excessivo das espécies reativas de oxigênio promovido por Al^{3+} .

O aumento das doses de Al^{3+} não alterou a espessura do mesófilo foliar de ambas as progênies avaliadas, devido à baixa mobilidade do metal para a parte aérea. A progênie CCN-10 x SCA-6 apresentou maior plasticidade fenotípica foliar em relação ao 'Catongo' x 'Catongo', que lhe conferiu tolerância às condições de toxidez de Al^{3+} .

O incremento das doses de Al^{3+} via seminal promoveu maiores alterações ultraestruturais nos tecidos radiculares, principalmente para a progênie 'Catongo' x 'Catongo'. As mudanças ultraestruturais, em nível radicular, promoveram aumento na absorção e translocação desequilibrada de nutrientes minerais da raiz para parte aérea, em função do rompimento de membranas celulares e de modificações na endoderme, interferindo na seletividade iônica.

O aumento da expressão de *SOD_{cyt}* correlaciona-se com a tolerância de CCN-10 x SCA-6 ao incremento do estresse oxidativo promovido pelo Al^{3+} tóxico. Embora tenha sido detectado aumento da expressão do gene *PER-1* apenas na dose $30 \text{ mg Al}^{3+} \text{ L}^{-1}$ em folhas de 'Catongo' x 'Catongo', aos 60 dias após a germinação das sementes, o aumento da atividade de PODs, enzimas codificadas por este gene, pode ter sido decorrente da expressão deste gene em épocas anteriores ao período de coleta de material vegetal para análise.

Plântulas oriundas do cruzamento entre CCN-10 x SCA-6 mostraram-se mais tolerantes ao Al^{3+} tóxico em relação às do cruzamento entre 'Catongo' x 'Catongo', quando obtidas a partir da germinação de sementes imersas por 24 h em soluções contendo Al^{3+} tóxico.

7. REFERÊNCIAS

- ALI, B.; HASAN, S.A.; HAYAT, S.; HAYAT, Q.; YADAV, S.; FARIDUDDIN, Q.; AHMAD, A. A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminium stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). **Environmental and Experimental Botany**, v.62, p.153-159, 2008.
- ALMEIDA, A-A. F.; VALLE, R. R. Ecophysiology of the cacao tree. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 4, p. 425-448, 2007.
- ALVERSON, W.S.; WHITLOCK, B.A.; NYFFELER, R.; BAYER, C.; BAUM, D.A. Phylogeny of the core Malvales: evidence from *ndhF* sequence data. **American Journal of Botany**, v. 86, p.1474-1486, 1999.
- ANTUNES, A.M.G.; NUNES, M.A. Effects of aluminum on nutrients solution pH and nitrate/ammonium uptake by triticale. **Journal of Plant Nutrition**, v. 20, p. 1391-1401, 1997.
- APEL, K. and HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- APG II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.141, p. 399-436, 2003.
- ARRUDA, M.A.Z. AND AZEVEDO, R.A. Metallomics and chemical speciation: towards a better understanding of metal-induced stress in plants. **Annals of Applied Biology**, v.155, p. 301-307, 2009.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, 601–639, 1999.
- BALIGAR, V.C. and FAGERIA, N.K. Nutrient use efficiency in acid soils: Nutrient management and plant use efficiency. In Plant Soil Interactions at low pH, Ed. AC Monez *et al.*, p. 75-95, **Brazilian Soil Science Society**, Campinas, Brazil, 1997.
- BARTLEY, B.G.D. The Genetic Diversity of Cacao and Its Utilization. **CABI Publishing**. Wallingford, UK. 341p, 2005.
- BEN, J. R.; MORELLI, M.; ESTEFANEL, E. Influência da calagem na toxidez de alumínio para plantas de cevada. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 177-189, 1976.
- BHUJA, P., MCLACHLAN, K., STEPHENS, J., TAYLOR, G. Accumulation of 1,3- β -D-glucans, in response to aluminum and cytosolic calcium in *Triticum aestivum*. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 5, p. 543–549, 2004.

BONATO, C.M.; RUBIN FILHO, C.J.; MELGES, E.; SANTOS, V.D. **Nutrição Mineral de Plantas**. Universidade Estadual de Maringá. Maringá (PR), 1998.

BOSCOLO, P.R.S.; MENOSSI, M.; JORGE, R.A. Aluminum induced oxidative stress in maize. **Phytochemistry**, v. 62, p. 181–189, 2003.

CABALA-ROSAND, P. and SANTANA, C. J. L. Simpósio sobre acidez e calagem. Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo. Campinas, SP, Brazil, v. 25, p. 321-345, 1983.

CANÇADO, G.M.A.; LOPES, M.A.; PAIVA, E. Genética e bioquímica da tolerância das plantas ao alumínio. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G., eds. Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/ DCS, 819p, 1999. CARVALHO, J.G., eds. Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/ DCS, 819p, 1999.

CHANG, Y. C.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Accumulation of aluminium in the cell wall pectin in cultured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells treated with a combination of aluminium and iron. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, n. 8, p. 1009–1017, 1999.

CHUGH, L. K.; SAWHNEY, S. K. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.37, n.4, p.297-303, 1999.

CODOGNOTTO, L.M.; SANTOS, D.M.M.; LEITE, I.C.; MARIN, A.; MADALENO, L.L.; KOBORI, N.N.; BANZATTO, D.A. Efeito do alumínio nos teores de clorofilas de plântulas de feijão-mungo e labe-labe. **Revista Ecosystema**, v. 27, n. 2, p. 27-39, 2002.

COLLET, L.; DE LEON, C.; KOLLMEIER, M.; SCHMOHL, N.; HORST, W.J. Assessment of aluminum sensitivity of maize cultivars using roots of intact plants and excised root tips. **Journal of Plant Nutrition**, v. 165, p. 357–65, 2002.

CORRALES, I.; POSCHENRIEDER, C.H.; BARCELO, J. Boron-induced amelioration of aluminium toxicity in a monocot and a dicot species. **Journal of Plant Physiology**, 165, 504–513, 2008.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVÁ, E.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN BRESUGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress response. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 779–795, 2000.

DELHAIZE, E.; CRAIG, S.; BEATON, C.D.; BENNET, A.J.; JAGADISH, V.C.; RANDAL, P.I. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Uptake and

distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiology**, v. 103, p. 315–321, 1993.

DI CAGNO, R.; GUIDE, L.; STEFANI, A.; SOLDATNI, C.F. Effects of cadmium on growth of *Helianthus annuus* seedlings: physiological aspects. **New Phytologist**, v.14, n.1, p.65-71, 1999.

ETICHA, D.; THÉ, C.; WELCKER, C.; NARRO, L.; STAB, A.; HORST, W.J. Aluminium-induced callose formation in root apices: inheritance and selection trait for adaptation of tropical maize to acid soils. **Field Crops Research**, v. 93, n. 2-3, pp. 252–263, 2005.

EZAKI, B.; GARDNER, R.C.; EZAKI, Y.; MATSUMOTO, H. Expression of Aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. **Plant Physiology**, v. 122, p. 657–665, 2000.

FAGERIA, N.K. and BALIGAR, V.C. Fertility management of tropical acid soils for sustainable crop production. In Handbook of Soil Acidity, Ed. Zdenko Rengel, p. 359-385, Marcel Dekker, New York, 2003.

FERREIRA, R.P.; MOREIRA, A.; RASSINI, J.B. Toxidez de alumínio em culturas anuais. **EMBRAPA**, 2006.

FIGUEIRA, F.; JANICK, J.; LEVY, M.; GOLDSBROUGH, P. Reexamining the classification of *Theobroma cacao* L. using Molecular Markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 119, n. 5, p. 1073–1082. 1994.

FOY, C. D. Effects of aluminum on plant growth. In: CARSON, E. W. Ed. **The plant root and its environment**. Charlottesville: University Press of Virginia, p. 601-642, 1974.

FOY, C.D. Physiological effects of hydrogen, aluminum, and manganese toxicities in acid soil. In: Adams F, editor. Soil acidity and liming. Agronomy monograph; n. 12, 2nd ed. ASA-CSSA-SSSA, Wis. p. 57–97, 1984.

FOY, C.D. Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 19, p. 959-987, 1988.

FOY, C.D.; CHANEY R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plant. **Annual Review of Plant Biology**, v. 29, p. 511–566, 1978.

FREITAS, F. A.; KOPP, M. M.; SOUSA, R. O.; ZIMMER, P. D.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C. Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 72-79, 2006.

GENG, M.; XU, M.; XIAO, H.; WANG, H.; HE, L.; ZHAO, Z.; YU, M. Protective role of mucilage against Al toxicity to root apex of pea (*Pisum sativum*). **Acta**

Physiologiae Plantarum, v. 34, n. 4, p. 1261 – 1266, 2011.

GIANNAKOULAS, A.; MOUSTAKAS, M.; SYROS, T.; YUPSANIS, T.; Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in a Al sensitive line. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, p. 487-494, 2010.

GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKAS, M.; MYLONA, P.; PAPADAKIS, I. TRAIANOS YUPSANIS, P. Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al accumulation. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 385-396, 2008.

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

GLORIA, B. A. and GUERREIRO, S. M. C. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: UFV, 438 p, 2006.

GOMES, M.P.; MARQUES, T.C.L.L.S.M.; NOGUEIRA, M.O.G.N.; CASTRO, E.M.; SOARES, A.M. Ecophysiological and anatomical changes due to uptake and accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*. **Scientia Agricola** (Piracicaba, Braz.), v. 68, n. 5, p. 566-573, 2011.

GRENNAN, A.K. Metallothioneins, a diverse protein family. **Plant Physiology**, v. 155, p. 1750–1751, 2011.

GRILL, E.; WINNACKER, E.L.; ZENK, M.H. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants are functionally analogous to metallothioneins. The Proceedings of the National Academy of Science USA, v.84, p.439–443, 1987.

GRILL, E.L.; WINNACKER, M.H.; ZENK, M.H. PCs: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. **Science**, v. 230, p. 674-676, 1985.

GUO, W.J.; MEETAM, M.; GOLDSBROUGH, P.B. Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. **Plant Physiology**, v. 146, p. 1697–1706, 2008.

HAMEL, F.; BRETON, C.; HOUDE, M. Isolation and characterization of wheat aluminum-regulated genes: possible involvement of aluminum as a pathogenesis response elicitor. **Planta**, v. 205, p. 531, 1998.

HAMPP, R. and SCHNABI, H. Effect of aluminium ions on CO₂ fixation and membrane system of isolated spinach chloroplasts. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 76, p. 300-306, 1975.

HAQ, F.; MAHONEY, M.; KOROPATNICK, J. Signalling events for metallothionein induction. *Mutat. Res.* 533, 211–226, 2003.

HARDY, F. Cacao Manual. Inter-American Institute of Agriculture Science, Turrialba, Costa Rica, 1960.

HARTWIG, I.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F.; BERTAN, I.; SILVA, J.A.G.; SCHMIDT, D.A.M.; VALÉRIO, I.P.; MAIA, L.C.; FONSECA, D.A.R.; REIS, C.E.S. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, n. 2, p. 219-228, 2007.

HEBBAR, P.; BITTENBENDER, H.C.; O'DOHERTY, D. Farm and forestry production and marketing profile for cacao (*Teobroma cacao*). In: Elevitch, C.R. (ed.). Specialty crops for Pacific Island agroforestry. **Permanent Agriculture Resources**, Holualoa, Hawai'i. <http://agroforestry.net/scFS>. 2011 (revised).

HODSON, M.J. and WILKINS, D.A. Localization of aluminium in the roots of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst) inoculated with *Paxillus involutus* Fr. **New Phytologist**, v. 118, p. 273 – 278, 1991.

HORST, W. J.; PUSCHEL, A. K.; SCHMOHL, N. Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminium sensitivity in maize, **Plant and Soil**, v. 192, n. 1, p. 23–30, 1997.

HORST, W.J.; ASHER, C.J.; CAKMAK, I.; SZULKIEWICZ, P.; WISSEMEIER, A.H. Short term response of soybean roots to aluminum. **Journal Plant Physiology**, v. 140, p. 174–8, 1992.

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

IJIMA, M.; HIGUCHI, T.; BARLOW, P.W. Contribution of root cap mucilage and presence of an intact root cap in maize (*Zea mays*) to the reduction of soil mechanical impedance. **Annals of Botany**, v. 94, p. 473–477, 2004.

INOUE, M. Phytoquelatins. Toxic metals in plants. **Journal Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 65-78, 2005.

JONES, D.L.; BLANCAFLOR, E.B.; KOCHIAN, L.V.; GILROY, S. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, n. 7, p. 1309–1318, 2006.

JONES, D.L.; KOCHIAN, L.V. Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role of aluminum toxicity. **Plant Cell**, Rockville, v.7, n.11, p.1913-1922, 1995.

KARIMI, N.; GHADERIAN, S.M.; RAAB, A.; FELDMANN, J.; MEHARG, A.A. An arsenic accumulating, hypertolerant brassica, *Isatis cappadocica*, **New Phytologist**, v.184, p.41–47, 2009.

KENNEDY, A.J. Cacao. In: Smartt J and Simmonds NW (eds). Evolution of Crop Plants. 2nd edition. Longman Scientific and Technical, London, pp 472-475, 1995.

KINRAIDE, T.B. Identity of the rhizotoxic aluminium species. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 134, p. 167-178, 1991.

KINRAIDE, T.B.; PARKER, D.R.; ZOBEL, R.W. Organic acid secretion as a mechanism of aluminium resistance: a model incorporating the root cortex, epidermis, and the external unstirred layer. **Journal of Experimental Botany**, v. 417, p. 1853–186, 2005.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Reviews Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 46, p. 237–260, 1995.

KOCHIAN, L.V.; PENCE, N.S.; LETHAM, D.L.D.; PINEROS, M.A.; MAGALHAES, J.V.; HOEKENGA, O.A.; GARVIN, D.F. Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. **Plant and Soil**, v. 247, p. 109–119, 2002.

KONARSKA, A. Changes in the ultrastructure of capsicum annuum l. seedlings roots under aluminum stress conditions. **Acta agrobotânica**, v. 61, n. 1, p. 27–32, 2008.

KONARSKA, A. Effects of aluminum on growth and structure of red pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, n. 1, p. 145–151, 2010.

KOPITTKE P. M.; MCKENNA, B. A.; BLAMEY, F. P. C.; WEHR J. B. ; MENZIES, N. W. Metal-induced cell rupture in elongating roots is associated with metal ion binding strengths. **Plant Soil**, v. 322, p. 303–315, 2009.

KOPITTKE, P.M.; ASHER, C.J.; KOPITTKE, R.A.; MENZIES, N.W. Toxic effects of Pb²⁺ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Environmental Pollution**, v. 150, p. 280–287, 2007.

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

LACHENAUD, P.; MOOLEEDHAR, V.; COUTURIER, C. Les cacaoyers spontanés de Guyane. Nouvelles prospections. **Plantations, Recherche, Développement**, v. 4, n. 1, p. 25-30, 1997.

LAMB, C. and DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 251-275, 1997.

- LOGAN, D.C. Plant mitochondrial dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1763, p. 430–441, 2006.
- LONDOÑO, M.E.A. and VALENCIA, A. G. Toxicidad de aluminio en plantas de café. **Cenicafé**, v. 34, p. 61-97, 1983.
- LI, Z. and XING, D. Mechanistic study of mitochondria-dependent programmed cell death induced by aluminium phytotoxicity using fluorescence techniques. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 1, p. 331–343, 2011.
- LIU, Q.; YANG, J.L.; HE, L.S.; LI, Y.Y.; ZHENG, S.J. Effect of aluminum on cell wall, plasma membrane, antioxidants and root elongation in triticale. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 1, p. 87–92, 2008.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDC T method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOCKWOOD, R. Who needs clothing? **INGENIC Newsletter**, v. 8, p. 2-5, 2003.
- LONDOÑO, M.E.A. and VALENCIA, A. G. Toxicidad de aluminio en plantas de café. **Cenicafé**, v. 34, p. 61-97, 1983.
- MA, B.; GAO, L.; ZHANG, H.; CUI, J.; SHEN, Z. Aluminum-induced oxidative stress and changes in antioxidant defenses in the roots of rice varieties differing in Al tolerance . **Plant Cell Rep**, v. 31, p. 687–696, 2012.
- MA, J. F. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 41, p. 383–390, 2001.
- MA, J.F.; RYAN, P.R; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **TRENDS in Plant Science**, v.6, n.6, 2001.
- MA, F.; SHEN, R.; NAGAO, S.; TANIMOTO, E. Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, p. 583-589, 2004.
- MACÊDO, C.E.C. and JAN, V.V.S. Effect of aluminum stress on mineral nutrition in rice cultivars differing in aluminum sensitivity. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 4, p.363–369, 2008.
- MACNAIR, M.R. The hyperaccumulation of metals by plants. **Advances in Botanical Research**, p.63–105, 2003.
- MALATHI, N.; SARETHY, I.P.; PALIWAL, K. Effect of aluminum on hydroponically grown *Acacia nilotica* seedlings. **Jouranl of Plant Biology**, v. 28, p. 105–109, 2001.

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

MARON, L.G.; KIRST, M.; MAO, C.; MILNER, M.J.; MENOSSI, M.; KOCHIAN, L.V. Transcriptional profiling of aluminum toxicity and tolerance responses in maize roots. **New Phytologist**, v. 179, p. 116–128, 2008.

MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **International Review of Cytology**, v. 200, p. 1–46, 2000.

MATSUMOTO, H.; HIRASAWA, F.; TORIKAI, H.; TAKAHASHI, E. Localization of absorbed aluminium in pea root and its binding to nucleic acid. **Plant, Cell and Physiology**, v. 17, p. 127–137, 1976a.

MAY, H.M. and NORDSTROM, D.K. Assessing the Solubilities and Reaction Kinetics of Aluminous Minerals in Soils. In: Ulrich B, Sumner M.E. (eds). Soil Acidity. Berlin, Germany: Springer Verlag, 125–148. 1991.

McQUATTIE, C.J.; SCHIER, G.A. Effect of ozone and aluminum on pitch pine (*Pinus rigida*) seedlings: needle ultrastructure. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 23, p. 1375–1387, 1993.

MENDONÇA, R. J.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M. A.; OLIVEIRA, J. A. Capacidade de cultivares de arroz de modificar o pH de soluções nutritivas na presença de alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 5, p. 447-452, 2005.

MERIGA, B.; REDDY, B.K.; RAO, K.R.; KISHOR, P.B.K. Aluminium induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 63–68, 2004.

MINIBAYEVA, F.V.; GORDON, L.K.; KOLESNIKOV, O.P.; CHASOV, A.V. Role of extracellular peroxidase in the superoxide production by wheat root cells. **Protoplasma**, v. 217, p. 125–128, 2001.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene net work of plants. **Trends in Plant Science**, n. 9, p. 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, p. 300-309, 2011.

MOHANTY, S.; DAS, A.B.; DAS, P.; MOHANTY, P. Effect of a low dose of aluminum on mitotic and meiotic activity, 4c DNA content, and pollen sterility in rice, *Oryza sativa* L. Cv. Lalat. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, p. 70–75, 2004.

MONTEIRO, W.R. and AHNERT, D. Melhoramento Genético do Cacaueiro. **Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro**. 688p, 2012.

MOUSTAKAS, M. and OUZOUNIDOU, G. Increases non-photochemical quenching in leaves of aluminum-stressed wheat plants is due to Al³⁺-induced elemental loss. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 32, p. 527-532, 1994.

MOUSTAKAS, M.; ELEFThERIOU, E.P.; OUZOUNIDOU, G. Short-term effects of aluminium at alkaline pH on the structure and function of the photosynthetic apparatus. **Photosynthetica**, v. 34, p. 169-177, 1997.

MOUSTAKAS, M.; OUZOUNIDOU, G.; ELEFThERIOU, E.P.; LANNOYE, R. Indirect effects of aluminium stress on the function of the photosynthetic apparatus. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 34, p. 553–560, 1996.

MUNNÉ-BOSCH, S.; JUBANY-MARÍ, T.; ALEGRE, L. Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts. **Plant, Cell and Environmental**, v. 24, p. 1319–1327, 2001.

NAKAYAMA, L.H.I.; PINTO, L.R.M.; SANTANA, C.J.L. The effect of lime application on the cultivation of cacao (*Theobroma cacao* L). Proceedings of the 10th International Cocoa Research Conference, Santo Domingo, Dominican Republic, p. 259-264, 1987.

NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R.D.; HANCOCK, J.T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1237–1247, 2002.

NOLLA, A.; SCHLINDWEIN, J.A.; ANGHINONI, I. Crescimento, morfologia radicular e liberação de compostos orgânicos por plântulas de soja em função da atividade de alumínio na solução do solo de campo natural. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n.1, p. 97-101, 2007.

NOSKO, P.; BRASSARD, P.; KRAMER, J.R; KERSHAW, K.A. The effect of aluminum on seed germination and early seedling establishment, growth and respiration of white spruce (*Picea glauca*). **Canadian Journal of Botany**, v. 66, p. 2305-2310, 1988.

PANDA, S.K. and MATSUMOTO, H. Changes in antioxidant gene expression and induction of oxidative stress in pea (*Pisum sativum* L.) under Al stress. **Biomaterials**, v. 23, p. 753–762, 2010.

PANDA, S.K. Molecular physiology of aluminum toxicity and tolerance in plants. **The Botanical Review**, v. 73, n. 4, p. 326-347, 2007.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.

PIMENTEL, R.R.; MACHADO, S.R.; ROCHA, J.F. Estruturas secretoras de *Pavonia alnifolia* (Malvaceae), uma espécie ameaçada de extinção. **Rodriguésia**, v. 62, n. 2, p. 253-262, 2011.

PIROVANI, C.P.; CARVALHO, H.A.S.; MACHADO, R.C.R.; GOMES, D.S.; ALVIM1, F.C.; POMELLA, A.W.V.; GRAMACHO, K.P.; CASCARDO, J.C.M.; PEREIRA, G.A.G.; MICHELI, F. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis**, 2008.

POLÉC-PAWLAK, K.; RUZIK, R.; ABRAMSKI, K.; CIURZYNSKA, M.; GAWRONSKA, H. Cadmium speciation in *Arabidopsis thaliana* as a strategy to study metal accumulation system in plants. **Analytica Chimica Acta**, v. 540, p. 61-70, 2005.

RANIERI, A. Gluthatione-ascorbic acid cycle in pumpkin plants grown under polluted air in open-top chambers. **Journal of Plant Physiology**, v.142, p.286-290, 1993.

RAO, I.M.; ZEIGER, R.S.; VERA, R.; SARKARUNG, S. Selection and breeding for acid-soil tolerance in crops. **Bioscience**, v.43, n.7, p.454-465, 1993.

RASCIOA N.; NAVARI-IZZO, F. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? Review. **Plant Science**, v. 180, p. 169–181, 2011.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7th ed. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2007

RENGEL, Z. and ZHANG, W.H. Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. **New Phytologist**, v. 159, p. 295–314, 2003.

RIBEIRO, M.A.Q.; ALMEIDA, A.A.F.; MIELKE, M.S.; GOMES, F.P.; PIRESA, M.V.; BALIGAR, V.C. Aluminum effects on growth, photosynthesis, and mineral nutrition of cacao genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, p. 2-28, 2011.

RICHARDS, K.D.; SCHOTT, E.J.; SHARMA, Y.K.; DAVIS, K.R.; GARDNER, R.C. Aluminum Induces Oxidative Stress Genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 116, p. 409–418, 1998.

ROBINSON, B.; KIM, N.; MARCHETTI, M.; MONI, C.; SCHROETER, L.; DIJSSEL, C.; MILNE, G.; CLOTHIER, B. Arsenic hyperaccumulation by aquatic macrophytes in the Taupo Volcanic Zone, New Zealand, **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 206–215, 2006.

SANTANA, C.J.L. and CABALA-ROSAND, P. Soil acidity and cacao response to lime application in South Bahia Brazil. Proceeding. 9th Intenational Cacao Research Conference, Lome Togo, p. 199-203, 1984.

SANTOS, F. S.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; MAZUR, N. **Nutrição Mineral de Plantas**. Fernandes, M. S., ed.; SBCS: Viçosa, cap. 16, 2006.

SCHMOHL, N. and HORST, W.J. Cell wall pectin content modulates aluminium sensitivity of *Zea mays* (L.) cells grown in suspension culture, **Plant, Cell and Environment**, v. 23, n. 7, p. 735–742, 2000.

SCHMOHL, N.; HORST, W.J. Effect of aluminium on the activity of apoplastic acid phosphatase and the exudation of macromolecules by roots and suspension-culture cells of *Zea mays* L. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, p. 1213-1218, 2002.

SHARMA, P.; DUBEY, R.S. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 2027-2038, 2007.

SHI, G.; CAIA, Q. Leaf plasticity in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in response to heavy metal stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.67, p.112-117, 2009.

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

SILVA, S.; CARNIDE, O.P.; LOPES, P.M.; MATOS, M.; PINTO, H. G.; SANTOS, C. Differential aluminium changes on nutrient accumulation and root differentiation in an Al sensitive vs. tolerant wheat. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, p. 91–98, 2010.

SILVA, S.; SANTOS, C.; MATOS, M.; CARNIDE, O.P. Al toxicity mechanisms in tolerant and sensitive rye genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, v. 75, p. 89–97, 2011.

SIMONOVICOVA, M.; HUTTOVA, J.; MISTRÍK, I.; SIROKA, B.; TAMAS, L. Root growth inhibition by aluminum is probably caused by cell death due to peroxidase-mediated hydrogen peroxide production. **Protoplasma**, v. 224, p. 91–98, 2004.

SIMONOVICOVÁ, M.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I.; SIROKÁ, B.; TAMÁS, L. Root growth inhibition by aluminum is probably caused by cell death due to peroxidase-mediated hydrogen peroxide production. **Protoplasma**, v. 224, p. 91–98, 2004.

SIVAGURU, M.; FUJIWARA, T.; SAMAJ, J.; BALUSKA, F.; YANG, Z.; OSAWA, I.; MAEDA, T.; MORI, T.; VOLKMANN, D.; MATSUMOTO, H. Aluminum induced 1,3- β -D-glucan inhibits cell to cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants, **Plant Physiology**, v. 124, n. 3, p. 991– 1005, 2000.

SIVAGURU, M.; HORST, W.J. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiology**, v. 116, p. 155–163, 1998.

SIVAGURU, M.; HORST, W.J.; ETICHA, D.; MATSUMOTO, H. Aluminum inhibits apoplastic flow of high-molecular weight solutes in root apices of *Zea mays* L. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 169, p. 679–690, 2006.

SMYTH, A.J. The selection of soils for cocoa. Soils Bull 5, Food and Agricultural Organization of the United Nation Rome, 1966.

SNOWDEN, K.C. and GARDNER, R.C. Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. **Plant Physiology**, v. 103, p. 855-861, 1993.

SOMASUNDARAM, S.; FUKUZONO, S.; IJIMA, M. Dynamics of root border cells in rhizosphere soil of *Zea mays* L. crushed cells during root penetration, survival in soil, and long term soil compaction effect. **Plant Production Science**, v. 11, p. 440–446, 2008.

SORIA, J.; TONOSAKI, S.; MORENO, J. A polinizacao do cacauero pela *Forcipomyia* ao vivo. **Cacau Atualidades**, v. 12, p. 14-18, 1975.

SORIA, J.N. Principal varieties of cocoa cultivated in tropical America. Cocoa Growers Bull, v. 19, p. 12-21, 1970.

SOUZA JUNIOR. 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.

SRIDHAR, B.B. M.; DIEHL, S.V.; HAN, F.X.; MONTS, D.L.; SU, Y. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). **Environmental and Experimental Botany**, v. 54, p. 131–141, 2005.

SUJKOWSKA-RYBKOWSKA, M. Reactive oxygen species production and antioxidative defense in pea (*Pisum sativum* L.) root nodules after short-term aluminum treatment. **Acta Physiologiae Plantarum**, 2012.

SUN, R.; ZHOU, Q.; JIN, C. Cadmium accumulation in relation to organic acids in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. **Plant Soil**, v. 285, n. 125–134, 2006.

TAIZ, L and ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719p. 2006.

TAMÁS, L.; HUTTOVÁ, J., MISTRÍK, I. Effect of aluminium on peroxidase activity in root of Al-sensitive and Al-resistant barley cultivars. **Rostlinná Výroba**, v. 48, n. 2, p. 76-79, 2002.

TAMÁS, L.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I.; SIMONOVICOVA, M.; SIROKA, B. Aluminum induced drought and oxidative stress in barley roots. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 781–784, 2006.

TAYLOR, G. J. The physiology of aluminum tolerance. **Metal ions in biological systems**, New York, v.24, p.165-198, 1988.

TAYLOR, G.J.; McDONALD-STEPHENS, J.L.; HUNTER, D.B.; BERTSCH, P.M.; ELMORE, D.; RENGEL, Z.; REID, R.J. Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara coralline*. **Plant Physiology**, v. 123, p. 987–996, 2000.

THORNTON, F.C.; SCHAEDELE, M.; RAYNAL, D.L. Effect of aluminum on the growth of sugar maple in solution culture. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 16, p. 892-896, 1986.

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, p. 1005-1024, 2000.

TOXOPEUS, H. Cocoa breeding; a consequence of mating system, heterosis and population structure. In: Conference on Cocoa and Coconuts in Malaysia, **Proceedings**. ISP, Kuala Lumpur, p. 3-12. 1972.

VAN FLEET, D.S. Histochemistry and function of the endodermis. **Botanical Review**, v. 27, p. 165–221, 1961.

VÁZQUEZ, M.D.; POSCHENRIEDER, C.; CORRALES, I.; BARCELÓ, J. Change in apoplastic Al during the initial growth response to Al by roots of a resistant maize variety. **Plant Physiology**, v. 119, p. 435–444, 1999.

VENKATACHALAM, P.; JAIN, A.; SAHI, S.; RAGHOTHAMA, K. Molecular cloning and characterization of phosphate (Pi) responsive genes in Gulf ryegrass (*Lolium multiflorum* L.): a Pi hyperaccumulator. **Plant Molecular Biology**, v. 69, p. 1–21, 2009.

VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. Recent advances in aluminium toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 129-143, 2005.

von UEXKÜLL, H.R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant Soil**, v. 171, p. 1–15, 1995.

WATANABE, T.; MISAWA, S.; HIRADATE, S.; OSAKI, M. Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminum accumulation. **New Phytologist**, v. 178, p. 581–589, 2008.

WELINGER, K.. Plant peroxidases: structure-function relationships. In: Penel, C.; Gaspar, T.H.; Greppin, H (eds). Plant peroxidases 1980-1990, topics and detailed literature on molecular, biochemical, and physiological aspects. University of Geneva, Switzerland, p. 1-24, 1992.

WOOD, G.A.R. and LASS, R.A. *Cocoa*. 4th Edition. Blackwell Science Oxford, UK, 620 p, 2001.

XU, F.J.; LI, G.; JIN, C.W.; LIU, W.J.; ZHANG, S.S.; ZHANG, Y.S. and LIN, X.Y. Aluminum-induced changes in reactive oxygen species accumulation, lipid peroxidation and antioxidant capacity in wheat root tips. **Biologia Plantarum**, v. 1, p. 89-96, 2012.

YADAV, S.K.; MOHANPURIA, P.; Responses of *Camellia sinensis* cultivars to Cu and Al stress. **Biologia Plantarum**, v. 53, p. 737-740, 2009.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; DEVI, S.R.; RIKIISHI, S.; MATSUMOTO, H. Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. **Plant Physiology**, v. 128, p. 63–72, 2002.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. **Plant Physiology**, v. 125, p. 199-208, 2001.

YANG, Z.M.; YANG, H.; WANG, J.; WANG, Y.S. Aluminum regulation of citrate metabolism for Al-induced citrate efflux in the roots of *Cassia tora* L. **Plant Science**, v. 166, p. 1589–1594, 2004.

ZENK, M.H. *Gene*. v. 179, p. 21–30, 1996.

ZHANG, Z.C.; CHEN, B.X.; QIU, B.S. Phytochelatin synthesis plays a similar role in shoots of the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii* as in non-resistant plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 1248–1255, 2010.

ZHAO, F.J.; LOMBI, E.; BREEDON, T.; MCGRATH, S.P. Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, p. 507–514, 2000.

ZHENG, K.; PAN, J.W.; YE, L.; FU, Y.; PENG, H.Z.; WAN, B.Y.; GU, Q.; BIAN, H.W.; HAN, N.; WANG, J.H.; KANG, B.; PAN, J.H.; SHAO, H.H.; WANG, W.Z.; ZHU, M.Y. Programmed cell death-involved aluminum toxicity in yeast alleviated by antiapoptotic members with decreased calcium signals. **Plant Physiology**, v. 143, p. 38-49, 2007.