

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



**Análises fisiológicas e moleculares de plantas jovens de cacau
crescidas em solo de tabuleiro costeiro compactado, com
localização de fósforo e com aplicação de paclobutrazol**

THAYSE FRANÇA TOSTO

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Março de 2019

THAYSE FRANÇA TOSTO

**Análises fisiológicas e moleculares de plantas jovens de cacau
crescidas em solo de tabuleiro costeiro compactado, com
localização de fósforo e com aplicação de paclobutrazol**

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

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

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

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Março de 2019

THAYSE FRANÇA TOSTO

**Análises fisiológicas e moleculares de plantas jovens de cacau
crescidas em solo de tabuleiro costeiro compactado, com
localização de fósforo e com aplicação de paclobutrazol**

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

Área de concentração: Genética e Biologia
Molecular

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

APROVADA: 28 de março de 2019

Dr. Milena Amaral dos Santos
(UESC)

Dr^a. Bruna Carmo Rehem
(IFBA)

Dr. Cláudio Antonio F. de Melo
(UESC)

Dr. Raúl René Melendez Valle
(CEPLAC/UESC)

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que me ensinaram o que eu aprendi: em especial aos meus pais Divinalva França Tosto e Maxwell Kleber Imbassahy Tosto, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões, amo vocês.

“Sou sempre eu mesma, mas com certeza não serei a mesma de sempre.”

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

Ao longo destes quatro anos, aprendi o conceito de uma equipe sem ao menos perceber sua existência.

Hoje sou grata a Deus pelo dom da vida, e por poder agradecer a um grupo de pessoas que direta ou indiretamente estiveram presentes na realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade concedida para a realização do Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa durante o curso.

Ao meu orientador Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida, pelos ensinamentos, orientação, palavras de incentivo, paciência, correções e oportunidade de realizar este trabalho.

Ao prof. Dr. Arlicélio de Queiroz Paiva, pela disponibilidade e orientação.

Aos técnicos, funcionários e professores do Centro de Biotecnologia e Genética (CBG); Horlei e Dona Jô obrigada por toda a ajuda e pela amizade.

As amigas CBGet's por tornarem o processo mais alegre e pelas amizades conquistadas – Luana amo você.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal, em especial a Natália Martins, que se tornou uma grande amiga, exemplo de força e superação.

Aos IC's que passaram pelo grupo, com eles tive a oportunidade de compartilhar ensinamentos, dentre eles Carlos Henrique, por abraçar este trabalho junto a mim.

A todos os funcionários da UESC que com um simples bom dia e um sorriso, deixavam meus dias melhores. Fabrícia e Mara sempre carinhosas e cuidadoras.

Aos meus amigos e familiares, pelo carinho e pela compreensão nos momentos de ausência.

E por fim, aos meus Enzo, Zulú e Marcos Antonio, obrigada pela família que construímos, o segredo da minha felicidade.

Sumário

RESUMO.....	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 <i>Theobroma cacao</i> L.	5
2.2 Estresse mecânico em plantas	7
2.3 Giberelinas	11
3. CAPÍTULO 1	14
Análise do perfil proteômico em raízes de plantas jovens de cacau crescidas em solo de tabuleiro costeiro compactado e com localização de fósforo.....	14
Resumo.....	14
3.1 Introdução	15
3.2 Material e Métodos	18
3.2.1 Material vegetal e condições de cultivo.....	18
3.2.2 Análise proteômica.....	21
3.2.2.1 Extração de proteínas	21
3.2.2.2 SDS-PAGE Bi-dimensional	21
3.2.2.3 Excisão dos spots e extração de peptídeos	22
3.2.2.4 Análise por espectrometria de massas (MS/MS)	23
3.2.2.5 Processamento e anotação das proteínas	23
3.3 Resultados.....	23
3.3.1 Perfil proteico de raízes de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas à compactação do solo e a localização de doses de P.....	23
3.3.2 Identificação e Classificação das proteínas em processos biológicos	27
3.4 Discussão	45

3.5 Conclusões	54
3.6 Referências.....	55
4. CAPÍTULO 2	63
Alterações morfofisiológicas, bioquímicas e moleculares de plantas jovens de cacau ao estresse mecânico por compactação do solo associado a doses de paclobutrazol	63
Resumo	63
4.1 Introdução	64
4.2 Material vegetal e condições de cultivo	66
4.2.1 Montagem do experimento.....	66
4.2.2 Trocas gasosas foliares	68
4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	68
4.2.4 Teor de Prolina.....	69
4.2.5 Metabolismo antioxidativo	70
4.2.6 Parâmetros Biométricos	73
4.2.7 Análise estatística	73
4.3 Resultados	74
4.3.1 Trocas gasosas foliares	74
4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	75
4.3.3 Teor de Prolina.....	76
4.3.4 Parâmetros Biométricos	77
4.3.5 Metabolismo Antioxidativo.....	78
4.4 Discussão	80
4.5 Conclusões	86
4.6 Referências.....	87
Legendas de Figuras.....	94
Lista de Tabelas	97

Lista de Figuras.....	100
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	109
6. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES.....	110

RESUMO

Tosto, Thayse França, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, março 2019. **Análises fisiológicas e moleculares de plantas jovens de cacau crescidas em solo de tabuleiro costeiro compactado, com localização de fósforo e com aplicação de paclobutrazol.** Orientador: Alex-Alan Furtado de Almeida.

Na região cacaueira da Bahia existem grandes áreas de solos de tabuleiros costeiros (TC), que normalmente não são utilizados para o cultivo de cacau em virtude de suas limitações químicas e físicas decorrentes da compactação. Nestes solos há restrições ao crescimento radicular e ao desenvolvimento da planta toda. Objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar as respostas morfofisiológicas, bioquímicas e moleculares de plantas jovens de *Theobroma cacao* crescidas em solo TC com diferentes níveis de compactação, localização de fósforo (P) e doses de paclobutrazol (PBZ). Foram realizados dois experimentos em condições de casa de vegetação, utilizando solo de TC, acondicionado em tubos de policloreto de polivinila (PVC) com 0,24 m de altura e 0,1 m de diâmetro interno, subdividido em três anéis com 0,08 m de altura conectados com fita adesiva. No experimento 1, o solo dos anéis superior e inferior tiveram densidade 1 kg dm^{-3} para todos os tratamentos, ao passo que o solo dos anéis intermediários tiveram diferentes densidades ($1,0$ e $1,7 \text{ kg dm}^{-3}$) e uma camada de caulim (0,01 m de espessura) entre o solo compactado e a parede do PVC, para inibir o crescimento radicular junto à parede do tubo. Além disso, o solo dos anéis inferiores no tratamento compactado ($1,7 \text{ kg dm}^{-3}$), receberam duas doses diferentes de P [baixa (200 mg dm^{-3}) e ideal (400 mg dm^{-3})]. No experimento 2, a montagem foi similar ao experimento 1, com exceção das densidades do solo e doses de P. Neste experimento, o solo dos anéis intermediários tiveram quatro densidades ($1,0$; $1,3$; $1,5$ e $1,7 \text{ kg dm}^{-3}$) e os anéis inferiores não receberam doses diferenciadas de P. Além disso, foram aplicados 100 mL de solução de PBZ em diferentes concentrações (0, 30, 60 e $90 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ PBZ no solo) nos tratamentos compactados, aos 60 dias após a emergência das plântulas. No experimento 1, foram avaliados o perfil proteico radicular em plantas jovens de *T. cacao*, genótipo CCN 51, submetidas a compactação do solo e a localização de P. No experimento 2, foram avaliados o crescimento, as trocas gasosas foliares, o teor de prolina, microscopia eletrônica de varredura, em nível foliar, e a atividade de enzimas do metabolismo antioxidativo em plantas jovens de *T. cacao* submetidas a compactação do solo e a doses de paclobutrazol (PBZ) no solo. No experimento 1, observamos um aumento na expressão das proteínas nas raízes crescidas no solo compactado, associada com a localização da dose ideal de P. A maior parte das proteínas, identificadas nos tratamentos de compactação do solo, pertenceu ao grupo de proteínas envolvidas no metabolismo de compostos orgânicos. As proteínas de maior expressão,

pertencentes a este grupo, estão relacionadas à degradação de reservas energéticas, durante o estresse mecânico provocado pela compactação do solo. Estas proteínas contribuem para a manutenção da produção de energia na forma de ATP, utilizada para o crescimento de raízes no solo compactado e com baixa disponibilidade de oxigênio. Estas alterações promovem a manutenção da homeostase celular e estimulam o crescimento do sistema radicular durante o processo de estresse. Como resultados do experimento 2, vimos que a aplicação de PBZ evitou danos nas trocas gasosas foliares, promoveu maior espessura total foliar, maior abertura transversal dos estômatos e maior teor de prolina. Em contrapartida, reduziu o número de folhas, a altura das plantas, a área foliar, a biomassa seca de folha, além de aumentar a biomassa seca de caule na maior densidade do solo utilizada 1,7 kg dm⁻³. Além disso, alterou o metabolismo das enzimas do sistema antioxidativo catalase, peroxidase do guaiacol e peroxidase do ascorbato, induzindo a expressão gênica, afim de responder às mudanças ambientais, e manter o equilíbrio entre a formação e a desintoxicação de ERO, resultando na melhor resposta das plantas ao estresse. Nossos resultados apontam para possíveis mecanismos de tolerância das plantas, promovidos pela aplicação do PBZ.

Palavras-chave: Tigmomorfogênese, fotossíntese, prolina, proteômica, latossolo amarelo coeso, antigiberélico.

1. INTRODUÇÃO

A natureza sésil das plantas faz com que as mesmas dependam do seu ambiente circundante (Chehab et al., 2009). Em condições de estresse abiótico pode haver limitações para o seu crescimento e desenvolvimento. Dentre os estresses abióticos podemos destacar o estresse mecânico por compactação do solo. Geralmente, para minimizar estes fatores estressores, são utilizadas várias práticas de manejo do solo, como a subsolagem e adubação fosfatada (Naido et al., 1978). Entretanto, estas práticas apresentam alto custo e podem inviabilizar economicamente o cultivo de espécies de interesse econômico.

A exemplo de espécies de grande importância econômica mundial, temos o *Theobroma cacao*, uma espécie lenhosa perene, cujas amêndoas de seus frutos são utilizadas para fabricação de chocolate, cosméticos, sorvetes, polpas, sucos, licor, dentre outros (Almeida e Valle, 2007). O cultivo de plantas de cacau em solos de tabuleiros costeiros (TC) é limitado pela coesão do solo, que compromete o crescimento e desenvolvimento das plantas. Este tipo de solo abrange grandes áreas da região cacaueira da Bahia, Brasil, caracterizados como Latossolo Amarelo Coeso.

Normalmente, os solos de TC possuem limitações físicas e químicas que comprometem o crescimento e desenvolvimento das plantas. As limitações físicas estão associadas à presença de horizontes coesos, em virtude da acomodação de colóides que migraram da superfície, provocando a obstrução dos macroporos e, como consequência, diminuindo a permeabilidade e a aeração do solo (Potocka et al., 2011; Aguiar Netto, Nacif, 1988). Além disso, observa-se, também, redução na profundidade efetiva do solo, prejudicando a dinâmica da água no seu perfil, impedindo o aprofundamento do sistema radicular e comprometendo o desenvolvimento da planta toda. Por outro lado, as limitações químicas, neste tipo de solo, estão relacionadas com a baixa capacidade de suprimento de nutrientes, o aumento da acidez com a profundidade, o caráter álico (alto teor de alumínio) e a baixa capacidade de retenção de água (Souza, 1996).

Baixas densidades no solo podem ser benéficas ao crescimento das raízes, já que estas dependem da interação de seu ápice com as partículas de solo, aumentando assim o seu contato com o solo para absorção de água e nutrientes. Por outro lado, altas densidades no solo limitam o crescimento de raízes nas camadas compactadas, em detrimento da redução da área de absorção de água e nutrientes e do suprimento de oxigênio (Alvarenga et al., 1996; Roselem et al., 1994).

Outro grande problema encontrado no cultivo de plantas em solos de TC está relacionado ao aproveitamento de fósforo (P). Estes solos possuem altas concentrações de alumínio trocável (Al^{3+}) que tem a capacidade de adsorver P, deixando-o indisponível para as plantas (Naido et al., 1978). O processo de aquisição de P tem sido mais extensivamente estudado, usando topologia entre os nutrientes minerais, avaliando como ocorre a sua aquisição através da raiz, e as adaptações na raiz para melhorar a sua aquisição no solo, devido sua relativa imobilidade (Wang et al., 2006). Sendo assim, os nutrientes presentes no solo, bem como a sua mobilidade, estão estreitamente relacionados com a morfofisiologia da raiz. Visto que, o sistema radicular da planta cresce em estreita coordenação com o crescimento da planta toda, cujas funções são reguladas pela ciclagem de nutrientes entre parte aérea e a raiz (Wang et al., 2006).

Plantas crescidas em solos compactados sofrem desequilíbrios no seu desempenho e na sua fisiologia, pois a compactação do solo, à semelhança do alagamento do solo, resulta, também, em hipoxia (baixa concentração de oxigênio) e/ou anoxia (“ausência” de oxigênio), que conseqüentemente, (i) danificam as raízes, em consequência da inibição da respiração celular aeróbica e ativação da respiração anaeróbica ou fermentação, reduzindo, assim, a produção de ATP; (ii) aumenta a produção de espécies reativas de oxigênios (Gill e Tujeta, 2010); (iii) promove o fechamento estomático e redução da atividade fotossintética em nível foliar; (iv) altera a produção de biomassa; (v) altera a expressão gênica, em virtude da síntese de proteínas anaeróbicas e (vi) promove o desenvolvimento de aerênquima e de lenticelas

hipertrofiadas; dentre outras alterações (Bertolde et al., 2014; Bertolde et al., 2009).

A redução da disponibilidade de O₂ no solo, devido a compactações, dentre outros fatores, influencia a sobrevivência, o crescimento e a produtividade das plantas, crescidas nestes ambientes (Pezeshki, 2001). Além do mais, interfere nas trocas gasosas foliares, ocasionando uma diminuição da condutância estomática e na taxa de fotossintética; na absorção de macro e micronutrientes minerais; no balanço hormonal (Lopez e Kursar, 2003; Kozlowski et al., 1999); na partição e translocação de fotoassimilados; na produção de biomassa (Pezeshki, 2001), e no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Bertolde et al., 2009).

O excesso de ERO pode levar a morte celular devido sua alta toxicidade (Gill e Tujeta, 2010). Para minimizar os efeitos deletérios de ROS, as plantas possuem um mecanismo antioxidativo enzimático e não enzimático. Dentre os mecanismos enzimáticos temos a atuação de enzimas importantes como a dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase do guaiacol (GPX), catalase (CAT), dentre outras (Mittler, 2002). No entanto, os mecanismos não enzimáticos, compreendem várias substâncias como o ácido ascórbico (vitamina C), a glutathione, a prolina, o α -tocoferol (vitamina E) e os flavonóides em sistemas de oxidorredução (Mittler et al., 2004).

A compactação de solos de TC promove o crescimento da parte aérea de *T. cacao*, em detrimento do alongamento de entrenós (Tosto, 2015), provavelmente em função da produção de giberelinas. As giberelinas são hormônios de crescimento que atuam regulando vários processos no crescimento e desenvolvimento das plantas (Olszewski et al., 2002, Yamaguchi, 2008). Estes hormônios têm sido relacionados à germinação e desenvolvimento de sementes, expansão foliar e floral, alongamento de caule (Yamaguchi, 2008) e crescimento de gemas laterais (Ni et al., 2015), dentre outros.

A via de metabolismo de ácidos giberélicos (GA) tem sido alvo de vários estudos em plantas. Já foi identificado um grande número de genes que

codificam as enzimas do metabolismo de ativação e desativação de GA (Hedden e Phillips, 2000). No entanto, sabe-se que alguns compostos, que regulam crescimento, têm a capacidade de desativar genes na via de biossíntese desses hormônios, a exemplo do paclobutrazol (PBZ).

Paclobutrazol é um regulador de crescimento que atua inibindo a biossíntese de GAs em plantas (Zhao et al., 2015). Em *Artocarpus altilis*, a aplicação de paclobutrazol foi capaz de reduzir o comprimento de entrenós (Zhou et al., 2016). Segundo estes autores, nem todos os genes testados responderam, de forma semelhante, às diferentes condições de estresses, alguns foram super expressos (up-regulation) sob condição de seca, mas regulados negativamente (down-regulation) sob estresse salino. Isso leva a uma reflexão de que diferentes mecanismos de regulação destes genes contribuem para a resposta ao crescimento. Valle e Almeida (1989), ao avaliarem os efeitos do PBZ nas características morfológicas de plantas jovens de *T. cacao*, observaram alterações na altura da planta, no diâmetro do caule, na área foliar, na biomassa seca, além de alterações na partição de fotoassimilados entre raiz e parte aérea. Entretanto, pouco se sabe sobre sua regulação e função no desenvolvimento de plantas jovens de *T. cacao* submetidas a compactação do solo.

A proteômica clássica inclui metodologias baseadas em técnicas de electroforese em gel bidimensional (2DE) e espectrometria de massas (MS) (Parker et al., 2006 Oeljeklaus et al., 2009). O método clássico possui algumas limitações, como sensibilidade, resolução, cobertura e velocidade de captura de dados (Han et al., 2006 e Oeljeklaus et al., 2009). Isto, por sua vez, evidencia a dificuldade de se trabalhar com a diversidade biológica de proteínas e sua gama de propriedades fisiológicas e bioquímicas. O sucesso da análise proteômica está relacionado ao desenvolvimento de programas computacionais capazes de analisar, armazenar e correlacionar uma grande quantidade de informações de sequências genômicas em banco de dados de mundo todo (Pandey e Mann, 2000).

Diante disso, nossa hipótese é de que plantas jovens de *T. cacao* submetidas ao estresse mecânico, pela compactação do solo, associada à

adubação localizada de P e a aplicação de paclobutrazol no solo, potencializa o crescimento do sistema radicular em detrimento da parte aérea, em função da alteração da razão fonte/dreno e da partição de fotoassimilados, favorecendo o aprofundamento das raízes no solo. O presente trabalho teve como objetivos principais avaliar o perfil proteômico e identificar as proteínas diferencialmente acumuladas (DEP) em raízes de plantas jovens de cacau, crescidas em solo de tabuleiro costeiro compactado e com localização de fósforo (P) e avaliar a fotossíntese, o crescimento, o teor de prolina e o metabolismo antioxidativo em plantas de *T. cacao*, do genótipo CCN 51 crescidas em solos de tabuleiro costeiro compactado e com aplicação de paclobutrazol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Theobroma cacao* L.

Theobroma cacao L. é uma espécie da família *Malvaceae*, nativa das Américas Central e do Sul, considerada a mais importante economicamente do gênero *Theobroma* (Risterucci et al., 2000; Solorzano et al., 2012). Originalmente, o cacau foi dividido em dois grupos genéticos, Crioulo e Forasteiro, baseados em suas características geográficas e morfológicas. Um terceiro grupo genético, Trinitário, foi obtido a partir do cruzamento dos dois primeiros (Cheesman, 1944). O melhoramento genético clássico do cacau buscou, através do cruzamento entre os diferentes grupos, aumentar a produtividade e resistência a doenças (Warren, 1992). Contudo, esse processo foi demorado devido ao longo ciclo de geração, e pelas limitações na disponibilidade de terras e outros recursos (Toxopeus, 1969).

O cacau tem uma longa cadeia de fornecedores que se estende de pequenos proprietários, geralmente em regiões tropicais remotas e menos desenvolvidas do mundo, até às fabricas e consumidores, principalmente em países industrializados e mais desenvolvidos (Beckett et al., 2017). Até meados da década de 20, o Brasil ocupava o primeiro lugar no ranking de produtividade mundial de cacau. Atualmente, o Brasil contribui com 4% da produção mundial,

ficando atrás de países como Costa do Marfim (40%), Gana (20%), Nigéria (5%) e Camarões (5%). Esse grande decréscimo na produtividade foi devido à introdução da doença vassoura de bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) (Leite, 2012).

A primeira tentativa de frear a vassoura de bruxa com o uso de variedades resistentes ocorreu em 1938, em Trinidad, depois que esforços para controlar a doença com fungicidas e medidas sanitárias falharam (Wood e Lass, 2001). No Brasil, o primeiro programa de melhoramento foi baseado em seleção comum, no mutante de semente alva Catongo e em algumas cultivares importadas pertencentes ao grupo Trinitário. Em 1963 foi instalado um novo programa de melhoramento, depois do surgimento do Centro de Pesquisa do Cacau (CEPEC), baseado em seleções locais e em uma grande variedade de clones importados (ALVIM, 1975).

O crescimento e o desenvolvimento do cacau são altamente dependentes da temperatura (Almeida e Valle, 2007). A faixa de temperaturas experimentada pelos cultivos de cacau é muitas vezes maior do que a de seu habitat natural. Consequentemente, a temperatura é o principal fator limitante das regiões nas quais o cacaueiro pode ser cultivado e o estresse térmico é um fator que afeta a variação sazonal na produtividade de cacau, dentre outros tipos de estresse (Daymond e Hadley, 2004).

Outro fator importante é o alagamento, que pode criar condições hipóxicas no solo, sendo comuns em algumas áreas produtoras de cacau, como Brasil, Gana, Nigéria e Costa do Marfim, onde a precipitação total geralmente excede em muito a evapotranspiração (Sena Gomes e Kozlowski, 1986). Estudos no Brasil mostram que períodos de brotação e consequente expansão foliar sempre estiveram associados a um período anterior de estresse hídrico (Alvim, 1977). Além disso, muitas vezes a produção de cacau é limitada por outros estresses abióticos, como deficiências nutricionais, e por estresses bióticos, como doenças e insetos (Wood e Lass, 2001).

Na tentativa de compreender melhor os mecanismos de resistências do *Theobroma cacao* ao estresse biótico e abiótico, diversos pesquisadores

realizaram estudos de expressão gênica (do Nascimento et al., 2018; Reis et al., 2018), atividade das enzimas do estresse oxidativo (Santos et al., 2009; Reis 2018) e proteômica (Bertolde et al., 2014; Niemenak et al., 2015). A proteômica tornou-se um método poderoso para identificar as alterações bioquímicas e moleculares associadas a diferentes estágios de desenvolvimento, tratamentos e ambientes (Niemenak et al., 2015).

2.2 Estresse mecânico em plantas

A natureza sésstil das plantas faz com que as mesmas dependam do seu ambiente circundante (Chehab et al., 2009). Ao longo de sua evolução, as plantas adaptaram mecanismos internos que facultam-nas de aproveitarem ao máximo de quaisquer condições do ambiente para o seu crescimento e desenvolvimento (Coutand, 2010). Movimentos rápidos induzidos mecanicamente pelo toque, por exemplo, de um inseto em plantas, cujos órgãos possuem tecidos contendo células sensoriais, podem ser observados em espécies como *Dionaea muscipula* ou *Mimosa pudica*, cujo toque promove o murchamento das folhas pela perda rápida de água das células sensoriais (Lee et al. 2005). Neste caso, estas respostas rápidas ao estímulo mecânico são comumente denominadas de tigmonastismo (Lee et al. 2005).

Entretanto, em plantas destituídas de células sensoriais, as respostas aos estímulos físicos ou mecânicos são em longo prazo (Chehab et al., 2009), promovem mudanças morfofisiológicas, bioquímicas e moleculares, alterando, conseqüentemente, o seu padrão de crescimento (Liu et al., 2007; Coutand, 2010), comumente denominado de tigmomorfogênese (Jaffe, 1973). O movimento das plantas provocado pelo vento, bem como por gotas de chuva, toques sutis e fricção, seja pela passagem de animais ou máquinas, são estímulos mecânicos que induzem à tigmomorfogênese (Jaffe, 1973; Reis et al., 2018), por meio da síntese de uma matriz de fitormônios, moléculas de sinalização, e outros componentes químicos, além de expressão gênica (Chen et al., 2005; Chehab et al., 2009); induzindo alterações morfofisiológicas em

seu crescimento e desenvolvimento (Said et al., 2009). Algumas respostas das plantas aos estímulos mecânicos estão associadas ao seu crescimento e são causadas por mudanças na expressão de genes que codificam proteínas envolvidas em diversos processos celulares (Lee et al., 2005).

Estudos com *Arabidopsis thaliana* demonstraram que alguns genes, cuja expressão é induzida pelo toque, codificam para a proteína ligante ao Ca^{2+} , calmodulina, sugerindo um papel para o Ca^{2+} como mediador de respostas de crescimento (Allen et al., 1999). Vários trabalhos são direcionados em identificar os componentes da via de transdução de sinal seguido da perturbação mecânica (Liu et al., 2007; Chehab et al., 2008; Said et al., 2009), visto que as plantas possuem uma rede muito sofisticada de sistemas de comunicação intracelular, que os cientistas estão apenas começando a compreender (Chen et al., 2005). Logo, existe a necessidade de intensificar as pesquisas científicas no sentido de desvendar os mecanismos de transdução de sinal, por meio do quais as plantas detectam e respondem aos estímulos mecânicos (Chehab et al., 2009).

Moléculas sinalizadoras e fitormônios são responsáveis pela expressão de genes que codificam proteínas que estão envolvidas em detectar e responder rapidamente a perturbações mecânicas (Chehab et al., 2009). Contudo, é através de ferramentas genéticas, moleculares e bioquímicas que se faz possível entender e elucidar os mecanismos pelos quais as plantas percebem e respondem apropriadamente a estas perturbações (Chehab et al., 2009). Conforme Liu et al. (2007) durante o estresse mecânico é possível notar alterações morfológicas no crescimento e desenvolvimento da planta, essas perturbações físicas têm como causa visíveis alterações na quantidade de folhas, no comprimento de raízes, e na espessura do entrenó, bem como outras modificações.

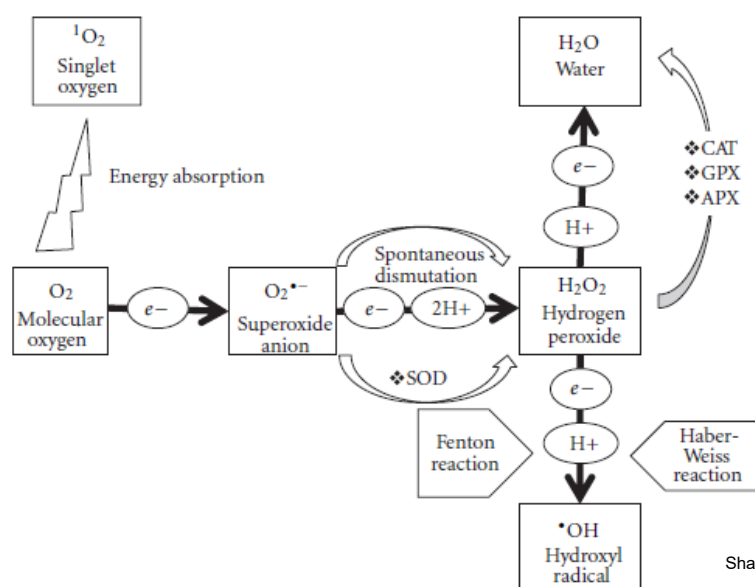
O desempenho das plantas constantemente está sendo afetado por fatores que causam estresse, sejam os mesmos bióticos ou abióticos. Em defesa, a planta tem a capacidade de ativar rotas em resposta a tais estresses, sendo uma delas a rota octadecanóide. Nessa via de sinalização, ocorre a

produção do ácido jasmônico, hormônio esse responsável pela expressão dos genes de defesa, além da produção de ERO que podem atuar como molécula de sinalização (Soares e Machado, 2007).

Nos processos de sinalização molecular, as ERO vem atuando nesse papel, deixando de ser consideradas apenas subproduto de um processo indesejável do metabolismo celular (Sharma et al., 2012). No entanto, é necessário um equilíbrio entre a produção de ERO e a defesa antioxidativa, a mesma responsável pela proteção, mas também por comunicações inter e intra-celulares (Corpas et al., 2015). Uma perturbação nesse equilíbrio, pode ser gerada por várias condições adversas ou defesas antioxidativas prejudicadas, ocasionando geração excessiva de ERO (Krishnamurthy e Rathinasabapathi, 2013). Essas espécies reativas de oxigênio podem ser produzidas em diferentes compartimentalizações celulares, como nas diferentes organelas, incluindo cloroplastos, mitocôndrios ou peroxissomos (Corpas et al., 2015).

De acordo com Barbosa et al. (2014) o aumento da produção de ERO que ocasiona um desequilíbrio na planta, leva a danos em suas estruturas celulares, levando a morte celular programada, devido as condições de estresse conferida e a alta toxicidade gerada. Segundo Gupta (2011), a quantidade de espécies reativas de oxigênio como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^-), e oxigênio singlete (1O_2) são grande e surgem como uma das primeiras respostas ao estresse gerado ao vegetal. A produção das espécies reativas de O_2 ocorre por dois diferentes mecanismos, (i) através da redução monovalente parcial do O_2 produzindo O_2^- , H_2O_2 e OH , ou (ii) absorvendo energia para o O_2 levando a formação de 1O_2 (Figura 1) (Sharma et al., 2012). Para a proteção contra esses danos oxidativos, existe um sistema complexo antioxidativo que inclui enzimas e também substratos moleculares, que vão ser responsáveis pela eliminação de suas espécies reativas de oxigênio associadas (Krishnamurthy e Rathinasabapathi, 2013).

As espécies reativas de oxigênio são produzidas normalmente no metabolismo celular e sob condições de estresse, ocorre um desequilíbrio devido ao seu acúmulo (Choudhury et al., 2017; Sharma et al., 2012). Para que se tenha sucesso na eliminação ERO produzidas durante vários estresses ambientais requer ações enzimáticas e não enzimáticas presentes nos tecidos, o que ajuda na manutenção da estrutura e integridade dos componentes celulares (Caverzan et al., 2016). Em um ambiente estressor a produção de ROS se intensifica devido ao seu favorecimento por parte do meio ao que a planta se encontra, seja por uma exposição luminosa a níveis elevados, seja por concentrações altas de metais pesados, sais, temperatura elevadas ou estresses físicos (Sharma et al., 2012). As plantas em resposta a tais danos deletérios, conta com o auxílio do metabolismo antioxidativo enzimático, sendo várias as enzimas que atuam na redução dos níveis de ERO (Mittler et al., 2004). Dentre as principais enzimas de atuação temos: dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase do guaiacol (GPX) e catalase (CAT) (Elavarthi e Martin, 2010). Já a respeito do metabolismo não enzimático temos a atuação do ácido ascórbico (vitamina C), a prolina, o α -tocoferol (vitamina E), a glutatona e os flavonóides em sistemas de oxidorredução (Mittler et al., 2004).



Sharma et al., 2012

Figura 1: Representação esquemática da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) em plantas. A ativação do O_2 ocorre por dois diferentes mecanismos, através da redução monovalente por etapas do O_2 levando à formação de O_2^- , H_2O_2 e OH , ou pela transferência de energia para o O_2 levando a formação de 1O_2 .

2.3 Giberelinas

Os hormônios são pequenas moléculas com o poder de levar a modificações tanto fisiológicas quanto bioquímicas nas plantas, em resposta a modificações geradas no meio ao qual circunda (Franklin, 2008). Os hormônios vegetais são de extrema importância para que a planta cresça e se desenvolva, bem como responda a mudanças no ambiente. Em condições adversas, a qual poderá levar a planta a uma condição de estresse, os hormônios vegetais podem ajudar no processo de tolerância a diversos estresses bióticos e abióticos. Como hormônios vegetais que respondem a condições adversas de estresse, podemos incluir a auxina, giberelina, ácido abscísico, etileno, citocininas, óxido nítrico (nítro), brassinosteróide e ácido salicílico, entre outros (Miransari, 2016).

Dentre os hormônios vegetais citados, as giberelinas ganham destaque devido seu papel na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas, atuando na germinação, no alongamento e na floração das sementes (Ogas et al., 1997). Nos plastídios é onde se inicia a biossíntese das giberelinas (GAs), já no citosol ocorre a sua inativação (Minguet et al., 2014). Estes hormônios pertencem a uma família de pequenos compostos orgânicos com 20 carbonos e são classificadas como um fitormônio diterpenóides tetracíclicos, constituídos de quatro unidades de isoprenóides, produzidos por plantas e alguns fungos, respondendo uma gama de processos (Gao et al., 2017). Dentre esses processos de atuação das GAs, incluímos o desenvolvimento do alongamento do caule, germinação, dormência, floração, folhas, frutos e senescência celular (Soumya et al., 2017).

Os estímulos externos apresentam grande influência sobre a expressão de enzimas devido a sensibilidade das mesmas. Algumas enzimas são responsáveis por codificarem genes que vão atuar na catalisação de etapas importantes na biossíntese das GAs, o que faz com que fatores ambientais venham a interferir nos níveis desse hormônio (Minguet et al., 2014). Progressos vem ocorrendo em estudos sobre a biossíntese, sinalização, transporte e metabolismo das GAs. Dentre os avanços sobre tal ação desse hormônio vegetal se encontra a degradação das proteínas DELLA, membro da família de proteínas nucleares repressora do crescimento (Gao et al., 2017).

Em outras pesquisas, plantas mutantes que foram afetadas na biossíntese ou na sinalização de GAs, tiveram como consequência a germinação alterada e na fase adulta apresentaram porte anão, bem como um florescimento tardio (Achard e Genschik, 2009). De acordo com Colebrook et al. (2014), a diminuição dos níveis de GAs, causa restrição no crescimento da planta, isto quando a mesma se encontra disposta a múltiplos tipos de estresse, o que justifica o resultado do estudo acima citado. Em contrapartida, em resposta ao estresse abiótico as giberelinas vem apresentando um importante papel com o aumento da sinalização e biossíntese de GAs, sendo uma forma de escape ou tolerância para planta sobre alguns tipos de condição de estresse (Colebrook et al., 2014). Quanto à sinalização de giberelinas, elas agregam diversas vias de sinalização que vão atuar sobre a condição de exposição ao estresse, que quando afetadas terão alterações no crescimento das plantas, que pode ser suprido ou promovido, dependerá de qual situação a planta está sendo exposta (Colebrook et al., 2014).

Vários reguladores de crescimento atuam inibindo a síntese de vários fitormônios. Como exemplo destes reguladores temos o PBZ, que atua alterando os níveis de hormônios vegetais. O Paclobutrazol inibe a síntese de GAs e aumenta o nível de citocininas nas plantas (Soumya et al., 2017). O bloqueio na rota metabólica de síntese de GAs, resulta no acúmulo de terpenóides com consequente produção de ácido abscísico. O ácido abscísico por sua vez, desempenham papéis importantes na maturação de sementes, germinação, crescimento de plântulas, respostas de estresse vegetativo,

regulação estomática, resposta a patógenos, floração e senescência (Finkelstein, 2013).

3. CAPÍTULO 1

Análise do perfil proteômico em raízes de plantas jovens de cacau crescidas em solo de tabuleiro costeiro compactado e com localização de fósforo

Thayse França Tosto, Alex-Alan Furtado de Almeida*, Arlicélio Queiroz Paiva, Carlos Henrique de Carvalho Neto, Raner José Santana Silva, Carlos Priminho Pirovani

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Jorge Amado, km 16, 45662-900, Ilhéus, BA, Brasil.

* Autor correspondente: alexalan@uesc.br

Resumo

A região cacaueira do estado da Bahia, Brasil, possui grandes áreas de solos de tabuleiro costeiro, onde não se cultivam plantas de cacau em virtude de suas limitações químicas e físicas. O presente trabalho teve como objetivos principais avaliar o perfil proteômico e identificar as proteínas diferencialmente acumuladas (DEPs) em raízes de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, crescidas em solo de tabuleiro costeiro compactado e com localização de fósforo (P). A partir da análise proteômica de raízes foram identificadas 46 proteínas exclusivas nas raízes das plantas controle, 47 proteínas nas raízes das plantas crescidas em solo compactado (densidade de $1,7 \text{ kg dm}^{-3}$) e com dose baixa de P, das quais 9 proteínas foram classificadas como diferencialmente acumuladas e 38 como exclusivas. Em contrapartida, nas raízes das plantas crescidas no solo compactado e com dose ideal de P, foram identificadas 99 proteínas, das quais 10 foram diferencialmente acumuladas e 89 exclusivas. As proteínas expressas nas raízes das plantas crescidas em solo compactado, associado com a localização de doses baixa e ideal de P, estão envolvidas com o metabolismo de compostos orgânicos, respostas ao estresse, processos biossintéticos e processos de oxirredução. Houve um aumento na expressão das proteínas nas raízes crescidas no solo compactado, associada com a localização da dose ideal de P. A maior parte das proteínas, identificadas nos tratamentos de compactação do solo, pertenceu ao grupo de proteínas envolvidas no metabolismo de compostos orgânicos. As proteínas de maior expressão, pertencentes a este grupo, estão relacionadas à degradação de reservas energéticas, durante o estresse mecânico provocado pela compactação do solo. Estas proteínas contribuem para a manutenção da produção energia na forma de ATP, utilizada para o crescimento de raízes no solo compactado e com baixa disponibilidade de oxigênio. A diferença na

abundância de proteínas, em cada processo biológico, demonstrou que as raízes de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 possuem diferentes mecanismos de resposta ao estresse mecânico. Estas alterações promovem a manutenção da homeostase celular e estimulam o crescimento do sistema radicular durante o processo de estresse.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*, solo coeso, perfil proteico, processos biológicos, CCN 51.

3.1 Introdução

O *Theobroma cacao* é uma espécie lenhosa perene de grande importância econômica, tanto para a indústria quanto para a economia de muitos países onde é cultivada (Almeida e Valle, 2007). A importância econômica do cacau está relacionada aos seus frutos, dos quais se extraem sementes (amêndoas) que servem de matéria prima para a fabricação de chocolate e de diversos outros produtos (Figueira et al., 1994; Almeida e Valle, 2007; 2009). O cacau é cultivado em países da América Latina, África e Ásia. No Brasil, é cultivado em alguns estados da federação, principalmente, no sul da Bahia, Pará e Espírito Santo, cuja produção tem uma série de restrições, associadas a estresses bióticos e abióticos, ocasionando perdas significativas (Lahive et al., 2019).

Os estímulos físicos ou mecânicos, denominados *thigmomorphogenesis* (Jaffe, 1973), causados por ventos fortes, chuvas, toques sutis, fricções e compactação do solo, bem como pela passagem de animais ou máquinas, podem provocar alterações no crescimento e no desenvolvimento das plantas e comprometer a sua produção. No cacaueiro, o estresse mecânico, provocado pela ação do vento, induz alterações morfofisiológicas, bioquímicas e moleculares durante o crescimento das plantas (Reis et al., 2018). Estas alterações ocorrem por meio de inúmeras moléculas de sinalização e de outros componentes químicos, que podem alterar a expressão de genes (Braam, 2005; Chen et. al., 2005; Chehab et. al., 2008; Chehab et. al., 2012; Lange e

Lange 2015) e, conseqüentemente, induzir modificações celulares profundas no perfil proteico (Saidi et al., 2009; Kosová et al., 2018).

Existem grandes áreas de solos de tabuleiros costeiros (TC), na região cacauera da Bahia, caracterizados como latossolos amarelos distróficos ou álicos, que apresentam horizontes subsuperficiais coesos, onde normalmente não se cultivam cacau em virtude de limitações físicas e químicas do solo. A coesão é originada da acomodação de colóides que migraram da superfície, provocando obstrução dos macroporos e, como consequência, diminuindo a permeabilidade e aeração do solo (Aguilar Netto e Nacif, 1988). Outro grande problema encontrado no cultivo de plantas em solos de TC está relacionado ao aproveitamento de fósforo (P). Estes solos possuem altas concentrações de alumínio trocável (Al^{3+}) que tem a capacidade de adsorver P, deixando-o indisponível para as plantas (Naido et al., 1978).

Pesquisas demonstram que o fornecimento de P no início do desenvolvimento das plantas é essencial, ele exerce funções importantes na respiração, fotossíntese e transferência de energia (Grant et al., 2001). Além do mais, plantas crescidas em condições de estresse por deficiência de P, sofrem redução na respiração e fotossíntese, na síntese de proteínas e ácidos nucleicos, na altura das plantas e no número e desenvolvimento de folhas, além do desenvolvimento radicular (Grant et al., 2001; Kim e Li, 2016; Razaq et al., 2017). Desse modo, as plantas têm a capacidade de se adaptarem a estas condições de deficiência de P, podendo aumentar a capacidade de aquisição do P, por meio de alterações no sistema radicular, como o aumento da área de superfície e comprimento de raízes, e relação raiz parte aérea (Kim e Li, 2016; Razaq et al., 2017). Dentre as diferentes estratégias para tolerar a deficiência de P no solo, algumas aumentam a proliferação de raízes, outras modificam a morfologia das raízes, além de se associarem a micorrizas (Grant et al., 2001; Razaq et al., 2017).

Assim como em solos alagados, as plantas crescidas em solos compactados, são submetidas a estresse por baixa disponibilidade de oxigênio no solo, resultando em uma condição de hipóxia. O déficit de oxigênio no solo provoca danos no crescimento e desenvolvimento de raízes, como o enraizamento de raízes adventícias, e deformações na raiz principal, além de

inibir a respiração celular aeróbica, sendo substituída pela fermentação com consequente redução na produção de ATP (Bailey-Serres e Voesenek, 2008; Vidoz et al., 2010). Além disso, ocorre aumento na produção de ERO; danos na atividade fotossintética; altera a produção de biomassa e a expressão gênica; promove o desenvolvimento de aerênquima e de lenticelas hipertrofiadas, mostrando assim, a existência de um mecanismo de homeostase regulando a resposta anaeróbica (Bertolde et al., 2010; Bertolde et al., 2014; Branco et al., 2017).

A expressão de proteínas com funções específicas é a forma mais comum de respostas celulares a estímulos externos (Kosová et al., 2018). Por sua vez, a análise proteômica engloba conhecimentos e técnicas capazes de identificar um conjunto de proteínas sintetizadas por uma célula, além de mostrar suas interações nos diversos processos biológicos (Mann et al., 2001). O conjunto proteico encontrado está relacionado com o estágio de desenvolvimento e diferenciação, bem como com as condições específicas do crescimento e desenvolvimento de cada organismo (Kosová et al., 2018). A proteômica clássica inclui metodologias baseadas em técnicas de electroforese em gel bidimensional (2DE) e espectrometria de massas (MS) (Parker et al., 2006; Oeljeklaus et al., 2008). O método clássico possui algumas limitações, como sensibilidade, resolução, cobertura e velocidade de captura de dados (Han et al., 2006 e Oeljeklaus et al., 2008). Isto, por sua vez, evidencia a dificuldade de se trabalhar com a diversidade biológica de proteínas e sua gama de propriedades fisiológicas e bioquímicas. O sucesso da análise proteômica está relacionado ao desenvolvimento de programas computacionais capazes de analisar, armazenar e correlacionar uma grande quantidade de informações de sequências genômicas em banco de dados de mundo todo (Pandey e Mann, 2000).

O presente trabalho teve como objetivos principais avaliar o perfil proteômico e identificar as proteínas diferencialmente acumuladas (DEPs) em raízes de plantas jovens de cacau, crescidas em solo de tabuleiro costeiro compactado e com localização de fósforo (P).

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material vegetal e condições de cultivo

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação, localizada no *Campus* Soane Nazaré de Andrade, da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rodovia Jorge Amado, km 16, Bairro Salobrinho, Ilhéus, BA, nas coordenadas 39°13'59" de longitude oeste e 14°45'15" de latitude sul.

O solo utilizado no experimento foi coletado na Fazenda São Sebastião (14° 54' 3,59" S; 39° 07' 2,3" W), no município de Ilhéus, BA, de um horizonte B de um latossolo amarelo coeso. O solo foi seco ao ar e passado em peneira de 4 mm de abertura de malha. Subamostras de solo foram retiradas para caracterizar inicialmente os atributos físicos (Tabela 1) e químicos (Tabela 2), na fração de 2 mm de diâmetro (Embrapa, 2009). De posse das análises física e química do solo, foi feita a correção de acidez e da fertilidade do solo antes da montagem do experimento. A cada 15 dias, fez-se uma adubação nitrogenada por vaso, na forma de ureia, após o plantio. Ainda, durante a adubação só foi adicionado P no solo, que foi utilizado para caracterizar os tratamentos.

Posteriormente, fez-se a semeadura utilizando sementes do genótipo de cacau CCN 51 oriundas de autofecundação de plantas com cinco a oito anos de idade, cultivadas nas fazendas reunidas do Vale da Juliana (Igrapiúna, BA). As sementes foram germinadas diretamente em tubos PVC com 0,24 m de altura e 0,1 m de diâmetro interno, subdividido em três anéis com 0,08 m de altura conectados com fita adesiva. O solo dos anéis superior e inferior teve densidade 1 kg dm⁻³ para todos os tratamentos, ao passo que o solo dos anéis intermediários teve densidades de 1 kg dm⁻³ para o controle e 1,7 kg dm⁻³ e uma camada de caulim (0,01 m de espessura) entre o solo compactado e a parede do PVC. Esse procedimento foi realizado, pois o caulim possui, em sua constituição, alumínio tóxico (Al³⁺) que impede que as raízes cresçam entre o solo e a parede de PVC, forçando, assim, o seu crescimento na camada de solo compactada. Para isto, o caulim foi umedecido com água, para formação

de uma pasta, que foi passada na parede do anel até que se formasse uma camada de caulim com 0,01m de espessura.

Após a adição do caulim na parede de PVC do anel intermediário, procedeu-se a compactação do solo deste anel. A compactação foi realizada mecanicamente, com o auxílio de um bastão de madeira com diâmetro compatível com o do anel do tubo de PVC. O volume da amostra de solo, para esta etapa, foi calculado para se obter a compactação correspondente aos tratamentos de densidade no solo. Além disso, o solo acondicionado nos anéis inferiores, para o tratamento compactado ($1,7 \text{ kg dm}^{-3}$), receberam no momento da adubação do solo, duas doses diferentes de P [baixa (200 mg dm^{-3}) e ideal (400 mg dm^{-3})]. Após o preenchimento dos três anéis com o solo, de acordo com os tratamentos preestabelecidos, estes, por sua vez, foram sobrepostos e unidos por meio de fita plástica adesiva. Posteriormente, o fundo dos vasos (anéis sobrepostos) foi tampado com lâmina de isopor perfuradas. Logo após, os vasos foram colocados sobre bancadas de madeira em condições de casa de vegetação.

Tabela 1 – Análise física do latossolo amarelo coeso utilizado no experimento, coletado no horizonte B, localizado no município de Ilhéus, BA, Brasil

Areia	Silte	Argila
----- g kg ⁻¹ -----		
487,3	65,7	447,0

Tabela 2 – Análise química do latossolo amarelo coeso utilizado no experimento, coletado no horizonte B, localizado no município de Ilhéus, BA, Brasil.

pH	P	MO	H+Al	Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	B	Cu	Fe	Mn	Zn
CaCl ₂	mg dm ⁻³	g dm ⁻³	----- mmol _c dm ⁻³ -----			-----			----- mg dm ⁻³ -----			-----		
4,8	3	6	28	1,2	1,8	10	6	17,8	45,8	0,2	0,1	20	0,4	1,1

P, K, Ca e Mg (Resina)

B (água quente)

Cu, Fe, Mn e Zn (DTPA)

Al (Cloreto de potássio 1 mmol_c dm⁻³)

MO – matéria orgânica, Walkley Black (Col.)

SB (Soma de bases trocáveis - Ca⁺², Mg⁺², K⁺, Na⁺ e mmol_c dm⁻³)

CTC (Capacidade de troca catiônica - mmol_c dm⁻³)

3.2.2 Análise proteômica

3.2.2.1 Extração de proteínas

O extrato de proteína total de raízes foi obtido de material vegetal coletado aos 60 dias após a emergência das plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51. Imediatamente após a coleta, o material vegetal foi imerso em nitrogênio líquido, armazenado em ultrafreezer - 80°C e, posteriormente, liofilizado e armazenado em freezer - 20°C. O extrato proteico foi obtido em triplicata pela extração fenólica, seguida de precipitação com acetato de amônio a 0,1 M em metanol (Pirovani et. al., 2008) e adaptado para raízes de cacau (Bertolde et al., 2014). Inicialmente, as proteínas foram quantificadas usando o 2-D Quanti Kit, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare, UK).

3.2.2.2 SDS-PAGE Bi-dimensional

Para o gel bi-dimensional, a primeira dimensão foi realizada em um sistema Ettan IPGphor (GE Healthcare), onde as amostras de proteína (350 ng) foram aplicadas em 250 µL de solução de reidratação, juntamente com strip tipo Immobililine DryStrip Reswelling (pH 3-10, GE Healthcare) de 13 cm, durante 12 h. Posteriormente, procedeu-se a focalização das amostras no mesmo aparelho. Logo depois, as strips foram armazenadas em ultrafreezer a - 80°C até a análise de segunda dimensão. Para a segunda dimensão, as strips foram incubadas durante 15 min em uma solução tampão de equilíbrio [uréia a 6 M, Tris-HCL (7,5 mM e pH 8,8), glicerol a 29,3%, SDS a 2% e azul de bromofenol a 0,002%] e com ditioneitol (DTT) a 1% p/v. Logo após, as strips permaneceram por mais um período de 15 min, num tampão de equilíbrio com iodoacetamida a 2,5% p/v. A segunda dimensão (SDS-PAGE) foi executada em um sistema SE600 Ruby (GE Healthcare): 15 mA, durante 5 min, 40 mA, durante 10 min e 50 mA por gel, por 4h, para cada strip, a uma temperatura constante de 11°C. O marcador de peso molecular utilizado foi fabricado pela GE Healthcare.

Após a eletroforese, as proteínas foram coradas com Coomassie coloidal a 0,08% p/v de G-250 (NEUTHOFF et al., 1988). Os géis foram digitalizados via ImageScanner II (Amersham) e analisados utilizando o ImageMAster Platinum 2D 6,0 software (GE Healthcare), considerando a área e intensidade dos spots. As amostras controle foram comparadas com as amostras de raízes de plantas submetidas aos diferentes tratamentos. A análise de spots diferenciais foi baseada no cálculo da ANOVA. Apenas valores de $p < 0,05$ e spots com variações de intensidade (fold) $\geq 1,5$ foram considerados como diferenciais.

3.2.2.3 Excisão dos spots e extração de peptídeos

Os spots de interesse de cada tratamento (diferenciais e exclusivos) foram excisados do gel e fragmentados com o auxílio de um bisturi. Logo após, foram descorados com 200 μL NH_4HCO_3 a 25 mM, contendo acetonitrila a 50%, overnight. Logo após, o sobrenadante foi descartado e os fragmentos de gel foram lavados com 200 μL de água Milli-Q e, posteriormente, desidratados em 100 μL de acetonitrila a 100 % por 10 min, a temperatura ambiente. Em seguida, foram secos usando centrífuga a vácuo no concentrador 5301 (Eppendorf) por 20 min. Após secagem, foram adicionados 4 μL de solução gelada de tripsina Gold (Promega) a 25 ng/ μL no material desidratado e deixados a 4°C por 10 min, para absorção da mesma nos fragmentos de gel. Imediatamente após, foi adicionado uma solução de NH_4HCO_3 a 25 mM até cobrir o gel, seguido de incubação a 37°C por 16 a 24 h para ação da tripsina. Para a extração peptídica, o sobrenadante de cada tubo foi coletado e transferido para um novo set de tubos. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com 50 μL de acetonitrila a 50% contendo ácido fórmico a 5 %, sob agitação durante 30 min em termomix Thermo Finemixer (SH2000-DX). Ao fim de cada lavagem, os sobrenadantes foram adicionados aos tubos novos. Ao término da extração, as amostras tiveram o volume reduzido a vácuo até atingir aproximadamente 20 a 30 μL .

3.2.2.4 Análise por espectrometria de massas (MS/MS)

Os peptídeos eluídos foram diretamente introduzidos num espectrômetro de massas Micromass Q-TOF Micro System (Waters, Manchester, Reino Unido), por meio de sua sonda de membrana de electropulverização. Os íons mais abundantes, observados na leitura do espectrômetro de massas, foram automaticamente selecionados para a dissociação induzida por colisão, utilizando o software Masslynx, gerando espectros MS/MS. Utilizou-se argônio gasoso para a dissociação dos peptídeos induzida por colisão.

3.2.2.5 Processamento e anotação das proteínas

Os espectros gerados foram analisados utilizando o software ProteinLynx v 2.3 e comparados contra o banco de dados do NCBI, por meio da ferramenta MASCOT MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com). As sequências FASTA geradas foram analisadas no software BLAST2GO (<http://www.blast2go.com>), o qual fornece informações importantes, como ontologia, funções, processos biológicos e localização celular.

3.3 Resultados

3.3.1 Perfil proteico de raízes de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas à compactação do solo e a localização de doses de P.

Observaram-se 262 spots para o tratamento controle (com densidade do solo de 1 kg dm^{-3}), 161 spots para o solo compactado (densidade $1,7 \text{ kg dm}^{-3}$) e com dose baixa de P e 413 spots para o solo compactado e com dose ideal de P, cujos spots se apresentaram como exclusivos e diferencialmente acumulados entre os tratamentos (Figura 1). As análises proteômicas evidenciaram que a compactação do solo e as doses de P interferiram no perfil proteômico das raízes de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51. De

modo geral, notou-se que houve aumento significativo no número de spots para as raízes das plantas submetidas ao tratamento de compactação do solo e dose ideal de P (Figura 1 B).

Após a detecção dos spots totais para cada tratamento, foi realizada uma comparação entre os géis. Para selecionar as proteínas diferencialmente acumuladas (DEPs), foram utilizados os requisitos do nível de expressão proteica com alteração de 1,5 vezes e $p < 0,05$. Segundo os dois critérios, ao comparar os géis do tratamento controle com o tratamento do solo compactado e com dose baixa de P, foram detectados 43 spots em comum, sendo que 15 spots foram diferencialmente acumulados entre os géis do controle e do tratamento compactado com dose baixa de P, 219 spots foram exclusivos para o gel do tratamento não compactado e 118 spots exclusivos para o gel do tratamento compactado com dose baixa de P (Figura 1 A). Por seguinte, na comparação entre os géis dos tratamentos controle e compactado com dose ideal de P, foram detectados 67 spots em comum, sendo que 25 destes spots foram diferencialmente acumulados, 195 spots exclusivos para o gel do tratamento não compactado e 346 spots exclusivos para o tratamento compactado e com dose ideal de P (Figura 1 B).

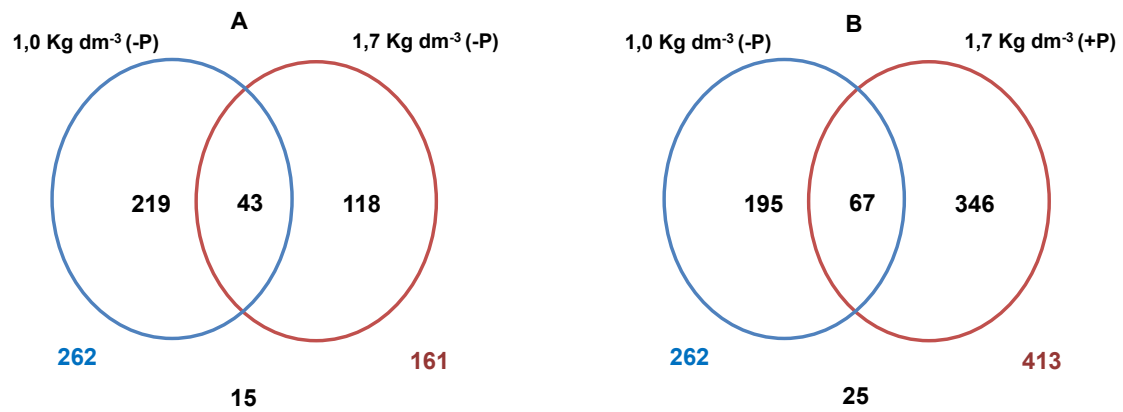
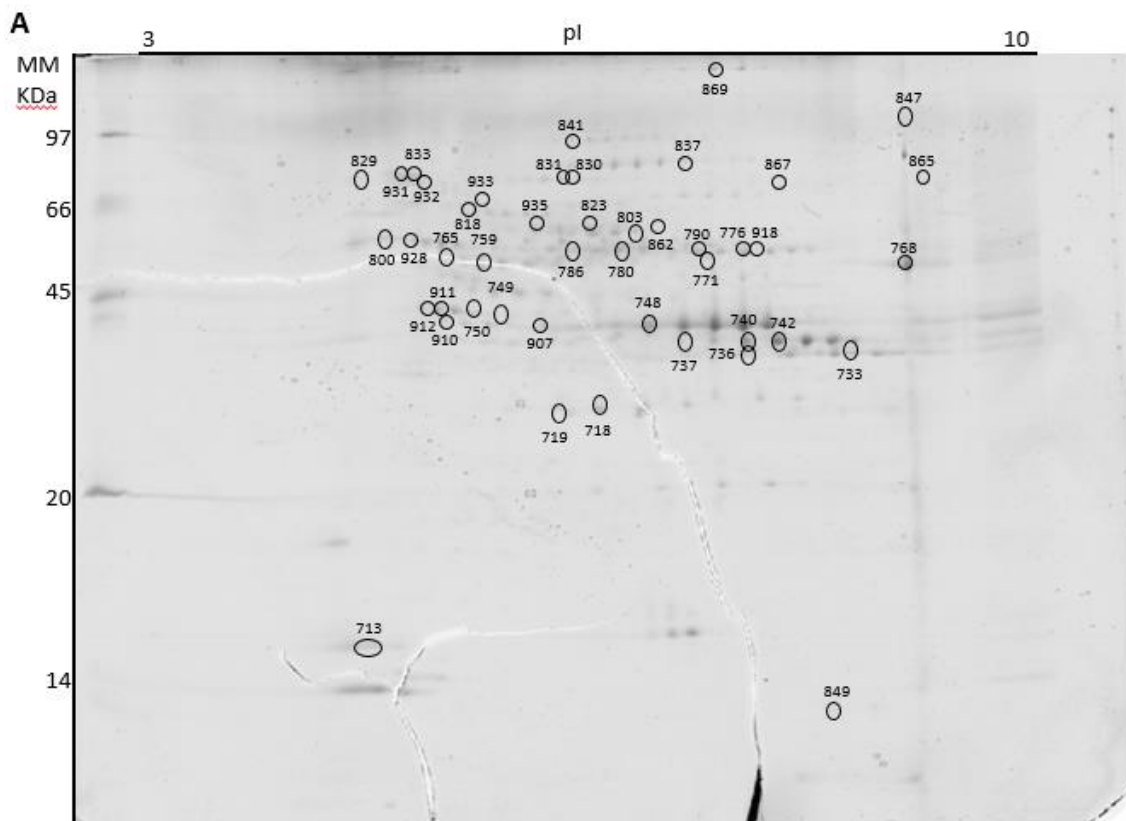


Figura 1 - Número de spots de proteínas de gel 2-DE. Diagrama de Venn dos *spots* totais (exclusivos e diferencialmente acumulados) de raízes de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 crescidas em latossolo amarelo coeso submetido à compactação do solo e a localização de doses de P. (A) controle (densidade do solo de 1 kg dm⁻³) versus solo compactado (densidade de 1,7 kg dm⁻³) e com dose baixa de P e (B) controle versus solo compactado e com dose ideal de P.



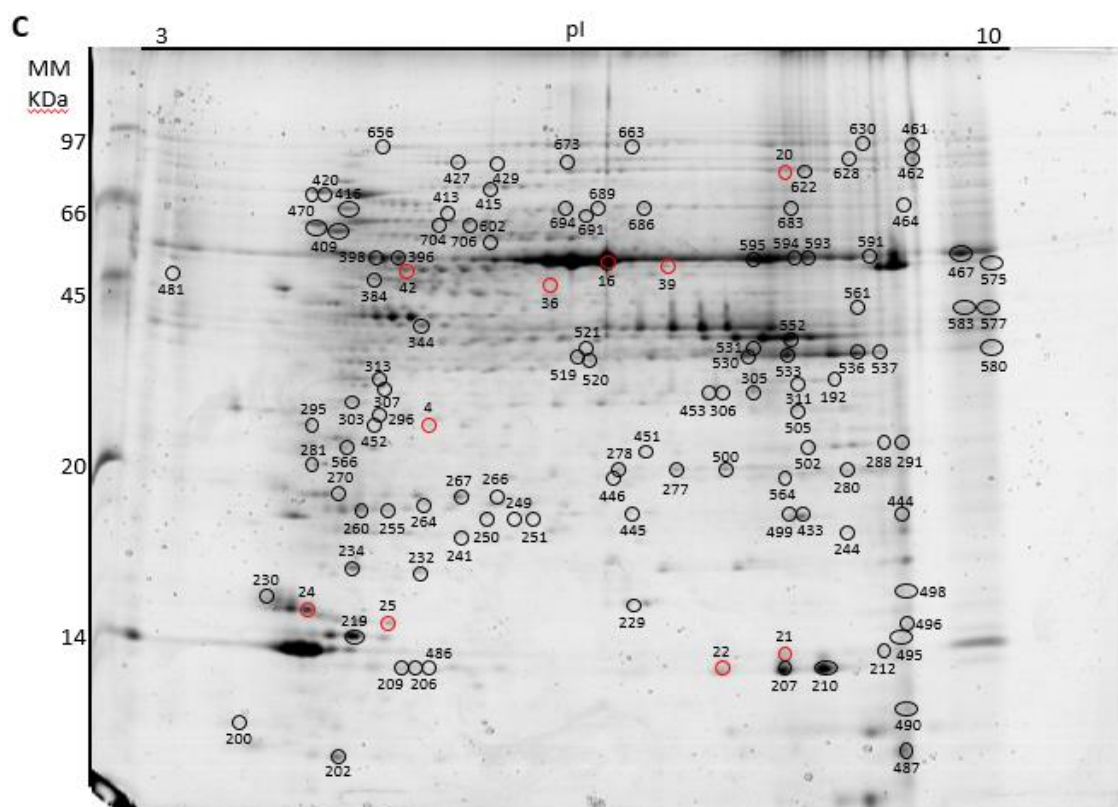
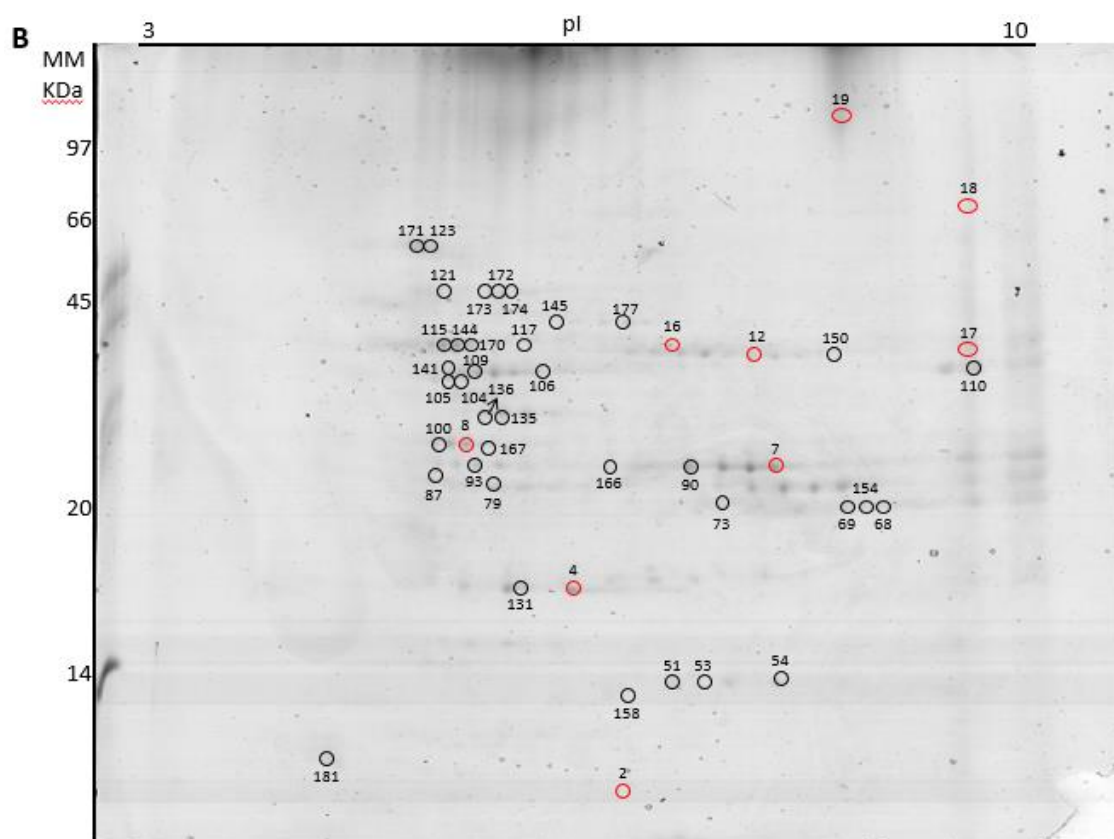


Figura 2 - Perfil proteico em géis 2DE, revelados por Comassie-Blue e digitalizados com LabScan análise no Software ImageMaster (GEHealthcare),

de raízes de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 crescidas em latossolo amarelo coeso submetido à compactação e a localização de doses de P. Em (A) controle (densidade do solo de 1 kg dm⁻³), (B) solo compactado (densidade de 1,7 kg dm⁻³) e com dose baixa de P e (C) solo compactado e com dose ideal de P. Onde kDa corresponde à massa molecular e pI o ponto isoelétrico de cada spot, variando em 3-10 NL (não linear). Círculo preto – spots exclusivos; Círculo vermelho – spots diferencialmente expresso.

3.3.2 Identificação e Classificação das proteínas em processos biológicos

Para o tratamento controle (densidade do solo de 1 kg dm⁻³), as proteínas totais foram classificadas e identificadas em sete processos biológicos (Figura 3 A). A maioria das proteínas foi classificada em transdução de sinal (25%), oxirredução (18%), resposta ao estresse (16%) e metabolismo de substâncias orgânicas (15%). As proteínas restantes foram classificadas como pertencentes a processos biossintéticos (11%), proteína de dobramento (10%) e sistema de desenvolvimento e estrutura (5%). Por outro lado, para o solo compactado e baixa dose de P, as proteínas foram classificadas como pertencentes a processo metabólico de substância orgânica (34%), resposta ao estresse (26%), oxirredução (17%), processo biossintético (8%), sistema de desenvolvimento e estrutura (7%), e transdução de sinal (5%) (Figura 3 B). Além disso, no solo compactado e com dose ideal de P, as proteínas foram classificadas como pertencentes a sete processos biológicos, cujo maior número de proteínas estava associado ao metabolismo de substância orgânica (25%), seguido de processo biossintético (21%), resposta ao estresse (18%), oxirredução (13%), sistema de desenvolvimento e estrutura (12%), transdução de sinal (8%) e proteínas de dobramento (3%) (Figura 3 C).

Analisando a categorização apenas das DEPs, as proteínas foram classificadas como pertencentes a cinco processos biológicos. As proteínas das raízes das plantas crescidas no solo compactado e com baixa dose de P, foram classificadas como pertencentes ao processo biossintético (31% up-reguladas), a oxirredução (10% up-reguladas e 10% down-reguladas), a respostas ao estresse (19% up-reguladas e 6% down-reguladas), seguido de sistema desenvolvimento (6% up-reguladas e 6% down-reguladas) e estrutura e metabolismo de substâncias orgânicas (6% up-reguladas e 6% down-

reguladas) (Figura 4 A). Entretanto, no solo compactado e com dose ideal P as proteínas foram classificadas como pertencentes ao metabolismo de substância orgânica (15% up-reguladas e 35% down-reguladas), a processos de oxirredução (7% up-reguladas e 7% down-reguladas), a respostas ao estresse (7% up-reguladas e 7% down-reguladas), a processo biossintético (14% down-reguladas) e a proteínas de dobramento (8% down-reguladas) (Figura 4 B).

Baseado na hierarquia de cluster, as DEPs foram organizadas nas principais categorias apresentadas ao longo do estresse mecânico por compactação do solo e doses de P (Figura 5). Houve maior acúmulo de proteínas associadas ao processo biossintético nas raízes das plantas crescidas no solo compactado e com baixa dose de P, em comparação ao tratamento controle. Foram identificadas, como participante deste processo, as proteínas DNA ligase 6, isoflavona redutase homol, actina, serina hidroximetiltransferase, ATP sintase subunidade beta (spots 2, 4, 8, 12, 17, respectivamente) (Figura 5 a). Por outro lado, no solo compactado e com dose baixa de P, foram identificadas proteínas supra-reguladas associadas ao processo de oxirredução como isoflavone redutase homol e álcool desidrogenase 1 (spots 4 e 7), ao passo que no solo compactado e com dose ideal de P, foi identificada a proteína lipoamina desidrogenase mitocondrial (spots 16) (Figura 5 b). Em contrapartida, no solo compactado e com dose baixa de P houve um acúmulo de proteínas associadas ao processo de respostas ao estresse, como as proteínas DNA ligase 6, isoflavona redutase homol e serina hidroximetiltransferase (spots 2, 4 e 12). Já no solo compactado e com dose ideal de P foi acumulada a proteína lipoamina desidrogenase mitocondrial (spot 16) (Figura 5 c). Além disso, no solo compactado e com dose baixa de P foi up-regulada apenas a proteína serina hidroximetiltransferase (spot 12), classificada como pertencente ao metabolismo de compostos orgânicos. Por outro lado, no solo compactado e com dose ideal de P houve regulação positiva para as proteínas lipoamina desidrogenase mitocondrial de 21 kDa e enolase (spots 16, 25 e 42) (Figura 5 d).

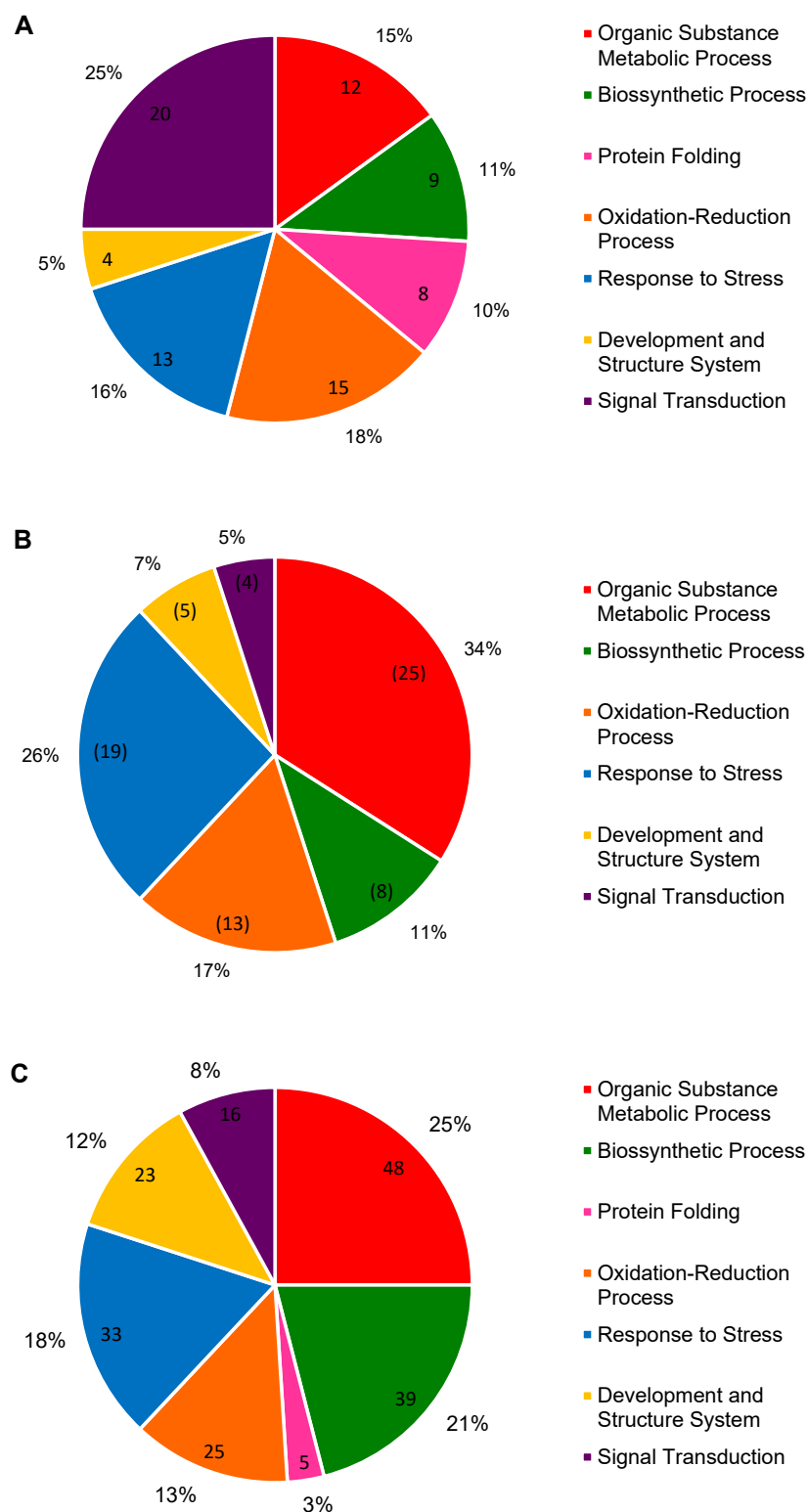


Figura 3 - Categorização processo biológico de proteínas totais identificadas em raízes de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 crescidas em latossolo amarelo coeso submetido à compactação e a localização de doses de P. (A) controle (densidade do solo de 1 kg dm⁻³), (B) solo compactado

(densidade de $1,7 \text{ kg dm}^{-3}$) e com dose baixa de P e (C) solo compactado e com dose ideal de P.

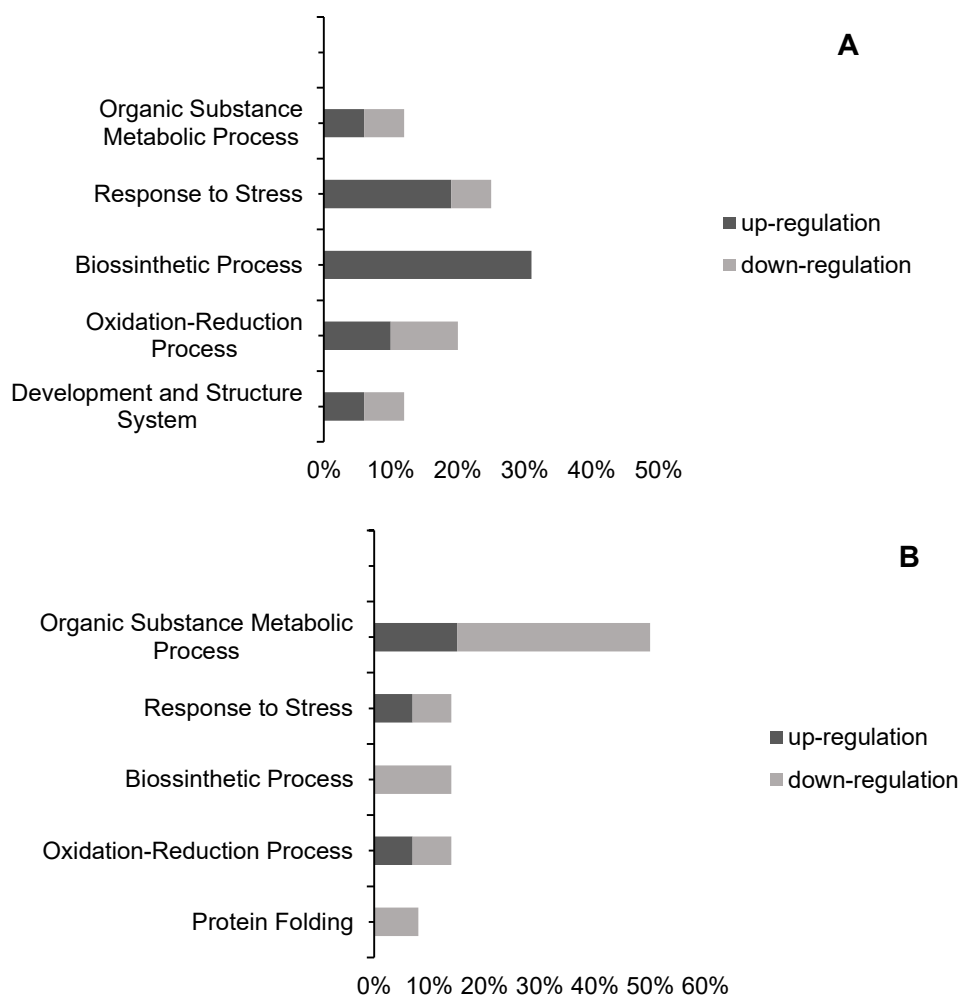


Figura 4. Categorizações dos processos biológicos de proteínas diferencialmente expressas; em raízes de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 crescidas em latossolo amarelo coeso, demonstrando o aumento de acúmulo (*up-regulation*: cinza escuro) ou redução de acúmulo (*down-regulation*: vermelho) em resposta à compactação do solo e a localização de doses de P. (A) solo compactado (densidade do solo de $1,7 \text{ kg dm}^{-3}$) e com dose baixa de P e (B) solo compactado e com dose ideal de P.

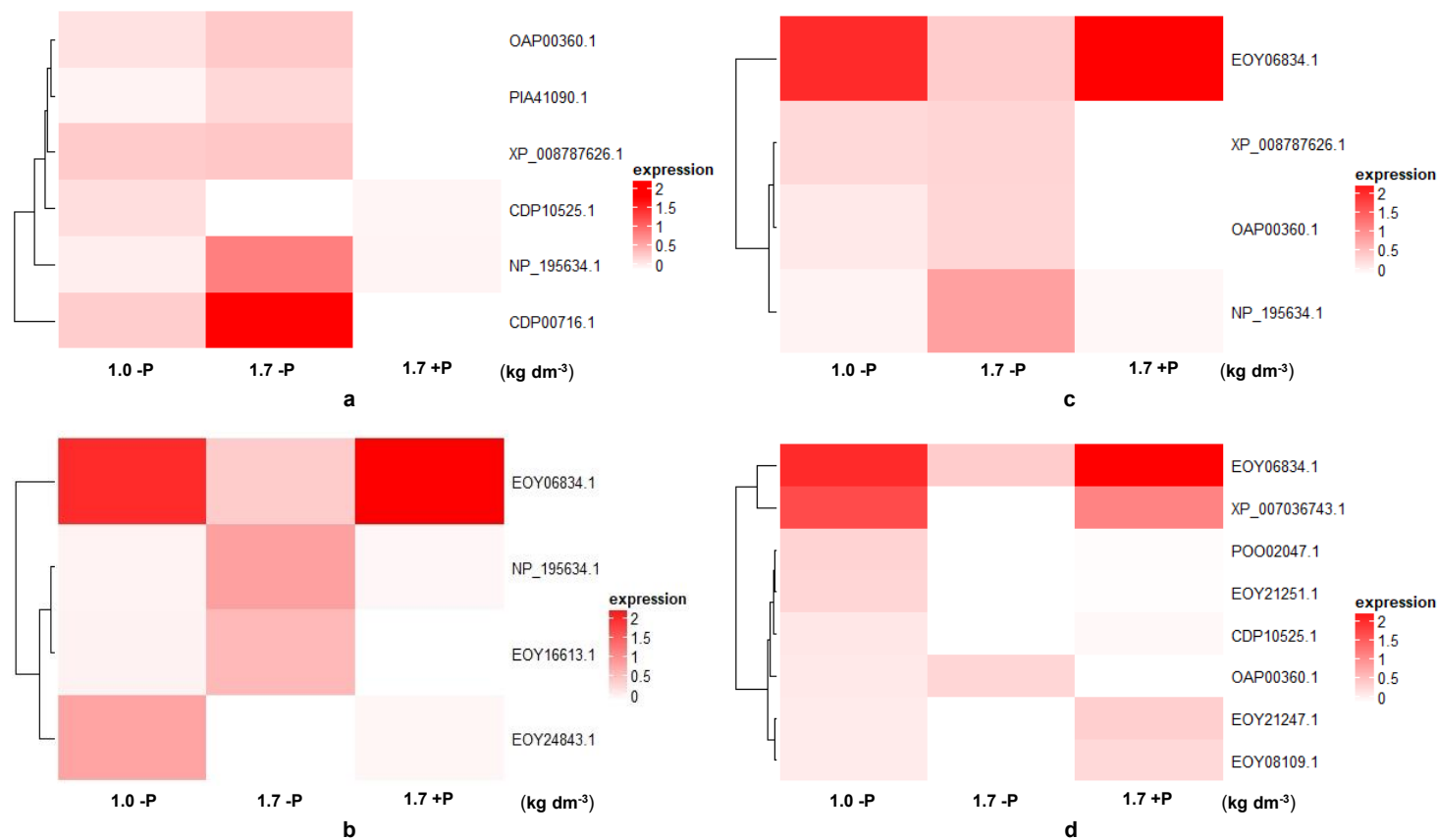


Figura 5. Agrupamento hierárquico de proteínas diferencialmente acumuladas (DEPs) com os principais processos biológicos similares de raízes de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 crescidas em latossolo amarelo coeso submetido à compactação do solo e a localização de P. **(a)** proteínas relacionadas a processos biossintéticos; **(b)** proteínas relacionadas a processos de oxirredução; **(c)** proteínas relacionadas aos processos de respostas ao estresse; **(d)** proteínas relacionadas aos processos de metabolismo de compostos orgânicos.

Tabela 3. Proteínas totais de raízes de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 crescidas em latossolo amarelo coeso com densidade de 1 kg dm⁻³ (controle) e identificadas por espectrometria de massas.

Nº SPOT	Nº ACESSO	NOME DA PROTEÍNA	MM ¹	pI ²	N ³	SCOR ⁴	Fold ⁵
713	<u>AAL85654.1</u>	trypsin inhibitor, partial	16971	4.54	4	260	U
718	<u>EOY14797.1</u>	Isoflavone reductase-like protein 4 isoform 1	34864	6.16	2	121	U
719	<u>BAM05608.1</u>	phenylcoumaran benzylic ether reductase	33866	5.78	2	114	U
733	<u>AIZ00507.1</u>	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, partial	21578	6.67	2	154	U
736	<u>EOY02669.1</u>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 isoform 1	35816	8.51	2	157	U
737	<u>EOY06041.1</u>	Lactate/malate dehydrogenase family protein	36097	6.60	1	58	U
740	<u>EOY14311.1</u>	Aldehyde dehydrogenase 5F1	59503	8.44	2	140	U
742	<u>EOY28328.1</u>	Larreatricin hydroxylase isoform 1	67801	6.23	6	424	U
748	<u>AAF01700.1</u>	alcohol dehydrogenase, partia	23381	6.58	1	83	U
749	<u>PIN04936.1</u>	3-phosphoglycerate kinase	42220	5.88	2	159	U
750	<u>XP_017973236.1</u>	PREDICTED: elongation factor Tu, chloroplastic	52371	6.45	1	61	U
759	<u>POE53420.1</u>	Atp synthase subunit beta, mitochondrial	64272	5.31	1	77	U
765	<u>AGE09560.1</u>	SAM2-like protein, partial	43504	5.59	1	161	U
768	<u>EMS59548.1</u>	WW domain-containing oxidoreductase	101562	5.77	1	60	U
771	<u>KJB06906.1</u>	hypothetical protein B456_001G0323001, partial	53026	5.67	3	202	U
776	<u>EOY05144.1</u>	Serine hydroxymethyltransferase 4 isoform 1	52261	7.15	2	140	U
780	<u>EOX98632.1</u>	Aldehyde dehydrogenase 6B2	58291	8.27	1	57	U

786	<u>Q9LEI9.1</u>	Enolase 2	48112	5.92	2	156	U
790	<u>EOY20678.1</u>	Aldehyde dehydrogenase family 2 member B4	62275	7.63	4	262	U
800	<u>EOY29550.1</u>	Cytosol aminopeptidase family protein	60844	7.56	2	120	U
803	<u>OAY77536.1</u>	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	58111	6.55	3	218	U
818	<u>KVI11652.1</u>	Alkaline phosphatase-like, alpha/beta/alpha	55496	6.38	1	72	U
823	<u>EOY03621.1</u>	Insulinase (Peptidase family M16) protein isoform 1	59199	6.49	2	135	U
829	<u>OIW13599.1</u>	hypothetical protein TanjilG_07941	71080	5.13	1	82	U
830	<u>POO01438.1</u>	Cobalamin-independent methionine synthase	89589	7.59	2	134	U
831	<u>PPE00164.1</u>	hypothetical protein GOBAR_DD02817	71292	6.37	1	72	U
833	<u>pir IPC1156</u>	dnaK-type molecular chaperone (clone pMON9508) - maize (fragment)	7619	4.56	2	151	U
837	<u>AFD50421.1</u>	cobalamine-independent methionine synthase, partial	19210	5.35	1	59	U
841	<u>GAV62290.1</u>	2-Hacid_dh domain-containing protein/ACT domain-containing protein/2-Hacid_dh_C domain-containing protein	63300	6.56	1	58	U
847	<u>G3PC2_ORYSJ</u>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2	36921	6.34	2	111	U
849	<u>KJB15749.1</u>	hypothetical protein B456_002G193600	18726	8.73	2	134	U
862	<u>Q9SPB1.1</u>	Leghemoglobin reductase	56030	7.08	1	73	U
865	<u>XP_024155957.1</u>	protein PLASTID TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE 14-like	34720	5.10	1	60	U
867	<u>AFD50421.1</u>	cobalamine-independent methionine synthase, partial	19210	5.35	3	267	U

869	<u>AAF01700.1</u>	alcohol dehydrogenase, partial	23381	6.58	1	78	U
873	<u>EOY21247.1</u>	21 kDa seed protein	24264	5.71	4	278	U
885	<u>OMO86225.1</u>	hypothetical protein CCACVL1_09717	3288	12.18	1	48	U
886	<u>KZN01491.1</u>	hypothetical protein DCAR_010244	40304	5.17	2	138	U
907	<u>PPS00608.1</u>	hypothetical protein GOBAR_AA20050	85612	6.89	1	66	U
910	<u>PPS04809.1</u>	hypothetical protein GOBAR_AA15857	87133	7.22	1	79	U
911	<u>POF17536.1</u>	actin, gamma	37025	5.46	1	82	U
912	<u>AGT28276.1</u>	actin, partial	17307	5.23	1	74	U
918	<u>EOY05144.1</u>	Serine hydroxymethyltransferase 4 isoform 1	52261	7.15	2	164	U
928	<u>BAA01372.1</u>	mitochondrial F1-ATPase beta subunit	59137	6.30	2	159	U
929	<u>OMP08887.1</u>	hypothetical protein COLO4_06025	59648	6.06	5	357	U
931	<u>EOY25097.1</u>	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	73498	5.14	3	201	U
932	<u>Q01899.1</u>	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial	72721	5.95	2	139	U
933	<u>EOY32236.1</u>	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	64513	5.62	1	63	U
935	<u>CDP10525.1</u>	unnamed protein product	89943	6.76	4	314	U

¹MM, corresponde aos valores de massa molecular (kDa); ²pI ao ponto isoelétrico estimados pelo programa *Image Master 2D Platinum 7.0*; ³N, corresponde ao número de peptídeos sequenciados por MS/MS; ⁴Score corresponde ao valor da cobertura calculada pelo *Mascot*, ⁵Fold, proteínas diferencialmente expressas em raízes de plantas jovens do genótipo de cacau submetidas a compactação do solo e a localização de P. As proteínas com abundância aumentaram (↑) ou diminuíram (↓) ou (U) exclusivas de um dos tratamentos em resposta a compactação do solo e a localização de P. O número representa mudanças na taxa de abundância proteica no tratamento comparado ao controle.

Tabela 4. Proteínas totais de raízes de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 crescidas em latossolo amarelo coeso compactado (densidade de 1,7 kg dm⁻³) e com dose baixa de P e identificadas por espectrometria de massas.

N° SPOT	N° ACESSO	NOME DA PROTEÍNA ↑ ↓	MM ¹	pI ²	N ³	SCOR ⁴	Fold ⁵
2	<u>XP_008787626.1</u>	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: DNA ligase 6-like	158222	6.94	1	54	1.89↑
4	<u>NP_195634.1</u>	Isoflavone reductase homolog	34248	6.33	1	59	12.62↑
7	<u>EOY16613.1</u>	Alcohol dehydrogenase 1 isoform 1	42553	6.56	8	541	5.40↑
8	<u>AFR36919.1</u>	actin, partial	37145	5.57	5	345	3.27↑
12	<u>OAP00360.1</u>	Serine hydroxymethyltransferase 4	52141	6.57	3	224	1.91↑
16	<u>EOY06834.1</u>	diidrolipoil dehydrogenase 1	54234	7.23	2	122	5.08↓
17	<u>CDP00716.1</u>	ATP synthase subunit beta	45367	5.04	2	114	5.09↑
18	<u>XP_018806973.1</u>	PREDICTED: armadillo repeat-containing kinesin-like protein 2	100848	6.16	1	54	1.59↑
19	<u>XP_024983118.1</u>	elongation factor 1-alpha-like	48291	9.20	1	61	2.49↓
51	<u>PKA66456.1</u>	Putative E3 ubiquitin-protein ligase LIN-1	169475	5.71	1	61	U
53	<u>XP_007046221.1</u>	PREDICTED: mitochondrial outer membrane protein porin of 36 kDa	29839	6.59	4	256	U
54	<u>EOY02054.1</u>	Mitochondrial outer membrane protein porin 1 isoform 2, partial	23941	6.10	2	124	U
68	<u>EOY00822.1</u>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 isoform 2	29064	9.36	2	158	U
69	<u>ACR00032.1</u>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial	6805	5.04	1	62	U
73	<u>XP_021285963.1</u>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	36843	7.03	3	201	U
79	<u>EXC05646.1</u>	Protein disulfide isomerase-like 2-2	42023	7.00	1	54	U

87	<u>PPS03841.1</u>	hypothetical protein GOBAR_AA16817	39898	5.67	1	80	U
90	<u>EOY16615.1</u>	Alcohol dehydrogenase 1 isoform 3	40236	7.09	7	443	U
93	<u>EOX98363.1</u>	Cinnamyl alcohol dehydrogenase 1	39418	5.52	4	223	U
100	<u>PHU00511.1</u>	Actin-7	69483	6.74	3	188	U
104	<u>EOY30588.1</u>	Insulinase protein isoform 1	62907	6.54	3	197	U
105	<u>XP_008354423.1</u>	PREDICTED: mitochondrial-processing peptidase subunit alpha-like	55671	6.11	1	57	U
106	<u>EOY08109.1</u>	Enolase	48165	5.61	5	305	U
109	<u>OVA04639.1</u>	Enolase	48162	5.50	3	238	U
110	<u>PIN02627.1</u>	Translation elongation factor EF-1 alpha/Tu	49669	9.10	2	119	U
115	<u>XP_007044141.1</u>	PREDICTED: ATP synthase subunit beta, mitochondrial	59857	6.01	9	573	U
117	<u>P05492.1</u>	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	55847	6.23	4	285	U
119	<u>EOY16328.1</u>	PDI-like 1-1 isoform 1	65945	5.40	3	183	U
123	<u>PIN00055.1</u>	Molecular chaperones GRP78/BiP/KAR2, HSP70 superfamily	71747	5.36	3	198	U
131	<u>XP_020269965.1</u>	Isoflavone reductase-like protein	33588	5.54	1	74	U
135	<u>AGE09560.1</u>	SAM2-like protein, partial	43504	5.59	1	85	U
136	<u>XP_007051250.1</u>	PREDICTED: S-adenosylmethionine synthase 2	43483	5.61	3	224	U
141	<u>ONM00906.1</u>	enolase2	43956	4.99	1	70	U
144	<u>EOX99973.1</u>	ATP synthase alpha/beta family protein isoform 2	59985	6.01	13	779	U
145	<u>PPD78058.1</u>	hypothetical protein GOBAR_DD25021 [Gossypium barbadense]	63989	7.16	4	246	U

150	KVI00009.1	hypothetical protein Ccrd_021776	48291	9.20	1	58	U
154	KQL00984.1	hypothetical protein SETIT_014034mg	32602	6.92	1	70	U
158	EOY02054.1	Mitochondrial outer membrane protein porin 1 isoform 2, partial	23941	6.10	2	136	U
166	AAF04851.1	putative alcohol dehydrogenase	42527	6.56	3	244	U
167	PHU03284.1	actin	41996	5.45	3	195	U
170	EOX99973.1	ATP synthase alpha/beta family protein isoform 2	59985	6.01	8	494	U
171	PRQ21927.1	putative Heat shock protein 70 family	62014	6.24	5	311	U
172	EOY04747.1	Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate-independent isoform 2	48133	5.90	1	77	U
173	OAY79436.1	hypothetical protein ACMD2_23678, partial	34588	8.59	1	54	U
174	XP_017242190.1	PREDICTED: uncharacterized ATP-dependent helicase YprA	140132	7.18	1	55	U
177	PHU02388.1	putative mitochondrial-processing peptidase subunit beta	42770	5.56	1	57	U
181	XP_007017153.1	PREDICTED: cysteine proteinase RD21A	52581	5.09	1	65	U

¹MM, corresponde aos valores de massa molecular (kDa); ²pI ao ponto isoelétrico estimados pelo programa *Image Master 2D Platinum 7.0*; ³N, corresponde ao número de peptídeos sequenciados por MS/MS; ⁴Score corresponde ao valor da cobertura calculada pelo *Mascot*, ⁵Fold, proteínas diferencialmente expressas em raízes de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas a compactação do solo e a localização de P. As proteínas com abundância aumentaram (↑) ou diminuíram (↓) ou (U), exclusivas de um dos tratamentos em resposta a compactação do solo e a localização de P. O número representa mudanças na taxa de abundância proteica no tratamento comparado ao controle.

Tabela 5. Proteínas totais de raízes de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 crescidas em latossolo amarelo coeso compactado (densidade de 1,7 kg dm⁻³) e com dose ideal de P e identificadas por espectrometria de massas.

N° SPOT	N° ACESSO	NOME DA PROTEÍNA	MM ¹	pI ²	N ³	SCOR ⁴	Fold ⁵
4	PKA66456.1	Putative E3 ubiquitin-protein ligase LIN-1	169475	5.71	1	60	12.62↓
16	EOY06834.1	diidrolipoil dehydrogenase 1	52106	5.80	1	87	5.68↑
20	CDP10525.1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine	89943	6.76	2	124	3.38↓
21	KJB15749.1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	18726	8.73	3	163	1.63↓
22	EOY21251.1	21 kDa seed protein	24263	5.94	7	485	24.73↓
24	XP_007036743.1	PREDICTED: 21 kDa seed protein	24423	5.70	9	356	1.55↓
25	EOY21247.1	21 kDa seed protein	24264	5.71	6	497	2.36↑
36	POO02047.1	NAD(P)-binding domain containing protein	42415	5.59	1	60	17.71↓
39	EOY24843.1	Monodehydroascorbate reductase 6 isoform 1	54485	8.79	2	139	10.61↓
42	EOY08109.1	Enolase	48165	5.61	3	83	1.95↑
192	XP_024155957.1	protein PLASTID TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE 14-like	34720	5.10	1	57	U
200	OMP04112.1	Lipoxygenase, LH2	21615	5.31	1	66	U
202	C0HK70.1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	15232	5.48	1	60	U
206	AFC01198.1	eukaryotic translation initiation factor	17716	5.60	1	60	U
207	OTG11461.1	putative cyclophilin-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase domain-containing protein	18553	8.84	2	60	U

209	KVI01912.1	Regulator of ribonuclease activity A	17906	5.68	1	63	U
210	XP_007041920.1	PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	18476	8.29	11	388	U
212	PIN08732.1	40S ribosomal protein S2	17940	9.02	2	122	U
219	AAL85660.1	trypsin inhibitor, partial	16845	4.64	3	235	U
229	XP_008787626.1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: DNA ligase 6-like	158222	6.94	1	57	U
230	AAV41233.1	putative 21 kDa trypsin inhibitor	24449	8.73	1	79	U
232	AAQ13823.1	osmotin-like pathogenesis-related protein, partial	26943	7.85	1	79	U
234	CDP00580.1	unnamed protein product	28011	9.16	2	116	U
241	EOY30200.1	Chaperonin 20 isoform 2	26752	8.55	2	149	U
244	XP_017977172.1	PREDICTED: proteasome subunit beta type-4	27716	7.03	3	131	U
249	PIN05818.1	20S proteasome, regulatory subunit alpha type PSMA3/PRE10	27610	5.92	1	60	U
250	EOY18135.1	Triosephosphate isomerase isoform 1	32446	8.05	3	196	U
251	EOY30235.1	20S proteasome subunit PAA2 isoform 2	20666	10.31	2	121	U
255	KHG06366.1	Proteasome subunit alpha type-2-B -like protein	11628	9.70	1	59	U
260	EOY18399.1	Chalcone-flavanone isomerase family protein	33647	8.82	2	149	U
264	XP_007024947.1	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-2-A	25699	5.51	5	287	U
266	KHG04433.1	Proteasome subunit alpha type-6	25216	6.60	2	142	U
267	EOY34025.1	Triosephosphate isomerase	27497	5.54	4	229	U
270	EOX97760.1	Triosephosphate isomerase isoform 1	43325	6.83	4	334	U

277	XP_007046221.1	PREDICTED: mitochondrial outer membrane protein porin of 36 kDa	29839	6.59	3	179	U
278	PPS06187.1	hypothetical protein GOBAR_AA14453	32201	6.82	1	61	U
280	EOX91677.1	Voltage dependent anion channel 2	29410	8.88	1	61	U
281	EOY30597.1	HAD superfamily isoform 1	36682	6.61	1	68	U
288	EOX98837.1	Cationic peroxidase 2 precursor	55145	9.41	5	324	U
291	PON57398.1	Peroxidase	36538	9.13	1	87	U
295	EOX93241.1	Aspartic proteinase A1 isoform 1	60494	5.04	2	112	U
296	OVA03388.1	Glyoxalase/fosfomycin resistance/dioxygenase domain	32325	7.68	1	58	U
303	EOY11131.1	DNA-damage-repair/toleration protein (DRT102)	34891	5.18	4	304	U
305	A2Y8E0.1	Ferredoxin--NADP reductase	40358	8.72	1	57	U
306	XP_007036696.1	PREDICTED: guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	36510	7.03	7	387	U
307	EOY11151.1	Cysteine synthase isoform 1	34424	5.22	5	304	U
311	KVI11904.1	Ribosomal protein 60S	38925	6.38	1	55	U
313	EOX98363.1	Cinnamyl alcohol dehydrogenase 1	39418	5.52	4	276	U
344	EOY14104.1	Phosphoglycerate kinase isoform 1	42379	5.89	3	181	U
384	EOY16613.1	Alcohol dehydrogenase 1 isoform 1	42553	6.56	10	618	U
396	BAA01372.1	mitochondrial F1-ATPase beta subunit	59137	6.30	1	85	U
398	XP_007044141.1	PREDICTED: ATP synthase subunit beta, mitochondrial	59857	6.01	16	869	U
409	EOY16328.1	PDI-like 1-1 isoform 1	65945	5.40	7	381	U

413	EOY26303.1	Vacuolar ATP synthase subunit A isoform 1	73558	5.64	3	193	U
415	XP_007046957.1	PREDICTED: succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit 1, mitochondrial	70449	6.19	4	315	U
416	EOY00499.1	DC1 domain-containing protein	65561	4.96	5	327	U
420	PSS00297.1	Heat shock protein 70 family protein	75130	5.35	1	44	U
427	EOX96247.1	Transketolase	81006	6.34	5	365	U
429	XP_018806973.1	PREDICTED: armadillo repeat-containing kinesin-like protein 2	100848	6.16	1	54	U
433	EOY10525.1	Cobalamin-independent synthase family protein isoform 1	85035	6.15	5	391	U
441	KHN00016.1	40S ribosomal protein S5	22624	9.62	3	178	U
444	EOY23792.1	60S ribosomal protein L9-1 isoform 1	28466	9.48	3	130	U
446	EOY02054.1	Mitochondrial outer membrane protein porin 1 isoform 2, partial	23941	6.10	2	114	U
451	PPE00837.1	hypothetical protein GOBAR_DD02114	25983	5.88	1	68	U
452	EOY20710.1	Carbonic anhydrase 2, CA2	29877	5.41	1	55	U
453	AIZ00507.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, partial	21578	6.67	1	78	U
461	ABE01138.1	elongation factor 1-alpha, partial	32827	8.18	2	125	U
462	APO15832.1	elongation factor 1-alpha	49558	9.19	1	50	U
464	EOY07767.1	GTP binding Elongation factor Tu family protein	63093	8.99	2	118	U
467	EOY33086.1	GTP binding Elongation factor Tu family protein isoform 2	38046	9.86	4	258	U
470	XP_007033712.2	PREDICTED: heat shock 70 kDa protein 6, chloroplastic	75577	5.29	7	496	U
481	AAF04851.1	putative alcohol dehydrogenase	42527	6.56	4	289	U

486	PKA61016.1	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	16641	5.43	3	120	U
487	PNY00099.1	60S ribosomal protein I22-2-like	14266	9.47	1	61	U
490	EOX98019.1	Glycine-rich RNA-binding protein 7	17363	8.75	3	138	U
495	PSS01446.1	Photosystem I reaction center subunit II like	22716	9.78	1	65	U
496	PHU04029.1	60S ribosomal protein L11	91101	9.64	2	133	U
498	AAF01037.1	NADH ubiquinone oxidoreductase PSST subunit	23935	9.53	1	65	U
499	OMO67728.1	Thaumatococcus	28067	8.27	1	69	U
500	XP_021299693.1	mitochondrial outer membrane protein porin of 36 kDa-like	29752	7.71	5	336	U
502	EOY02054.1	Mitochondrial outer membrane protein porin 1 isoform 2, partial	23941	6.1	2	131	U
505	EOY03376.1	Voltage dependent anion channel 1	29642	8.39	2	137	U
519	AVQ04668.1	phosphoglycerate kinase	42386	6.28	1	78	U
520	POE57248.1	presenilin-like protein	65403	8.64	1	50	U
521	PON32324.1	Target SNARE coiled-coil domain containing protein	11182	5.46	5	56	U
530	CDP01929.1	unnamed protein product	35264	8.76	1	59	U
533	EOY02670.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 isoform 2	36856	8.51	10	504	U
536	KEH25421.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	34963	7.02	3	214	U
537	PPE01492.1	hypothetical protein GOBAR_DD01464	37255	7.02	3	184	U
552	EOY16613.1	Alcohol dehydrogenase 1 isoform 1	42553	6.56	5	344	U
561	PHU11353.1	12-oxophytodienoate reductase 3	44209	8.70	1	76	U

564	EOX91677.1	Voltage dependent anion channel 2	29410	8.88	2	130	U
566	PSBO_PEA	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	35100	6.05	3	205	U
575	XP_017983624.1	PREDICTED: peroxidase 15	37613	4.61	2	185	U
577	PHU00511.1	Actin-7	69483	6.74	3	205	U
580	ACR00032.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial	6805	5.04	1	76	U
583	EOY29550.1	Cytosol aminopeptidase family protein	60844	7.56	4	284	U
591	EOY07767.1	GTP binding Elongation factor Tu family protein	63093	8.99	3	184	U
593	AIX10947.1	putative catalase	57463	6.94	3	193	U
594	ADR01107.1	catalase 3, partial	42725	6.00	1	44	U
595	EOY05144.1	Serine hydroxymethyltransferase 4 isoform 1	52261	7.15	4	312	U
602	ONM02484.1	Alanine--tRNA ligase	4079	8.71	3	44	U
622	POO01438.1	Cobalamin-independent methionine synthase	89589	7.59	1	56	U
628	KHG00606.1	Sucrose synthase	94323	6.03	2	128	U
630	EOY30166.1	Sucrose synthase 4 isoform 2	93343	6.13	2	161	U
656	EOY25798.1	Phospholipase D alpha 2 isoform 3	76337	5.65	2	118	U
663	EOY01474.1	Aconitase 3	109266	8.25	2	111	U
673	EOY10525.1	Cobalamin-independent synthase family protein isoform 1	85035	6.15	4	238	U
683	XP_015934969.1	NADP-dependent malic enzyme	67204	8.27	2	114	U
686	XP_020268220.1	pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha	67981	6.56	1	75	U

689	ALI57372.1	NADP-dependent malic enzyme	65806	5.82	2	132	U
691	XP_021775106.1	probable mitochondrial-processing peptidase subunit beta, mitochondrial	58445	6.40	1	54	U
694	EOY26303.1	Vacuolar ATP synthase subunit A isoform 1	73558	5.64	5	326	U
704	PSS02684.1	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	63342	6.32	2	152	U
706	EOY32878.1	Pyrimidine 2 isoform 1	58303	5.74	1	77	U

¹MM, corresponde aos valores de massa molecular (kDa); ²pI ao ponto isoelétrico estimados pelo programa *Image Master 2D Platinum 7.0*; ³N, corresponde ao número de peptídeos sequenciados por MS/MS; ⁴Score corresponde ao valor da cobertura calculada pelo *Mascot*, ⁵Fold, proteínas diferencialmente expressas em raízes de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 submetidas a compactação do solo e a localização de P. As proteínas com abundância aumentaram (↑) ou diminuíram (↓) ou (U), exclusivas de um dos tratamentos em resposta a compactação do solo e a localização de P. O número representa mudanças na taxa de abundância proteica no tratamento comparado ao controle.

3.4 Discussão

Os resultados demonstraram que o estresse mecânico por compactação do solo provocou uma alteração no perfil proteico de raízes das plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, já que houve uma redução no número de proteínas nas raízes, quando as plantas foram submetidas ao estresse mecânico (Figura 2 B). Contudo, no solo compactado e com dose ideal de P, obtivemos uma melhor resposta das raízes das plantas, quanto ao número de proteínas. Provavelmente, as raízes das plantas foram mais tolerantes ao estresse mecânico, provocado pela compactação do solo, na presença de dose ideal de P (Figura 2 C).

A produtividade do cacau é influenciada por vários fatores, dentre eles podemos citar o clima, o solo e as práticas culturais, que incluem adubação e irrigação. A nutrição mineral é essencial, uma vez que eleva a produtividade e melhora a qualidade dos frutos (Santana et al., 1988). Os nutrientes fornecidos por meio da adubação química devem ser aplicados, levando em consideração as exigências nutricionais da planta. Dentre os seis elementos minerais essenciais (N, P, K, Ca, Mg e S), o P é o mais limitante da produção de cacau (Gama-Rodrigues, 2004). Nos solos tropicais muito intemperizados e argilosos, a capacidade de fixação de P é elevada, reduzindo sua disponibilidade às plantas. O nutriente P atua como componente estrutural de membranas celulares, faz parte de compostos responsáveis pela fixação do CO₂ atmosférico e pelo metabolismo de açúcares, sendo fundamental para que as plantas alcancem seu potencial máximo (Santana et. al., 1988).

Solos brasileiros, como os solos de tabuleiros costeiros (TC), são deficientes em P (Silva et al., 1967), tornando-se necessária a utilização de adubos químicos para suprir a deficiência. Além disso, quando o crescimento das plantas é limitado pela deficiência de P no solo, há emissão de um maior número de raízes, em busca de aumentar a chance de capturar o nutriente (Naido et al., 1978; Kim e Li, 2016; Razaq et al., 2017). Portanto, existe um custo fisiológico para as plantas, cujas respostas refletem diretamente no proteoma, inclusive por meio da redução dos gastos energéticos em vias

metabólicas ligadas ao crescimento e desenvolvimento, promovendo modificações no perfil e no acúmulo de proteínas.

As técnicas de análise proteômica, aliada às ferramentas de bioinformática, são determinantes para a elucidação de informações das alterações que podem ocorrer na expressão de proteínas de um genoma, em condições adversas (Pandey e Mann, 2000). A utilização da técnica de SDS-PAGE para separação de proteína é relevante para fornecer informações preliminares ao procedimento do gel 2-DE (González-Fernández et al., 2010). Além disso, o resultado do presente trabalho mostrou eficiência no método de extração de proteína, o que resultou em massa proteica suficiente para fazer triplicatas de gel 2-DE (Figura 2).

No solo compactado e com doses baixa e ideal de P, a maioria das proteínas foi classificada como pertencentes ao processo de metabolismo de compostos orgânicos (Figura 3). Algumas destas proteínas foram agrupadas em mais de um processo, demonstrando as suas participações em várias vias de sinalizações. A maior parte das proteínas detectada está envolvida no metabolismo energético, como via glicolítica, fermentação e metabolismo de carboidratos. Isto, por sua vez, pode estar relacionado à degradação das reservas energéticas ocorrida durante o estresse mecânico provocado pela compactação do solo, contribuindo para a manutenção da produção de energia na forma de ATP, utilizada para o crescimento e o desenvolvimento das raízes.

As plantas produzem oxigênio (O_2) por meio da fotossíntese, só que este O_2 não é difundido de maneira eficiente para os órgãos não fotossintéticos das plantas, uma vez que seu transporte é passivo (van Dongen e Licausi, 2015). Em solos compactados, a exemplo dos solos de tabuleiros costeiros, a coesão provoca a obstrução dos macroporos e, como consequência, há redução na permeabilidade e aeração do solo, tornando o seu ambiente como hipóxico/anóxico (Aguiar Netto e Nacif, 1988), inapropriado para o crescimento e desenvolvimento do sistema radicular das plantas. Pois, o oxigênio molecular é indispensável para a maioria das reações bioquímicas das plantas, como o metabolismo energético (respiração), induzindo respostas à medida que as concentrações de O_2 diminuem e são rapidamente revertidas quando reoxigenadas (van Dongen e Licausi, 2015).

A manutenção da glicólise e da fermentação em ambientes hipóxicos/anóxicos foram demonstrados como características potenciais que promovem tolerância a tais condições de baixa disponibilidade de O₂ (Bertolde et al. 2014). Logo, genes associados aos processos fermentativos são induzidos, permitindo que a planta utilize a glicose para produzir energia na forma de ATP (van Dongen e Licausi, 2015). No presente estudo, foram identificados nas raízes das plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas ao estresse mecânico por compactação do solo e a localização de doses de P, proteínas do metabolismo energético, a exemplo de (i) ATP sintase, como diferencialmente acumulada, que teve um maior acúmulo (fold 5,08) no tratamento compactado com dose baixa de P (spot 17) e isoformas exclusivas (spots 117, 144, 170) (Tabela 4); (ii) álcool desidrogenase e suas isoformas como exclusivas em solos compactados com dose baixa (spot 4 número não corresponde e 90) (Tabela 4) e ideal de P (spot 384) (Tabela 5); (iii) isorformas de enolase exclusivas, no solo compactado e com doses baixa (spots 106, 109) (Tabela 4) e ideal de P (spot 384) (Tabela 5); (iv) gliceraldeído-3-fosfato, no solo compactado e com doses baixa (spots 68, 173) (Tabela 4) e ideal de P (spots 453, 533, 580) (Tabela 5) e (v) a isoformas 2 da sintase da sacarose 4 sendo exclusiva para o solo compactado e com dose ideal de P (spot 630) (Tabela 5), o que evidencia mecanismos de tolerância ao referido estresse mecânico no solo.

Outras proteínas DEPs foram também supra-reguladas nas raízes das plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 durante o estresse mecânico provocado pela compactação do solo. Dentre elas, inclui-se a isoforma 4 serina hidroximetiltransferase com um acúmulo de 1,91 vezes em relação ao controle (spot 12) no solo compactado e com baixa dose P (tabela 4), que atua no metabolismo geral de carbono (Engel et. al., 2011). Todavia, no solo compactado e com dose ideal de P (tabela 4), foram supra-reguladas as proteínas diidrolipoil desidrogenase (fold 5,68) (spot 16), que está envolvida no processo de homeostase celular e a peptidil-prolil cis-trans isomerase (fold 2,36) (spot 25), que atua impedindo a quebra das ligações peptídicas por meio da regulação negativa das endopeptidases (Tabelas 4 e 5). Estas proteínas atuam em processos metabólicos de compostos orgânicos, demonstrando que

as raízes de cacau submetidas à compactação do solo e a doses de P, requerem, além de altos níveis de energia, mecanismos de reparo aos danos causados pelo estresse mecânico no solo. Além disso, a diferença no acúmulo das proteínas identificadas pode estar relacionada à síntese de novas proteínas, por meio da expressão gênica e de modificações pós-traducionais (Reis et al., 2018).

Neste trabalho foi verificado também que grande parte das proteínas identificadas, nos diversos tratamentos avaliados, está relacionada com atividades de oxirredução (Figura 3). A baixa disponibilidade de O₂ no solo afeta diferentes processos morfofisiológicos das plantas (Kozlowski, 2002). Assim, quando uma planta se encontra em ambientes com baixa disponibilidade de O₂, ocorre uma redução da taxa fotossintética (Bertolde et al. 2012; Branco et al. 2017). Além disso, baixos níveis de O₂ provocam mudanças na síntese e degradação de proteínas e em todo metabolismo celular (Bailey-Serres e Voesenek, 2008). No presente trabalho, estas mudanças na síntese de proteínas foram verificadas pelo aumento de 12,6 vezes na expressão da proteína homóloga isoflavona redutase (spot 4) e de 5,4 vezes da proteína álcool desidrogenase (ADH) (spot 7) no solo compactado e com baixa dose de P (Tabela 4) e da proteína diidrolipoil desidrogenase 1 (fold 5,68) (spot 16) no solo compactado e com dose ideal de P (Tabela 5). A proteína diidrolipoil desidrogenase está relacionada a processos fotorrespiratórios, gerando grandes quantidades de NADH nos tecidos e também atuando no balanço redox (Timm et al., 2015).

As proteínas isoflavonas redutase possuem funções importantes nas respostas das plantas a vários estresses abióticos e bióticos (Cheng et al., 2015). Outras formas de isoflavonas redutase foram expressas como exclusivas no solo compactado e com dose baixa de P (spot 131) (Tabela 4). Algumas isoformas catalisam reações distintas de oxirredutase, outras estão envolvidas na via biossintética da fitoalexina isoflavonóide em plantas (Cheng et al., 2015). A proteína álcool desidrogenase (ADH) está envolvida em muitas rotas metabólicas, cuja principal função está relacionada com a catalisação da oxidação do etanol, assim como a redução do acetaldeído. Desta forma, o etanol produzido em nível radicular, em condições de baixa disponibilidade de

oxigênio no solo compactado, é rapidamente eliminado e, ou transportado das raízes para as folhas (Leblová et al., 1977). Portanto, nas folhas ocorre a conversão de etanol em acetil-CoA via ADH e que é utilizado no metabolismo foliar (Penachova et al., 2010). A super expressão do gene que codifica para ADH foi também observada em plantas jovens de cacau submetidas ao alagamento do solo (Bertolde et al., 2010). Isto demonstra a existência de mecanismos similares à tolerância em solos deficientes em oxigênio. Além disso, outras isoformas de ADH foram exclusivas em raízes das plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 crescidas em solo compactado e com doses baixa (spot 90 e 166) e ideal de P (spot 384), mostrando a tentativa de reparar os danos causados nas plantas pelo estresse mecânico (Tabela 4 e 5).

Algumas proteínas exclusivas também desempenham papéis importantes no processo de oxirredução. A exemplo da cinamil álcool desidrogenase (spot 313) que catalisa a redução de cinamaldeídos para seus derivados de álcool, atuando no processo de polimerização de lignina (Preisner et al., 2018). Esta proteína está associada à biossíntese de celulose na parede celular, conferindo rigidez e resistência contra ataques de patógenos e estresses mecânicos. Ao analisarem o efeito do estresse mecânico em *Solanum lycopersicum*, Saidi et al. (2009) perceberam que o enrijecimento da parede celular estava associado com a indução de proteínas relacionadas ao processo de lignificação. Outra proteína envolvida no processo de oxirredução é a ferredoxina – NADP redutase (spot 305), que participa de processos fotossintéticos que incluem a redução de NADP⁺, a fotofosforilação cíclica, a via tiorredoxina, além de ser uma enzima chave na assimilação de dióxido de carbono (Green et al., 1991). A ferredoxina – NADP redutase já foi relatada em tecidos não fotossintéticos de plantas superiores, incluindo em raízes de *Zea mays* (Suzuki et al., 1985). No presente trabalho, a presença desta enzima em raízes de cacau submetidas ao estresse mecânico pela compactação do solo e a doses de P, demonstra sua participação na manutenção da homeostase celular sob condições de estresse.

Quando as plantas são submetidas a estresse mecânico por compactação do solo e localização de doses de P, ocorre um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO), que não é eliminado pelo metabolismo antioxidativo enzimático e não enzimático, provocando estresse oxidativo nas

plantas (Tosto, 2015). Essas ERO podem ser utilizadas como moléculas sinalizadoras para ativar mecanismos de tolerância das plantas a estresses bióticos e abióticos, por meio de enzimas como dismutase do superóxido, catalase, peroxidases, dentre outras, que atuam no processo de eliminação de ERO, protegendo as plantas submetidas a estresses (Mittler, 2002).

No presente trabalho, ao analisar as DEPs, nas raízes de plantas jovens do genótipo CCN 51 crescidas em solo compactado e com dose baixa de P, observou-se um acúmulo das proteínas DNA ligase 6 (fold 1,89) (spot 2), isoflavona redutase (fold 12,62) (spot 4) e serina hidroximetiltransferase 4 (fold 1,91) (spot 12), em relação ao tratamento controle (Tabela 4). Por outro lado, no solo compactado e com dose ideal de P, verificou-se um maior acúmulo, em relação ao controle, da proteína diidrolipoil desidrogenase 1 (fold 5.68) (spot 16). Estes mecanismos de resposta das plantas, em condição de estresse mecânico, estão associados com a reparação de danos em nível celular. A enzima DNA ligase está associada à reparação de danos em nível de DNA (Wanterwoth et al., 2009). As isoflavonas redutases são classificadas como pertencentes ao processo biológico de repostas ao estresse, por ser uma das principais enzimas que atuam na síntese de fitoalexinas, além de apresentarem forte atividade antioxidante e potencial de eliminação de ERO (Cheng et al., 2015). Por outro lado, a serina hidroximetiltransferase 4, além de atuar no metabolismo geral do carbono, atua em resposta ao íon cádmio (Cd) (Tobón, 2015). Segundo estes autores, a sua expressão é justificada pela presença de Cd em adubos químicos fosfatados fornecidos as plantas, que é absorvido pelas raízes. Além disso, a proteína diidrolipoil desidrogenase 1, além de estar relacionada a processos fotorrespiratórios, se enquadra no processo de resposta ao estresse, visto que responde ao íon Cd.

Dentre as proteínas exclusivas encontradas em raízes, quando as plantas jovens de cacau foram crescidas em solo compactado e com baixa dose de P, se encontram a gliceraldeído-3-fosfato e suas isoformas (spots 68, 69, 73) e as proteínas de choque térmico de ordem 70 (spots 171 e 123), entre outras (Tabela 4). Por outro lado, quando estas plantas foram crescidas em solo compactado e com dose ideal de P, foram também identificadas proteínas exclusivas sintetizadas nas raízes, a exemplo da dismutase do superóxido (Cu-

Zn) (spot 202), isoforma 2 da chaperonina 20 (spot 241), precursor da cátião peroxidase 2 (spot 288) e peroxidase (spot 291) (Tabela 5). A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase pode estar associada à transdução de sinais de ERO, em respostas a estresse abiótico, já que possui sítios catalíticos de resíduos de cisteínas que estão propensos a oxidação por moléculas de peróxido de hidrogênio (Guo et al., 2012). Já foram observados aumentos na expressão (Yang et al., 1993) e na concentração desta proteína em resposta a estresse (Guo et al., 2012). Além disso, em *Arabidopsis thaliana* foi relatado a influência dessa enzima no desenvolvimento de raiz (Munõz-Bertomeu et al., 2009), o que evidencia sua expressão em raízes de plantas crescidas em solos compactados.

No amplo espectro de suas funções celulares, as chaperonas moleculares HSP70 ou proteínas de choque térmico, atuam na cascata de transdução de sinais, mediando a regulação da expressão gênica e mantendo a homeostase de células estressadas (Mishra et al., 2018). As plantas, por sua vez, respondem a diversos tipos de estresse, induzindo HSP 70, bem como outras proteínas que atuam em resposta ao estresse, evidenciando mecanismos de respostas similares (Mishra et al., 2018).

As plantas possuem uma família de enzimas conhecidas como dismutase do superóxido (SOD), que protegem as células por meio da dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio. Desta forma, atuam na linha de frente em defesa do excesso de ERO (Gill et al., 2014). A classe Cu-Zn SOD é a mais abundante nas plantas e sua expressão no tratamento com solo compactado com dose ideal de P, está associada ao estresse oxidativo nas células e a sinalização para proteção contra o estresse. A chaperonina 20 é uma chaperona contendo ferro (Fe) que atua ativando a dismutase do superóxido dependente de Fe (Fe-SOD). A enzima Fe-SOD é outra isoforma da metaloenzima que necessita de um metal específico como cofator para a sua atividade.

A presença do precursor da peroxidase catiônica, está relacionada à atividade catalítica de muitas reações de oxirredução na presença de H₂O₂ como agente oxidante. Existem várias enzimas de peroxidase catiônica em plantas, cujas localizações em nível celular se restringem às paredes celulares

e aos vacúolos, atuando na síntese de lignina e na extensibilidade da parede celular (Takeda et al., 2003). A sua expressão em nível radicular, em resposta das plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 ao estresse mecânico provocado pela compactação do solo, associado à localização de P, é muito importante, em razão de participarem tanto da construção quanto da regulação da parede celular (Whetten et al., 1998). Por outro lado, as peroxidases são outro grupo de enzimas que estão envolvidas em vários processos fisiológicos em plantas. Estas enzimas participam das respostas a estresses bióticos e abióticos, eliminando o excesso de ERO, além de estarem envolvidas na biossíntese de lignina (Vicuna, 2005). Logo, as raízes das plantas jovens de cacau, submetidas ao estresse mecânico e à variação de doses de P no solo, apresentaram uma cascata de sinalizações que levaram a respostas complexas, envolvendo sistemas antioxidantes que atuam na manutenção das perturbações do equilíbrio redox.

Todas as DEPs, classificadas no processo biossintético, foram mais acumuladas no solo compactado e com dose baixa de P em relação ao tratamento controle. Dentre essas proteínas expressas se encontraram a DNA ligase 6 (fold 1,89) (spot 2), homóloga da isoflavone reductase (fold 12,62) (spot 4), actina 7 (fold 3,27) (spot 8), serina hidroximetiltransferase (fold 1,91) (spot 12) e subunidade beta da ATP sintase (fold 5,09) (spot 17) (Tabela 4). No entanto, nenhuma das proteínas identificadas do processo biossintético em raízes de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, crescidas em solo compactado e com dose ideal de P, foram supra-reguladas (Tabela 5). Por outro lado, como proteína exclusiva, representante do processo biossintético, de raízes de plantas jovens de cacau crescidas em solo compactado e com dose baixa de P, foi expressa a ATP sintase e suas isorformas, como a subunidade alpha (spot 117) e a subunidade alpha e beta isoform 2 (spots 144 e 170), ao passo que para as raízes de plantas crescidas em solo compactado e com dose ideal de P foram expressas a subunidade beta ATP sintase (spot 398) e a subunidade vacuolar ATP sintase isoformas 1 (spot 413) (Tabelas 4 e 5).

As proteínas DNA ligase 6, isoflavona redutase e serina hidroximetiltransferase já relatadas anteriormente, participam de processos

biossintéticos de DNA, fitoalexinas e serina, respectivamente. O acúmulo destas proteínas está relacionado, possivelmente, com a tolerância das plantas de cacau CCN 51 ao estresse mecânico por compactação do solo e a doses de P. Por outro lado, a actina-7 é expressa em tecidos vegetais jovens e a maioria de suas respostas está relacionada a estímulos fisiológicos associados ao processo de crescimento de raízes (Gilliland et. al., 2003). Em *A. thaliana* esta proteína desempenha um papel essencial na germinação de sementes e no crescimento de raízes (Lu et. al., 2003). Já a proteína ATP sintase catalisa a síntese de moléculas de ATP, por meio do processo de fosforilação oxidativa, fornecendo energia para o funcionamento celular. A proteína ATP sintase vacuolar é composta por diferentes subunidades proteicas, e no vacúolo é responsável por fornecer energia para transporte de íons metálicos, sendo importante para a manutenção de ATP celular e de respostas ao estresse (Ratajczak, 2000).

3.5 Conclusões

As proteínas expressas nas raízes das plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51 crescidas em solo compactado, associado com a localização de doses baixa e ideal de P, estão envolvidas com o metabolismo de compostos orgânicos, respostas ao estresse, processos biossintéticos e processos de oxirredução. Houve um aumento na expressão destas proteínas nas raízes crescidas no solo compactado, associada com a localização da dose ideal de P. A maior parte das proteínas, identificadas nos tratamentos de compactação do solo, pertenceu ao grupo de proteínas envolvidas no metabolismo de compostos orgânicos.

As proteínas de maior expressão, pertencentes ao metabolismo de compostos orgânicos, estão relacionadas à degradação de reservas energéticas, durante o estresse mecânico provocado pela compactação do solo. Estas proteínas contribuem para a manutenção da produção energia na forma de ATP, utilizada para o crescimento de raízes no solo compactado e com baixa disponibilidade de oxigênio.

A diferença na abundância de proteínas, em cada processo biológico, demonstrou que as raízes de plantas jovens de cacau do genótipo CCN 51 possuem diferentes mecanismos de resposta ao estresse mecânico. Estas alterações promovem a manutenção da homeostase celular e estimulam o crescimento do sistema radicular durante o processo de estresse.

3.6 Referências

Aguiar Netto AO, Nacif PGS (1988) Caracterização morfológica e físico-hídrica de solos representativos do Recôncavo Baiano. I Determinação da capacidade de campo “*in situ*” e suas relações com dados obtidos em laboratório. Cruz das Almas BA: UFBA 59 p

Almeida A-AF, Valle RR (2009) Cacao: ecophysiology of growth and production: In: Ecophysiology of Tropical Tree Crops, Nova Science Publishers Inc. Hauppauge NY p. 37-70

Almeida A-AF, Valle RR (2007) Ecophysiology of the cacao tree. Brazilian Journal of Plant Physiology 19: 425-448

Bailey-Serres J, Voesenek LACJ (2008) Flooding stress: acclimations and genetic diversity. Annu Rev Plant Biol 59: 313–339

Bertolde FZ, Almeida A-AF, Pirovani CP (2014) Analysis of Gene Expression and Proteomic Profiles of Clonal Genotypes from *Theobroma cacao* Subjected to Soil Flooding. PLoS ONE 9 (10)

Bertolde FZ, Almeida A-AF, Pirovani CP, Gomes FP, Ahnert D, et al. (2012) Physiological and biochemical responses of *Theobroma cacao* L. genotypes to flooding. Photosynthetica 50 (3): 447–457.

Bertolde FZ, Almeida A-AF, Corrêa RX, Gomes FP, Gaiotto FA, et al. (2010) Molecular, physiological and morphological analysis of waterlogging tolerance in clonal genotypes of *Theobroma cacao* L. Tree Physiol. 30: 56–67.

Branco MCS, Almeida A-AF, Dalmolina AC, Ahnert D, Baligar VC (2017) Influence of low light intensity and soil flooding on cacao physiology. Scientia Horticulturae 217 243–257

Braam J (2005) In touch: Plant responses to mechanical stimuli. *New Phytol* 165: 373 – 389

Chehab EW, Yao C, Henderson Z, Kim S, Braam J (2012) Arabidopsis touch-induced morphogenesis is jasmonate mediated and protects against pests. *Curr. Biol* 22: 701–706.

Chehab EW, Kaspi R, Savchenko T, Rowe H, Negre-Zakharov F, Kliebenstein D, Dehesh K (2008) Distinct roles of jasmonates and aldehydes in plant-defence responses. *PLoS ONE* 3: e1904

Chen H, Wilkerson CG, KucharJA, Phinney BS, Howe GA (2005) Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 102: 19237–19242

Cheng Q, Li N, Dong L, Zhang D, Fan S, Jiang L, Wang X, Xu P, Zang S (2015) Overexpression of Soybean Isoflavone Reductase (*GmIFR*) Enhances Resistance to *Phytophthora sojae* in Soybean. *Front Plant Sci* v 6

Embrapa (2009) Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. – 2º edição revista e ampliada - Brasília DF p 627

Figueira A, Janick J, Levy M, Goldsbrough P (1994) Reexamining the Classification of *Theobroma cacao* L. Using Molecular Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119 (5):1073–1082

Engel N, Ewald R, Gupta KJ, Zrenner R, Hagemann M, Bauwe H (2011) The Presequence of Arabidopsis Serine Hydroxymethyltransferase SHM2 Selectively Prevents Import into Mesophyll Mitochondria. *Plant Physiol* Vol 157

Gama-Rodrigues AC (2004) Ciclagem de nutrientes em sistemas agroflorestais na região tropical: Funcionalidade e Sustentabilidade, In: MÜLLER, M.W.; Gama-Rodrigues AC, Brandão ICFL, Serôdio MHCF. *Sistemas agroflorestais*,

tendência da agricultura ecológica nos trópicos: sustento da vida e sustento de vida. 1ª ed. Ilhéus, Ba: Sociedade Brasileira de Sistemas Agroflorestais: Comissão Executiva do plano da lavoura cacauera 67-88

Gill SS, Anjum NA, Ritu Gill R, Yadav S, Hasanuzzaman M, Fujita M, Mishra P, Sabat SC, Tuteja N (2014) Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environ Sci Pollut Res* (14):10375 – 10394

Gilliland LU, Pawloski LC, Kandasamy MK, Meagher RB (2003) The ACT7 gene from *Arabidopsis* Actin plays an essential role in germination and root growth. *Plant J*. 33 (2): 319 - 328

González-Fernández R, Prats E, Jorrín-Novo JV (2010) Proteomics of plant pathogenic fungi. *Journal of biomedicine and biotechnology* 932527

Grant CA, Flaten DN, Tomasiewicz DJ, Sheppard SC (2001) The importance of early season phosphorus nutrition. *J Plant Sci* 81(2): 211-224

Green LS, Yee BC, Buchanan BB, Kamide K, Sanada Y, Wada K (1991) Ferredoxin and Ferredoxin-NADP Reductase from Photosynthetic and Nonphotosynthetic Tissues of Tomato. *Plant Physiol* 96 1207-1213

Guo G, Ge P, Ma C, Li X, Lv D, Wang S, Ma W, Yan W (2012) Comparative proteomic analysis of salt response proteins in seedling roots of two wheat varieties. *J. Proteomics* 75 1867–1885

Guo, L, Devaiah SP, Narasimhan R, Pan X, Zhang Y, Zhang W, Wang X (2012) Cytosolic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenases Interact with Phospholipase D to Transduce Hydrogen Peroxide Signals in the *Arabidopsis* Response to Stress. *The Plant Cell* 24: 2200–2212

Han X, Jin M, Breuker K, McLafferty FW (2006) Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses great than 200 kilodaltons. *Science* 314 (57): 109– 112

Jaffe MJ (1973) Thigmomorphogenesis: the response of plant growth and development to mechanical stimulation with special reference to *Bryonia dioica*. *Planta* 114: 143 – 156

Kim H-J, Li X (2016) Effects of Phosphorus on Shoot and Root Growth, Partitioning, and Phosphorus Utilization Efficiency in *Lantana*. *Hort Science* 51(8): 1001-1009

Kosová K, Vítámvás P, Urban MO, Prášil IT, Renaut J (2018) Plant Abiotic Stress Proteomics: The Major Factors Determining Alterations in Cellular Proteome. *Frontiers in Plant Science* 122 (9)

Kozłowski TT (2002) Acclimation and Adaptive Responses of Woody Plants to Environmental Stresses. *Bot Rev* 68(2): 270-334

Lahive F, Hadley P, J. Daymond AJ (2019) The physiological responses of cacao to the environment and the implications for climate change resilience. A review *Agronomy for Sustainable Development* 39:5

Lange MJP, Lange T (2015) Touchinduced changes in *Arabidopsis* morphology dependent on gibberellin breakdown. *Nat Plants* 1 14025.

Leblová S, Perglerová, Hlochová J (1977) Comparative Study of Plant Alcohol Dehydrogenases. *Biologia Plantarum (Praha)* 19 (2): 88—95

Mann M, Hendreckson RC, Panday A (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Res Biochem* 70: 437 - 473

Mishra D, Shekhar S, Sinhg D, Chakraborty S, Chakraborty N (2018) Heat shock protein and abiotic stress tolerance in Plant. In book: *Regulation of Heat Shock Protein Responses* pp 41 - 49

Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7: 405-410

Muñoz-Bertomeu J, Cascales-Miñana B, Mulet JM, Baroja-Fernández E, Pozueta-Romero J, Kuhn JM, Segura J, Ros R (2009). Plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deficiency leads to altered root development and affects the sugar and amino acid balance in Arabidopsis. Plant Physiol 151: 541 - 558

Naido G, Stewart JMcD, Lewis RJ (1978) Accumulation sites of Al in snapbean and cotton roots. Agronomy Journal. Madison 70 (3): 489-492

Oeljeklaus S, Meyer HE, Warscheid B (2008) Advances in plant proteomics using quantitative mass spectrometry. J Proteom 72: 545-554

Pandey A, Mann M (2000) Proteomics to study genes and genomes. Nature 405 837-846

Parker R, Flores TJ, Moore AL, Harpham NV (2006) An accurate and reproducible method to protect the profile of the effects of saline stress on the leaf blade of rice. J Exp Bot 57: 1109 -1118

Pechanova O, Hsu C-Y, Adams JP, Pechan T, Vandervelde L, et al. (2010) Apoplast proteome reveals that extracellular matrix contributes to multistress response in poplar. BMC genomics 11: 674–696

Pirovani CP, Carvalho HAS, Machado RCR, Gomes DS, ALVIM FC (2008) Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by Moniliophthoraperniciosa, the causal agent of the witches' broom disease. Electrophoresis 29 (11): 2391-2401.

Preisner M, Wojtasika W, Kostyna K, Bobaa A, Czuja T, Szopaa J, Kulmaa A (2018) The cinnamyl alcohol dehydrogenase family in flax: Differentiation during

plant growth and under stress conditions. Journal of Plant Physiology 221: 132 – 143

Ratajczack R. (2000) Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase. Biochimica et Biophysica Acta 1465 17 - 36

Razaq M, Zhang P, Shen H-I, Salahuddin (2017) Influence of nitrogen and phosphorous on the growth and root morphology of Acer mono. Plos One 12(2): e0171321

Reis GSM, Almeida AFD, Mangabeira PAO, Santos CId, Pirovani CP, Ahnert D (2018) Mechanical stress by wind in leaves of Theobroma cacao: photosynthetic, molecular, antioxidant and ultrastructural responses. PLoS ONE 13 (6)

Saidi I, Ammar BS, Demont-Caulet N, Thévenin J, Lapierre C, Bouzid S, Jouanin L (2009) Thigmomorphogenesis in *Solanum lycopersicum*: Morphological and biochemical responses in stem after mechanical stimulation. Plant Science 177: 1-6

Santana MBM, Cabala-Rosand P, Santana CJL (1988) Exigências nutricionais e uso de fertilizantes em sistemas de produção de cacau. Ilhéus, CEPEC/CEPLAC

Silva LF, MELO AAO, CARVALHO FR, DIAS ACCP (1967) Características dos principais solos de cacau da Bahia. Proceeding II International Cocoa Research Conference 412-416

Suzuki A, Oaks A, Jacquot J-P, Vidal J, Gadal P (1985) An electron transport system in maize roots for reactions of glutamate synthase and nitrite reductase. Plant Physiol 78: 374- 378

Takeda H, Kotake T, Nakagawa N, Sakurai N, Nevins DJ (2003) Expression and Function of Cell Wall-Bound Cationic Peroxidase em Asparagus Somatic Embryogenesis. *Plant Physiol* 131

Timm S, Wittmiß M, Gamlien S, Ewald R, Florian A, Frank M, Wirtz M, Hell R, Fernie AR, Bauwe H (2015) Mitochondrial Dihydrolipoyl Dehydrogenase Activity Shapes Photosynthesis and Photorespiration of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* Vol. 27: 1968–1984

Tobón CSJ (2015) Estado legal mundial del cadmio en cacao (*Theobroma cacao*): fantasía o realidad. *Producción + Limpia* vol 10 (1): 89-104

Tosto TF (2015) Fotossíntese, crescimento e metabolismo antioxidativo em plântulas de cacau submetidas ao estresse mecânico por compactação e a variações de doses de fósforo em solo de tabuleiros costeiros. 72f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Bahia: Ilhéus

van Dongen JT, Licausi F (2015) Oxygen sensing and signaling. *Annu Rev Plant Biol* 66:345-367

Vicuna, D (2005). The role of peroxidases in the development of plants and their responses to abiotic stresses. Doctoral thesis. Dublin Institute of Technology. doi:10.21427/D7CW2B

Vidoz ML, Loreti E, Mensuali A, Alpi A, Perata P (2010) Hormonal interplay during adventitious root formation in flooded tomato plants. *Plant Journal* 63: 551-562

Wanterwoth WM, Kozak J, Prosvot C, Bray CM, Anjelis KJ, West CE (2009) DNA ligase 1 deficient plants display severe growth defects and delayed repair of both DNA single and double strand breaks. *BMC Plant Biol* 9: 79

Whetten RW, Mackay JJ, Sederoff RR (1998) Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 585 – 609

4. CAPÍTULO 2

Alterações morfofisiológicas, bioquímicas e moleculares de plantas jovens de cacau ao estresse mecânico por compactação do solo associado a doses de paclobutrazol

Thayse França Tosto, Alex-Alan Furtado de Almeida*, Arlicélio Queiroz Paiva, Carlos Henrique de Carvalho Neto, Carlos Priminho Pirovani, Dário Ahnert, Isabela Miranda Oliveira Alves

*Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Jorge Amado, km 16, 45662-900, Ilhéus, BA, Brasil. e-mail: thayseftbio@gmail.com; e-mail: alex-alan.uesc@gmail.com

Resumo

O Paclobutrazol [(2RS, 3RS) -1- (4-clorofenil) -4, 4-dimetil-2- (1H-1, 2, 4-trizol-1-il) -pentan-3-ol] é um regulador de crescimento de plantas utilizado como protetor de múltiplos estresses. Para estudar o efeito do paclobutrazol (PBZ) em plantas de *Theobroma cacao* sob estresse mecânico por compactação do solo, analisamos as trocas gasosas foliares, a microscopia eletrônica de varredura e o teor de prolina foliares, além das variáveis de crescimento. As sementes foram germinadas em tubos PVC com 0,24 m de altura e 0,1 m de diâmetro interno, subdividido em três anéis com 0,08 m de altura conectados com fita adesiva. O solo dos anéis superior e inferior teve densidade 1 kg dm⁻³ para todos os tratamentos, ao passo que o solo dos anéis intermediários teve densidades de 1,0; 1,3; 1,5 e 1,7 kg dm⁻³ e uma camada de caulim (0,01 m de espessura) entre o solo compactado e a parede do PVC. Além disso, foram aplicados 100 mL de solução de paclobutrazol (PBZ) em diferentes concentrações (0, 30, 60, e 90 µg g⁻¹ PBZ no solo) nos tratamentos compactados, aos 60 dias após a emergência das plantas. As coletas de material vegetal ocorreram aos 60 dias após a aplicação do tratamento (DAAT) e as 0, 3, 6, 12, 24, 48 e 96 horas após a aplicação do paclobutrazol no solo. Como resultados, vimos que a aplicação de PBZ promoveu alterações nas trocas gasosas foliares, promoveu maior espessura total foliar, maior abertura transversal dos estômatos e maior teor de prolina. Em contrapartida, reduziu o

número de folhas, a altura das plantas, a área foliar, a biomassa seca de folha, além de aumentar a biomassa seca de caule na maior densidade. Além do mais, promoveu alterações no metabolismo das enzimas do sistema antioxidativo CAT, GPX e APX, promovendo condições de proteção às plantas, contra o estresse mecânico, ao longo do tempo. Nossos resultados apontam para possíveis mecanismos de tolerância das plantas, ao estresse mecânico por compactação do solo, promovidos pela aplicação do PBZ.

4.1 Introdução

A região sul da Bahia é a principal região produtora de cacau no Brasil, com produção estimada, em dezembro de 2018, de 122.568 mil toneladas, 46,1% a mais que a safra anterior, em uma área total de 480.045 mil hectares (IBGE, 2019). Com o desenvolvimento e uso de clones tolerantes à vassoura de bruxa e com características produtivas superiores, o Brasil, voltou em destaque como um dos principais dentre os países produtores de cacau no mundo, utilizando intensamente novas tecnologias dos sistemas de produção (Chepote et al., 2005). No entanto, a produção de cacau, por exemplo, é frequentemente limitada por vários fatores, como deficiência nutricional, alagamento, déficit hídrico, estresse mecânico, metais pesados e fungos (Rehem et al., 2011; Bertolde et al., 2014; Santos et al., 2014; Reis et al., 2015; 2018; Branco et al., 2017).

Na região sul da Bahia, conhecida como costa do cacau, existe uma região extensa de solos de tabuleiro costeiro (TC). Plantas crescidas nesses solos, possuem limitações físico-químicas que prejudicam seu crescimento e desenvolvimento. As limitações físicas estão relacionadas à presença de horizontes coesos, devido a acomodação de colóides que migraram da superfície, provocando a obstrução dos macroporos e, resultando na permeabilidade e a aeração do solo reduzidas (Potocka et al., 2011; Aguiar Netto e Nacif, 1988). Além do mais, observa-se, também, redução na profundidade efetiva do solo, prejudicando a dinâmica da água no seu perfil, impedindo o aprofundamento do sistema radicular e comprometendo o desenvolvimento da planta toda. Em contrapartida, dentre as limitações

químicas, neste tipo de solo, podemos citar a baixa capacidade de suprimento de nutrientes, o aumento da acidez com a profundidade, o caráter álico e a baixa capacidade de retenção de água (Souza, 1996).

Além disto, as plantas crescidas em solos compactados sofrem desequilíbrios no seu desempenho e na sua fisiologia, pois a compactação, assim como o alagamento do solo, leva às plantas a uma condição de hipoxia e, ou anoxia. Por sua vez, como consequência do crescimento das plantas em condições hipóxicas, ocorrem danos no crescimento das raízes, devido a inibição da respiração aeróbica, sendo substituída pela respiração celular anaeróbica ou fermentação. Ainda temos o aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Gill e Tujeta, 2010), o fechamento estomático e redução da atividade fotossintética em nível foliar; além de alterar a produção de biomassa, a expressão gênica, e promover o desenvolvimento de aerênquima e de lenticelas hipertrofiadas; dentre outras alterações. (Bertolde et al., 2009; Bertolde et al., 2014; Branco et al., 2017).

As plantas adaptam-se às condições ambientais através de mudanças fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Sob condições normais, existe um equilíbrio entre os processos de oxirredução, no entanto, em condições de estresse ocorre a produção excessiva de (ERO), levando as plantas a um mau desempenho no crescimento e desenvolvimento (Krishnamurthy e Rathinasabapathi, 2013). Ao mesmo tempo, as ERO, funcionam como moléculas de transdução de sinal para regular diferentes vias no processo de aclimação da planta (Choudhury et al., 2017). Por outro lado, as plantas são capazes de controlar esses efeitos, provocados muitas vezes por estresses abióticos, induzindo um sistema antioxidante. Esse sistema antioxidante têm a capacidade de manter a estabilidade no metabolismo, a fim de evitar desequilíbrios devido a perturbações ambientais. Vários estudos têm demonstrado, que diversos estresse abiótico, provocam danos às plantas desencadeadas por ERO, como seca (Moran et al., 1994), alagamento (Bertolde et al., 2009; Branco et al., 2017), estresse de alta temperatura (Larkindale et al., 2002), salinidade (Hernandez et al., 1993), intensidade de luz (Branco et al., 2017), estresse mecânico pelo vento (Reis et al., 2018) e estresse por metais pesados (do Nascimento et al., 2018).

Os reguladores de crescimento exercem um papel fundamental na regulação de muitos processos no crescimento e desenvolvimento das plantas, e têm se mostrado como protetor das plantas a diversos estresses (Vineeth et al., 2016). Essa capacidade protetora se deve à sua habilidade inata de induzir tolerância ao estresse abiótico, que por sua vez, aumenta a expressão e síntese de moléculas antioxidantes nas plantas (Jaleel et al., 2007; Gopi e Jaleel 2009). A exemplo destes reguladores de crescimento temos o Paclobutrazol [(2RS, 3RS)-1-(4-chlorophenyl)-4, 4-dimethyl-2-(1H-1, 2, 4-trizol-1-yl)-pentan-3-ol] (PBZ), que atua através de alterações nos níveis hormonais. Dentre os hormônios de atuação dos reguladores de crescimento, podemos citar as giberelinas (GAs), o ácido abscísico (ABA) e citoquininas (CK). Por sua vez, o PBZ inibe a síntese de giberelina com consequente produção de ácido abscísico e aumenta os níveis de citoquininas (Soumya et al., 2017).

O presente trabalho teve como hipótese de que aplicações de PBZ no solo regulam os processos fisiológicos e metabólicos para maior adaptação das plantas jovens de cacau à compactação do solo, potencializando o crescimento do sistema radicular em detrimento da parte aérea, em função da alteração da razão fonte/dreno e da partição de fotoassimilados, favorecendo o aprofundamento das raízes no solo.

O objetivo principal do presente trabalho foi avaliar a fotossíntese, o crescimento, a microscopia eletrônica de varredura em nível foliar e o metabolismo antioxidativo em plantas jovens de *T. cacao*, do genótipo CCN 51 crescidas em solos de tabuleiro costeiro compactado e com aplicação de PBZ.

4.2 Material vegetal e condições de cultivo

4.2.1 Montagem do experimento

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação, localizada no Campus Soane Nazaré de Andrade, da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rodovia Jorge Amado, km 16, Bairro Salobrinho, Ilhéus, BA, Brasil, nas coordenadas 39°13'59" de longitude oeste e 14°45'15" de

latitude sul. O Latossolo Amarelo coeso utilizado, foi seco ao ar e passado em peneira de 4,0 mm de abertura de malha. Subamostras de solo foram retiradas para caracterizar inicialmente os atributos fisioquímicos (Tabela 1), na fração de 2,0 mm de diâmetro (EMBRAPA, 2009).

De posse das análises física e química do solo, foram feitas as correções de acidez e da fertilidade do solo antes da montagem do experimento, e a cada 15 dias foi feita uma adubação nitrogenada por vaso, na forma de ureia, após o plantio.

Posteriormente, foi feita a semeadura utilizando sementes do genótipo de cacau CCN 51, que foram oriundas de autofecundação de plantas com cinco a oito anos de idade, cultivadas nas fazendas reunidas do vale da Juliana (Igrapiúna, BA). As sementes foram germinadas em tubos PVC com 0,24 m de altura e 0,1 m de diâmetro interno, subdividido em três anéis com 0,08 m de altura conectados com fita adesiva.

O solo dos anéis superior e inferior teve densidade 1 kg dm^{-3} para todos os tratamentos, ao passo que o solo dos anéis intermediários teve densidades de 1,0; 1,3; 1,5 e $1,7 \text{ kg dm}^{-3}$ e uma camada de caulim (0,01 m de espessura) entre o solo compactado e a parede do PVC. Esse procedimento foi realizado, pois o caulim possui, em sua constituição, alumínio tóxico (Al^{3+}) que impede que as raízes cresçam entre o solo e a parede de PVC, forçando, assim, o seu crescimento na camada de solo compactada. Para isto, o caulim foi umedecido com água, para formação de uma pasta, que foi passada na parede do anel até que se formasse uma camada de caulim com 0,01m de espessura. Após a adição do caulim na parede de PVC do anel intermediário, procedeu-se com a compactação do solo deste anel, de acordo com o grau de compactação.

A compactação foi realizada mecanicamente, com o auxílio de um bastão de madeira com diâmetro compatível com o do anel do tubo de PVC. O volume da amostra de solo, para esta etapa, foi calculado para se obter a compactação correspondente aos tratamentos de densidade no solo. Após o preenchimento dos três anéis com o solo, de acordo com os tratamentos preestabelecidos, estes, por sua vez, foram sobrepostos e unidos por meio de fita plástica adesiva. Posteriormente, o fundo dos vasos (anéis sobrepostos) foi

tampado com lâmina de isopor perfuradas, e colocados sobre bancadas da casa de vegetação.

Além disso, foram aplicados 100 mL de solução de paclobutrazol (PBZ) em diferentes concentrações (0, 30, 60, e 90 $\mu\text{g g}^{-1}$ PBZ no solo), para os tratamentos compactados, utilizando o produto comercial Cultar 250 sc, aos 60 dias após a emergência das plantas. As coletas de material vegetal ocorreram aos 60 dias após a aplicação do tratamento (DAAT) e as 0, 3, 6, 12, 24, 48 e 96 horas após a aplicação do paclobutrazol no solo.

4.2.2 Trocas gasosas foliares

As avaliações de trocas gasosas foliares foram realizadas aos 45 dias, após a aplicação do PBZ no solo, utilizando um medidor portátil de fotossíntese Li-Cor, modelo Li-6400 (Li-Cor, Biosciences Inc., Lincoln, NE, USA), equipado com fonte de luz artificial 6400-02B RedBlue. Durante as medições, o valor da radiação fotossinteticamente ativa (RFA) e a temperatura no interior da câmara foram fixados em 800 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e 26°C, respectivamente, utilizando acessórios do equipamento. As leituras foram registradas em intervalos de 2-3 min (coeficiente de variação de 0,1% a 0,2%). A fração molar de CO_2 intercelular (C_i), assim como a condutância estomática ao vapor de água (gs), foram calculados pelo referido equipamento a partir dos valores da taxa fotossintética líquida (A) e da transpiração (E). O déficit de pressão de vapor de água entre a folha e a atmosfera (VPDL) foi estimado a partir de valores de umidade e temperatura do ar e interior da câmara pelo referido aparelho.

4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise usando MEV, fragmentos de folhas dos tratamentos contrastantes (1,0; 1,3 e 1,7 kg dm^{-3} , com doses de 0 e 90 $\mu\text{g g}^{-1}$ PBZ no solo), coletados também aos 45 dias após a aplicação dos tratamentos (DAAT), foram fixados em glutaraldeído a 2,5%, preparado em tampão cacodilato de

sódio 0,1 M (pH 7,2). Posteriormente, os fragmentos de folha foram lavados no mesmo tampão e desidratados em série crescente de etanol. Imediatamente após a desidratação, o material foi levado ao ponto crítico (modelo CPD 030, BAL-TEC), o qual permitiu a retirada total da água existente no tecido vegetal. Em seguida, foi realizada a metalização das amostras (SPUTTER COATER, modelo SCD 050, marca BAL-TEC), com consequente observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV), modelo Quanta 250 (FEI Company). As espessuras de diversos componentes foliares foram medidas: parênquimas paliçádico (PP) e esponjoso (SP), as superfícies adaxial (EAd) e abaxial (EAb) da epiderme, o mesofilo total (TM), espessura total da folha (LT), aberturas transversal (TOS) e longitudinal (LOS) dos estômato, comprimento (SPL) e abertura (SPO) do poro estomático e a densidade estomática (SD).

4.2.4 Teor de Prolina

A determinação do teor de prolina foi realizada de acordo com Bates et al., (1973), com modificações adaptadas para leitura em microcubeta de quartzo e adaptações nos volumes de tolueno. Amostras foliares liofilizadas (25 mg para todos os tratamentos) foram macerados em nitrogênio líquido. Em seguida, foi adicionado em cada tubo 1 mL de ácido sulfossalicílico 3%. Os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex e, logo após, centrifugados a 10000 xg durante 5 min. Coletou-se 0,2 mL do sobrenadante (extrato bruto) e transferiu para tubos de ensaio de vidro e rosqueados. Em seguida, foi pipetado 0,2 mL de ninhidrina ácida e 0,2 mL de ácido acético glacial concentrado (Bates et al., 1973). Logo após, os tubos foram fechados hermeticamente, agitados em vórtex e incubados em banho-maria a 100 °C por 1 h, sendo que, logo após esse tempo, a reação foi interrompida em banho de gelo, adicionou-se 0,4 mL de tolueno e agitou vigorosamente em vórtex por 20 s. Posteriormente, os tubos foram deixados descansar até alcançar a temperatura ambiente. Imediatamente após, a fase superior foi recuperada com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro e transferida para uma microcubeta de quartzo. A leitura foi realizada a 520 nm usando tolueno como branco. A curva-

padrão foi preparada com L-prolina (MW: 115.13) e o teor de prolina foi calculado de acordo com a fórmula descrita por Bates et al., (1973).

4.2.5 Metabolismo antioxidativo

Para análise das enzimas do estresse oxidativo, as amostras da segunda ou terceira folha madura, a partir do ápice do eixo ortotrópico, nos diversos tratamentos, às 0, 3, 6, 12, 24, 48, 96 horas e 60 dias após a aplicação do PBZ, foram coletadas. Imediatamente após a coleta do material vegetal, foram imersos em nitrogênio líquido e o armazenado em ultrafreezer a -80 °C. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas e armazenadas em freezer -20 °C para as análises bioquímicas.

4.2.5.1 Preparo do extrato bruto

Para realização dos ensaios enzimáticos em folhas, o tecido vegetal foi submetido à maceração em nitrogênio líquido. Imediatamente após, foram pesados em balança analítica (SHIMADZO – AUW 220) 40 mg do macerado, que, em seguida, foi acondicionado em microtubos *eppendorf* de 2 mL. Logo após, irá adicionar polivinilpirrolidona (PVP) (0,7 g de PVP/g de tecido) para evitar a oxidação do macerado. Imediatamente após, o macerado foi ressuspenso em 800 µL de tampão de extração, que variou de acordo com o tipo de enzima envolvida no metabolismo antioxidativo [tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 7,0, para as atividades das enzimas catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX); tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, para peroxidase do guaiacol (GPX); e tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8 para a atividade da enzima dismutase do superóxido (SOD), seguido de agitação em vórtex. Posteriormente, as amostras foram submetidas à sonicação, em ultrassonicador de sonda (Gex 130, 130 W), sob amplitude de 70%, 8 pulsos de 5 s, com intervalos de 10 s, seguido de centrifugação (10.000 x g) por 10 min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado, considerado

como extrato bruto, e foi feita a sua transferência para um novo microtubo de 2 mL, que foi mantido em isopor com gelo, para uso imediato.

4.2.5.2 Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A reação de ativação da atividade de SOD foi mensurada como proposto por Gianopolitis e Ries (1977), com modificações. A unidade de atividade (UA) foi calculada para medir a capacidade da enzima de inibir 50% da redução fotoquímica de nitroazul de tetrazólio (NBT), que leva a formação do precipitado formazana azul. Ao extrato bruto foi adicionado o tampão de extração (fosfato de potássio, 50 mM, pH 6,0), EDTA (1mM) e metionina (13 mM). A atividade enzimática teve início com a adição de riboflavina (1 mM). A leitura inicial ocorreu após a placa ter ficado no escuro por 5 min, e a segunda leitura foi realizada após a placa ter sido submetida à luz fluorescente de 15 W por mais 10 min. Os brancos foram os poços que não tiveram extrato vegetal. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 560 nm e as amostras foram lidas em quadruplicatas no espectrofotômetro de microplacas *Spectramax Paradigm* (Molecular Devices).

4.2.5.3 Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade de CAT foi determinada por meio do consumo de H_2O_2 , segundo o método descrito por Havir e Mchale (1987), com modificações. O ensaio ocorreu a 30°C, momento no qual foi adicionado tampão de reação (tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 7,0) em 5 μL do extrato vegetal de folhas. A reação teve início com o acréscimo de H_2O_2 à 30 mM. As leituras foram realizadas em quadruplicatas, calculando-se o decaimento em comprimento de onda de 240 nm por 300 s, contra um branco sem extrato vegetal, e expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$, usando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M cm^{-1} . A atividade foi realizada no espectrofotômetro de microplacas *Spectramax Paradigm* (Molecular Devices).

4.2.5.4 Peroxidase do ascorbato (APX, 1. 11.1. 11)

A atividade de APX foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Nakano e Asada (1981), com modificações. Na reação, a presença de APX no extrato vegetal reduz a concentração de H_2O_2 do meio, em função da redução de ácido ascórbico adicionado. Ao extrato vegetal diluído foi acrescentado o tampão de reação (fosfato de potássio a 50 mM, ascorbato a 0,5 mM, EDTA a 0,1mM e H_2O_2 a 0,1 mM). A reação teve início com a adição do ascorbato. O decaimento foi acompanhado no comprimento de onda de 290 nm por 300 s, com leituras a cada 30 s. A atividade foi determinada em espectrofotômetro de microplacas Espectramax Paradigm (Molecular Devices). A análise foi realizada em quadruplicatas e os valores expressos em $\mu\text{mol ascorbato g}^{-1} \text{MS min}^{-1}$.

4.2.5.5 Peroxidase do guaiacol (GPX, EC 1.11.1.7)

A determinação da atividade de GPX, se constituiu no preparo do ensaio enzimático, em microplacas de 96 poços contendo 140 μL de tampão de reação GPX 2x [guaiacol 40 mmol L^{-1} , H_2O_2 a 0,06% e tampão fosfato de sódio (20 mmol L^{-1} , pH 6,0)], 139 μL de tampão fosfato (50 mmol L^{-1} , pH 6,0) e 1 μL de extrato enzimático de folhas. A leitura das amostras foi realizada em quadruplicatas, em espectrofotômetro de microplacas (VERSAmax), no comprimento de onda de 470 nm. A leitura foi mensurada por 300 s e o valor de consumo de GPX expresso com o aumento do consumo de guaiacol em $\mu\text{mol s}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$. A conversão dos dados obtidos em valores de absorvância a 470 nm $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$ para consumo de guaiacol em $\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$ foi feita com o uso da equação $y = 0,1284x + 0,0189$, originada a partir de uma curva padrão para POD-guaiacol (Rehem et al., 2011).

4.2.6 Variáveis de crescimento

Antes e 45 dias após a aplicação do PBZ no solo, foram feitas contagem no número de folhas por planta, medições da altura das plantas e diâmetro do coleto. O diâmetro do coleto e a altura do caule foram medidos com o uso de paquímetro digital e régua, respectivamente. No final do experimento, as plantas de cada tratamento foram divididas em partes (raiz, caule e folha). Em seguida, foi feita medição de área foliar total e estimativa do comprimento radicular. A área foliar foi mensurada com um medidor de área Li-Cor, modelo Li-3100 (Li-Cor, inc. Lincoln, Nebraska, USA). As diferentes partes foram armazenadas isoladamente em sacos de papel e colocadas para secar em estufa de circulação forçada de ar a 75 °C até massa constante, para obtenção da biomassa seca total da planta e de suas partes.

4.2.7 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 13 tratamentos [3 densidades de solo (1,3; 1,5 e 1,7 kg dm⁻³) x 4 doses de PBZ (0, 30, 60, 90 µg g⁻¹ no solo + controle (1,0 kg dm⁻³ sem adição de PBZ), em esquema fatorial 3 x 4 + 1, com número variável de repetições (5 para os dados de trocas gasosas foliares, MEV, prolina e metabolismo antioxidativo; e 10 para variáveis de crescimento) e uma plântula por unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, fez-se as comparações de médias dos tratamentos, por meio do teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$), quando pertinente.

4.3 Resultados

4.3.1 Trocas gasosas foliares

A compactação do solo e a aplicação das diferentes doses de PBZ no solo de plantas jovens de cacau crescidas em solo compactado, causaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nas trocas gasosas foliares avaliadas. As avaliações, realizadas aos 45 dias após a aplicação do PBZ, revelaram que a taxa fotossintética (A) das plantas jovens de cacau submetidas a compactação do solo e a doses de PBZ foram reduzidas em relação ao controle ($1,0 \text{ kg dm}^{-3}$ sem adição de PBZ). Para as densidades ($1,0$; $1,3$; $1,5$ e $1,7 \text{ kg dm}^{-3}$) sem a adição de PBZ, podemos observar que a compactação provocou uma redução na taxa fotossintética líquida. No entanto ao observar as densidades ($1,3$; $1,5$ e $1,7 \text{ kg dm}^{-3}$) com adição das doses de PBZ, observamos pouca variação entre os tratamentos (compactação + doses de PBZ), apresentando menores valores na taxa fotossintética na densidade de $1,3 \text{ kg dm}^{-3}$ com doses de 30 e $60 \mu\text{g g}^{-1}$ de PBZ no solo (Figura 1 A). Por sua vez, para esses dois tratamentos ($1,3 \text{ kg dm}^{-3}$ com doses de 30 e $60 \mu\text{g g}^{-1}$ de PBZ no solo), juntamente com a densidade de $1,7 \text{ kg dm}^{-3}$ e $90 \mu\text{g g}^{-1}$ de PBZ no solo, observamos maiores valores de concentração intercelular de CO_2 (C_i) e não encontramos diferenças significativas de C_i para as densidades de solo analisadas sem adição de PBZ (Figura 1 B). Assim como para a taxa fotossintética líquida, foi verificado uma redução nas taxas de transpiração (E) e de condutância estomática (g_s) de todos os tratamentos em relação ao controle (Figura 1 C e D). No tratamento $1,7 \text{ kg dm}^{-3}$ e $90 \mu\text{g g}^{-1}$ de PBZ no solo, verificamos uma maior taxa de E e de g_s , indicando possível mecanismo de tolerância das plantas a compactação do solo proporcionada pela maior concentração de PBZ aplicada no solo (Figuras 1 C e D). Para o déficit de pressão de vapor de água entre a folha e a atmosfera ($VPDL$), observamos maiores déficits para os tratamentos $1,3 \text{ kg dm}^{-3}$ com doses de 30 e $60 \mu\text{g g}^{-1}$ de PBZ no solo, que apresentaram menores taxas fotossintéticas, seguido de $1,3 \text{ kg dm}^{-3}$ $0 \mu\text{g g}^{-1}$; $1,3 \text{ kg dm}^{-3}$ $90 \mu\text{g g}^{-1}$; $1,5 \text{ kg dm}^{-3}$ com doses de 0 , 30 , 60 e $90 \mu\text{g g}^{-1}$ e $1,7$ com doses de 0 , 30 , $60 \mu\text{g g}^{-1}$;

1,7 kg dm⁻³ 90 µg g⁻¹ de PBZ no solo e o controle (1,0 kg dm⁻³ sem adição de PBZ) com os menores valores (Figura 1 E).

4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na tabela 2 estão identificados parâmetros micromorfológicos, analisados com o auxílio do microscópio eletrônico de varredura (MEV), mostrando as diferenças significativas das características observadas. Verificamos que os tratamentos controle, 1,3 kg dm⁻³ com 0 µg g⁻¹ e 1,7 kg dm⁻³ com 90 µg g⁻¹ PBZ no solo, apresentaram os maiores valores médio para espessura do parênquima esponjoso (SP). Ao observar a epiderme na face adaxial (Ead), vimos uma maior espessura nos tratamentos compactados e com e sem adição de PBZ em relação ao controle. Entretanto para a face abaxial da epiderme (Eab) a maior espessura se deu no controle em relação aos demais tratamentos. Também, para a espessura total da folha (LT), o tratamento controle e o com maior densidade e maior dose de PBZ (1,7 kg dm⁻³ e 90 µg g⁻¹ PBZ no solo), apresentou maior espessura total foliar, seguido de 1,3 e 1,7 kg dm⁻³ com 0 µg g⁻¹, e 1,3 kg dm⁻³ com 90 µg g⁻¹. E por fim não foram encontradas diferenças significativas para a espessura do parênquima paliçádico (PP) e nem para a espessura do mesofilo total (TM). O mesofilo foliar das plantas de *T. cacao* submetidas a compactação do solo e a doses de PBZ, aplicados no solo em diferentes concentrações, apresentou, em geral, uma única camada de parênquima paliçádico (PP), e duas ou três camadas de pequenas células de formato irregular formando o parênquima esponjoso, distribuídas nos espaços intercelulares formados (Figura 2 A-D).

Ao analisar as características anatômicas dos estômatos por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) em folhas de plantas jovens de *Theobroma cacao*, genótipo CCN 51, submetidos à compactação do solo e a doses de paclobutrazol, nós verificamos, que a abertura transversal do estômato (TOS) no controle e na densidade de 1,7 kg dm⁻³ e 90 µg g⁻¹ PBZ no solo, foram maiores que nos demais tratamentos. Entretanto não encontramos diferenças significativas (p<0,05) para a abertura longitudinal (LOS),

comprimento do poro estomático (SPL) e abertura do poro estomático (SPO). Porém, a densidade estomática (SD) foi maior no controle em relação aos demais tratamentos (Tabela 3).

4.3.3 Teor de Prolina

O teor de prolina analisado em folhas coletadas as 0, 3, 6, 12, 24, 48, 96 horas e 60 dias após a aplicação do PBZ no solo, apresentou variação significativa ($p < 0.05$) entre os tratamentos avaliados. Ocorreram muitas variações ao longo das coletas entre os tratamentos, devido a variações na expressão gênica em detrimento das condições de estresse (Figura 3). As 0 horas após a aplicação do PBZ no solo, as maiores taxas no teor de prolina se deu nos tratamentos 1,3 e 1,7 kg dm⁻³ e 30 µg g⁻¹; 1,3 e 1,5 kg dm⁻³ e 60 µg g⁻¹ e 1,5 kg dm⁻³ e 90 µg g⁻¹ PBZ no solo (Figura 3 A). Às 3 horas, após a aplicação de PBZ no solo, as maiores taxas foram no controle (1,0 kg dm⁻³ sem adição de PBZ), em 1,3 e 1,5 kg dm⁻³ e 0 µg g⁻¹; 1,5 e 1,7 kg dm⁻³ e 30 µg g⁻¹; 1,3 kg dm⁻³ e 60 µg g⁻¹; e 1,3, 1,5 e 1,7 kg dm⁻³ e 90 µg g⁻¹ PBZ no solo (Figura 3 B). Já as 6 horas, nós encontramos o maior teor de prolina no tratamento 1,7 kg dm⁻³ e 90 µg g⁻¹ PBZ no solo (Figura 3 C). Porém as 12 horas, se deu em 1,3 e 1,5 kg dm⁻³ e 0 µg g⁻¹; e 1,3 kg dm⁻³ e 30 µg g⁻¹ PBZ no solo (Figura 3 D). Em contrapartida, as 24 horas os teores de prolina se mantiveram elevados, exceto para os tratamentos 1,5 e 60 µg g⁻¹ e 1,7 kg dm⁻³ e 90 µg g⁻¹, onde observamos uma redução (Figura 3 E). No entanto, as 48 horas após a aplicação de PBZ no solo, as maiores taxas de teor de prolina foram observados nos tratamentos controle, 1,3 kg dm⁻³ e 0 µg g⁻¹; 1,5 kg dm⁻³ e 60 µg g⁻¹ e 1,3 kg dm⁻³ e 90 µg g⁻¹ (Figura 3 F). Em contrapartida as 96 horas após a aplicação do tratamento a maior taxa foi observada apenas no tratamento 1,7 kg dm⁻³ e 30 µg g⁻¹ (Figura 3 G). Por fim, aos 60 dias após a aplicação do PBZ no solo, foi verificado que as taxas de teor de prolina se mantiveram elevadas, ocorrendo uma redução apenas nos tratamentos 1,5 kg dm⁻³ e 30 µg g⁻¹; e 1,3 kg dm⁻³ e 90 µg g⁻¹ de PBZ no solo (Figura 3 H).

4.3.4 Parâmetros Biométricos

A área foliar e o comprimento de raiz, bem como a biomassa seca dos órgãos das plantas de cacau, genótipo CCN 51, submetidas a compactação do solo e a doses de PBZ foram analisadas (Figura 4 e 5). Foi verificado uma maior área foliar nos tratamentos sem a aplicação do PBZ (1,0; 1,3; 1,5; e 1,7 kg dm⁻³ e 0 µg g⁻¹ PBZ no solo), indicando uma redução na área foliar nas plantas após a aplicação do regulador de crescimento (Figura 4 A). No entanto, não encontramos diferenças significativas para o comprimento de raiz (Figura 4B). Por consequência de uma redução na área foliar, a biomassa seca de folha também foi reduzida com a aplicação do PBZ em todos os tratamentos, exceto o controle (Figura 5 A). Em contrapartida, a biomassa de caule foi superior na densidade controle e na maior densidade (1,7 kg dm⁻³) em todas as doses de PBZ aplicadas (30, 60 e 90 µg g⁻¹ PBZ no solo). Porém a maior biomassa de raiz foi encontrada nas densidades controle e 1,5 e 1,7 kg dm⁻³ com 30 µg g⁻¹ PBZ no solo.

Na tabela 4 estão identificados o delta do número de folhas, da altura da planta e do diâmetro do coleto de antes e após 60 dias da aplicação do PBZ no solo, mostrando efeito significativo para a maioria das características observadas. Ao analisar o número de folhas, foi superior para os tratamentos sem aplicação de PBZ, indicando uma redução no número de folhas nas plantas com adição de PBZ. Para a variável altura da planta, não encontramos diferenças significativas comparando os tratamentos. No entanto nas densidades de 1,3 e 1,7 kg dm⁻³, ao comparar as doses de PBZ, verificamos que a aplicação de PBZ, induziu a redução na altura da planta, em relação aos seus respectivos controles. Entretanto para o diâmetro do coleto não encontramos diferenças significativas nem entre nem dentre os tratamentos (Tabela 4).

4.3.5 Metabolismo Antioxidativo

4.3.5.1 Atividade da Dismutase do Superóxido

Ao avaliar a atividade da dismutase do superóxido (SOD) em folhas de plantas jovens de *T. cacao*, genótipo CCN 51, submetidas a compactação do solo e a doses de PBZ, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos avaliados, em nenhuma das épocas de coleta (Figura 6 A-H).

4.3.5.2 Atividade da Catalase

As plantas jovens de *T. cacao* submetidas a compactação do solo e a aplicação de PBZ no solo, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) quanto à atividade foliar de CAT, em algumas épocas de coleta (Figura 7). Nas coletas realizadas às 0, 3, 12 e 96 horas após a aplicação de PBZ no solo, não encontramos atividade para a referida enzima. Porém, às 6, 24, 48 horas e 60 dias após a aplicação do PBZ no solo, encontramos variações significativas na atividade de CAT. Observamos às 6 horas após a aplicação de PBZ no solo, uma maior atividade de CAT na maior densidade ($1,7 \text{ kg dm}^{-3}$) com $60 \mu\text{g g}^{-1}$ de PBZ no solo (Figura 7 A). No entanto, às 24 horas após a aplicação de PBZ no solo, verificamos uma redução na atividade de CAT em todos os tratamentos, em relação à coleta de 6 horas, sendo mais evidente em $1,0 \text{ kg dm}^{-3}$ e $0 \mu\text{g g}^{-1}$; $1,5 \text{ kg dm}^{-3}$ e $30 \mu\text{g g}^{-1}$; e $1,5 \text{ kg dm}^{-3}$ e $90 \mu\text{g g}^{-1}$ de PBZ no solo (Figura 7 B). Por outro lado, às 48 horas após a aplicação de PBZ no solo, ocorreu um pequeno aumento nas atividades de CAT, ao comparar a coleta de 24 horas, sendo superiores nos tratamentos $1,7 \text{ kg dm}^{-3}$ com 30 e $60 \mu\text{g g}^{-1}$ de PBZ no solo (Figura 7 C). E por fim aos 60 dias após a aplicação de PBZ no solo, as atividades de CAT foram reduzidas ao longo das demais coletas, não apresentando diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Figura 7 D).

4.3.5.3 Atividade da Peroxidase do Ascorbato

Ao avaliar a atividade da APX nas folhas de plantas jovens de cacau, foi observado variações significativas ($p < 0,05$) quanto a atividade dessa enzima (Figura 8). Houve pouca variação significativa $p < 0,05$, na atividade da enzima APX às 0 horas após a aplicação de PBZ no solo, sendo maior na densidade de $1,3 \text{ kg dm}^{-3}$ sem adição de PBZ no solo (Figura 8 A). Por sua vez, às 3 horas, as maiores atividades foram na densidade de $1,5 \text{ kg dm}^{-3}$ com doses de 60 e $90 \mu\text{g g}^{-1}$ de PBZ no solo (Figura 8 B). No entanto, às 6 horas, a maior atividade de APX se deu em $1,5 \text{ kg dm}^{-3}$ e $0 \mu\text{g g}^{-1}$; e $1,3 \text{ kg dm}^{-3}$ e $30 \mu\text{g g}^{-1}$ de PBZ no solo (Figura 8 C). Já às 12 horas após a aplicação de PBZ no solo, a maior atividade foi observada no tratamento $1,7 \text{ kg dm}^{-3}$ e $30 \mu\text{g g}^{-1}$ de PBZ no solo (Figura 8 D). Por outro lado, às 24 horas, as reduções mais significativas na atividade desta enzima, quando comparadas aos demais tratamentos, foram observadas nos tratamentos controle, $1,5 \text{ kg dm}^{-3}$ e $30 \mu\text{g g}^{-1}$ e $1,7 \text{ kg dm}^{-3}$ e $90 \mu\text{g g}^{-1}$ PBZ no solo (Figura 8 E). Em contrapartida, os maiores valores de atividade às 48 horas após a aplicação de PBZ no solo, foram em $1,3 \text{ kg dm}^{-3}$ e $0 \mu\text{g g}^{-1}$, $1,5$ e $1,7 \text{ kg dm}^{-3}$ e $30 \mu\text{g g}^{-1}$, $1,3$ e $1,5 \text{ kg dm}^{-3}$ e $60 \mu\text{g g}^{-1}$, e $1,3 \text{ kg dm}^{-3}$ e $90 \mu\text{g g}^{-1}$ de PBZ no solo (Figura 8 F). Por seguinte, às 96 horas, a maior atividade da enzima APX foi na densidade de $1,3 \text{ kg dm}^{-3}$ e $30 \mu\text{g g}^{-1}$ de PBZ no solo (Figura 8 G). Contudo, assim como na atividade de CAT, aos 60 dias após a aplicação de PBZ no solo, as atividades de APX foram reduzidas ao longo das demais coletas, não apresentando diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Figura 8 H).

4.3.5.4 Atividade da Peroxidase do Guaicol

Quando analisamos a atividade da GPX nas folhas de plantas jovens de cacau, foi observado variações significativas ($p < 0,05$) quanto aos picos de atividade dessa enzima, em todas as coletas avaliadas (Figura 9). Às 0 horas após a aplicação de PBZ no solo, os maiores picos de atividade de GPX se deu nos tratamentos $1,5 \text{ kg dm}^{-3}$ com 0 e $30 \mu\text{g g}^{-1}$, e $1,7 \text{ kg dm}^{-3}$ com 60 e $90 \mu\text{g g}^{-1}$.

¹ de PBZ no solo (Figura 9 A). Já às 3 horas os maiores valores foram no tratamento de 1,3 kg dm⁻³ e 0 µg g⁻¹ de PBZ no solo (Figura 9 B). Enquanto isso às 6 horas em 1,5 kg dm⁻³ com 0 e 90 µg g⁻¹, 1,3 kg dm⁻³ 30 e 60 µg g⁻¹, e 1,7 kg dm⁻³ e 60 µg g⁻¹ de PBZ no solo (Figura 9C). Em seguida às 12 horas, o maior pico encontrado foi nas densidades de 1,5 kg dm⁻³ e 0 µg g⁻¹ e 1,7 kg dm⁻³ com 0 e 30 µg g⁻¹ de PBZ no solo (Figura 9 D). Após esse período as taxas na atividade de GPX foram reduzidas, bem como observado em CAT e APX, sendo maiores na coleta das 24 horas após a aplicação de PBZ no solo nos tratamentos controle, 1,3 e 1,5 kg dm⁻³ e 0 µg g⁻¹ de PBZ no solo (Figura 9 E). No entanto, às 48 horas a menor atividade foram nos tratamentos controle, 1,5 kg dm⁻³ e 60 µg g⁻¹ e 1,7 kg dm⁻³ e 0 µg g⁻¹ de PBZ no solo (Figura 9 F). Por sua vez, as maiores atividades às 96 horas e aos 60 dias após a aplicação de PBZ no solo foram nos tratamentos 1,5 kg dm⁻³ e 0 µg g⁻¹ e 1,7 kg dm⁻³ e 60 µg g⁻¹ de PBZ no solo, respectivamente (Figura 9 G e H).

4.4 Discussão

As plantas jovens de cacau CCN 51 submetidas a compactação do solo e a doses de PBZ, apresentaram alterações na maquinaria fotossintética. Em plantas crescidas em condições de estresse abiótico, ocorre uma diminuição da fotossíntese, tanto na taxa fotossintética quanto na concentração interna de CO₂ que inibe o metabolismo fotossintético (Cornic, 2000). Resultados semelhantes foram encontrados em nossa pesquisa, já que o estresse mecânico por compactação do solo reduziu a taxa fotossintética líquida, a transpiração e a condutância estomática. A aplicação do PBZ tem sido relatada para aumentar a taxa fotossintética e reduzir a condutância estomática em *Setaria itálica* cultivada em condições de campo (Bisht et al., 2007), embora tenhamos observado pouca variação entre os tratamentos com adição de doses de PBZ. Para as densidades de 1,3; 1,5; e 1,7 kg dm⁻³ e 90 µg g⁻¹ não encontramos diferenças significativas nas taxas fotossintéticas, possivelmente porque a maior concentração de PBZ, conferiu uma maior tolerância ao estresse por compactação do solo. Em *Aesculus hippocastanum*

L., foi relatado que a aplicação de PBZ elevou as taxas fotossintéticas (Percival e Noviss, 2008), bem como em plantas de amendoim (Yan e Pan, 1992). O aumento na concentração de CO₂ intercelular e alteração na condutância estomática foi a razão para o aumento na fotossíntese em diversas espécies tratadas com PBZ *Amorphophallus campanulatus* (Manivannan et al., 2007; Gopi e Jaleel, 2009) e *Odontonema strictum* (Rezazadeh et al., 2016).

Alguns trabalhos relatam que a aplicação do PBZ reduz significativamente as taxas de transpiração em plantas submetidas ao estresse hídrico (George e Nissen, 1992; Sailerova e Zwiazek, 2010). Assim também no presente trabalho, houve uma redução de *g_s* e *E* em todos os tratamentos em relação ao controle. Ainda, dentre as densidades com adição de PBZ, na presença da maior densidade e maior concentração de PBZ no solo, tivemos maiores valores de *g_s* e *E*, provavelmente devido à maior abertura transversal (TOS) do estômato nesse tratamento (Tabela 3), mostrando o efeito significativo da maior dose de PBZ, conferindo tolerância para as plantas crescidas nos solos mais compactados. Estes resultados também foram observados em *Malus halliana* sob estresse hídrico, onde os efeitos foram mais significativos quando a concentração foi de 100 mg L⁻¹ (Xiu et al., 2018).

As observações em microscopia eletrônica de varredura realizadas na lâmina foliar mostraram variações na anatomia foliar das amostras submetidas a compactação do solo e a doses de PBZ no solo. A maior espessura de SP e, conseqüentemente, maior LT nos tratamentos controle e 1,7 kg dm⁻³ e 90 µg g⁻¹, demonstra uma maior tolerância a destruição de células foliares, no controle por não está submetido a nenhum estresse, e no tratamento com maior compactação e maior dose de PBZ, pelo efeito protetor conferido pelo PBZ. As folhas crescidas posteriormente a aplicação do PBZ se apresentaram com um aspecto áspero e encarquilhadas. Relato semelhante foi reportado em abacaxizeiro, onde, após a primeira aplicação do regulador vegetal, ocorreram alterações morfológicas ocasionando o fechamento da roseta foliar, devido ao enrolamento e torção das folhas jovens (Antunes et al., 2008).

No presente trabalho observamos alterações nas características anatômicas dos estômatos entre os tratamentos, apenas na TOS e na SD. A maior taxa de transpiração no controle, seguida de 1,7kg dm⁻³ e 90 µg g⁻¹ de

PBZ no solo, podem ser justificadas pela maior abertura transversal dos estômatos nos mesmos tratamentos. Entretanto, a aplicação de PBZ favorece a produção de ácido abscísico a partir do momento em que a síntese de giberelinas é bloqueada, assim ocorre o acúmulo de precursores na via de terpenóides, promovendo a síntese de ácido abscísico (Rademacher, 1997). O ácido abscísico por sua vez, tem o papel de promover o fechamento da abertura estomática, diminuindo a perda de água das folhas pela transpiração. Além disso, o ácido abscísico gera modificações anatômicas nas folhas conferindo uma barreira contra perda de água (Soumya et al., 2017). Em plantas de *E. canadensis* crescidas sob estresse hídrico exibiu um aumento na densidade estomática, podendo ser uma tentativa de usar a água de forma eficiente (Klooster e Palmer-Young, 2004). Todavia, em plantas crescidas em solos compactados a maior densidade estomática no tratamento controle em relação aos demais tratamentos compactados pode estar relacionado com uma maior eficiência no uso da água, pois nos tratamentos compactados, a adesão do solo compromete a percolação de água no meio. Portanto, a redução na densidade estomática nos tratamentos compactados pode ser uma estratégia para melhorar a eficiência do uso da água em plantas crescidas em solos compactados.

A prolina atua de forma essencial em resposta a tolerância citoplasmática de plantas, sob vários estresses abióticos (Bandurska 2000). Várias pesquisas têm mostrado, que a aplicação das maiores concentrações de PBZ e de outros triazóis, tem aumentado o teor de prolina e proteínas solúveis, além do aumento do conteúdo de lignina, o fechamento parcial estomático, reduzindo a taxa de transpiração, em diversas culturas (Özmen et al., 2003; Jaleel et al., 2006; Wang et al., 2015; Kamran et al., 2018). Esse aumento de prolina em plantas tratadas com PBZ, justifica as variações ao longo das coletas das plantas sob condições de estresse por compactação do solo, encontradas em nossa pesquisa, sendo bastante evidente na coleta de 6 horas após a aplicação do PBZ, onde o maior valor de teor de prolina, se deu na maior densidade e maior dose de PBZ ($1,7 \text{ kg dm}^{-3}$ e $90 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ PBZ no solo) (Figura 3 C).

O teor de prolina das folhas e tubérculos da cenoura aumentou quando as plantas foram tratadas com PBZ (Gopi et al., 2007). E também induziu um aumento do conteúdo de ABA, o que favoreceu o aumento de teor de prolina e aminoácidos em plantas de cenoura (Davis et al., 1988; Gopi et al., 2007). Portanto, maiores quantidades de prolina nas plantas sob estresse mecânico, tratadas com PBZ, implicam tolerância ao estresse, induzido pelo PBZ em plantas. Esse fato também foi observado em plantas sob o déficit de água (Turkan et al., 2005; Aly e Latif 2011; Jungklang e Saengnil 2012).

Em nossa pesquisa a aplicação do PBZ, reduziu o número de folha, a altura das plantas, a área foliar, a biomassa seca de folha, além de elevar a biomassa seca de caule na maior densidade. Respostas semelhantes foram encontradas por Rosmin (1994), ao trabalhar também com plantas de *T. cacao*. Ele observou que o aumento da concentração de PBZ nas plantas de cacau, promoveu a redução na altura da planta, no diâmetro do caule, no tamanho da folha, no comprimento do entrenó e no índice de área foliar. Ainda em trabalhos realizados com plantas de cacau, foi verificado que a aplicação do PBZ, promoveu mudanças nas características morfológicas e de crescimento. Dentre estas alterações, incluem-se a redução no diâmetro, na altura, no número de folhas, na área foliar e no peso seco das partes da planta, nas concentrações de PBZ aplicadas. O efeito de cada mudança, dependeu da concentração de PBZ aplicada, e do estágio de crescimento das plantas (Valle e Almeida, 1991).

O PBZ regula o crescimento das plantas através de alterações na síntese de importantes hormônios vegetais, incluindo as giberelinas, ABA e citocininas (Grossman, 1988; Fletcher e Hofstra, 1990). Pesquisas relatam que a redução no crescimento da planta, reduzindo sua altura, o alongamento do entrenó e a área foliar efetivamente, em diversas culturas (Setia et al., 1996; Wang e Chen, 1997; Jaleel et al., 2007a). Também tem sido relatado, em pimenta e tomate, para reduzir o crescimento da planta, altura, comprimento do entrenó, folhas mais espessas e mais escuras (Rahman et al., 1989a, b). A redução da altura da planta é uma consequência do bloqueio da rota de síntese de ácidos giberélicos, inibindo a formação de giberelina pelo paclobutrazol (Fletcher et al., 2000).

A raiz é o principal órgão das plantas e o estudo das suas características morfológicas é essencial para otimizar o cultivo de várias culturas, uma vez que ela é responsável pela captação e utilização de água e nutrientes (Kamran et al., 2018). Assim, o crescimento e desenvolvimento das culturas dependem substancialmente da raiz, por isso é tão importante o estudo de sua morfologia.

Embora não tenhamos encontrado diferenças significativas para o comprimento de raiz (Figura 4 B), já foi relatado que em cultura de milho, a aplicação do PBZ foi eficiente para melhorar as características morfofisiológicas das raízes. O PBZ induziu o aumento o fluxo de seiva, o peso seco, o diâmetro e a razão raiz / parte aérea (Kamran et al., 2018). Em suma, um sistema extenso de enraizamento é vital quando as plantas são cultivadas em solos contendo deficiências nutricionais e de oxigênio (Bengough et al., 2011).

As plantas geralmente usam enzimas antioxidantes, como GPX, APX, SOD e CAT, para reduzir danos oxidativo causados pelo acúmulo de ROS durante condições de estresse. O estresse mecânico leva a superprodução de ROS, indicando um potencial estresse oxidativo ou via de sinalização nas plantas (Gill e Tuteja, 2010; Reis et al., 2018). Em vista disso, a redução das ROS, é devido à atuação de diferentes enzimas antioxidantes (Gill e Tujeta, 2010).

Por sua capacidade inerente de promover tolerância ao estresse abiótico, os reguladores do crescimento de plantas têm exercido funções importantes em resposta e proteção a vários estresses (Sharma e Dubey 2005; Vineeth et al., 2016). Desse modo, atuam aumentando as enzimas e moléculas antioxidantes nas plantas sob condições estressantes (Jaleel et al., 2007a). Contudo, a aplicação de PBZ foi descrito de forma significativa para aumentar a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, POX, APX) em várias espécies de plantas, conferindo proteção contra o estresse às mesmas (Gopi et al., 2007; Jaleel et al., 2007a; Percival e Noviss 2008; Mohamed et al., 2011; Pan et al. 2013).

Nossos resultados demonstram que a atividade das enzimas antioxidantes em plantas de *T. cacao* submetidas a compactação do solo e a

doses de PBZ são diferenciais. Embora não tenhamos encontrado diferença significativa para a atuação da SOD em todos os tratamentos e épocas de coleta, ela desempenha papel central na defesa contra o estresse oxidativo (Gill et al., 2015). Isto justifica os valores elevados de sua atividade em todos os tratamentos e mantidos ao longo de cada coleta. Por sua vez, o aumento de sua atividade está correlacionado com o aumento da tolerância da planta contra estresses ambientais (Gill et al., 2015). Ainda, verificamos reduções nas atividades das enzimas do metabolismo antioxidativo CAT, GPX e APX ao longo das coletas para todos os tratamentos. Esta redução pode estar relacionada com o processo de aclimação das plantas ao estresse mecânico por compactação do solo, conferidos pela atuação do PBZ. Em suma, ao perceberem a presença de ROS, as plantas, induzem a expressão gênica, afim de responder às mudanças no ambiente, e manter o equilíbrio entre a formação e a desintoxicação de ROS, resultando na melhor resposta das plantas ao estresse por compactação do solo.

4.5 Conclusões

As plantas jovens de *T. cacao*, do genótipo CCN 51, apresentaram respostas diferenciais quanto a compactação do solo e a doses de PBZ. Constatou-se que, o estresse por compactação do solo e a aplicação de doses de PBZ no solo, interferiram diretamente na taxa fotossintética (A), na concentração interna de CO_2 (C_i), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e déficit de pressão de vapor de água entre a folha e a atmosfera ($VPDL$).

Em plantas cultivadas com maior densidade de solo e dose de PBZ, foi observado maior espessura total foliar e maior abertura transversal dos estômatos. Ademais, o teor de prolina variou ao longo das coletas das plantas sob condições de estresse por compactação do solo, encontradas em nossa pesquisa, sendo bastante evidente na coleta de 6 horas após a aplicação do PBZ no solo, onde o maior valor de teor de prolina, também se deu na maior densidade e maior dose de PBZ no solo. Em contrapartida a aplicação do PBZ no solo, reduziu o número de folha, a altura das plantas, a área foliar, a biomassa seca de folha, além de elevar a biomassa seca de caule na maior densidade. Ainda, a aplicação do PBZ no solo de plantas crescidas sob estresse mecânico por compactação do solo, induziu alterações no metabolismo das enzimas CAT, GPX e APX do sistema antioxidativo. Por sua vez, essas mudanças ocorridas no metabolismo antioxidativo, está relacionado à ação protetora do PBZ, reduzindo as variações e manutenções das atividades enzimáticas; inibindo a sinalização de estresse oxidativo e a produção de ERO.

As alterações promovidas pela aplicação do PBZ no solo, indicam possíveis mecanismos de tolerância das plantas ao estresse por compactação do solo, sendo evidenciada pela maior concentração de PBZ aplicada no solo.

4.6 Referências

Aguiar Netto AO, Nacif PGS (1988) Caracterização morfológica e físico-hídrica de solos representativos do Recôncavo Baiano, I. Determinação da capacidade de campo “in situ” e suas relações com dados obtidos em laboratório. Cruz das Almas BA: UFBA 9 p

Aly A, Latif H (2011) Differential effects of paclobutrazol on water stress alleviation through electrolyte leakage, phytohormones, reduced glutathione and lipid peroxidation in some wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.) grown in-vitro. Romanian Biotechnological Letters 16: 6710–6721

Antunes AM, Ono EO, Sampaio AC (2008) Effect of Paclobutrazol in the control of the natural flowering difference of 'Smooth Cayenne' pineapple plant Rev Bras Frutic 30 (2)

Bandurska H (2000). Does proline accumulated in leaves of water deficit stressed barley plants confine cell membrane injury? Free proline accumulation and membrane injury index in drought and osmotically stressed plants. Acta Physiologiae Plantarum 22: 409-415

Bates L, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39 (1): 205-207

Bengough AG, McKenzie BM, Hallett PD, Valentine TA (2011) Root elongation, water stress, and mechanical impedance: A review of limiting stresses and beneficial root tip traits. J Exp Bot 62: 59–68

Bertolde FZ, Almeida A-AF, Corrêa RX, Gomes FP, Gaiotto FA, Baligar VC, Loguercio LL (2009) Molecular, physiological and morphological analysis of waterlogging tolerance in clonal genotypes of *Theobroma cacao* L. Tree Physiology, 30: 56–67

Bertolde FZ, Almeida A-AF, Pirovani CP (2014) Analysis of Gene Expression and Proteomic Profiles of Clonal Genotypes from *Theobroma cacao* Subjected to Soil Flooding. PLoS ONE 9 (10)

Bisht R, Singariya P, Bohra SP, Mathur N (2007). Triazoles: Their effects on net photosynthetic rate, transpiration rate and stomatal resistance in *Setaria italica* plants grown in vivo. *Asian Journal of Experimental Sciences* 21: 271–276

Branco MCS, Almeida A-AF, Dalmolina AC, Ahnert D, Baligar VC (2017) Influence of low light intensity and soil flooding on cacao physiology. *Scientia Horticulturae* 217 243–257

Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R (2017) Reactive oxygen species, abiotic stress and stress Combination. *The Plant Journal* 90(5):856-86

Cornic G (2000) Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture: Not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science* 5: 187–188

Davis TD, Steffens GL, Sankhla N (1988) Triazol plant growth regulators. *Horticultural Review* 10: 151–188

do Nascimento JL, de Almeida AF, Barroso JP, Mangabeira PAO, Ahnert D, Sousa AGR, Silva JVS1, Baligar VC (2018) Physiological, ultrastructural, biochemical and molecular responses of young cocoa plants to the toxicity of Cr (III) in soil. *Ecotoxicol Environ Saf* 159: 272-283

Embrapa (2009) Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. – 2º edição revista e ampliada - Brasília DF 627 p

Fletcher RA, Hofstra G (1990) Improvement of uniconazoleinduced protection in wheat seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation* 9: 207–212

Fletcher RA, Gilley A, Davis TD, Sankhla N (2000) Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. *Horticultural Review* 24: 55–138

George AP, Nissen RJ (1992) Effects of water stress, nitrogen and paclobutrazol on flowering, yield and fruit quality of the low-chill peach cultivar, 'flordaprince'. *Scientia Horticulturae* 49: 197–199

Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59 (2): 309-314

Gill SS, Tujeta N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909 – 930

Gill SS, Anjum NA, Gill R, Yadav S, Hasanuzzaman M, Fujita M, Mishra P, Sabat SC, Tuteja N (2015) Superoxide dismutase--mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environ Sci Pollut Res Int* 22(14):10375-94

Gopi R, Jaleel C, Sairam R, Lakshmanan GMA, Gomathinayagam M, Panneerselvam R (2007) Differential effects of hexaconazole and paclobutrazol on biomass, electrolyte leakage, lipid peroxidation and antioxidant potential of *Daucus carota* L. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 60: 180–186

Gopi R, Jaleel C (2009) Photosynthetic alterations in *Amorphophallus campanulatus* with triazoles drenching. *Global Journal of Molecular Sciences* 4: 15–18.

Grossman K. (1988) Plant cell suspensions for screening and studying the mode of action of plant growth retardants. In K Maramorosch, G Sato (Eds) *Advances in cell culture* 89–136. San Diego: Academic Press

Havir EA, Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 84: 450-455

Hernandez JA, Corpas FJ, Gomez M, del Rio LA, Sevilla F (1993) Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiol Plant* 89:103-10

IBGE, 2019. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - LSPA. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/bahia>. Acesso em: fevereiro de 2019

Jaleel CA, Gopi R, Manivannan P, Panneerselvam R (2007) Responses of antioxidant defense system of *Catharanthus roseus* (L.) to paclobutrazol treatment under salinity. *Acta Physiologiae Plantarum* 29: 205–209

Jaleel CA, Manivannan P, Sankar B, Kishorekumar A, Sankari S, Panneerselvam R (2007c) Paclobutrazol enhances photosynthesis and

ajmalicine production in *Catharanthus roseus*. Process Biochemistry 42: 1566–1570

Jungklang J, Saengnil K (2012) Effect of paclobutrazol on patumma cv. Chiang Mai Pink under water stress. Songklanakarin Journal of Science and Technology 34: 361–366

Kamran M, Cui W, Ahmad I, Meng X, Zhang X, Su W, Chen J, Ahmad S, Fahad S, Han Q, Liu T (2018) Effect of paclobutrazol, a potential growth regulator on stalk mechanical strength, lignin accumulation and its relation with lodging resistance of maize. Plant Growth Regul 84: 317–332

Klooster B, Palmer-Young Evan (2004) Water stress marginally increases stomatal density in *E. canadensis*, but not in *A. gerardii*. Tillers 5: 35 - 40

Krishnamurthy A, Rathinasabapathi B (2013) Oxidative stress tolerance in plants: Novel interplay between auxin and reactive oxygen species signaling. Plant Signaling & Behavior 8:10

Larkindale J, Knight MR (2002) Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. Plant Physiol 128:682-95

Manivannan P, Jaleel, CA, Kishorekumar A, Sankar B, Somasundaram R, Sridharan R, et al. (2007) Changes in antioxidant metabolism of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. by propiconazole under water deficit stress. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 57: 69–74

Mohamed GF, Agamy RA, Rady MM (2011) Ameliorative effects of some antioxidants on water-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants. Journal of Applied Sciences Research 7: 2470–2478

Moran J, Becana M, Iturbe-Ormaetxe I, Frechilla S, Klucas R, Aparicio-Tejo P (1994) Drought induces oxidative stress in pea plants. Planta 194:346-52

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, Plant and Cell Physiology 22 (5): 867-880

Özmen AD, Özdemir F, Türkan I (2003) Effects of paclobutrazol on response of two barley cultivars to salt stress. *Biol. Plant.* 46: 263–268

Pan S, Rasul F, Li W, Tian H, Mo Z, Duan M, Tang X (2013) Roles of plant growth regulators on yield, grain qualities and antioxidant enzyme activities in super hybrid rice (*Oryza sativa* L.). *Rice* 6 (9)

Percival C, Noviss K (2008) Triazole induced drought tolerance in horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*). *Tree Physiology* 28: 1685–1692.

Potocka I, Szymanowska-Pulka J, Karczewski J, Nakielski J (2011) Effect of mechanical stress on *Zea* root apex, I, Mechanical stress leads to the switch from closed to open meristem organization. *Journal of Experimental Botany* 62 (13): 4583 – 4593

Rademacher W (1997) Bioregulation of crop plants with inhibitors of gibberellin biosynthesis. *Proceedings of Plant Growth Regulation Society of America* 24: 27–31

Reis GSM, Almeida A-AF, Almeida NM, Castro AV, Mangabeira PAO, Pirovani CP (2015) Molecular, biochemical and ultrastructural changes induced by Pb toxicity in seedlings of *Theobroma cacao* L. *PLoS ONE* 10 (7): e0129696

Reis GSM, Almeida A-AF, Mangabeira PAO, Santos Cld, Pirovani CP, Ahnert D (2018) Mechanical stress by wind in leaves of *Theobroma cacao*: photosynthetic, molecular, antioxidant and ultrastructural responses. *PLoS ONE* 13 (6)

Rehem BC, Almeida A-AF, Santos IC, Gomes FP, Pirovani CP, Mangabeira, PAO, Corrêa RX, Yamada MM, Valle RR (2011) Photosynthesis, chloroplast ultrastructure, chemical composition and oxidative stress in *Theobroma cacao* hybrids with the lethal gene *Luteus-Pa* mutant. *Photosynthetica* 49 (1): 127-139

Rezazadeh A, Harkess RL, Guihong B (2016) Effects of paclobutrazol and flurprimidol on water stress amelioration in potted red firespike. *Hort Technology* 26: 26–29

Rosmin K (1994) Effect of paclobutrazol on growth and yield of cocoa high density plantings 22: 1-35

Sailerova K, Zwiazek JJ (2010) Early effects of triadimefon on water relations, sterol composition and plasma membrane ATPase in white spruce (*Picea glauca*) seedlings. *Physiologia Plantarum* 97 (4):747–753

Santos ICd, Almeida A-AFd, Anheret D, Conceição ASd, Pirovani CP, Pires JL (2014) Molecular, Physiological and Biochemical Responses of *Theobroma cacao* L. Genotypes to Soil Water Deficit. *PLoS ONE* 9 (12): e115746

Setia RC, Kaur P, Setia N, Amerada (1996). Influence of paclobutrazol on growth and development of fruit in *Brassica juncea* (L.) Czern and Coss. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 307–316

Sharma P, Dubey RS (2005) Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 35–52

Soumya PR, Kumar P, Pal M (2017) Paclobutrazol: a novel plant growth regulator and multi-stress ameliorant. *Ind J Plant Physiol* 22(3): 267-278

Souza LS (1996) Uso e manejo dos solos coesos dos tabuleiros costeiros. In: REUNIÃO TÉCNICA SOBRE SOLOS COESOS DOS TABULEIROS COSTEIROS. Pesquisa e desenvolvimento para os Tabuleiros Costeiros. Cruz das Almas BA Anais... Aracaju. SE: EMBRAPA-CPATC 80: 36-75

Turkan I, Bor M, Ozdemir F, Koca H (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought tolerant *P. acutifolius* Gray and drought sensitive *P. vulgaris* subjected to poly ethylene glycol mediated water stress. *Plant Science* 168: 223–231

Valle RR, Almeida A-AFde (1991) Growth Reduction effects of Paclobutrazol Applied at Different Cacao Seedling Stages. *Pesq agropec bras* 26(11/12): 1911-1917

Vineeth TV, Kumar P, Krishna GK (2016) Bioregulators protected photosynthetic machinery by inducing expression of photorespiratory genes under water stress in chickpea. *Photosynthetica* 54: 234–242

Wang HF, Chen RX (1997) Effect of S-3307 on seedling growth and yield of rape. *Plant Physiology* 33: 345–346

Wang C, Hu D, Liu X, She H, Ruan R, Yang H, Yi Z, Wu D (2015) Effects of uniconazole on the lignin metabolism and lodging resistance of culm in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M). *F Crop Res* 180: 46–53

Xiu EY, Yanfang Z, Chen B, Ya H, Dawuda MM (2018) Effects of paclobutrazol on the physiological characteristics of *Malus halliana* Koehne Seedlings under drought stress via principal component analysis and membership function analysis. *Arid Land Research and Management*. 1-17
10.1080/15324982.2018.1488300

Yan XH, Pan RZ (1992) Effects of triadimefon on the growth, photosynthesis and respiration of groundnut seedlings. *Oil Seed Crops (China)* 4: 57

Legendas de Figuras

Figura 1. Taxa fotossintética líquida por unidade de área foliar (A), concentração interna de CO₂ (B), transpiração (C), condutância estomática ao vapor de água (D) e déficit de pressão de vapor de água entre a folha e a atmosfera (E), em folhas de plantas jovens de *T. cacao*, genótipo CCN 51, submetidas a compactação e doses de PBZ no solo. Plantas jovens com 45 dias após a aplicação do PBZ no solo. Valores médios de cinco repetições ($\pm$ SE). As letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos (compactação + doses de PBZ) e as letras minúsculas indicam comparação entre as 4 densidades (1,0; 1,3; 1,5; 1,7 kg dm⁻³) dentro de cada dose de PBZ (0, 30, 60 e 90 μ g g⁻¹ PBZ no solo) pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Figura 2. Micromorfologias de secções transversais do mesofilo foliar (A-D) de plantas jovens de *T. cacao*, genótipo CCN 51, submetidas a compactação e a doses de PBZ no solo: 1,0 kg dm⁻³ e 0 μ g g⁻¹ de PBZ no solo (A); 1,3 kg dm⁻³ e 0 μ g g⁻¹ de PBZ no solo (B); 1,3 kg dm⁻³ e 90 μ g g⁻¹ de PBZ no solo (C); 1,7 kg dm⁻³ e 0 μ g g⁻¹ de PBZ no solo (D); 1,7 kg dm⁻³ e 90 μ g g⁻¹ de PBZ no solo (E). Barra: 40 μ m.

Figura 3. Teor de prolina em folhas de *T. cacao*, genótipo CCN 51, submetidas a compactação do solo e a doses de PBZ no solo. 0 horas (A), 3 horas (B), 6 horas (C), 12 horas (D), 24 horas (E), 48 horas (F), 96 horas (G) e 60 dias (H), após a aplicação de PBZ no solo. Valores médios de 3 repetições ($\pm$ SE). As letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos (compactação + doses de PBZ) e as letras minúsculas indicam comparação entre as 4 densidades (1,0; 1,3; 1,5; 1,7 kg dm⁻³) dentro de cada dose de PBZ (0, 30, 60 e 90 μ g g⁻¹ PBZ no solo) pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Figura 4. Área foliar (A) e comprimento de raiz (B) em plantas de *T. cacao*, genótipo CCN 51, submetidas a compactação do solo e a doses de PBZ no solo. Valores médios de 10 repetições ($\pm$ SE). As letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos (compactação + doses de PBZ) e as letras minúsculas indicam comparação entre as 4 densidades (1,0; 1,3; 1,5; 1,7 kg

dm⁻³) dentro de cada dose de PBZ (0, 30, 60 e 90 µg g⁻¹ PBZ no solo) pelo teste de Scott-Knott (p <0,05).

Figura 5. Biomassa seca de raiz (A), caule (B) e folha (C) de plantas de *T. cacao*, genótipo CCN 51, submetidas a compactação do solo e a doses de PBZ no solo. Valores médios de 10 repetições (±SE). As letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos (compactação + doses de PBZ) e as letras minúsculas indicam comparação entre as 4 densidades (1,0; 1,3; 1,5; 1,7 kg dm⁻³) dentro de cada dose de PBZ (0, 30, 60 e 90 µg g⁻¹ PBZ no solo) pelo teste de Scott-Knott (p <0,05).

Figura 6. Atividade da SOD em folhas de *T. cacao*, genótipo CCN 51, submetidas a compactação do solo e a doses de PBZ no solo. 0 horas (A), 3 horas (B), 6 horas (C), 12 horas (D), 24 horas (E), 48 horas (F), 96 horas (G) e 60 dias (H), após a aplicação de PBZ no solo. Valores médios de 4 repetições (±SE). As letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos (compactação + doses de PBZ) e as letras minúsculas indicam comparação entre as 4 densidades (1,0; 1,3; 1,5; 1,7 kg dm⁻³) dentro de cada dose de PBZ (0, 30, 60 e 90 µg g⁻¹ PBZ no solo) pelo teste de Scott-Knott (p <0,05).

Figura 7. Atividade da CAT em folhas de *T. cacao*, genótipo CCN 51, submetidas a compactação do solo e a doses de PBZ no solo. 6 horas (A), 24 horas (B), 48 horas (C), e 60 dias (D), após a aplicação de PBZ no solo. Valores médios de 4 repetições (±SE). As letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos (compactação + doses de PBZ) e as letras minúsculas indicam comparação entre as 4 densidades (1,0; 1,3; 1,5; 1,7 kg dm⁻³) dentro de cada dose de PBZ (0, 30, 60 e 90 µg g⁻¹ PBZ no solo) pelo teste de Scott-Knott (p <0,05).

Figura 8. Atividade da APX em folhas de *T. cacao*, genótipo CCN 51, submetidas a compactação do solo e a doses de PBZ no solo. 0 horas (A), 3 horas (B), 6 horas (C), 12 horas (D), 24 horas (E), 48 horas (F), 96 horas (G) e 60 dias (H), após a aplicação de PBZ no solo. Valores médios de 4 repetições (±SE). As letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos (compactação + doses de PBZ) e as letras minúsculas indicam comparação

entre as 4 densidades (1,0; 1,3; 1,5; 1,7 kg dm⁻³) dentro de cada dose de PBZ (0, 30, 60 e 90 µg g⁻¹ PBZ no solo) pelo teste de Scott-Knott (p <0,05).

Figura 9. Atividade da GPX em folhas de T. cacao, genótipo CCN 51, submetidas a compactação do solo e a doses de PBZ no solo. 0 horas (A), 3 horas (B), 6 horas (C), 12 horas (D), 24 horas (E), 48 horas (F), 96 horas (G) e 60 dias (H), após a aplicação de PBZ no solo. Valores médios de 4 repetições (±SE). As letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos (compactação + doses de PBZ) e as letras minúsculas indicam comparação entre as 4 densidades (1,0; 1,3; 1,5; 1,7 kg dm⁻³) dentro de cada dose de PBZ (0, 30, 60 e 90 µg g⁻¹ PBZ no solo) pelo teste de Scott-Knott (p <0,05).

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Análises físico-químicas do solo utilizado no experimento, coletado no horizonte B do Latossolo Amarelo coeso, localizado no município de Ilhéus, BA, Brasil.

pH	(CaCl ₂)	4.8
P	mg dm ⁻³	3.0
MO	g dm ⁻³	6.0
H + Al	mmol _c dm ⁻³	28.0
Al	mmol _c dm ⁻³	1.2
K	mmol _c dm ⁻³	1.8
Ca	mmol _c dm ⁻³	10.0
Mg	mmol _c dm ⁻³	6.0
SB	mmol _c dm ⁻³	17.8
CTC	mmol _c dm ⁻³	45.8
B	mg dm ⁻³	0.2
Cu	mg dm ⁻³	0.1
Fe	mg dm ⁻³	20
Mn	mg dm ⁻³	0.4
Zn	mg dm ⁻³	1.1
Sand	g kg ⁻¹	487.3
Silt	g kg ⁻¹	65.7
Clay	g kg ⁻¹	447.0

P, K, Ca e Mg (Resina)

B (água quente)

Cu, Fe, Mn e Zn (DTPA)

Al (Cloreto de Potássio 1 mmol_c dm⁻³)

MO Walkley Black (Col.)

SB (Soma de bases trocáveis - Ca⁺², Mg⁺², K⁺, Na⁺ e mmol_c dm⁻³)

CTC (Capacidade de troca catiônica - mmol_c dm

Tabela 2. Características anatômicas analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) de folhas de plantas jovens de *Theobroma cacao*, genótipo CCN 51, submetidos à compactação do solo e a doses de paclobutrazol. Valores médios de nove repetições ($\pm$ SE). Letras maiúsculas indicam comparação entre tratamentos e letras minúsculas dentro de cada tratamento pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$).

Densidade (kg dm ⁻³)	PBZ ($\mu\text{g g}^{-1}$ solo)	PP (μm)	SP (μm)	Ead (μm)	Eab (μm)	TM (μm)	LT (μm)
1.0	0	22.10 $\pm$ 0.38 ns	29.61 $\pm$ 3.03 Aa	9.68 $\pm$ 1.09 Bb	15.66 $\pm$ 1.10 Aa	48.99 $\pm$ 2.64 ns	74.51 $\pm$ 2.36 Aa
1.3	0	17.78 $\pm$ 0.80 ns	29.96 $\pm$ 1.22 Aa	13.91 $\pm$ 1.87 Aa	9.87 $\pm$ 0.70 Ba	49.00 $\pm$ 1.99 ns	70.49 $\pm$ 1.10 Ba
	90	20.34 $\pm$ 1.05 ns	22.61 $\pm$ 1.75 Bb	14.45 $\pm$ 1.05 Aa	9.62 $\pm$ 0.38 Ba	43.59 $\pm$ 2.71 ns	63.33 $\pm$ 2.84 Cb
1.7	0	18.80 $\pm$ 0.80 ns	25.41 $\pm$ 0.90 Bb	12.26 $\pm$ 1.03 Aa	9.82 $\pm$ 0.68 Ba	46.89 $\pm$ 1.26 ns	68.78 $\pm$ 0.41 Bb
	90	21.81 $\pm$ 1.52 ns	29.29 $\pm$ 1.99 Aa	15.86 $\pm$ 1.41 Aa	10.96 $\pm$ 0.51 Ba	46.63 $\pm$ 2.77 ns	74.88 $\pm$ 1.04 Aa

Tabela 3. Características anatômicas dos estômatos analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) de folhas de plantas jovens de *Theobroma cacao*, genótipo CCN 51, submetidos à compactação do solo e a doses de paclobutrazol. Valores médios de nove repetições ($\pm$ SE). Letras maiúsculas indicam comparação entre tratamentos e letras minúsculas dentro de cada tratamento pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$).

Densidade (kg dm ⁻³)	PBZ ($\mu\text{g g}^{-1}$ solo)	TOS (μm)	LOS (μm)	SPL (μm)	SPO (μm)	SD (μm^2)
1.0	0	15.75 $\pm$ 0.2 Aa	14.13 $\pm$ 0.2 ns	7.71 $\pm$ 2.1 ns	2.12 $\pm$ 0.1 ns	527.58 $\pm$ 16.6 Aa
1.3	0	14.88 $\pm$ 0.2 Ba	13.28 $\pm$ 0.2 ns	7.72 $\pm$ 0.1 ns	1.71 $\pm$ 0.1 ns	466.66 $\pm$ 21.8 Ba
	90	14.69 $\pm$ 0.1 Ba	14.03 $\pm$ 0.4 ns	7.99 $\pm$ 0.4 ns	2.16 $\pm$ 0.2 ns	494.11 $\pm$ 19.6 Ba
1.7	0	14.53 $\pm$ 0.1 Bb	13.41 $\pm$ 0.1 ns	6.98 $\pm$ 0.03 ns	1.41 $\pm$ 0.06 ns	489.99 $\pm$ 22.3 Ba
	90	17.75 $\pm$ 0.1 Aa	13.63 $\pm$ 0.4 ns	7.85 $\pm$ 0.2 ns	1.74 $\pm$ 0.03 ns	449.34 $\pm$ 2.55 Ba

Tabela 4. Variações antes e 60 dias após a aplicação de PBZ no solo (Δ). Número de folhas (NF), altura da planta (AP) e diâmetro do coleto (DC), em plantas jovens de *Theobroma cacao*, genótipo CCN 51, submetidos à compactação do solo e a doses de paclobutrazol. Valores médios de dez repetições ($\pm$ SE). Letras maiúsculas indicam comparação entre tratamentos e letras minúsculas dentro de cada tratamento pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$).

Densidades (kg dm ⁻³)	PBZ (μ g g ⁻¹)	Δ NF	Δ AP (cm)	Δ DC (mm ²)
1.0	0	6.9 $\pm$ 0.23 Aa	1.77 $\pm$ 0.26 Aa	9.37 $\pm$ 2.27 Aa
	0	6.4 $\pm$ 0.4 Aa	1.78 $\pm$ 0.34 Aa	5.49 $\pm$ 0.78 Aa
1.3	30	3.3 $\pm$ 0.5 Cb	0.43 $\pm$ 0.2 Ab	2.86 $\pm$ 0.89 Aa
	60	2.9 $\pm$ 0.48 Cb	0.36 $\pm$ 0.34 Ab	4.58 $\pm$ 0.69 Aa
	90	2.0 $\pm$ 0.47 Cb	0.48 $\pm$ 0.47 Ab	6.95 $\pm$ 1.49 Aa
	0	5.9 $\pm$ 0.58 Aa	1.65 $\pm$ 0.41 Aa	7.50 $\pm$ 1.22 Aa
1.5	30	4.0 $\pm$ 0.33 Bb	0.81 $\pm$ 0.25 Aa	4.90 $\pm$ 0.75 Aa
	60	3.2 $\pm$ 0.59 Cc	1.29 $\pm$ 0.52 Aa	8.15 $\pm$ 1.73 Aa
	90	1.9 $\pm$ 0.27 Dd	1.02 $\pm$ 0.19 Aa	6.67 $\pm$ 0.89 Aa
	0	6.1 $\pm$ 0.31 Aa	1.47 $\pm$ 0.61 Aa	11.44 $\pm$ 1.21 Aa
1.7	30	4.5 $\pm$ 0.54 Bb	-0.5 $\pm$ 0.74 Ab	8.22 $\pm$ 0.83 Aa
	60	2.5 $\pm$ 0.42 Cc	0.62 $\pm$ 0.27 Ab	9.51 $\pm$ 1.04 Aa
	90	2.3 $\pm$ 0.39 Cc	0.79 $\pm$ 0.33 Ab	8.43 $\pm$ 0.87 Aa

Lista de Figuras

Figura 1

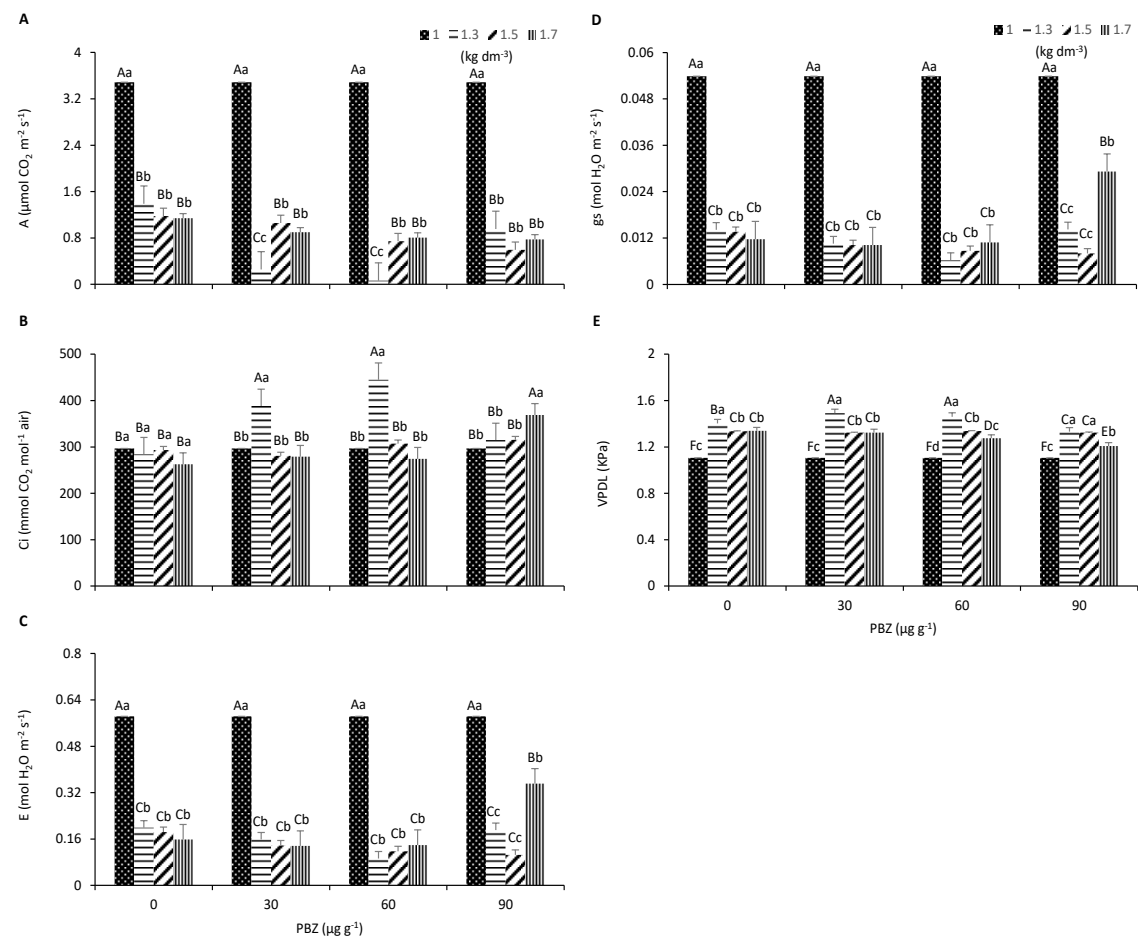


Figura 2

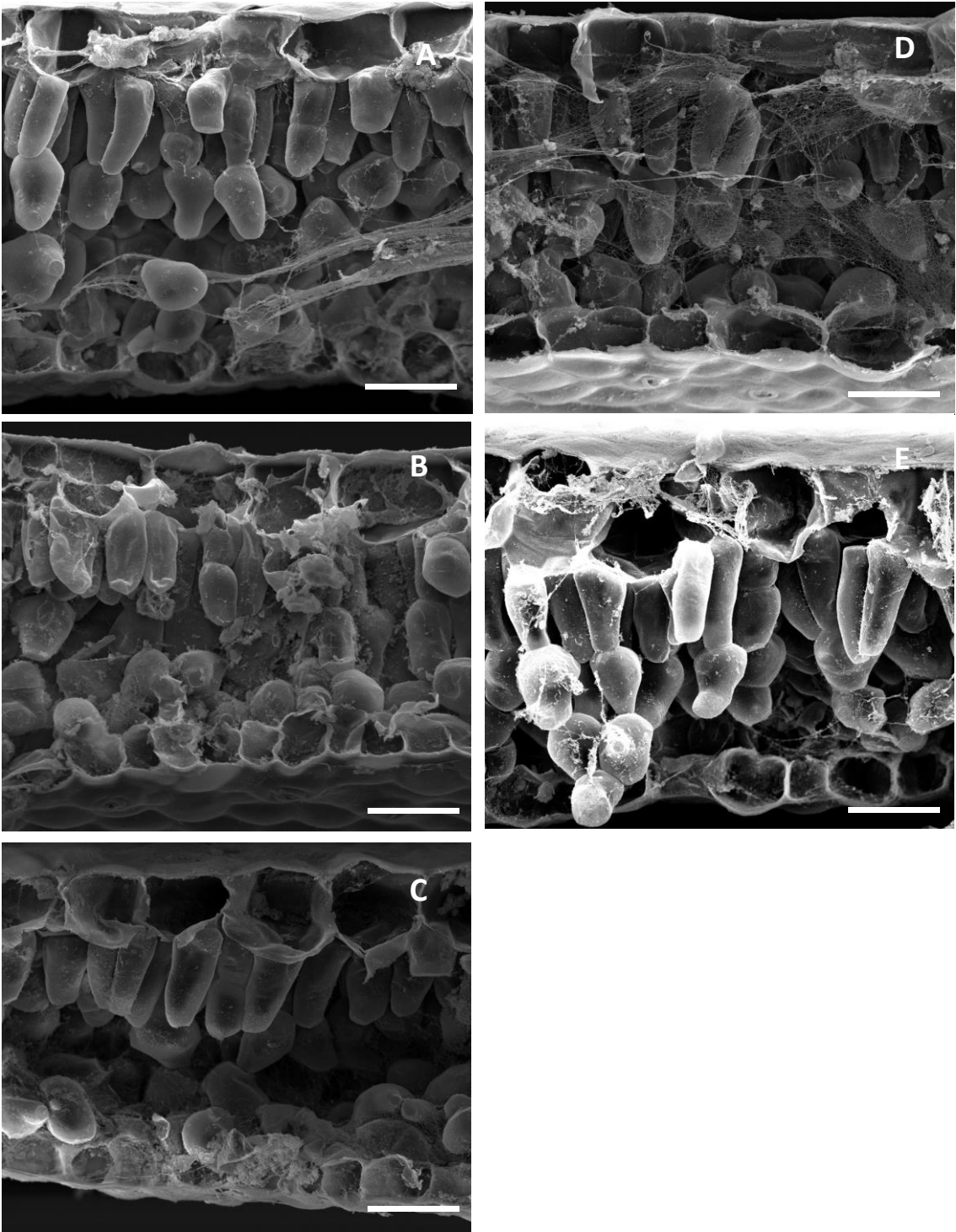


Figura 3

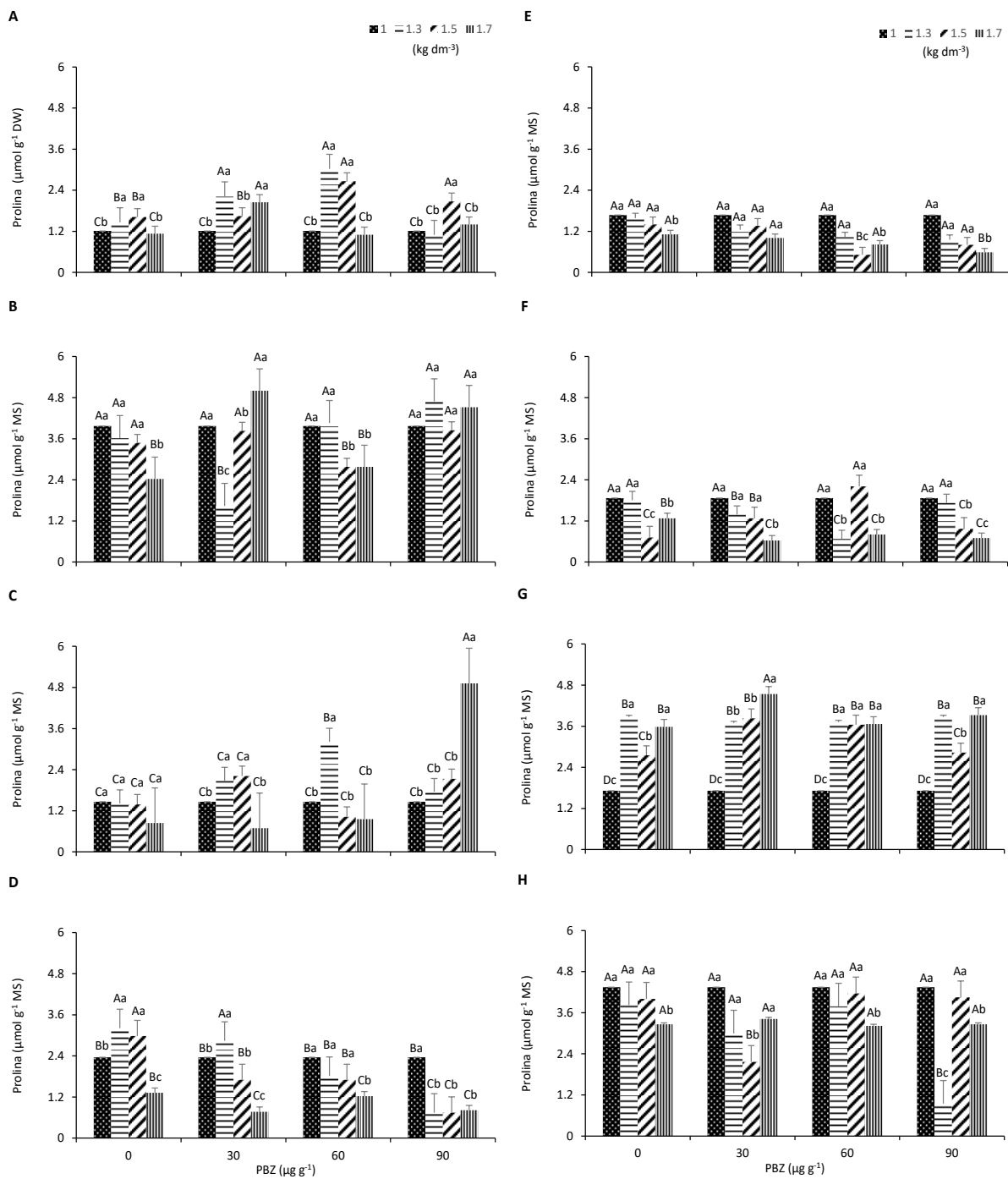


Figura 4

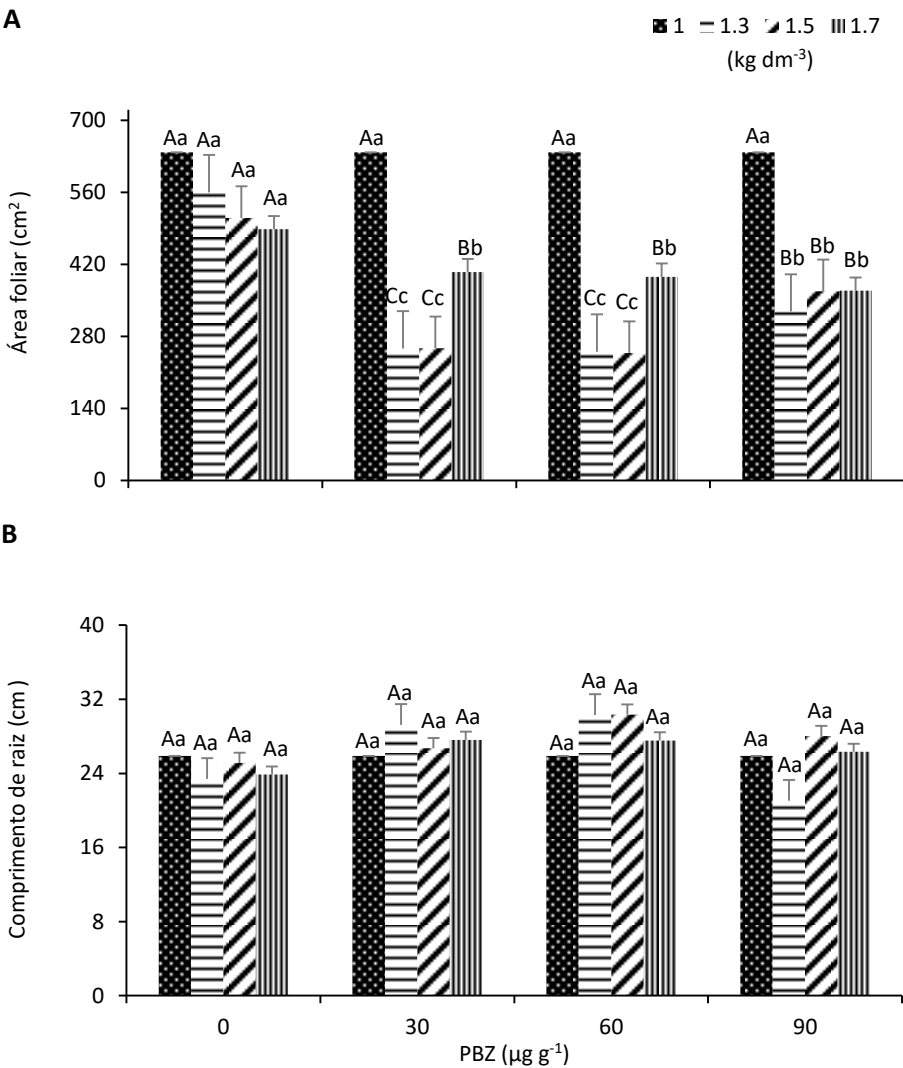


Figura 5

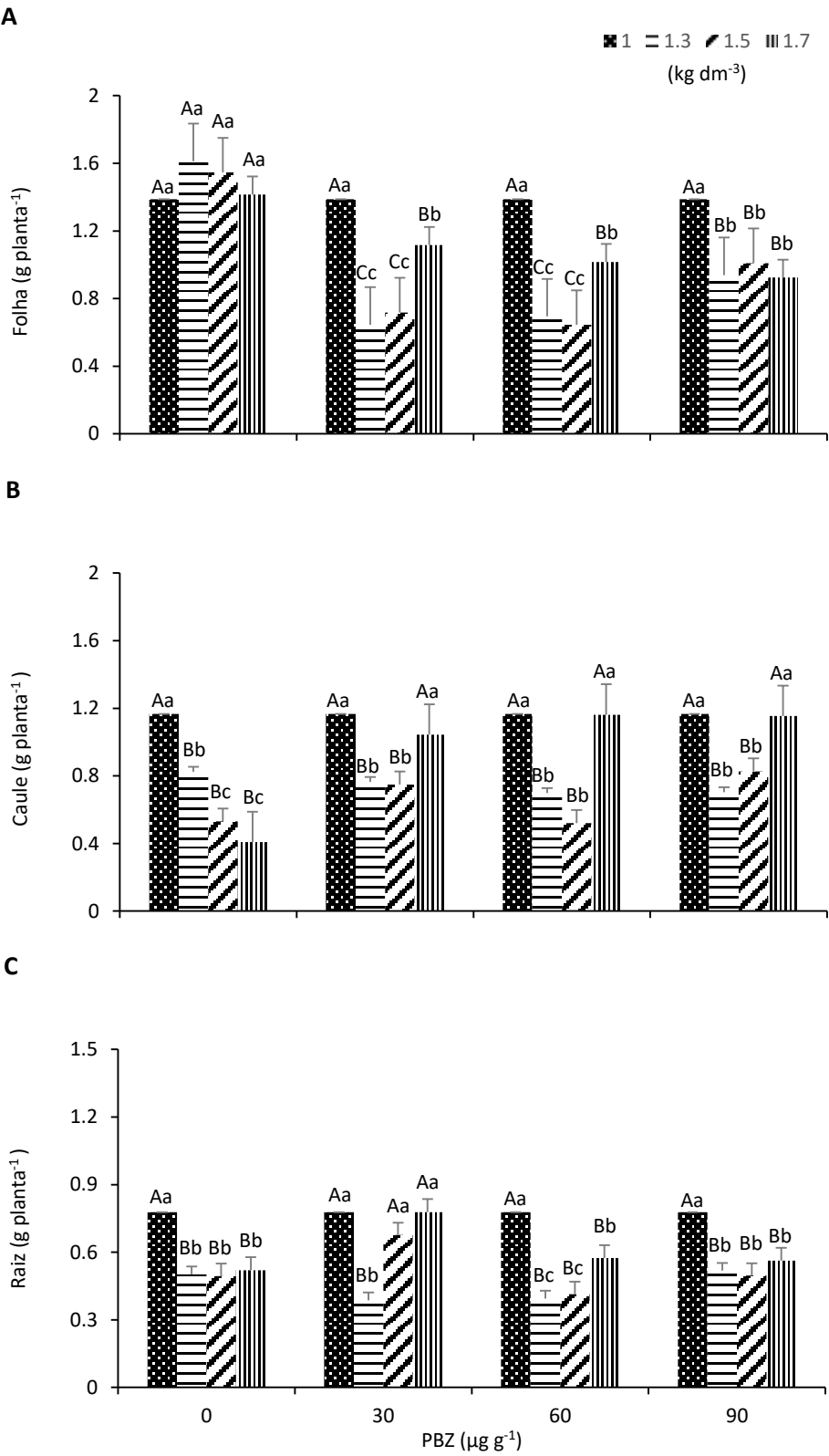


Figura 6

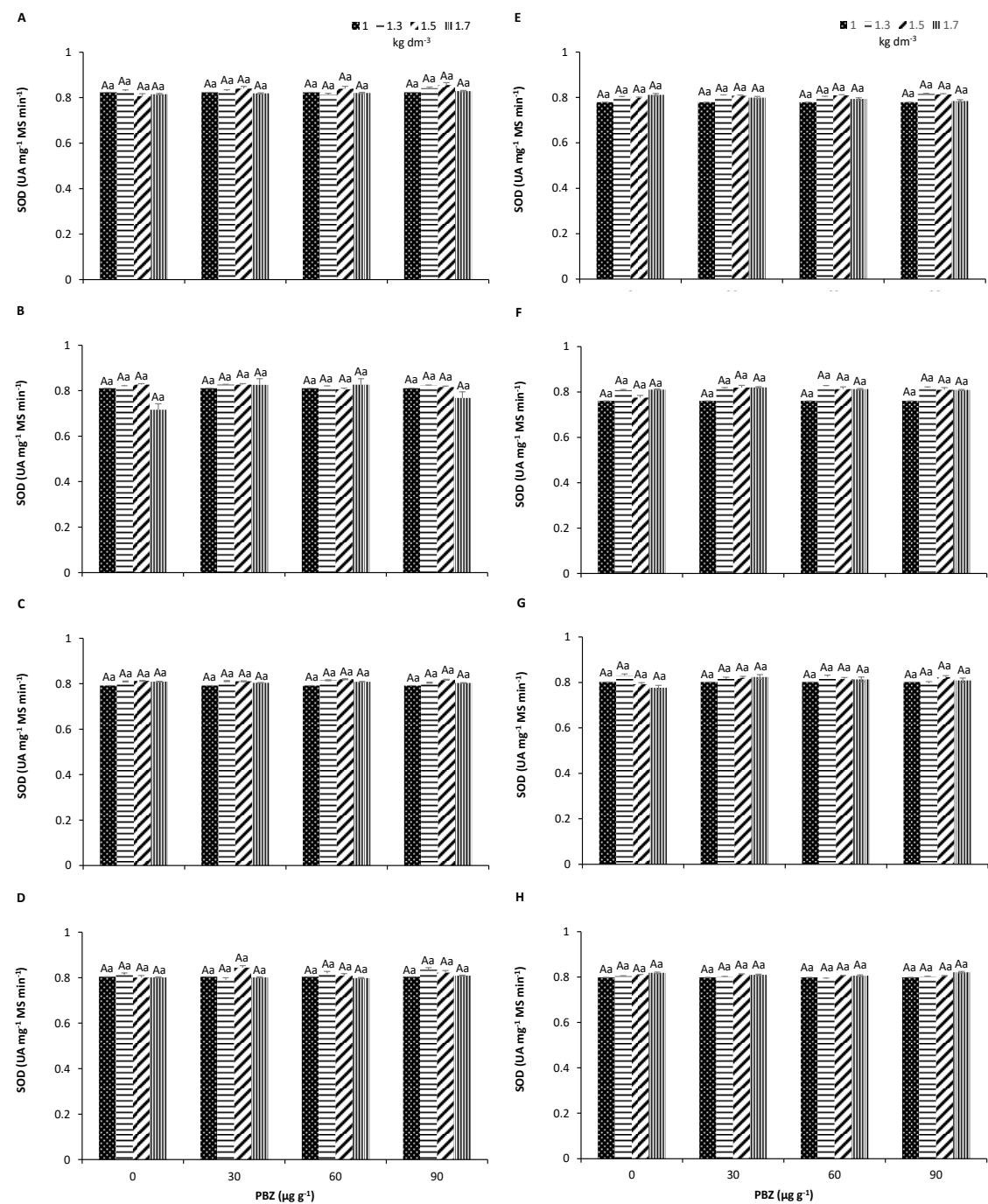


Figura 7

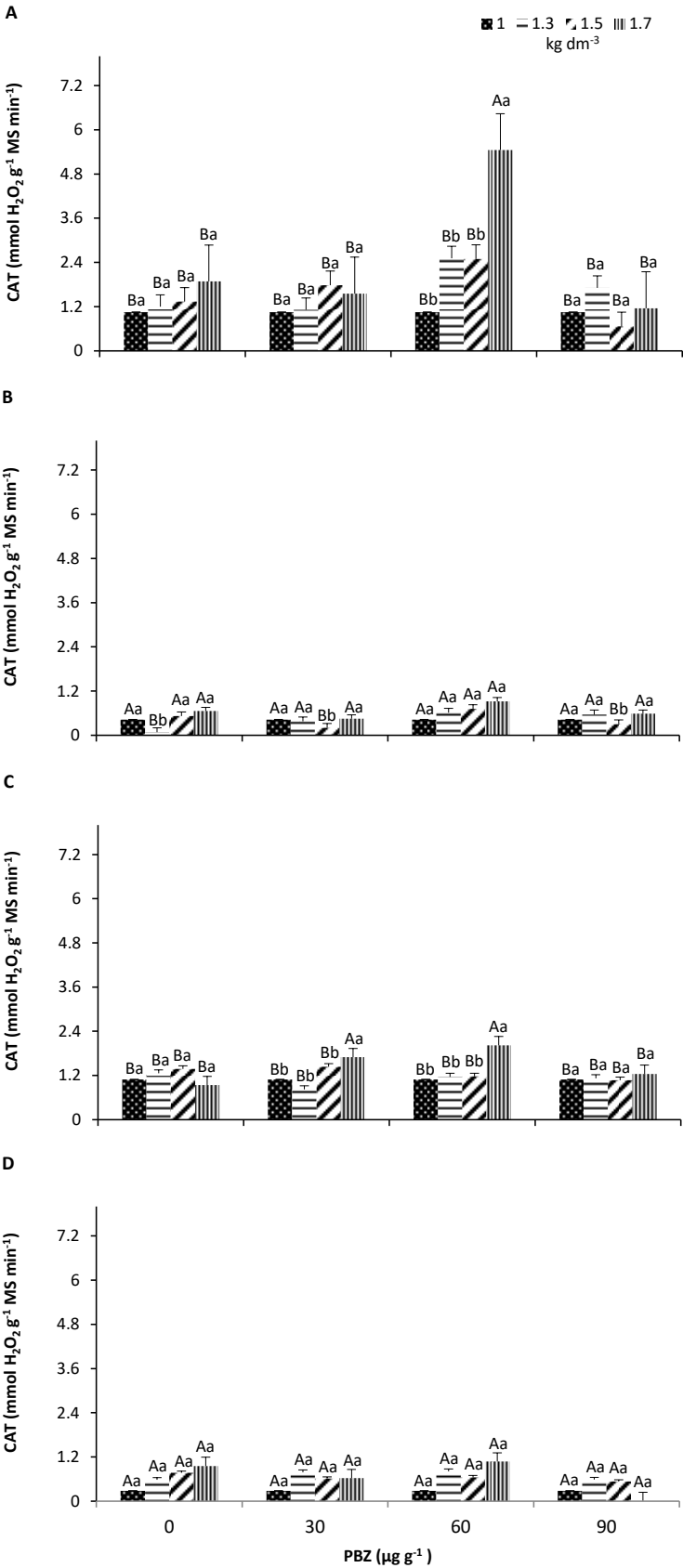


Figura 8

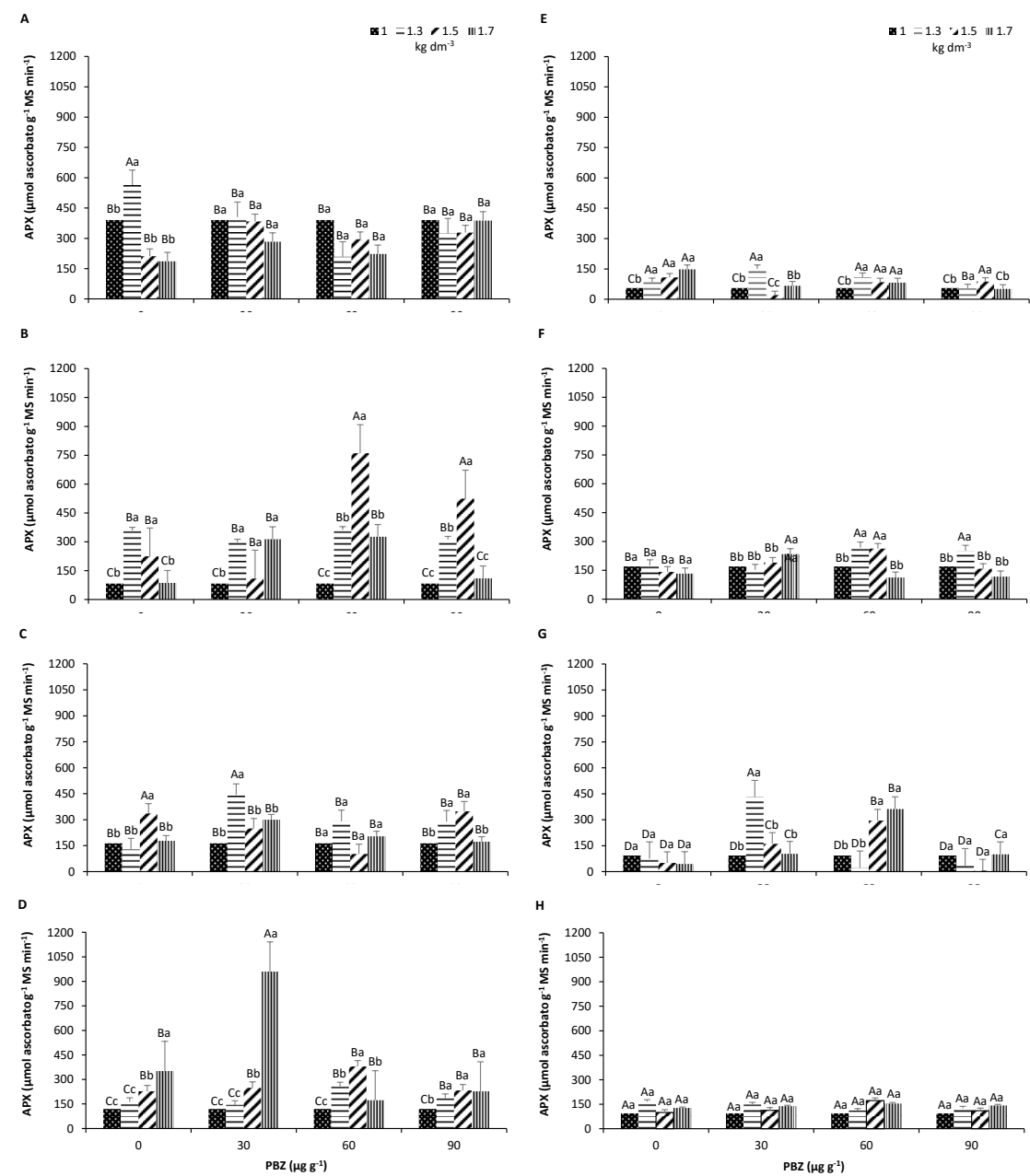
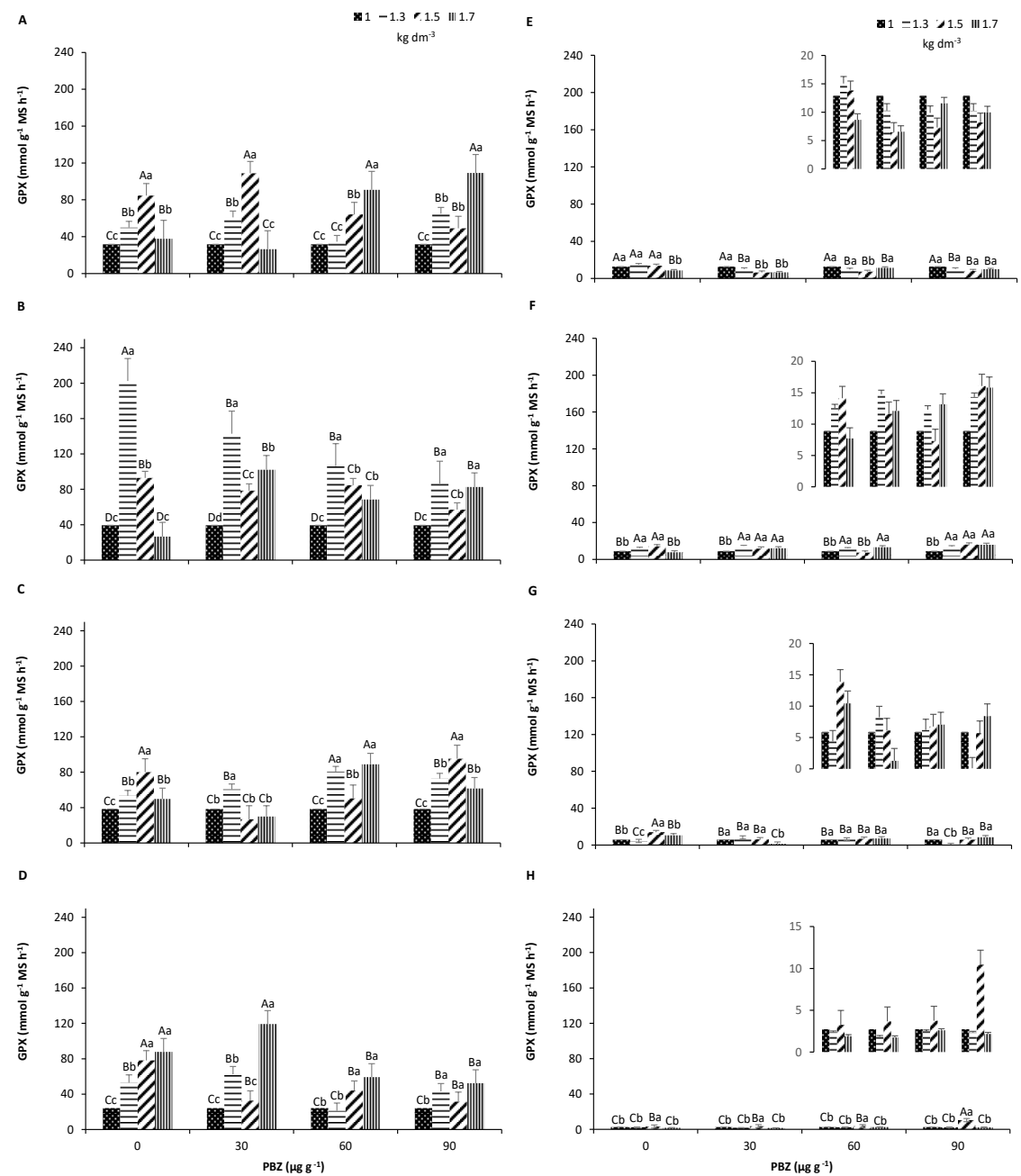


Figura 9



5. CONCLUSÕES GERAIS

Observou-se um aumento na expressão das proteínas nas raízes crescidas no solo compactado, associada com a localização da dose ideal de P. A maioria das proteínas, que foram identificadas nos tratamentos de compactação do solo, pertenceu ao grupo de proteínas envolvidas no metabolismo de compostos orgânicos.

As proteínas de maior expressão, pertencentes ao metabolismo de compostos orgânicos, estão relacionadas à degradação de reservas energéticas, durante o estresse mecânico provocado pela compactação do solo. Estas proteínas contribuem para a manutenção da produção energia na forma de ATP, utilizada para o crescimento de raízes no solo compactado e com baixa disponibilidade de oxigênio. Estas alterações estão relacionadas à manutenção da homeostase celular e estimulam o crescimento do sistema radicular durante o processo de estresse.

A aplicação do PBZ nas plantas jovens de *T. cacao*, do genótipo CCN 51, pareceu funcionar como um protetor contra o estresse mecânico por compactação do solo. Em plantas com maior densidade de solo e dose de PBZ, a aplicação do PBZ, promoveu maior espessura total foliar e maior abertura transversal dos estômatos. Por outro lado, o teor de prolina variou ao longo das coletas das plantas sob condições de estresse por compactação do solo. Em contrapartida a aplicação do PBZ no solo, agiu de forma a reduzir o número de folha, a altura das plantas, a área foliar, a biomassa seca de folha, além de elevar a biomassa seca de caule na maior densidade e promover alterações no metabolismo das enzimas do sistema antioxidativo.

Os resultados sugerem que as alterações promovidas pela aplicação do PBZ no solo, indicam possíveis mecanismos de tolerância das plantas ao estresse por compactação do solo, sendo evidenciada pela maior concentração de PBZ aplicada no solo. No entanto, é necessária mais pesquisa para revelar o mecanismo induzido por PBZ de proteção a múltiplos estresses.

6. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

Achard P e Genschik P (2009) Releasing the brakes of plant growth: How GAs shutdown DELLA proteins. *J Exp Bot* 60(4):1085 - 1092

Aguiar Netto AO, Nacif PGS (1988) Caracterização morfológica e físico-hídrica de solos representativos do Recôncavo Baiano. I. Determinação da capacidade de campo “in situ” e suas relações com dados obtidos em laboratório. Cruz das Almas BA: UFBA 59 p

Allen GJ, Kwak JM, Chu SP, Llopis J, Tsien RY, Harper JF, Schroeder JI (1999) Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal* 19(6): 735-747

Almeida A-AF, Valle RR (2007) Ecophysiology of the cacao tree. *Braz. J. Plant Physiol* 19 (4)

Alvarenga RC, Costa LM, Moura Filho W, Regazzi AJ (1996) Crescimento de raízes de leguminosas em camadas de solo compactadas artificialmente. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. Campinas 20: 319 - 326

Alvim PT (1975) Cocoa research in Brazil. *Cocoa Growers' Bull* 23: 18 - 24

Alvim PT (1977). Cacao. In *Ecophysiology of Tropical Crops*. Eds Alvim PT and Kozlowski TT. New York: Academic Press 279 - 313

Barbosa MR, Silva MMA, Willadino L, Ulisses C, Camara T (2014) Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Cienc. Rural* 44(3): 453 - 460

Beckett ST, Fowler MS, Ziegler GR (2017) *Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use*. 5th Edition

Bertolde FZ, Almeida A-AF, Corrêa RX, Gomes FP, Gaiotto FA, Baligar VC, Loguercio LL (2009) Molecular, physiological and morphological analysis of waterlogging tolerance in clonal genotypes of *Theobroma cacao* L. *Tree Physiology* 30: 56 - 67

Bertolde FZ, Almeida A-AF, Pirovani CP (2014) Analysis of Gene Expression and Proteomic Profiles of Clonal Genotypes from *Theobroma cacao* Subjected to Soil Flooding. PLoS ONE 9(10): e108705

Caverzan A, Casassola A, Brammer SP (2016) Reactive Oxygen Species and Antioxidant Enzymes Involved in Plant Tolerance to Stress. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/61368>> Acessado em: 26 de jan de 2019

Cheesman EE (1944) Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. Trop Agric 21:144 - 159

Chehab EW, Eich E, Braam J (2009) Thigmomorphogenesis: a complex plant response to mechano-stimulation. Journal of Experimental Botany 60(1): 43 – 56

Chen H, Wilkerson CG, Kuchar JA, Phinney BS, Howe GA (2005) Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 102: 19237–19242

Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R (2017) Reactive oxygen species, abiotic stress and stress Combination. The Plant Journal 90(5):856 - 886

Colebrook EH, Thomas SG, Phillips AL, Hedden P (2014) The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. Journal of Experimental Biology 217: 67 - 75

Corpas FJ, Gupta DK, Palma JM (2015) Production Sites of Reactive Oxygen Species (ROS) in Organelles from Plant Cells. Chapter from book Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress 1 – 22

Coutand C, Julien JL, Moulia B, Mauget JC, Guitard D (2010) Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: global mechanical analysis. Journal Experimental Botany 51: 1813–1824

Daymond AJ, Hadley P (2004) The effects of temperature and light integral on early vegetative growth and chlorophyll fluorescence of four contrasting

genotypes of cacao (*Theobroma cacao*). *Annals of Applied Biology* 145: 257-262

do Nascimento JL, de Almeida AF, Barroso JP, Mangabeira PAO, Ahnert D, Sousa AGR, Silva JVS1, Baligar VC (2018) Physiological, ultrastructural, biochemical and molecular responses of young cocoa plants to the toxicity of Cr (III) in soil. *Ecotoxicol Environ Saf* 159: 272 - 283

Elavarthi S, Martin B (2010) Spectrophotometric Assays for Antioxidant Enzymes in Plants. *Methods Mol Biol* 639: 273 - 281

Finkelstein R (2013) Absciscic Acid Synthesis and Response. *Arabidopsis Book* 11: e0166

Franklin KA (2008) Shade avoidance. *New Phytol* 179: 930 - 944

Gill SS, Tujeta N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology Biochemistry* 48: 909 – 930

Gupta SD (2011) Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants. Boca Raton: CRC Press 1st 384p

Hedden P, Phillips AL (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant in Science* 5: 523 – 530

Jaffe MJ (1973) Thigmomorphogenesis: the response of plant growth and development to mechanical stimulation. *Planta* 114: 143-157

Kozlowski TT (1999) Soil compaction and growth of woody plants. *Scandinavian. Journal of Forest Research* 14:596 - 619

Krishnamurthy A, Rathinasabapathi B (2013) Oxidative stress tolerance in plants Novel interplay between auxin and reactive oxygen species signaling. *Plant Signaling & Behavior* 8:10

Lee D, Polisensky DH, Braam J (2005) Genome-wide identification of touchand darkness-regulated *Arabidopsis* genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes. *New Phytologist* 165: 429–444

Leite PB (2012). Caracterização de chocolates provenientes de variedades de cacau *Theobroma cacao* L. resistentes à vassoura de bruxa. Mestrado (Mestre em Ciência dos Alimentos) Universidade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia

Liu Y, Schieving F, Stuefer JF, Anten NP (2007) The effects of mechanical stress and spectral shading on the growth and allocation of ten genotypes of a stoloniferous plant. *Annals of Botany* 99: 121 - 130

Lopez OR, Kursar TA (2003) Does flood tolerance explain tree species distribution in tropical seasonally flooded habitats? *Oecologia* 136: 193 - 204

Minguet, EG, Alabadí D, Blázquez MA (2014) Gibberellin Implication in Plant Growth and Stress Responses. In: Tran LS, Pal S (eds) *Phytohormones: A Window to Metabolism, Signaling and Biotechnological Applications*. Springer New York NY 20: 119 - 161

Miransari M (2016) Environmental Stresses in Soybean Production. *Soybean Production* 2: 131-156

Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9(10): 490 – 498

Naido G, Stewart JMcd, Lewis RJ (1978) Accumulation sites of Al in snapbean and cotton roots. *Agronomy Journal*. Madison 70 (3): 489 - 492

Ni J, Gao C, Chen M-S, Pan B-Z, Ye K, Xu Z-F (2015) Gibberellin promotes branching in *Jatropha curcas*. *Plant Cell Physiology* 56(8): 1655 - 1666

Niemenak N, & Kaiser E, Maximova S, Laremore T, & Guiltinan M (2015) Proteome analysis during pod, zygotic and somatic embryo maturation of *Theobroma cacao*. *Journal of plant physiology* 180: 49 – 60

Oeljeklaus S, Meyer HE, Warscheid B (2009) Advances in plant proteomics using quantitative mass spectrometry. *J Proteom* 72: 545 - 554

Ogas J, Cheng J-C, Sung ZR, Someville C (1997) Cellular differentiation regulated by gibberellin in the *Arabidopsis thaliana* pickle mutant. *Science* 277: 91 - 94

Olszewski N, Sun TP, Gubler F (2002) Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* 14: 61 – 80

Parker R, Flores TJ, Moore AL, Harpham NV (2006) An accurate and reproducible method to protect the profile of the effects of saline stress on the leaf blade of rice. *J Exp Bot* 57: 1109 - 1118

Pezeshki SR (2001) Wetland plant responses to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany* Paris 46 (3): 299 - 312

Potocka I, Szymanowska-Pulka J, Karczewski J, Nakielski J (2011) Effect of mechanical stress on *Zea* root apex. I. Mechanical stress leads to the switch from closed to open meristem organization. *Journal of Experimental Botany* 62 (13): 4583 - 4593

Reis GSM, Almeida A-AF, Mangabeira PAO, Santos ICd, Pirovani CP, Ahnert D (2018) Mechanical stress by wind in leaves of *Theobroma cacao*: photosynthetic, molecular, antioxidant and ultrastructural responses. *PLoS ONE* 13 (6)

Risterucci AM, Grivet L, N'Goran JAK, Pieretti I, Flament MH, Lanaud C (2000) A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. TAG Theoretical and Applied Genetics 101(5-6): 948 - 955

Rosolem CA, Almeida ACS, Sacramento LVS (1994) Sistema radicular e nutrição da soja em função da compactação do solo. *Bragantia Campinas* 53 (2): 259 – 266

Saidi I, Ammar BS, Demont-Caulet N, Thévenin J, Lapierre C, Bouzid S, Jouanin L (2009) Thigmomorphogenesis in *Solanum lycopersicum*: Morphological and biochemical responses in stem after mechanical stimulation. *Plant Science* 177: 1-6

Santos ICd, Almeida A-AFd, Anhert D, Conceição ASd, Pirovani CP, Pires JL, et al. (2014) Molecular, Physiological and Biochemical Responses of

Theobroma cacao L. Genotypes to Soil Water Deficit. PLoS ONE 9(12): e115746.

Sena Gomes AR, Kozłowski TT (1986) The effects of flooding on water relations and growth of *Theobroma cacao* var. *catongo* seedlings. J Hort Sci 61:265 - 276

Sharma P, Jhan AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. Journal of Botany 26 p

Soares AMS, Machado OLT (2007) Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas 1(1) 19p

Solorzano RGL, Fouet O, Lemainque A, Pavék S, Boccara M, Argout X., Amores F, Courtois B, Risterucci AM, Lanaud C (2012) Insight into the Wild Origin, Migration and Domestication History of the Fine Flavour Nacional *Theobroma cacao* L. Variety from Ecuador. PLoS ONE 7(11): e48438

Soumya PR, Kumar P, Pal M (2017) Paclobutrazol: a novel plant growth regulator and multi-stress ameliorant. Ind J Plant Physiol 22(3): 267 - 278

Souza LS (1996) Uso e manejo dos solos coesos do tabuleiros costeiros. In: Reunião técnica sobre solos coesos dos tabuleiros costeiros. Pesquisa e desenvolvimento para os Tabuleiros Costeiros. Cruz das Almas BA Anais... Aracaju SE: EMBRAPA-CPATC 80p: 36 - 75

Tosto TF (2015) Fotossíntese, crescimento e metabolismo antioxidativo em plântulas de cacau submetidas ao estresse mecânico por compactação e a variações de doses de fósforo em solo de tabuleiros costeiros. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia Bahia: Ilhéus 72p

Toxopeus H (1969) Cacao, *Theobroma cacao* L. In: Fenworth FP and Wit F (eds) Outlines of Perennial Crop Breeding in the Tropics. Veenman and Zonen Wageningen 79 – 109

- Valle RR, Almeida A-AF (1989) Paclobutrazol Effects on Cacao Seedlings. *Pesquisa agropecuária brasileira*. Brasília 249: (I) 149-152
- Wang H, Inukai Y, Yamauchi A (2006) Root Development and Nutrient Uptake. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25: 279 - 301
- Warren J. (1992) Cocoa breeding in the 21st century. 13–17th September; Port of Spain, Trinidad and Tobago 215 - 220
- Wood GRA, Lass RA (2001) Cocoa (Tropical Agriculture). Wiley-Blackwell 4: 82 - 83
- Yamaguchi S (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology* 59: 225 – 251
- Zhao D, Gong S, Hao Z, Meng J, Tao J (2015) Response to Paclobutrazol Inhibition of Lateral Branching. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 24332 - 24352
- Zhou Y, Underhill Steven JR (2016) Breadfruit (*Artocarpus altilis*) gibberellin 2-oxidase genes in stem elongation and abiotic stress response. *Plant Physiology and Biochemistry* 98: 81 - 88

