

SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA PROMOVE AUMENTO NA DENSIDADE ESTOMÁTICA DE FOLHAS DE *Coffea arabica* L. SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO SEGUIDO DE REIDRATAÇÃO¹

Cleide Nascimento Campos², Naiára Nascimento Campos³, Roniel Geraldo Ávila⁴, Lillian Magalhães Azevedo⁵, Kamila Rezende Dázio de Souza⁶, Jose Donizeti Alves⁷.

¹ Trabalho financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

² Doutoranda, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, cleide125@gmail.com

³ Graduanda, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-BA, naiarancampos@hotmail.com

⁴ Pesquisador Pós-doc, Instituto Federal Goiano, Rio Verde-GO, ronielgeraldo@yahoo.com.br

⁵ Mestranda, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, li.magalhaes.A@hotmail.com

⁶ Pesquisadora Pós-doc, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas-MG, krdazio@hotmail.com

⁷ Pesquisador, DSc, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, jdalves@dbi.ufla.br

RESUMO: Nos últimos anos muito se tem comentado sobre os possíveis efeitos das alterações climáticas nos vegetais, destacando-se a seca como o principal fator que afeta o desenvolvimento das plantas, inclusive do cafeeiro. Diante disso, surge o interesse na utilização de substâncias como a melatonina, que promovam tolerância das plantas aos diferentes estresses bióticos e abióticos. Desta forma, foi realizado um experimento cujo objetivo foi avaliar a ação da melatonina na indução de tolerância à seca e avaliar modificações morfoanatômicas sob estresse hídrico em mudas de *Coffea arabica* L. da cultivar Catuaí 144. As mudas de café foram colocadas em recipiente de 3 litros contendo solo padrão para mudas de café, passaram por um período de aclimação de 4 semanas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) num esquema fatorial 4X3, sendo quatro tratamentos (controle irrigado, 0, 300 e 500µM de melatonina sob estresse hídrico) e três épocas de coleta (0 dias, agravamento dos sintomas no tratamento de 0 µM e 24h após reidratação), com três repetições. Foi observado que a melatonina na dose de 300 mM promoveu maior densidade estomática em folhas de *Coffea arabica* L. submetidas ao déficit hídrico seguido de reidratação.

PALAVRAS-CHAVE: cafeeiro, seca, indução de tolerância.

MELATONIN SUPPLEMENT PROMOTES INCREASE IN THE STOMATIC DENSITY OF *Coffea arabica* L. LEAVES SUBMITTED TO WATER DEFICIT FOLLOWED BY REHYDRATION

ABSTRACT: In recent years much has been commented on the possible effects of climate change on plants, with drought being the main factor affecting the development of plants, including coffee. Therefore, there is an interest in the use of substances such as melatonin, which promote plant tolerance to different biotic and abiotic stresses. Thus, an experiment was carried out aiming to evaluate the action of melatonin in the induction of drought tolerance and to evaluate morphological modifications under water stress in *Coffea arabica* L. seedlings of Catuaí 144 cultivar. The coffee seedlings were placed in a container of 3 liters containing standard soil for coffee seedlings, went through an acclimatization period of 4 weeks. The experiment was conducted in a completely randomized design (CRD) in a 4X3 factorial scheme, with four treatments (irrigated control, 0, 300 and 500µM melatonin under water stress) and three collection times (0 days, worsening of symptoms in the treatment of 0µM and 24h after rehydration), with three repetitions. It was observed that melatonin at 300µM promoted higher stomatal density in leaf of the *Coffea arabica* L. mesophyll submitted to water deficit followed by rehydration.

KEY WORDS: coffee tree, drought, induction tolerance.

INTRODUÇÃO

Fatores ambientais influenciam diretamente a anatomia foliar, sendo a condição hídrica um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento da folha (CASTRO et al., 2009; SILVA et al., 2005). A anatomia foliar do cafeeiro demonstra plasticidade para fatores como as condições de radiação, alterando as espessuras do parênquima paliádico e esponjoso, dimensões estomáticas, entre outras (NASCIMENTO et al., 2006). Diante disso, respostas adequadas às mudanças ambientais são cruciais para o desenvolvimento e sobrevivência das plantas. Na tentativa de aumentar a tolerância das plantas aos diferentes estresses ambientais, surge o interesse pela utilização de substâncias que promovam essa tolerância. Dentre essas moléculas, a melatonina é descrita como promotora de tolerância a estresses em plantas (ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2014). Sua síntese é indutível nos vegetais, quando estes estão expostos a estresses bióticos e abióticos, limitando o estresse oxidativo pela indução da expressão de genes relacionados a estresses, redução da peroxidação lipídica e dos níveis de H₂O₂, e aumento do sistema antioxidante enzimático

(ZHANG et al., 2014; REITER et al., 2015). Embora a melatonina esteja atuando na promoção da tolerância de diferentes espécies vegetais a estresses abióticos, não há estudos que relacionem a aplicação exógena da melatonina com a tolerância de café à seca. Diante da importância da cafeicultura atrelada à ocorrência de seca nos locais de cultivo de café, surge a oportunidade de estudar a melatonina como indutora de tolerância do cafeeiro à seca.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras. Utilizaram-se mudas de *Coffea arabica* cv. Catuaí 144 com 5 pares de folhas, obtidas de viveiro comercial. As mudas foram transferidas para vasos de polipropileno contendo 3kg de substrato padrão para mudas de cafeeiro e passaram por um período de aclimação de 4 semanas. Em seguida, foram impostos quatro tratamentos: controle, em que as plantas eram irrigadas e cuja umidade do substrato era mantida próxima à capacidade de campo; melatonina a 0 μM , cujas plantas tiveram a rega suspensa até a manutenção de 40% da capacidade de campo; melatonina a 300 μM + déficit hídrico, em que as plantas foram tratadas com 300 μM de melatonina e tiveram a rega suspensa até a manutenção de 40% da capacidade de campo; e melatonina a 500 μM + déficit hídrico, em que as plantas foram tratadas com 500 μM de melatonina e tiveram a rega suspensa até a manutenção de 40% da capacidade de campo. Foram realizadas três avaliações: T0 - primeiro dia antes da aplicação dos tratamentos; T1 - aos 20 dias após imposição dos tratamentos, quando apareceram os primeiros sintomas. Em seguida, realizou-se a reidratação de todas as plantas e, 24 horas depois realizou-se a terceira coleta (T2). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) num esquema fatorial 4X3, sendo quatro tratamentos e três épocas de coleta, com três repetições. A estrutura anatômica das folhas foi estudada utilizando-se cinco folhas totalmente expandidas, retiradas do terço superior das plantas. Após a coleta, as folhas e raízes foram fixadas em FAA 70% (formaldeído, ácido acético e álcool etílico) (JOHANSEN, 1940) por 72 horas e conservadas em álcool etílico 70% (v/v) em vidros para posteriores análises. Os cortes transversais foliares foram realizados na região mediana das folhas, por meio de secções obtidas com o auxílio do micrótomo de mesa. As secções foram clarificadas em solução a 50% de hipoclorito de sódio, sendo lavadas em água destilada e submetidas ao processo de coloração com a mistura de azul de astra-safranina (safranina 7,5: azul de astra 2,5), seguindo-se os métodos descritos por Kraus e Arduin (1997), sendo as lâminas montadas em glicerina a 50%. Para as avaliações relativas à caracterização dos estômatos (número médio por mm, diâmetro polar e equatorial), foram feitos cortes paradérmicos manuais, utilizando-se uma lâmina de aço. Os cortes realizados na região mediana das folhas na epiderme da face abaxial foram submetidos ao processo de coloração com safranina e colocados sobre uma lâmina contendo água glicerinada. Foram observados cinco campos da região mediana de cada folha, totalizando 15 campos por tratamento (três folhas por tratamento). Foi realizada a contagem do número de células epidérmicas, estômatos e medições do diâmetro polar e equatorial. O índice estomático (I.E.) foi calculado com a utilização da seguinte fórmula: $I.E. (\%) = [Sn / (Sn+Em)] \times 100$, sendo Sn o número de estômatos e Em o número de células da epiderme. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico LEICA DM 750 acoplado a uma câmara digital Cânon Poxer Shot A620. As medições dos padrões anatômicos analisados foram realizadas pelo programa de análise de imagens Axion Vision SE 64 (REL 4.9). As variáveis foram analisadas quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($p \geq 0,05$). Em seguida, foram submetidas à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que as características estomáticas foram afetadas pelo déficit hídrico (Tabela1). Verificou-se no T1 que o déficit hídrico acarretou um aumento no número de estômatos, diâmetro polar, diâmetro equatorial e índice estomático quando comparado às plantas controle. Já nas plantas que foram pré-tratadas com melatonina, observou-se que na concentração de 300 μM , houve um acréscimo no número de estômatos e diâmetro polar, sendo que nas demais variáveis não houve diferença. Já na concentração de 500 μM de melatonina as plantas apresentaram uma redução no número de estômatos e um aumento do diâmetro equatorial. Já no T2 não houve diferença entre os tratamentos em relação ao número de estômatos e índice estomático. Plantas pré-tratadas com melatonina há 300 μM diminuiu o diâmetro polar, já em concentração de 500 μM diminuiu diâmetro polar e equatorial, quando comparadas as plantas não tratadas. Segundo Castro et al. (2009) condições ambientais como estresse hídrico alteram o tamanho e a densidade dos estômatos, assim sendo, verifica-se uma diminuição no tamanho dos estômatos, para que haja uma menor perda de água pela transpiração, e simultaneamente aumenta sua densidade para poder controlar as trocas gasosas. O aumento na densidade estomática pode ser relacionado com uma maior capacidade das plantas em captar o CO_2 da atmosfera, permitindo que mais desse gás seja fixado, aumentando a taxa fotossintética. Neste trabalho, no T1 pode-se observar que houve um aumento na densidade estomática, porém os diâmetros polar e equatorial também aumentaram. Em plantas tratadas com melatonina 300 μM esse aumento foi maior que nas plantas não tratadas e tratadas com 500 μM .

Tabela 1: Densidade estomática, diâmetro polar, diâmetro equatorial e índice estomático (μm) de mudas de cafeeiro controle e pré-tratadas com melatonina e submetidas ao déficit hídrico.

		Densidade Estomática	Diâmetro Polar	Diâmetro Equatorial	Índice Estomático
T0	Controle	49,87 Aa	31,61 Ab	21,56 Ab	0,18 Aa
	DH	49,87 Aa	31,61 Ab	21,56 Aa	0,18 Aa
	DH + 300 μM	49,87 Ab	31,61 Ab	21,56 Ab	0,18 Ab
	DH + 500 μM	49,87 Aa	31,61 Aa	21,56 Aa	0,18 Aa
T1	Controle	46,47 Ca	15,71 Cc	10,21 Cc	0,17 Ba
	DH	53,80 Ba	31,12 Bb	19,51 Bb	0,19 Aa
	DH + 300 μM	59,07 Aa	32,90 Aa	19,95 Bc	0,20 Aa
	DH + 500 μM	50,13 Ca	30,84 Ba	20,45 Ac	0,17 Ba
T2	Controle	47,80 Aa	33,41 Ba	22,50 Aa	0,17 Aa
	DH	51,00 Aa	34,53 Aa	21,94 Aa	0,19 Aa
	DH + 300 μM	48,93 Ab	33,08 Ba	22,30 Aa	0,17 Ab
	DH + 500 μM	53,47 Aa	32,06 Ca	21,06 Ba	0,18 Aa

*As letras mostram as diferenças entre as médias segundo o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro de cada tempo, enquanto as letras minúsculas comparam o efeito do tempo em cada tratamento.

CONCLUSÃO

1 - Existe indícios de que a melatonina a 300 μM atue favoravelmente sob plantas de *Coffea arabica* submetidas ao déficit hídrico, pois aumentaram a densidade estomática. Além disso, a depender da dose utilizada a melatonina tem efeitos antagônicos, onde menores doses são benéficas às plantas e maiores doses são prejudiciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNAO, M. B.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J. Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress: **Trends in plant science**, v. 19, n. 12, p. 789-797, 2014.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia Vegetal: Estrutura e Função de Órgãos Vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill Book Co., New York, N.Y., 1940.
- NASCIMENTO, E. A. *et al.* Alterações morfofisiológicas em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) consorciado com seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Ciência Rural**, v. 36, n. 03, p. 852-857, 2006.
- REITER, R. J. *et al.* Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 7396-7437, 2015.
- SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Interrelações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botânica Brasílica**, v. 19, n. 01, p. 183-194, 2005.
- ZHANG, N. *et al.* Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. **Journal of Experimental Botany**, p. 5-10, 2014.