

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

CAROLINE NERY JEZLER

**AVALIAÇÃO ANATÔMICA E ULTRAESTRUTURAL DE *Coffea arabica* L. EM  
RESPOSTA AO BORO E AO COBRE**

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

J59a  
2016 Jezler, Caroline Nery, 1988-  
Avaliação anatômica e ultraestrutural de *Coffea arabica* L.  
em resposta ao boro e ao cobre / Caroline Nery Jezler. – Viçosa,  
MG, 2016.  
x, 65f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Marília Contin Ventrella.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Coffea arabica*. 2. Café - Anatomia. 3. Ultraestrutura.  
4. Células e tecidos vegetais. 5. Micronutrientes vegetais.  
6. Plantas - Efeito do cobre. 7. Plantas - Efeito do boro.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Vegetal. Programa de Pós-graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 583.93

CAROLINE NERY JEZLER

**AVALIAÇÃO ANATÔMICA E ULTRAESTRUTURAL DE *Coffea arabica* L. EM  
RESPOSTA AO BORO E AO COBRE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2016

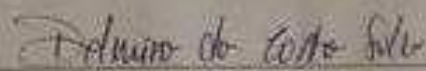
CAROLINE NERY JEZLER

AVALIAÇÃO ANATÔMICA E ULTRAESTRUTURAL DE *Coffea arabica* L. EM  
RESPOSTA AO BORO E AO COBRE

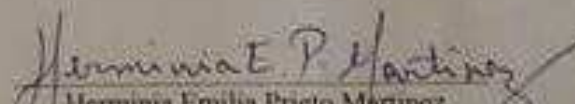
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 26 de fevereiro de 2016.

  
Aristéia Alves Azevedo

  
Delmira da Costa Silva

  
Edson Marcio Mattiello

  
Herminia Emilia Prieto Martinez  
(Coorientadora)

  
Marília Contin Ventrella  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, pai eterno, pela sua bondade e misericórdia. Sem Seu amor e proteção jamais chegaria onde estou. A caminhada foi muito mais tranquila quando entreguei a minha vida em Suas mãos. Agradeço imensamente pela fé que me mantém viva e me dá forças para continuar, sempre.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), por tornar o meu sonho real, aos professores do Programa de Pós-Graduação em Botânica da UFV, por todo conhecimento compartilhado, aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, pela atenção diária, e à CAPES, pela bolsa concedida.

Agradeço à minha orientadora, profa. Dra. Marília Ventrella, por todo exemplo de competência, determinação e dedicação. Sua orientação foi essencial para o sucesso desse trabalho. Tenho um carinho especial por você.

À minha coorientadora profa. Dra. Herminia Martinez pela disponibilidade ilimitada. Você é um exemplo de profissionalismo, no qual me espelho para um futuro próximo.

Aos professores Dr. Paulo Cecon, pelo auxílio nas análises estatísticas e por todo bom humor em cada reunião, e ao Dr. Carlos Schaefer, pelo auxílio nas microanálises.

Ao Gilmar, Carla e Carlota, do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV, por toda ajuda e companheirismo na última etapa do trabalho.

Aos meus pais Carlos e Fátima Jezler, meus sinceros agradecimentos. Nutro por vocês um amor incondicional. Serei eternamente grata pela criação consciente e responsável, pelos ensinamentos indispensáveis que me tornaram uma mulher honesta, de bom caráter e personalidade, por toda dedicação para que eu tivesse a melhor educação e obtivesse os melhores resultados, e principalmente por toda cumplicidade, amor, carinho e apoio diário. Meu sucesso profissional reflete toda a base de família, da qual tenho muito orgulho de fazer parte. Vocês foram e serão o meu grande alicerce e o meu maior exemplo. Amo Vocês.

Aos meus irmãos Carla, Carlos Jr. e Marcus. Vocês me ensinaram o encanto de ser a caçula da família e me proporcionaram o prazer de admirá-los pelas diferentes escolhas que fizeram na vida. Tive a oportunidade de reunir a força de vontade de um, com a leveza da vida do outro e com a amizade sincera e as conversas descontraídas que me ampararam nos momentos mais difíceis que vivi em Viçosa.

Ao meu marido, Thiago Nascimento, que me apoiou desde a aprovação no doutorado à minha defesa, mesmo sabendo que a distância seria cruel. O simples fato de saber que você estava ao meu lado, mesmo distante, era suficiente para me dar forças para continuar. Nossas conversas acalmavam o meu coração e me encorajavam para o novo. Agradeço por todo amor e compreensão cedidos nesses quatro anos em que estivemos distantes fisicamente, mas unidos em alma e coração.

À Luana e à Maria, irmãs que ganhei neste lugar que aprendi a amar. A amizade e o carinho de vocês me foram essenciais, principalmente quando o coração chorava a dor da distância de casa.

À Patrícia e à Aurora, que foram muito mais do que técnicas, mas sim amigas para todos os momentos. Os abraços carinhosos de bom dia e o sorriso fácil renovavam as minhas energias.

À Lays, que muito admiro. Agradeço por todo apoio, incentivo, carinho e amizade. Trabalhar ao seu lado sempre foi muito fácil e prazeroso. Formamos uma boa dupla. “Tamo junto”.

À Valéria e à Martielly, pelos bons momentos vividos em nossa república. Nossas conversas, desabafos e reflexões me auxiliaram no processo contínuo de amadurecimento emocional. Agradeço por terem me mostrado o quanto podemos ser melhores a cada amanhecer.

Aos amigos distantes, Laize, Lívia, Gudinho, Jamille e Melissa, os quais preencheram o vazio das noites sem sono, e aos amigos próximos, Isabel, Marinalva, Eliza, Tiago, Ivan, Walas e Leonardo, pelo companheirismo e agradáveis momentos de convivência.

Por fim, agradeço a todos que me auxiliaram nessa etapa tão prazerosa da vida.

**“Um homem é o que ele lê, come e bebe na vida. Logo deve escolher a melhor  
leitura, a melhor comida e a melhor bebida, o café...”**

**Johann Wolfgang von Goethe**

## **BIOGRAFIA**

CAROLINE NERY JEZLER, filha de Carlos Alberto Jezler e Fátima Lúcia Nery dos Santos Jezler, nasceu em Salvador, Bahia, no dia 25 de janeiro de 1988.

Completo o primeiro e segundo grau em Ilhéus, Bahia, no Instituto Nossa Senhora da Piedade, em dezembro de 2002 e dezembro de 2005, respectivamente.

Em março de 2006 ingressou no curso de Ciências Biológicas, na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, graduando-se em fevereiro de 2010.

Em março de 2010 iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, na UESC, submetendo-se à defesa da dissertação no dia 17 de fevereiro de 2012.

Ao final de fevereiro de 2012 iniciou o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Botânica, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se à defesa da tese no dia 26 de fevereiro de 2016.



## SUMÁRIO

	pág.
<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
<b>2.1 Objetivos gerais</b> .....	3
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	4
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	5
<b>CAPÍTULO I: Deficiência x excesso de boro em cafeeiro: alterações morfoanatômicas e ultraestruturais</b> .....	7
RESUMO .....	7
INTRODUÇÃO .....	8
MATERIAL E MÉTODOS .....	9
RESULTADOS .....	14
DISCUSSÃO .....	32
CONCLUSÕES .....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37
ANEXO A .....	40
ANEXO B .....	41
<b>CAPÍTULO II: Efeitos de doses de cobre sobre a anatomia e a ultraestrutura de órgãos vegetativos de cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.)</b> .....	42
RESUMO .....	42
INTRODUÇÃO .....	43
MATERIAL E MÉTODOS .....	44
RESULTADOS .....	48
DISCUSSÃO .....	58
CONCLUSÕES .....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62
ANEXO A .....	64
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	65

## RESUMO

JEZLER, Caroline Nery, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Avaliação anatômica e ultraestrutural de *Coffea arabica* L. em resposta ao boro e ao cobre.** Orientadora: Marília Contin Ventrella. Coorientadora: Herminia Emilia Prieto Martinez.

O Brasil é o maior produtor mundial de café, e o café arábica (*Coffea arabica* L.) é o mais apreciado pelos países consumidores. Minas Gerais destaca-se como principal estado produtor de café no país, mas suas lavouras apresentam diferentes situações nutricionais, principalmente no teor de micronutrientes, como B e Cu. Condições de deficiência e excesso de nutrientes podem ocasionar o aparecimento de sintomas macroscópicos característicos e prejudicar a produção. Mesmo quando os sintomas macroscópicos não ocorrem, as plantas podem apresentar “fome ou toxidez oculta”, observados apenas anatômica e ultraestruturalmente, ou por avaliação do estado nutricional. Sendo assim, objetivou-se avaliar os efeitos de doses de deficiência e excesso de B e Cu sobre os aspectos macroscópicos, anatômicos e ultraestruturais e avaliar o estado nutricional dos cafeeiros cultivados em sistema hidropônico. O cafeeiro pode ser considerado mais tolerante ao excesso de B do que à deficiência, pois sob condições de deficiência menor quantidade de B chega aos ápices caulinares pelo xilema (via apoplasto), o que promove uma série de alterações morfoanatômicas e ultraestruturais nas plantas. A deficiência de B, causa primariamente, alteração na síntese de pectinas durante a formação de novas paredes celulares de primórdios foliares em expansão. Essa alteração desencadearia uma série de processos até a abscisão foliar e, finalmente, morte do meristema apical. Além disso, a destruição dessas regiões associadas à síntese de auxina (AIA) provocaria um desbalanço hormonal em toda a planta e, nas raízes, os níveis inadequados de AIA causariam diferenciação precoce de células e tecidos, formação de raízes ramificadas e encurtadas, até necrose do ápice radicular. Assim, o evento final da deficiência de B seria a diminuição da área do sistema radicular e do potencial de absorção de água e nutrientes. Como ocorre brotação após a abscisão dos órgãos em expansão sob deficiência de B, sugere-se que também ocorra retranslocação deste nutriente pelo floema (via simplástica), das folhas mais velhas para folhas mais novas. O acúmulo de B nas folhas mais novas após a brotação corrobora com essa possibilidade. Em contrapartida, a alteração dos cloroplastos é o sintoma ultraestrutural primordial da deficiência ou do excesso de Cu em folhas de

cafeeiros, o que reforça a importância desse nutriente no processo fotossintético. Porém, o atraso no surgimento de sintomas morfoanatômicos da deficiência e do excesso de Cu em cafeeiros pode ser consequência do acúmulo deste nutriente nas raízes e da retranslocação para as folhas mais novas, favorecendo a manutenção de concentrações adequadas na planta.

## ABSTRACT

JEZLER, Caroline Nery, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Anatomical and ultrastructural evaluation of *Coffea arabica* L. in response to boron and copper.** Adviser: Marília Contin Ventrella. Co-adviser: Herminia Emilia Prieto Martinez.

Brazil is the world's largest coffee producer, and arabica (*Coffea arabica* L.) is the most specie appreciated by the consuming countries. Minas Gerais stands out as the main coffee producing state in the country, but their crops have different nutrient conditions, especially in the micronutrient content, such as B and Cu. Conditions of deficiency and excess nutrients can cause the appearance of characteristic macroscopic symptoms and impair production. Even when the macroscopic symptoms do not occur, the plants may have "hidden hunger or toxicity," observed only anatomical and ultrastructure, or assessment of nutritional status. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of doses of deficiency and excess of B and Cu on the macroscopic, anatomical and ultrastructural aspects and assess the nutritional status of coffee grown hydroponically. The coffee may be considered more tolerant to excessive B than the deficiency. Under conditions of deficiency of B minor amount of B reaches the xylem to the shoot tip (apoplastic pathway), which promotes a series of morphoanatomic and ultrastructural alterations in plants. Deficiency of B, cause primarily, changes in pectin synthesis during the formation of new cell walls of leaf primordia expanding. This change would trigger a series of processes to leaf abscission, and ultimately death of apical meristem. Furthermore, the destruction of these regions associated with auxin synthesis (AIA) would trigger a hormonal disbalance throughout the plant and the roots. In roots, inadequate levels of AIA cause early differentiation of cells and tissues, formation of branched and shortened roots, and necrosis of the apex. Thus, the final event of B deficiency would be to reduce the area of the root system and the potential for absorption of water and nutrients. As occur regrowth after abscission of organs expanding deficiency in B, it is suggested that also this nutrient translocation occurs through phloem (symplastic pathway), older leaves to young leaves. The accumulation of B in younger leaves after regrowth corroborates this possibility. In contrast, the change of chloroplasts is the primary ultrastructural symptom of deficiency or excess Cu in coffee leaves, which reinforces the importance of this nutrient in the photosynthetic process. However, the delay in the onset of morphoanatomic symptoms

of deficiency and excess Cu in coffee may be a consequence of the accumulation of this nutrient in the roots and translocation to the younger leaves, favoring the plant rebalancing.

.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior produtor mundial de café (FAO, 2015), e a cafeicultura brasileira tem importância considerável no que se refere ao volume de produção, consumo interno, exportação de grãos, além da alta capacidade de geração de emprego e renda na economia (TEIXEIRA, 2002). O Brasil produz comercialmente as espécies *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre (café robusta), as quais representam 74,1% e 25,88% da produção nacional, respectivamente (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2015). Tal expressão econômica do café arábica resulta da produção de um café de melhor qualidade, sendo mais apreciado em todos os países consumidores.

Dentre os principais estados produtores de café no Brasil, Minas Gerais destaca-se por apresentar cerca de 51,6% da área cultivada com café no país, e a espécie predominantemente utilizada é a do café arábica (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2015). No entanto, apesar da expressiva produção cafeeira do estado, as lavouras apresentam diferentes situações nutricionais, com desequilíbrios consideráveis no teor de nutrientes (MARTINEZ et al., 2003). A variada fertilidade dos solos mineiros (LANA et al., 2010), juntamente com a elevada extração de nutrientes pelo cafeeiro, aumenta a necessidade de aplicação de adubos e corretivos para elevar a produtividade da cultura. Entretanto, a utilização desses insumos pode acarretar consequências negativas para as plantas, seja pela aplicação deficiente ou excessiva de determinado nutriente, ou pelo fornecimento em épocas inadequadas do crescimento e desenvolvimento da planta (REIS et al., 2013).

Os nutrientes requeridos em altas e baixas concentrações pelas plantas vasculares são descritos como macronutrientes e micronutrientes, respectivamente. Os micronutrientes agem como constituintes das paredes (B) e membranas celulares (B e Zn), como constituintes de enzimas (Fe, Cu e Ni) e ativadores de enzimas (Zn e Mn), além de atuarem também no processo fotossintético (Fe, Cu, Mn e Cl) (MARSCHNER, 2012). Especificamente em cafeeiros, ressaltam-se principalmente deficiências de B e Cu em plantas cultivadas em campo (MARTINEZ et al., 2003).

Os solos podem apresentar deficiência natural de B (MARSCHNER, 2012), mas altas concentrações desse elemento também são relatadas naturalmente em solos ou em águas subterrâneas, além de ser adicionado antropicamente por meio do uso de fertilizantes, água de irrigação e atividades mineradoras (NABLE et al., 1997). A

deficiência de Cu pode ocorrer naturalmente nos solos, ou o Cu pode ser complexado com a matéria orgânica, tornando-se indisponível para absorção pelas plantas. A toxidez de Cu também pode ocorrer naturalmente nos solos ou pode ser causada por atividades antrópicas, como uso de fungicidas cúpricos e atividades urbanas e industriais (BARKER; PILBEAM, 2007).

O B é um micronutriente envolvido em diversas vias metabólicas, participando do transporte de açúcares, da estrutura da parede celular e da membrana plasmática, lignificação, metabolismo de carboidrato e de RNA, respiração, metabolismo de auxina e de fenóis (MARSCHNER, 2012). Estudos anatômicos evidenciam inibição do crescimento de raízes, bem como maior deposição de lignina em plantas expostas ao excesso de B (CERVILLA et al., 2009). Sob deficiência, pode haver espessamento irregular da parede celular e desenvolvimento anormal do complexo de Golgi, com aumento do número e tamanho de vesículas secretoras, além de limitação do alongamento e divisão celular nos ápices radiculares (MATOH, 1997).

O Cu é um micronutriente que atua no processo fotossintético, na respiração, no metabolismo de carbono e de nitrogênio, além de participar da proteção contra o estresse oxidativo (MARSCHNER, 2012). A aplicação excessiva de fertilizantes, além de fungicidas e bactericidas cúpricos pode acarretar em disponibilidade excessiva desse elemento para as plantas (SONMEZ et al., 2006). Desta forma, estas podem apresentar redução do volume e má formação de raízes, que prejudicam o seu crescimento e desenvolvimento, folhas cloróticas em decorrência da redução expressiva do número e tamanho dos cloroplastos, além de alterações ultraestruturais como desaparecimento de grãos de amido, dilatação das membranas celulares e aumento do tamanho dos plastoglobulos (PANOU-FILOTHEOU et al., 2001). Destaca-se, ainda, que tanto o excesso quanto a deficiência de Cu podem causar alterações no crescimento e desenvolvimento das plantas, por afetar etapas importantes do processo fotossintético, como o transporte de elétrons (YRUELA, 2005).

Portanto, as plantas podem apresentar alterações em seu crescimento e desenvolvimento dependendo do grau de tolerância à deficiência e ao excesso de B e Cu. Em cafeeiros, tal prejuízo pode ser refletido diretamente na produção e qualidade dos grãos, prejudicando o comércio e reduzindo o valor de mercado deste produto no Brasil.

Tanto em condições de deficiência quanto em excesso de nutrientes, as plantas podem manifestar sintomas macroscópicos característicos, sejam em raízes, caules ou folhas, e esses sintomas podem auxiliar na determinação do seu estado nutricional (MARSCHNER, 2012). O surgimento dos sintomas macroscópicos representa o último passo de uma série de eventos metabólicos, os quais podem ser detectados também por meio de análise química do material vegetal (MALAVOLTA, 2006) ou por análises anatômicas e ultraestruturais (LAVRES-JUNIOR et al., 2009). No entanto, mesmo quando não há o desenvolvimento desses sintomas macroscópicos, as plantas podem apresentar “fome ou toxidez oculta”, as quais resultam na redução da produção bem como desenvolvimento inadequado das plantas (VASCONCELLOS et al., 2001).

Apesar dos desequilíbrios no teor de micronutrientes em lavouras cafeeiras de Minas Gerais (MARTINEZ et al., 2003) e da importância econômica da cultura, os estudos já realizados não avaliaram de forma integrada a dinâmica nutricional e as alterações morfoanatômicas e ultraestruturais, seja em cultivo tradicional (POLTRONIERI et al., 2011) ou em sistema hidropônico (TOMAZ et al., 2006). Nesse contexto, o sistema hidropônico é vantajoso, pois apresenta maior controle das condições externas na manutenção de nutrientes prontamente disponíveis para a absorção da planta (SHAVRUKOV et al., 2012).

Dessa maneira, a avaliação morfoanatômica e ultraestrutural de cafeeiros submetidos a diferentes doses de B e Cu associada ao acúmulo desses nutrientes na planta pode ser uma ferramenta útil para o entendimento da dinâmica desses nutrientes na planta.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

Avaliar e interpretar as possíveis alterações morfoanatômicas e ultraestruturais em folhas, caules e raízes de cafeeiros (*C. arabica* L.) em fase de formação, submetidos à deficiência e ao excesso de B e Cu, em sistema hidropônico, e o estado nutricional das plantas nessas condições.



## 2.2 Objetivos específicos

Responder as seguintes questões:

- Quais alterações morfoanatômicas e ultraestruturais qualitativas e, ou quantitativas ocorrem em raízes, caules e folhas de cafeeiros submetidos à deficiência e ao excesso de B?
- Qual a sequência dessas alterações em plantas submetidas à deficiência e ao excesso de B?
- O que é mais prejudicial para o cafeeiro, a deficiência ou o excesso de B?
- Quais alterações morfoanatômicas e ultraestruturais qualitativas e, ou quantitativas ocorrem em raízes, caules e folhas de cafeeiro submetidos à deficiência e ao excesso de Cu?
- Qual a sequência dessas alterações em plantas submetidas à deficiência e ao excesso de Cu?
- O que é mais prejudicial para o cafeeiro, a deficiência ou o excesso de Cu?

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barker AV, Pilbeam DJ. 2007.** *Handbook of Plant Nutrition*. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis Group.
- Cervilla LM, Rosales MA, Rubio-Wilhelmi MM, Sánchez-Rodríguez E, Blasco B, Ríos JJ, Romero L, Ruiz JM. 2009.** Involvement of lignification and membrane permeability in the tomato root response to boron toxicity. *Plant Science* **176**: 545-552.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB).** *Acompanhamento da safra brasileira de café, safra 2015, quarto levantamento, dezembro 2015*. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_12\\_17\\_09\\_02\\_47\\_boletim\\_cafe\\_dezembro\\_2015\\_2.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_02_47_boletim_cafe_dezembro_2015_2.pdf)>. Acesso em: 21 dez. 2015.
- Food and Agriculture Organization (FAO).** *Statistical Pocketbook Coffee 2015*. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4985e.pdf>>. Acesso em: 21 dez. 2015.
- Lana RMQ, Oliveira AS, Lana AMQ, Faria MV. 2010.** Levantamento do estado nutricional de plantas de *Coffea arabica* L. pelo DRIS, na região do Alto Paranaíba, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **34**: 1147-1156.
- Lavres-Junior J, Malavolta E, Nogueira NL, Moraes MF, Reis AR, Rossi ML, Cabral CP. 2009.** Changes in anatomy and root cell ultrastructure of soybean genotypes under manganese stress. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **33**: 395-403.
- Malavolta E. 2006.** *Manual de nutrição de plantas*. São Paulo: Agronômica Ceres.
- Marschner H. 2012.** *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3ed. London: Academic Press, 2012.
- Martinez HEP, Menezes JFS, Souza RB, Venegas VHA, Guimarães PTG. 2003.** Faixas críticas de concentrações de nutrientes e avaliação do estado nutricional de cafeeiros em quatro regiões de Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **38**: 703-713.
- Matoh T. 1997.** Boron in plant cell walls. *Plant and Soil* **193**: 59-70.
- Nable RO, Bañuelos GS, Paull JG. 1997.** Boron toxicity. *Plant and Soil* **193**: 181-198.
- Panou-Filotheou H, Bosabalidis AM, Karataglis S. 2001.** Effects of copper toxicity on leaves of Oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). *Annals of Botany* **88**: 207-214.

**Poltronieri Y, Martinez HEP, Cecon PR. 2011.** Effect of zinc and its form of supply on production and quality of coffee beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**: 231–2436.

**Reis THP, Furtini Neto AE, Guimarães PTG, Guerra AF, Oliveira CHC. 2013.** Estado nutricional e frações foliares de P no cafeeiro em função da adubação fosfatada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **48**: 765-773.

**Shavrukov Y, Genc Y, Hayes J. 2012.** *The Use of Hydroponics in Abiotic Stress Tolerance Research, Hydroponics - A Standard Methodology for Plant Biological Researches*. Dr. Toshiki Asao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0386-8, InTech, DOI: 10.5772/35206. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/hydroponics-a-standard-methodology-for-plant-biological-researches/the-use-of-hydroponics-in-abiotic-stress-tolerance-research>> Acesso em: 16 out. 2015

**Sonmez S, Kaplan M, Sonmez NK, Kaya H, Uz I. 2006.** High level of copper application to soil and leaves reduce the growth and yield of tomato plants. *Scientia Agricola* **63**: 213-218.

**Teixeira TD. 2000.** *Política estratégica para a cafeicultura brasileira*. In: Simpósio de pesquisas dos cafés do Brasil, 1, 2000, Poços de Caldas. **Palestras do I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Brasília: Embrapa Café, 2002. p.169-193.

**Tomaz MA, Martinez HEP, Sakiyama NS, Cruz CM, Pereira AA. 2006.** Absorção, translocação e utilização de zinco, cobre e manganês por mudas enxertadas de *Coffea arabica*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **30**: 377-384.

**Vasconcellos CA, Alves VMC, Pereira Filho IA, Pitta GVE. 2001.** *Nutrição e adubação do milho visando obtenção do minimilho*. Sete Lagoas: Embrapa. (Comunicado Técnico, 09).

**Yruela I. 2005.** Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**: 145-156.

## CAPÍTULO I

### DEFICIÊNCIA X EXCESSO DE BORO EM CAFEEIROS: ALTERAÇÕES MORFOANATÔMICAS E ULTRAESTRUTURAIS

**RESUMO:** A cafeicultura é uma atividade agrícola de grande valor econômico, principalmente para o Brasil, que é considerado o maior exportador mundial de grãos. Dentre os fatores que interferem na produtividade dos cafeeiros, o estado nutricional da cultura é considerado de grande relevância, refletindo também a fertilidade do solo, que em algumas lavouras cafeeiras apresentam deficiência de boro (B). O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da deficiência ( $0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e do excesso ( $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) de B em cafeeiros (*Coffea arabica* L.) cultivados em sistema hidropônico, comparados com a faixa ótima ( $25$  e  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  B). As análises foram realizadas por meio de observações macroscópicas, anatômicas, ultraestruturais e do estado nutricional das plantas. O B absorvido pelas raízes foi translocado para as folhas, concentrando-se principalmente neste órgão. A deficiência de B promoveu alterações mais marcantes do que o excesso de B, e os sintomas macroscópicos de deficiência apareceram primeiro. Plantas submetidas à deficiência de B apresentaram alterações em raízes, como emissão de raízes laterais mais curtas e mais próximas ao ápice, alteração nas células do promeristema, diferenciação precoce dos tecidos radiculares, produção de elementos de vaso tortuosos e engrossamento das raízes. Nas folhas jovens houve o aparecimento de manchas necróticas, as quais progrediram até a abscisão foliar, e encarquilhamento de folhas maduras de plantas submetidas tanto à deficiência quanto ao excesso de B. Apesar da deficiência de B causar alterações no ápice radicular, nenhuma alteração foi observada no ápice caulinar. A deficiência e o excesso de B alteraram também algumas características anatômicas foliares, como a espessura da epiderme da face adaxial da folha, a espessura dos parênquimas paliçádico e lacunoso, e também características ultraestruturais dos cloroplastos. A análise do estado nutricional das plantas detectou alteração nas concentrações de Mn, P e S em função das doses de B. Os resultados sugerem que a deficiência de B é mais prejudicial para o cafeeiro do que o excesso.

**PALAVRAS-CHAVE:** Nutrição mineral, hidroponia, micronutriente, cloroplastos.

## 1. INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma atividade agrícola com considerável valor histórico (TRUZZI; BASSANEZI, 2009), social (SYMPSON; RAPONE, 2000) e econômico (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION – ICO, 2015) em diferentes partes do mundo. O Brasil produz principalmente a espécie *Coffea arabica* L. (café arábica) (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2015), e Minas Gerais destaca-se como uma das maiores regiões produtoras de café no país (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2015).

As condições climáticas (ESTRADA et al., 2012), a ocorrência de doenças (RIBEYRE; AVELINO, 2012) e o estado nutricional dos cafeeiros (DIAS et al., 2015) são alguns dos fatores que podem alterar a sua produtividade, aumentar o seu custo de produção ou reduzir a qualidade do grão a ser comercializado. O estado nutricional dos cafeeiros pode refletir a fertilidade do solo em que são cultivados, e são relatados desequilíbrios consideráveis no teor de macronutrientes em *Coffea canephora* (BRAGANÇA et al., 2009), e de micronutrientes em *Coffea arabica* (MARTINEZ et al., 2003) cultivadas em solos com baixa fertilidade ou com aplicações excessivas de adubos.

Em condições de deficiência e excesso de nutrientes, as plantas podem manifestar sintomas macroscópicos em raízes, caules ou folhas, e esses sintomas podem auxiliar na determinação do seu estado nutricional (MARSCHNER, 2012). Porém, o surgimento desses sintomas macroscópicos de deficiência ou excesso de nutrientes representa o último passo de uma série de eventos metabólicos, mas que podem ser detectados por meio de análise química do material vegetal (MALAVOLTA, 2006) ou por análises anatômicas e ultraestruturais (LAVRES-JUNIOR et al., 2009).

Em cafeeiros, a deficiência de B é uma das mais expressivas em condições de campo (MARTINEZ et al., 2003). O B é um micronutriente essencial para as plantas vasculares (KABATA-PENDIAS, 2010) e está envolvido em muitos processos fisiológicos, como transporte de açúcares, lignificação, manutenção da estrutura da parede celular e de membranas, metabolismo de carboidratos, de RNA, de auxinas e de fenóis (MARSCHNER, 2012). Sob deficiência ou toxidez de B, as plantas podem apresentar inibição do alongamento das raízes, aumento da espessura da parede celular, perda da integridade da membrana, desenvolvimento anormal de células do xilema e

floema (DELL; HUANG, 1997), degradação da lamela média, morte de células da epiderme e do floema (HUANG et al., 2014), bem como prejuízo no crescimento e desenvolvimento da planta como um todo.

Em geral, a concentração total de B em solos é de cerca de 42 mg kg<sup>-1</sup> B, podendo variar de 10-100 mg kg<sup>-1</sup> B dependendo do solo em questão (KABATA-PENDIAS, 2010). A disponibilidade de B pode ser limitante para a produtividade de culturas, como o café, cujas faixas críticas dos teores foliares variam de 31-76 mg kg<sup>-1</sup> B em lavouras mineiras de alta produtividade (MARTINEZ et al., 2003). Concentrações foliares abaixo dessa faixa limitariam a produção e acima tornariam a adubação não econômica.

Neste estudo, cafeeiros (*Coffea arabica*) foram cultivados sob diferentes doses de B em sistema hidropônico, o que possibilita maior controle da disponibilidade de nutrientes para as plantas. Foram avaliados os aspectos morfoanatômicos e ultraestruturais de órgãos vegetativos e o teor de nutrientes, a fim de estabelecer as alterações associadas à deficiência e ao excesso de B em cafeeiros. Dessa forma, algumas questões poderão ser respondidas:

- Quais alterações morfoanatômicas e ultraestruturais qualitativas e, ou quantitativas ocorrem em raízes, caules e folhas de cafeeiros submetidos à deficiência e ao excesso de B?
- Qual a sequência dessas alterações em plantas submetidas à deficiência e ao excesso de B?
- O que é mais prejudicial para o cafeeiro, a deficiência ou o excesso de B?

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Sistema de cultivo e condução do experimento**

O experimento foi conduzido em sistema hidropônico de duas fases com solução estática aerada; uma fase líquida, composta por água e nutrientes, e uma fase gasosa, correspondente ao ar misturado à solução por injeção de ar comprimido. O sistema hidropônico foi montado em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), situada no município de Viçosa

(MG), localizada nas coordenadas 20° 45' 14'' S e 42° 52' 55'' O, com altitude média de 648 m.

Sementes de café (*Coffea arabica* L.) da variedade Catuaí Vermelho IAC 44 foram semeadas sobre folhas de papel Germitest® umedecidas com água (06/09/2013). Após trinta e oito dias da semeadura, as plântulas (com um par de folhas) foram transplantadas para bandejas plásticas de 50 L com solução nutritiva contendo 6; 0,5; 3,23; 2,25; 1; 1,75 mmol L<sup>-1</sup> de N, P, K, Ca, Mg e S e 80; 12; 25; 1,5; 2; 0,3 µmol L<sup>-1</sup> de Fe, Mn, B, Cu, Zn e Mo, respectivamente (CLEMENTE et al., 2013) com modificações de acordo com as necessidades apresentadas pelas plantas. Durante nove meses, as plantas foram mantidas nessas bandejas plásticas, e conforme cresciam aumentava-se o espaçamento entre as plantas, reduzindo o número de plantas por bandeja.

Após 9 meses mantidas em bandejas plásticas de 50 L, as plantas foram transplantadas individualmente para vasos plásticos com capacidade de 4 L, mantendo-se a solução nutritiva inicial com modificação apenas da concentração de B. Desta maneira, empregaram-se doses crescentes de B, de modo a obter-se uma curva de resposta ao nutriente. Sendo assim, as plantas foram submetidas a 0 (deficiência), 25 e 100 (faixa ótima) e 200 (excesso) µmol L<sup>-1</sup> B.

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por um vaso plástico com uma planta. O café foi cultivado com diferentes doses de B por 90 dias, quando realizou-se coleta para a análise do teor de nutrientes e para as análises em microscopia de luz e em microscopia eletrônica de transmissão. A duração do experimento (90 dias) foi determinada pela expansão completa das folhas que seriam utilizadas para as análises. No entanto, uma coleta prévia foi realizada aos 50 dias após a exposição dos cafeeiros às doses de B, para análises em microscopia de luz, devido ao aparecimento de sintomas macroscópicos de deficiência de B em folhas jovens. Para a amostragem foram escolhidos os ramos plagiotrópicos, no terço médio das plantas e, durante o experimento, foram realizados registros fotográficos dos sintomas macroscópicos de deficiência de B em folhas. As folhas foram separadas em folhas jovens (que foram emitidas após o início do experimento) e folhas maduras (que existiam antes do início do experimento, mas se expandiram completamente durante o experimento).

Para desconsiderar possíveis efeitos da condição hidropônica sobre os aspectos morfoanatômicas das plantas, especialmente das raízes, cafeeiros da variedade Catuaí Vermelho IAC 44 também foram mantidas em solo para análises estruturais.

A solução nutritiva foi monitorada por meio de aferição do pH, utilizando-se pHmetro digital, mantendo o pH entre 5,5 e 6. Para isto, foram utilizadas soluções de correção à base de hidróxido de sódio ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e ácido clorídrico ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ). Para determinar o momento da troca da solução nutritiva, utilizaram-se os valores de condutividade elétrica, obtidos por meio de condutivímetro digital, admitindo-se depleção máxima de 30% da concentração inicial.

## **2.2 Quantificação do teor de nutrientes na planta**

As amostras de raízes, caule e folhas jovens e maduras foram coletadas aos 90 dias de exposição às doses de B, lavadas em água deionizada e secas em estufa de ventilação forçada de ar a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 72 h. Posteriormente, foram moídas em moinho tipo Wiley, equipado com peneira de 20 mesh, para posterior digestão via úmida nítrico-perclórica em bloco digestor e quantificação dos teores de Cu, Zn, Mn, Fe, Ca e Mg por espectrofotometria de absorção atômica, dos teores de K por espectrofotometria de emissão de chama, dos teores de S por turbidimetria do sulfato e dos teores de P por colorimetria. O B foi determinado colorimetricamente pela Azometina H após incineração do material vegetal em mufla.

Os teores de B foram quantificados em raízes, caules e folhas jovens e maduras, enquanto os teores de Cu, Zn, Mn, Fe, P, K, Ca, Mg e S apenas nas folhas maduras. O método de digestão empregado para quantificação de B foi por via seca em forno mufla, utilizando-se 0,250 g de material vegetal e 10 mL de ácido clorídrico para dissolução do resíduo orgânico. Para realização da leitura, preparou-se uma solução de 6 mL, constituída por 2 mL da solução da digestão seca juntamente com 2 mL de solução tampão e 2 mL de solução de Azometina H (WOLF, 1974). Para a quantificação dos demais elementos utilizou-se o método de digestão via úmida nítrico-perclórica em bloco digestor. Foram pesados 0,200 g de material vegetal, acrescentado-se 4 mL de ácido nítrico e 2 mL de ácido perclórico. Ao final, adicionaram-se 23 mL de água deionizada, completando-se o volume para 25 mL.



### **2.3 Processamento das amostras para análise anatômica**

Para as análises anatômicas em microscopia de luz foram utilizados fragmentos de raízes, caules e folhas. Das raízes foram coletados os ápices e também porções próximas ao ápice. Caules e folhas foram coletados do 3º ramo plagiotrópico a partir do ápice. Foram coletados o ápice de caule, porções de caule do 3º entrenó a partir do ápice, além de fragmentos do terço mediano de folhas jovens e folhas maduras, considerando a nervura principal e fragmentos da região mediana da folha (entre a margem e a nervura principal).

Todo material vegetal coletado foi fixado em FAA<sub>50</sub> por 48 h e conservado em álcool 70% (JENSEN, 1962). Posteriormente, o material foi desidratado em série etílica, incluído em metacrilato (Historesin-Leica, Instruments, Heidelberg, Germany), seccionado transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155, Leica, Deerfield, Illinois, USA) com 5 µm de espessura, corado com azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1964 modificado) e montado em resina sintética (Permount, Fisher, Fair Lawn, New Jersey, USA). Em secções de folhas jovens com sintoma macroscópico de deficiência de B (necrose) realizou-se teste histoquímico com Cloreto Férrico 10% para detecção de compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940).

O registro fotográfico das plantas, bem como dos aspectos morfológicos das raízes, foi realizado com câmera fotográfica digital (SONY DSC-WX80). Os registros anatômicos foram obtidos com câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRx, Göttinger, Germany) acoplada a microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) e computador com o programa de captura de imagens Axion Vision.

Foram avaliadas alterações qualitativas, como acúmulos de compostos, degradação de células, hipertrofia e hiperplasia celular, entre outras características. Já as alterações quantitativas foram avaliadas por meio de análises micromorfométricas com o software Image Pro-Plus 4.5. Foram realizadas medidas lineares (distância, a partir do ápice, de inserção das raízes laterais; distância, a partir do ápice, de elementos de vaso já diferenciados em raízes; espessura da região cortical de raízes; diâmetro das células da região cortical das raízes; espessura da epiderme das faces adaxial e abaxial da folha, dos parênquimas paliçádico e lacunoso e espessura total da folha) e medidas de contagem (número de camadas de células da região cortical das raízes, número de

camadas da faixa cambial em caules, densidade de estômatos/mm<sup>2</sup> na epiderme da face abaxial da folha) em secções transversal e longitudinal de raízes, caules e folhas, realizando 10 medições por repetição.

A análise anatômica de secções transversais de raízes de cafeeiros submetidos às doses de B foi realizada por meio da padronização de raízes em estágio semelhante de maturação do xilema e com o mesmo número de polos de protoxilema.

As raízes de cafeeiros cultivados em solo, juntamente com aquelas de cafeeiros mantidos sob 25 µmol L<sup>-1</sup> B (controle), foram submetidas aos mesmos processamentos para microscopia de luz, para identificar os efeitos da hidroponia sobre os aspectos morfoanatômicos das raízes. Além disto, as raízes foram coletadas, lavadas em água corrente e coradas com violeta cristal (1%) para avaliação das características morfológicas.

### **2.3 Processamento das amostras para análise ultraestrutural**

Para a avaliação ultraestrutural em microscopia eletrônica de transmissão foram utilizados fragmentos do terço mediano das folhas maduras, os quais foram fixados em glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2%, pré-contrastados com acetato de uranila 0,5% por 12 h, desidratados em série de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%, por 10 minutos cada) e embebidos em resina Spurr (SPURR, 1969). Seções ultrafinas, com 60-80 nm, foram obtidas em ultramicrotomo MT2-B (Du Pont-Sorval) com navalhas de vidro. As seções ultrafinas foram coletadas com grids de cobre e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963), para obtenção de imagens em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss, EM 109, a 80 kV.

### **2.4 Análise estatística**

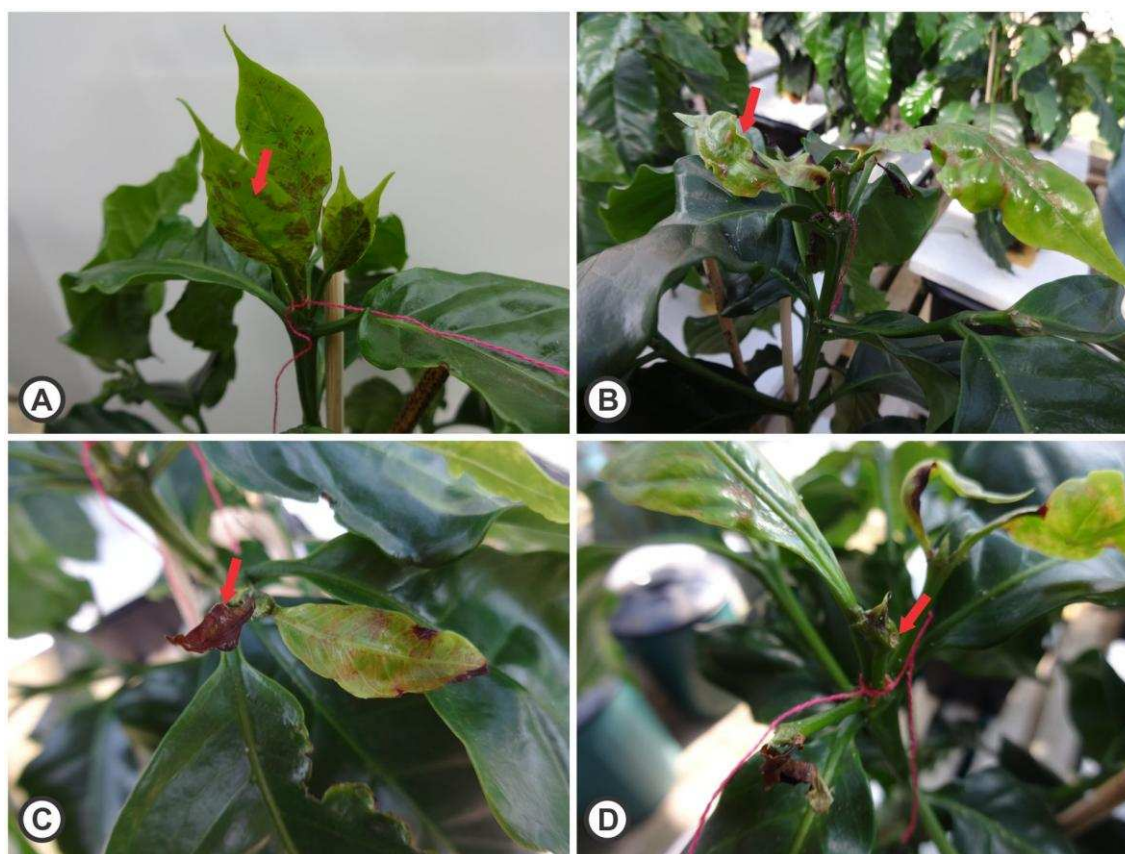
Os dados micromorfométricos foram analisados por meio de análise estatística descritiva, utilizando-se média ± desvio padrão. Os dados de teor de nutrientes foram submetidos à análise de regressão. Os modelos foram escolhidos com base na significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se o teste de Student, adotando-se o nível de 5%, no coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>:

S.Q.Regressão/S.Q.Tratamento) e no comportamento do fenômeno. Os dados foram analisados utilizando-se o software estatístico SAEG.

### 3. RESULTADOS

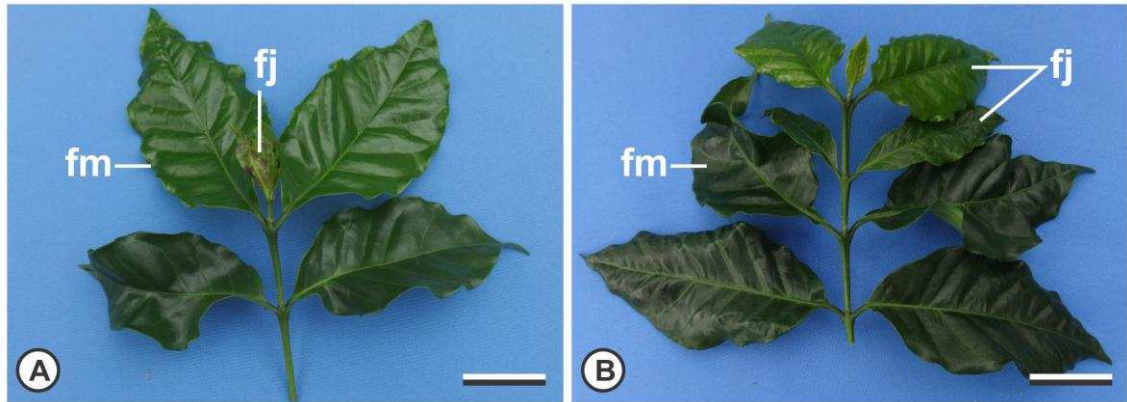
#### 3.1 Sintomas macroscópicos em resposta às doses de B

O primeiro sintoma macroscópico de deficiência de B apareceu aos 50 dias de cultivo e caracterizou-se pelo surgimento de manchas necróticas em folhas jovens, dos ramos ortotrópicos e plagiotrópicos (Fig. 1A). Posteriormente, houve deformação foliar (Fig. 1B), expansão das áreas necróticas (Fig. 1C), e, por fim, abscisão foliar (Fig. 1D), mas nenhum sintoma macroscópico de deficiência de B foi observado no sistema radicular das plantas. Além disso, nenhum sintoma macroscópico de excesso de B foi observado em plantas submetidas a  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  B no mesmo período.



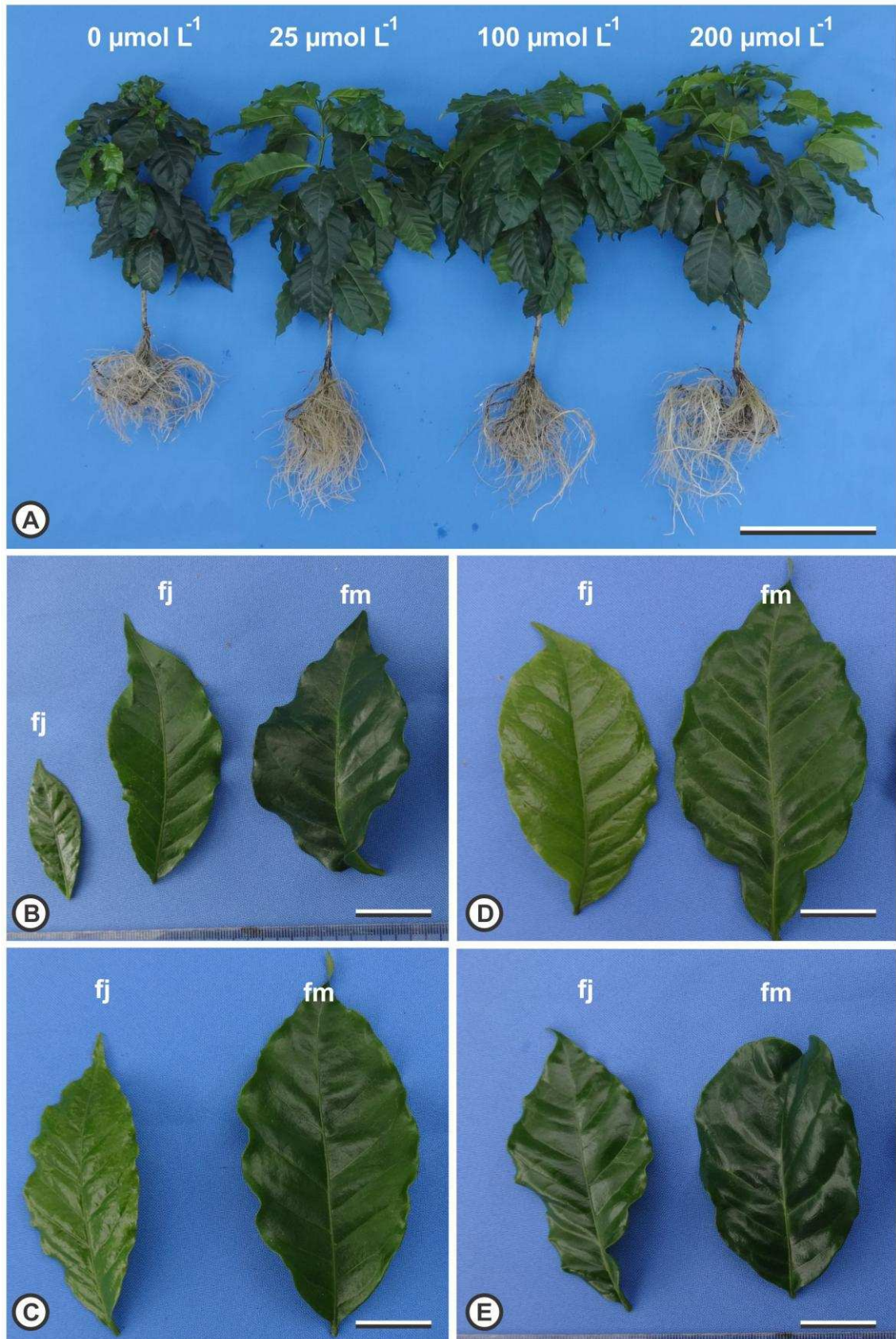
**Fig. 1.** Sintomas macroscópicos de deficiência de B ( $0 \mu\text{mol L}^{-1}$  B) em cafeeiros entre 50-70 dias de cultivo em solução nutritiva. Aparecimento de manchas necróticas (seta) (A), deformação foliar (seta) (B), expansão das áreas necróticas (seta) (C), abscisão foliar (seta) (D).

Apesar dos sintomas macroscópicos de deficiência de B em folhas jovens de cafeeiros, o meristema apical do caule permaneceu íntegro. A integridade dessa região meristemática garantiu a produção de novos pares de folhas jovens até o final do período experimental. Não houve perda de dominância apical nem superbrotações (Fig. 2).



**Fig. 2.** Ramos plagiotrópicos de cafeeiros submetidos a  $0 \mu\text{mol L}^{-1}$  B por 50 (A) e 90 (B) dias de cultivo em sistema hidropônico. Notar a manutenção da integridade do meristema apical do caule em ramos coletados aos 90 dias de cultivo, sem a presença de superbrotações, mantendo a dominância apical e emitindo dois pares de folhas jovens. Folhas jovens (fj), folhas maduras (fm). Barra = 4 cm.

Houve diferença no desenvolvimento de cafeeiros submetidos às doses de B durante 90 dias de cultivo (Fig. 3). As plantas submetidas à deficiência de B apresentaram porte reduzido quando comparadas aos demais tratamentos (Fig. 3A). Além disto, as plantas submetidas à deficiência emitiram dois pares de folhas jovens com expansão foliar reduzida (Fig. 3B), em contraste com um único par de folhas jovens emitido pelas plantas submetidas aos demais tratamentos (Fig. 3C-E). As folhas maduras apresentaram aspecto encarquilhado em cafeeiros sob 0 (Fig. 3B) e 200 (Fig. 3E)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B.

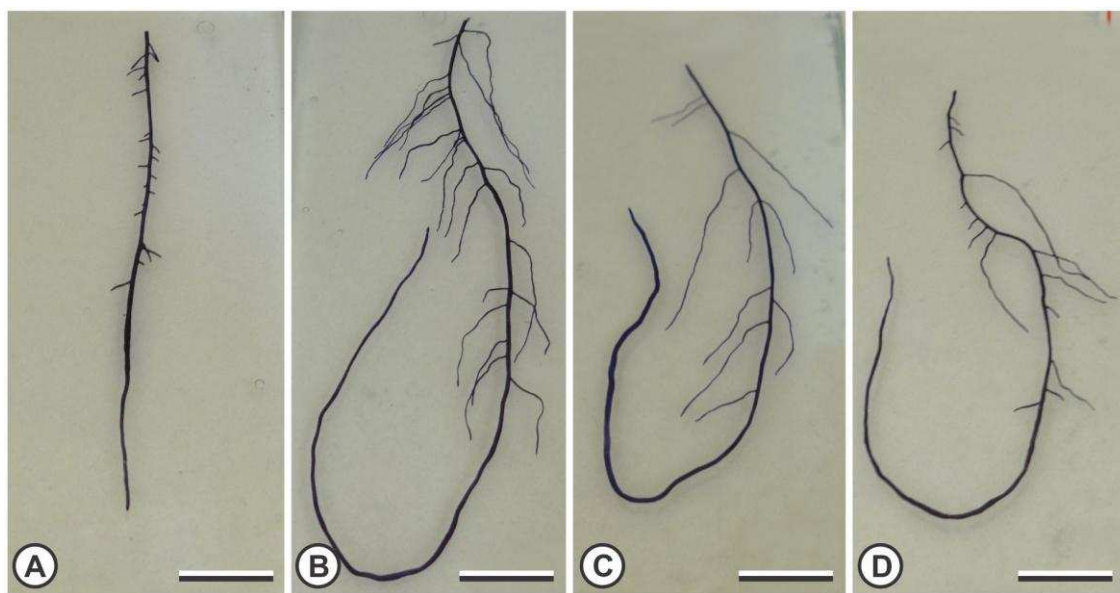


**Fig. 3.** Aspecto geral de cafeeiros após 90 dias de cultivo em sistema hidropônico sob doses de B (A). Folhas jovens (fj) e folhas maduras (fm) de cafeeiros submetidos a 0 (B), 25 (C), 100 (D) e 200 (E)  $\mu\text{mol}$

L<sup>-1</sup> B. Notar porte reduzido das plantas e a emissão de dois pares de folhas jovens em plantas submetidas a 0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B (A e B). Barra = 25 cm (A); 2,5 cm (B-E).

Nos caules, o único sintoma macroscópico evidente foi a redução dos entrenós. As raízes de cafeeiros cultivados em sistema hidropônico não apresentaram pelos radiculares, enquanto em cafeeiros cultivados em solo, as raízes apresentaram zona pilífera bem evidente. Desta maneira, foi possível afirmar que a ausência de pelos radiculares em todos os tratamentos resultou do cultivo em sistema hidropônico e não das doses de B.

As raízes de cafeeiros submetidos à deficiência de B apresentam raízes laterais muito mais curtas e mais próximas ao ápice (Fig. 4A; Tabela 1), quando comparadas às raízes de plantas submetidas aos demais tratamentos (Fig. 4B-D).



**Fig. 4.** Aspecto geral de raízes de cafeeiros cultivados sob doses de B, aos 90 dias de cultivo. 0 (A), 25 (B), 100 (C) e 200 (D)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B. Notar raízes laterais mais curtas e mais próximas ao ápice em cafeeiros submetidos a 0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B. Barra = 1 cm.

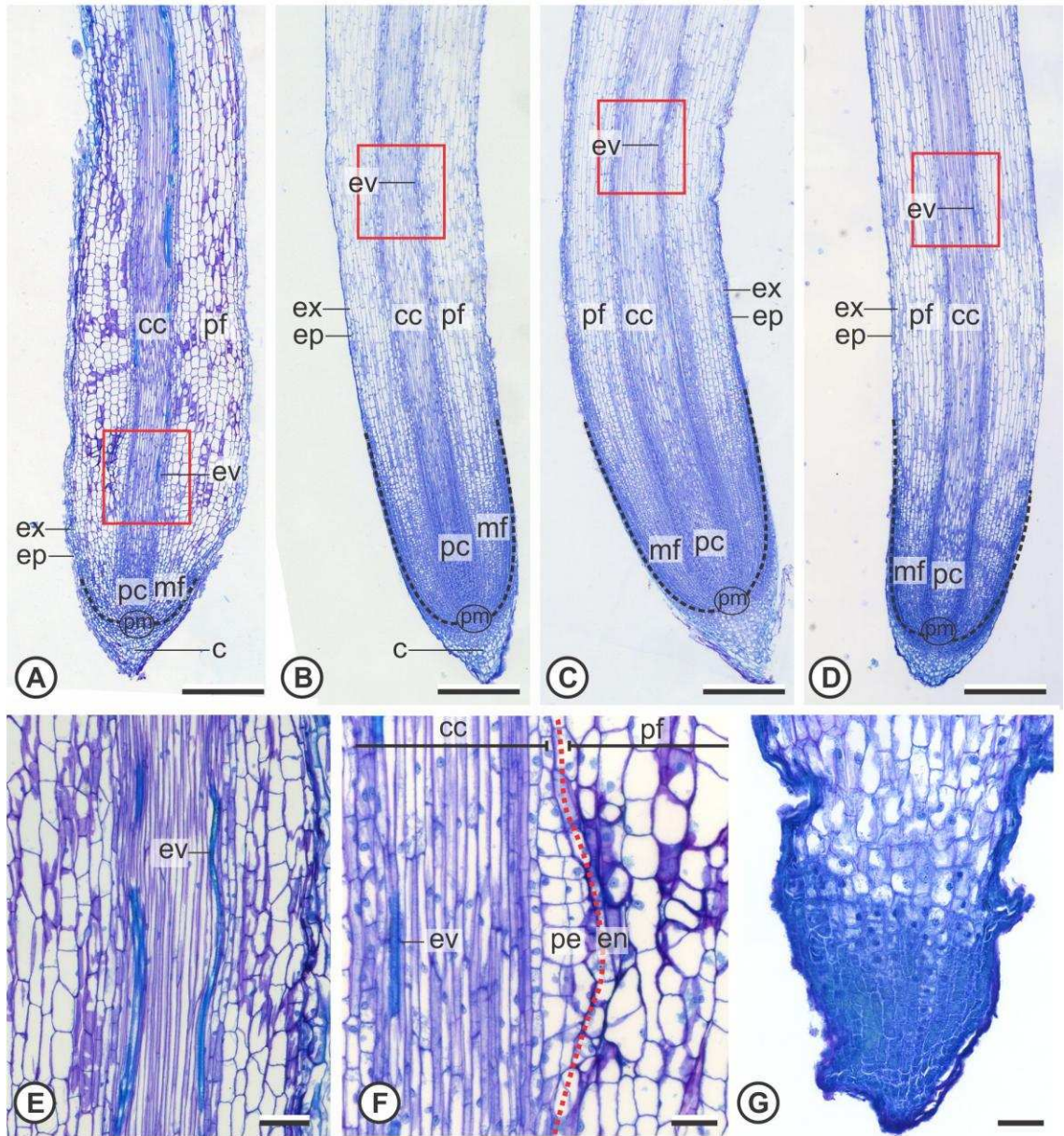
**Tabela 1.** Distância de inserção, a partir do ápice, das raízes laterais de cafeeiros submetidos a doses de B. Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão.

Dose	Distância (cm)
0	3,72 $\pm$ 0,66
25	8,39 $\pm$ 0,78
100	7,45 $\pm$ 1,34
200	7,35 $\pm$ 1,07

### 3.2 Análise anatômica

As características anatômicas de raízes de cafeeiros submetidos à deficiência de B (Fig. 5A) difeririam em relação aos demais tratamentos (Fig. 5B-D). Houve uma redução drástica no comprimento da região meristemática e da região de alongamento celular, resultando na diferenciação precoce de todas as células e tecidos da raiz. A epiderme, a região cortical e os tecidos do cilindro central já estão diferenciados a menos de um 1 mm de distância da região do promeristema. As células do promeristema altamente vacuoladas também produziram pequeno número de células em direção à coifa (Fig. 5A), quando comparadas aos demais tratamentos (Fig. 5B-D). Os elementos de vaso de raízes de plantas submetidas à deficiência de B apresentaram diferenciação precoce (Fig. 5A; Tabela 2), além de serem tortuosos (Fig. 5E). Apesar de menos visíveis, os elementos crivados também se diferenciam precocemente como os elementos de vaso nessas raízes.

Em raízes de cafeeiros sob deficiência de B pode-se observar o desenvolvimento de um primórdio radicular a partir de divisões do periciclo, a poucos micrômetros da região meristemática (Fig. 5A e F). Nessas condições, algumas raízes também apresentaram necrose do ápice radicular (Fig. 5G).



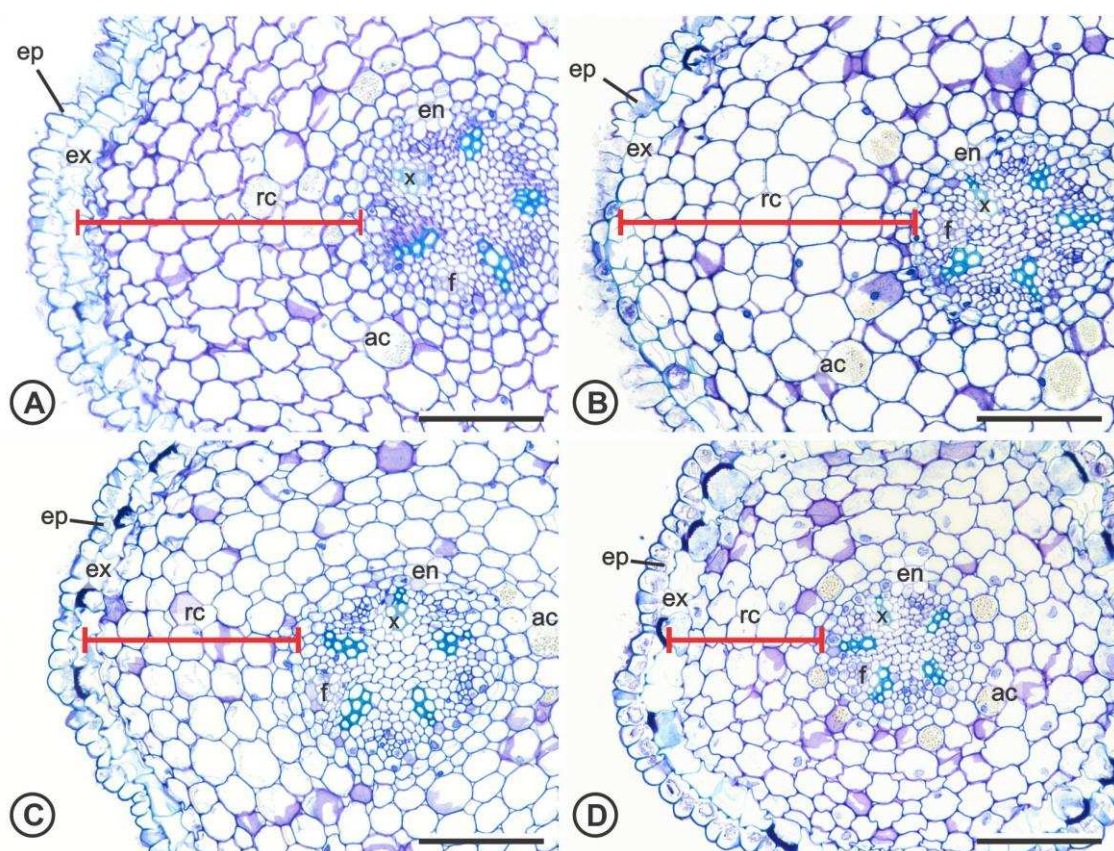
**Fig. 5.** Ápices radiculares de cafeeiros submetidos às doses de B, aos 90 dias de cultivo (fotomicrografias de secções longitudinais). 0 (A, E, F e G), 25 (B), 100 (C) e 200 (D)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B. Notar elementos de vaso tortuosos (E), primórdio radicular em desenvolvimento (F) e necrose do meristema apical (G). Quadrados vermelhos indicam região de diferenciação de elementos de vaso, e a Figura F corresponde ao quadrado vermelho da Figura A. Cilindro central (cc), coifa (c), elementos de vaso (ev), endoderme (en - linha tracejada vermelha), epiderme (ep), exoderme (ex), meristema fundamental (mf), parênquima fundamental (pf), procâmbio (pc), promeristema (pm), protoderme (linha tracejada preta). Barra = 400  $\mu\text{m}$  (A-D); 100  $\mu\text{m}$  (E); 50  $\mu\text{m}$  (F e G).



**Tabela 2.** Distância, a partir do ápice, de elementos de vaso diferenciados em raízes de cafeeiros submetidos a doses de B. Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão.

Dose	Distância ( $\mu\text{m}$ )
0	550,0 $\pm$ 264,6
25	2725,0 $\pm$ 909,9
100	2975,0 $\pm$ 953,5
200	2800,0 $\pm$ 778,9

A padronização das raízes de cafeeiros em estágio semelhante de maturação do xilema e com o mesmo número de polos de protoxilema permitiu a comparação das raízes entre as doses de B (Fig. 6). Desta maneira, verificou-se que a espessura da região cortical das raízes variou com as doses de B, sendo maior em cafeeiros sob deficiência de B (Tabela 3). Essa variação ocorreu em função do número de camadas de células da região cortical, que é maior com a deficiência de B, mas não em função do diâmetro destas células.



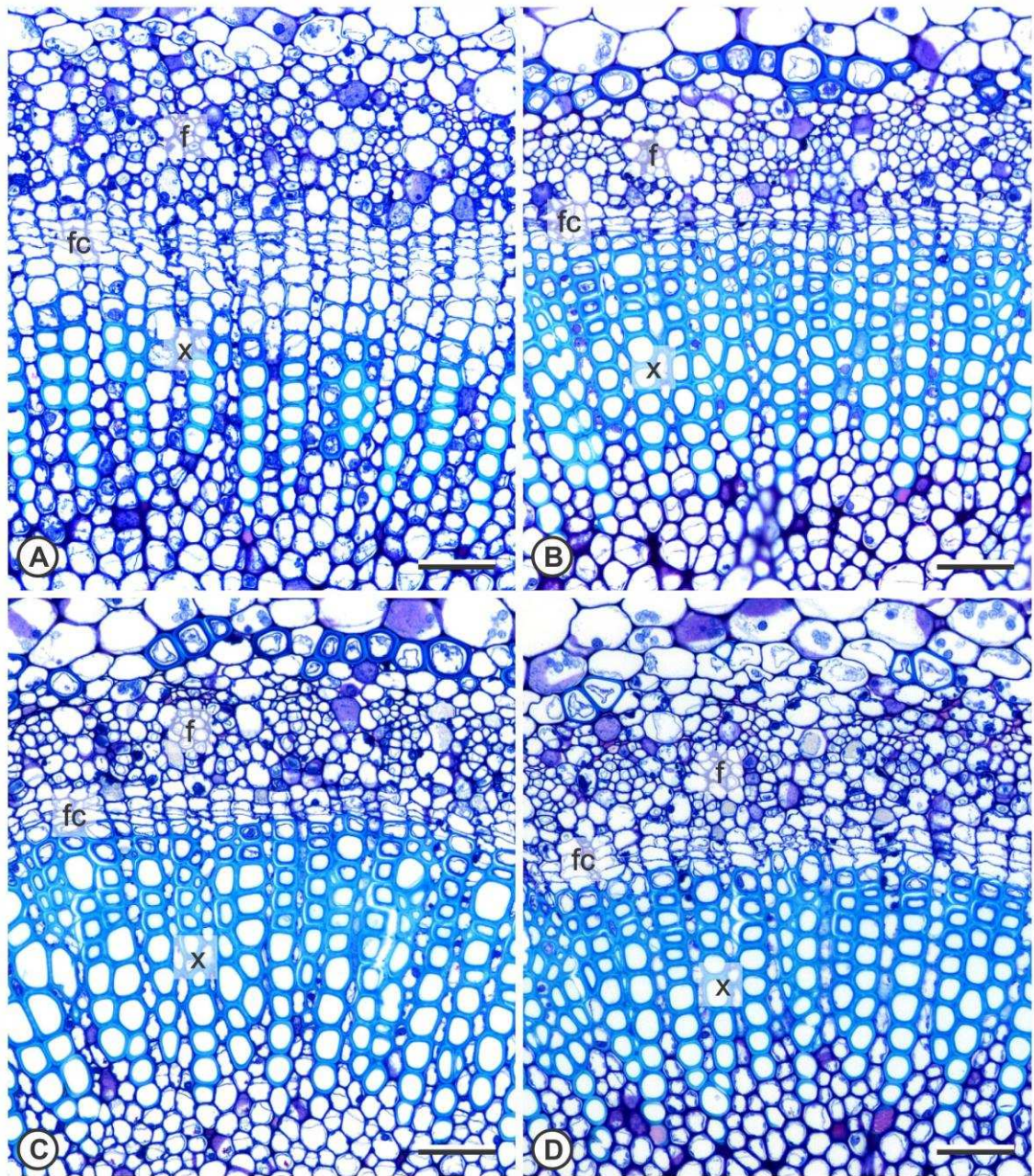
**Fig. 6.** Raízes de cafeeiros submetidos a doses de B, com variação na espessura e no número de camadas de células da região cortical, aos 90 dias de cultivo (fotomicrografias de seções transversais). 0 (A), 25

(B), 100 (C) e 200 (D)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B. Areia cristalina (ac), endoderme (en), epiderme (ep), exoderme (ex), floema (f), região cortical (rc), xilema (x). Barra = 100  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 3.** Espessura, número de camadas de células e diâmetro de células da região cortical de raízes de cafeeiros submetidos a doses de B. Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão.

Dose	Espessura ( $\mu\text{m}$ )	Número de camada de células (und)	Diâmetro das células ( $\mu\text{m}$ )
0	232 $\pm$ 55	11,5 $\pm$ 2,3	0,052 $\pm$ 0,017
25	195 $\pm$ 36	10,2 $\pm$ 1,5	0,055 $\pm$ 0,018
100	187 $\pm$ 15	9,2 $\pm$ 1,2	0,049 $\pm$ 0,005
200	160 $\pm$ 47	7,5 $\pm$ 1,0	0,049 $\pm$ 0,012

No caule de cafeeiros, o câmbio vascular apresentou características distintas entre as plantas submetidas às doses de B (Fig. 7). Sob deficiência de B, houve aumento no número de camadas da faixa cambial (Tabela 4), atraso na diferenciação dos elementos de vaso, e presença de várias células-mãe do xilema não diferenciadas próximas à faixa cambial (Fig. 7A). Nos demais tratamentos a diferenciação dos elementos de vaso é mais precoce (Fig. 7B-D).

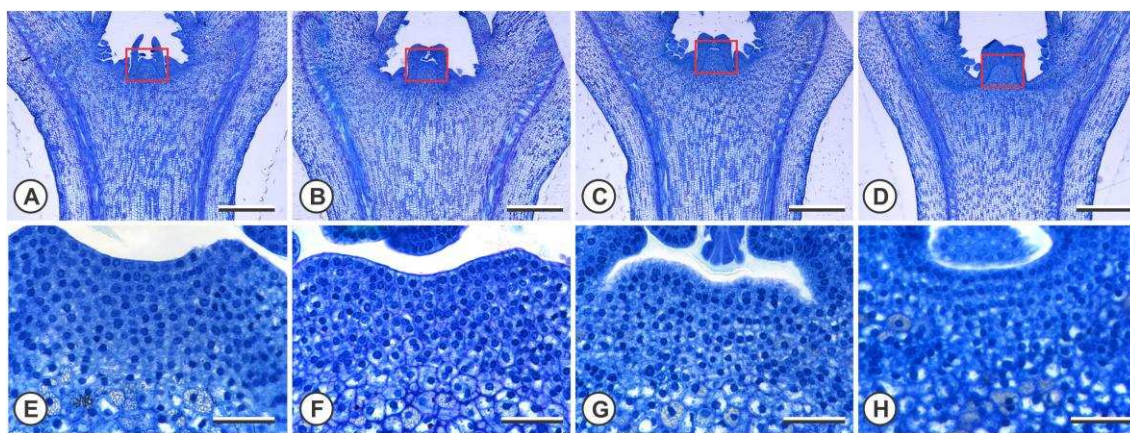


**Fig. 7.** Caule de cafeeiros submetidos às doses de B, aos 90 dias de cultivo (fotomicrografias de seções transversais). 0 (A), 25 (B), 100 (C) e 200 (D)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B. Notar aumento no número de camadas da faixa cambial, atraso na diferenciação dos elementos de vaso e presença de várias células-mãe do xilema não diferenciadas próximas à faixa cambial em caules de cafeeiros submetidos à 0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B. Faixa cambial (fc), floema (f), xilema (x). Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 4.** Número de camadas de células da faixa cambial em caules de cafeeiros submetidos a doses de B. Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão.

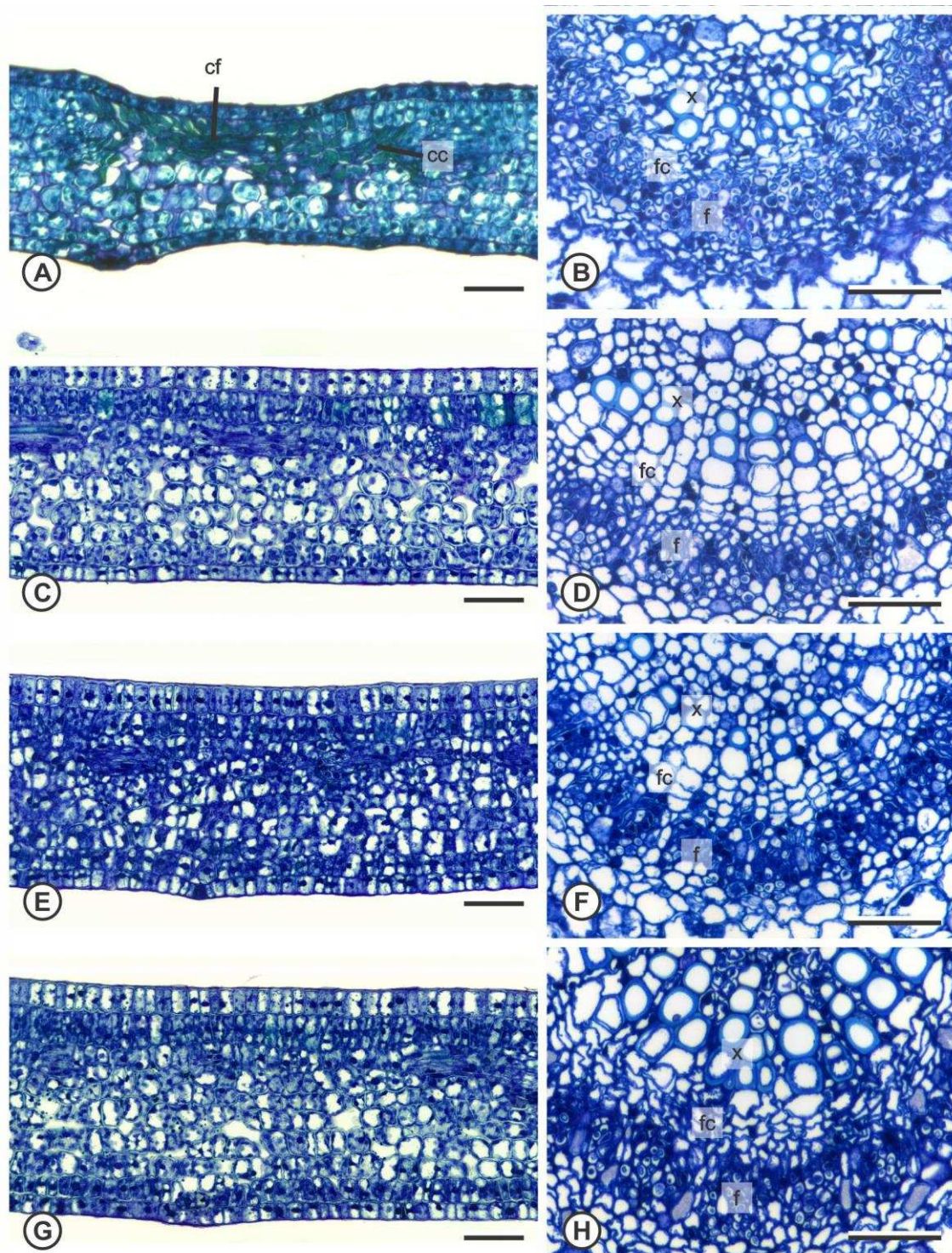
Dose	Camadas de células da faixa cambial (und)
0	3,2 $\pm$ 0,9
25	2,0
100	2,0
200	2,0

Enquanto o ápice radicular de cafeeiros foi fortemente alterado em plantas sob deficiência de B, o ápice caulinar não apresentou nenhuma alteração anatômica referente as doses de B (Fig. 8A-D). A integridade do meristema apical do caule foi mantida entre os tratamentos, e a região meristemática caracterizou-se pela presença de células indiferenciadas, de tamanho reduzido e altamente compactadas, demonstrando características típicas desta região (Fig. 8E-H).



**Fig. 8.** Ápices caulinares de cafeeiros submetidos às doses de B aos 90 dias de cultivo (fotomicrografias de seções longitudinais). A-D. Aspecto geral do ápice de caule. E-H. Detalhe da região do promeristema observado em detalhe vermelho de A-D. 0 (A e E), 25 (B e F), 100 (C e G), 200 (D e H)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B. Barra = 900  $\mu\text{m}$  (A-D); 50  $\mu\text{m}$  (E-H).

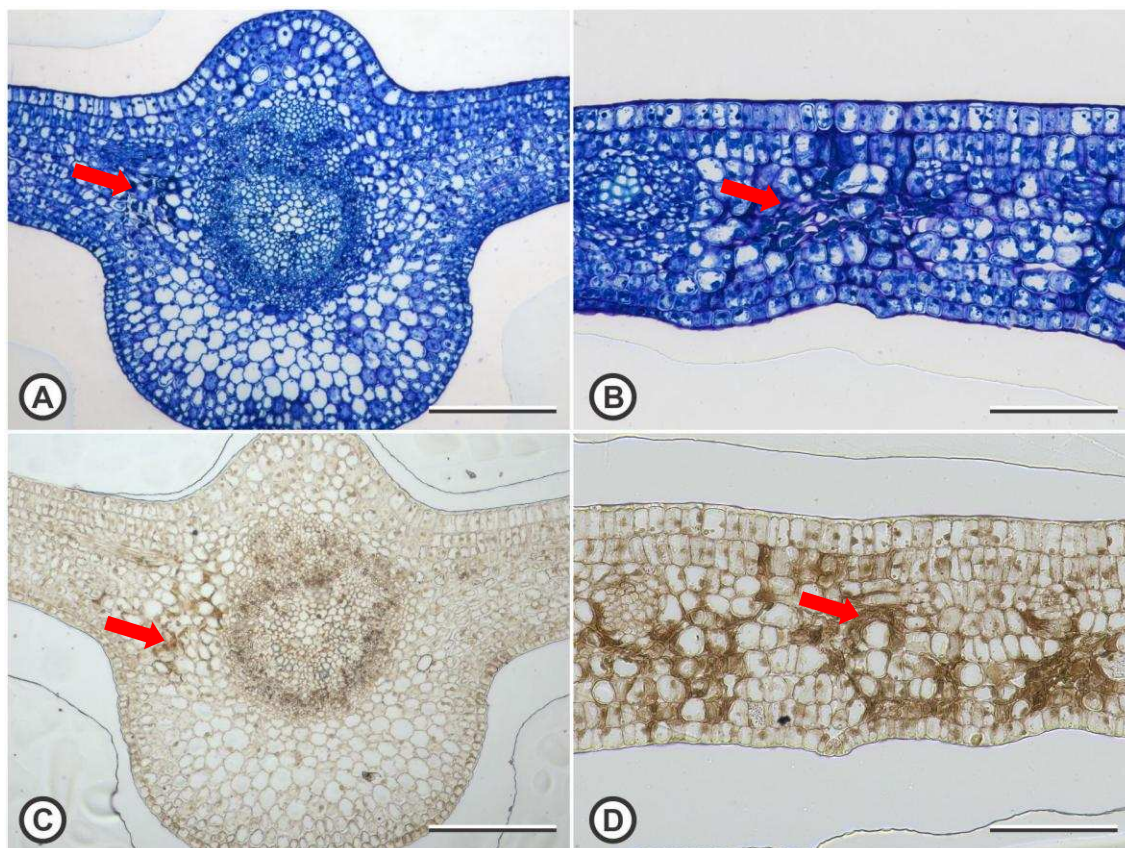
Os sintomas macroscópicos (necrose) de deficiência de B em folhas jovens de cafeeiros coletados aos 50 dias de exposição aos tratamentos foram também observados anatomicamente (Fig. 9). A necrose se iniciou nas células do mesofilo, com a dissolução da lamela média (Fig. 9A e B), acúmulo de compostos fenólicos, alteração da forma celular (Fig. 9C), desestruturação e, finalmente, colapso das células (Fig. 9D).



**Fig. 9.** Folhas jovens de cafeeiros submetidos às doses B. Detalhe da região intervenal (A, C, E e G) e da nervura principal (B, D, F e H) de folhas de cafeeiros submetidos a 0 (A e B), 25 (C e D), 100 (E e F) e 200 (G e H)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B, aos 50 dias de cultivo (fotomicrografias de secções transversais). Notar o acúmulo de compostos fenólicos (cf), alteração da forma celular, desestruturação e colapso das células

(cc) no mesofilo, e desestruturação do xilema, do floema e da faixa cambial na nervura principal de folhas de cafeeiros sob deficiência de B (A e B). Faixa cambial (fc), floema (f), xilema (x). Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

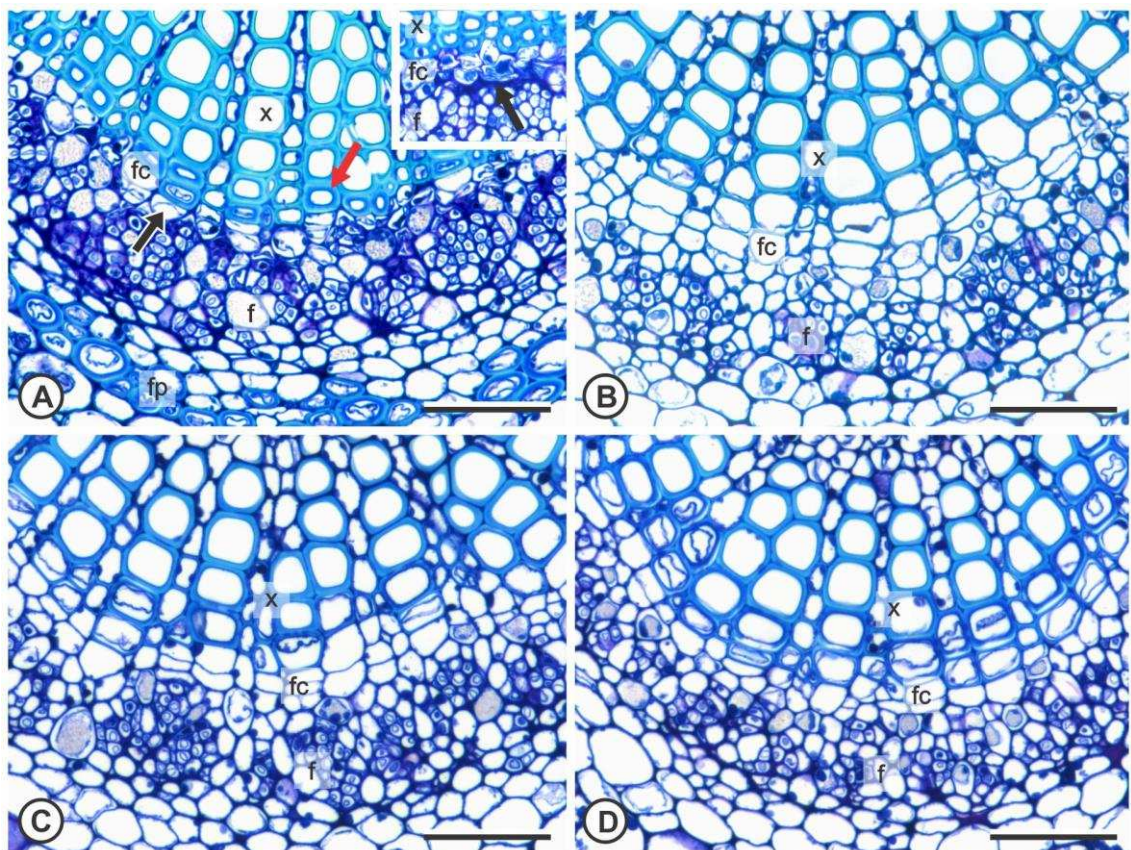
O acúmulo de compostos fenólicos no mesofilo e na nervura principal de folhas jovens com necrose foi detectado pela reação positiva (coloração marrom) do teste histoquímico com Cloreto Férrico (Fig. 10).



**Fig. 10.** Acúmulo de compostos fenólicos em folhas jovens de cafeeiros submetidos à  $0 \mu\text{mol L}^{-1}$  B (fotomicrografias de secções transversais). Detalhe da nervura principal (A e C) e da região intervenal (B e D) corados com azul de toluidina (A e B) e com cloreto férrico (C e D). Setas indicam acúmulo de compostos fenólicos. Barra = 200  $\mu\text{m}$  (A e C); 100  $\mu\text{m}$  (B e D).

Aos 90 dias de cultivo, também ocorreram alterações anatômicas na região da nervura principal das folhas de cafeeiros sob deficiência de B, em relação aos demais tratamentos (Fig. 11). Houve degradação de paredes celulares ao longo do floema, com acúmulo de material péctico-celulósico, e diferenciação de fibras pericíclicas logo abaixo do floema (Fig. 11A). Sob deficiência de B, a nervura principal das folhas apresentaram apenas uma camada de iniciais cambiais, imediatamente ladeada por

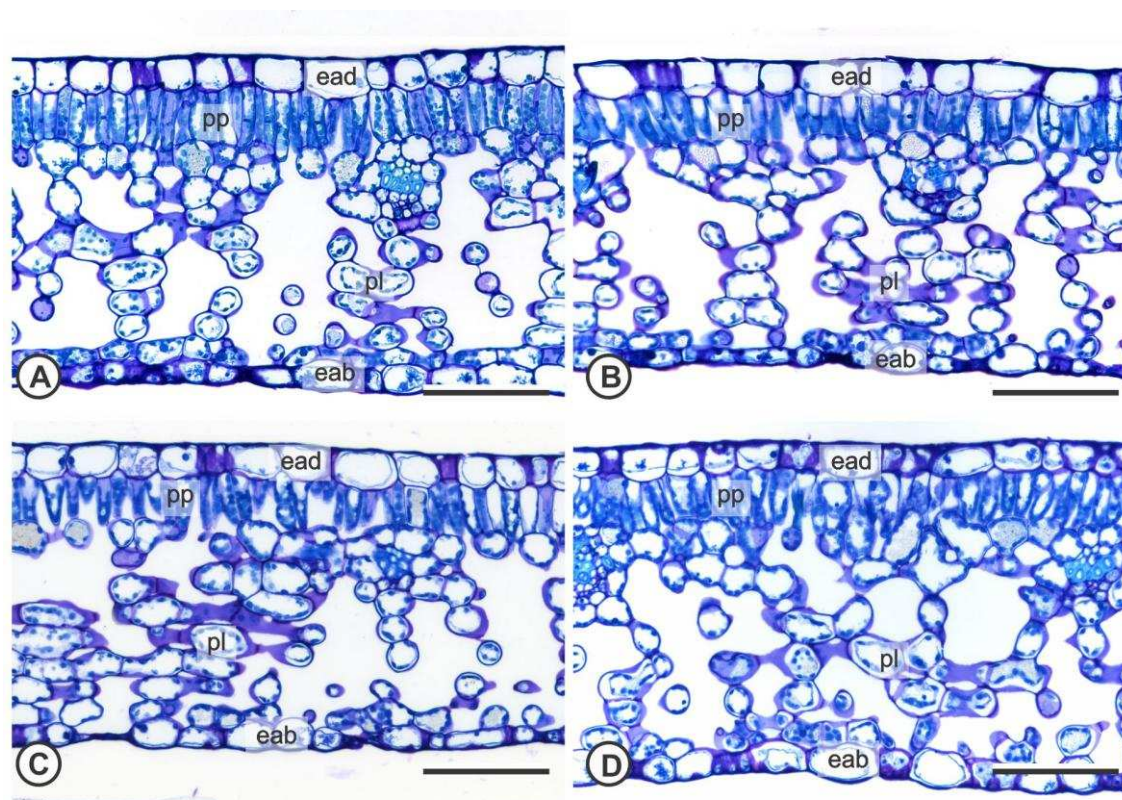
células completamente diferenciadas de xilema e floema secundários, voltadas para a face adaxial e abaxial, respectivamente, demonstrando a inatividade desse meristema (Fig. 11A). Além disso, ainda sob deficiência de B, os elementos de vaso apresentaram menor calibre e com paredes mais espessas (Fig. 11A). Nos demais tratamentos, a faixa cambial apresentou mais de uma camada de células iniciais, células diferenciadas de xilema e floema secundários apenas a certa distância desta região e ausência de fibras pericíclicas (Fig. 11B-D).



**Fig. 11.** Folhas maduras de cafeeiros submetidos às doses de B, evidenciando a região da nervura principal, aos 90 dias de cultivo (fotomicrografias de secções transversais). 0 (A), 25 (B), 100 (C) e 200 (D)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B. Notar na nervura principal de folhas de cafeeiros submetidos à 0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B os elementos de vaso menores e mais espessos (seta vermelha), a degradação de parede celular ao longo do floema (f - seta preta; detalhe), uma única camada de células do câmbio vascular (seta preta e branca) e a presença de fibras pericíclicas (fp). Faixa cambial (fc), xilema (x). Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

Na região intervenal, apenas alterações anatômicas quantitativas foram observadas em cafeeiros submetidos às doses de B (Fig. 12; Tabela 5). Em geral, folhas

de cafeeiros submetidos a  $0 \mu\text{mol L}^{-1}$  B apresentaram maior espessura foliar, resultado da maior espessura da epiderme adaxial e dos parênquimas paliçádico e lacunoso. A densidade estomática também foi maior em condições de deficiência de B.



**Fig. 12.** Folhas de cafeeiros submetidos às doses de B, aos 90 dias de cultivo (fotomicrografias de secções transversais). 0 (A), 25 (B), 100 (C) e 200 (D)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B. Notar maior espessura total da folha de cafeeiros submetidos a  $0 \mu\text{mol L}^{-1}$  B. Epiderme da face adaxial (ead) e abaxial (eab) da folha, parênquima lacunoso (pl), parênquima paliçádico (pp). Barra =  $100 \mu\text{m}$ .

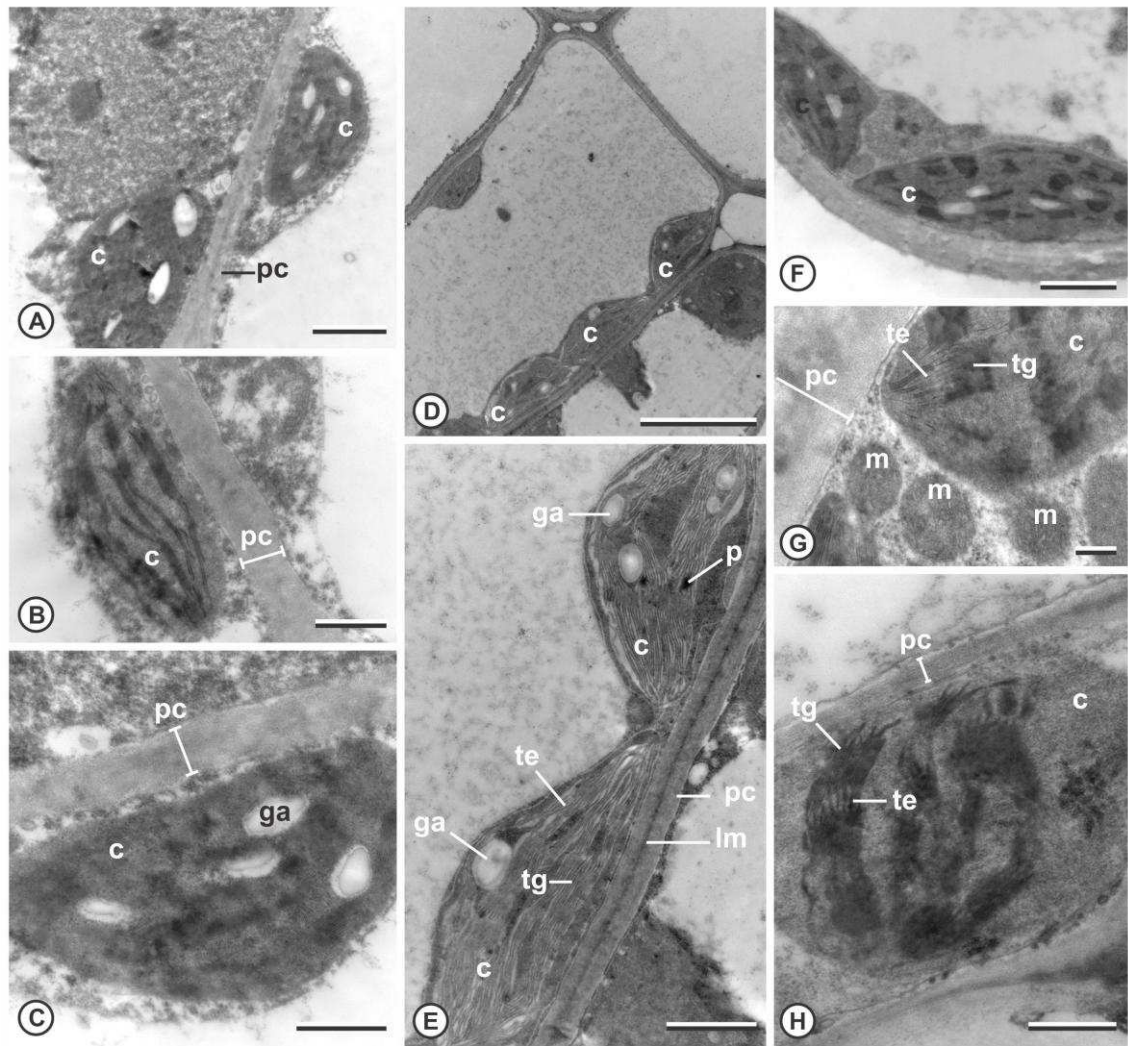
**Tabela 5.** Espessura da epiderme da face adaxial (EAD) e abaxial (EAB) da folha, espessura do parênquima paliçádico (PP) e lacunoso (PL), espessura total da folha (ETF) e densidade estomática (EST) em folhas de cafeeiros submetidos a doses de B. Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão.

Dose	EAD ( $\mu\text{m}$ )	EAB ( $\mu\text{m}$ )	PP ( $\mu\text{m}$ )	PL ( $\mu\text{m}$ )	ETF ( $\mu\text{m}$ )	EST (n° est / $\text{mm}^2$ )
0	$27,16 \pm 2,88$	$17,67 \pm 1,90$	$47,14 \pm 3,87$	$173,12 \pm 17,09$	$260,23 \pm 21,44$	$255,8 \pm 43,6$
25	$25,25 \pm 1,34$	$18,80 \pm 1,97$	$37,83 \pm 0,99$	$163,43 \pm 7,15$	$240,08 \pm 8,59$	$243,6 \pm 8,7$
100	$24,35 \pm 2,28$	$17,37 \pm 3,49$	$38,75 \pm 1,95$	$162,10 \pm 26,76$	$239,42 \pm 31,16$	$231,4 \pm 66,1$
200	$24,04 \pm 0,35$	$20,51 \pm 2,66$	$38,55 \pm 4,65$	$167,56 \pm 12,29$	$247,08 \pm 19,07$	$253,1 \pm 29,3$



### 3.3 Análise ultraestrutural

As folhas de cafeeiros submetidos a 0 (Fig. 13A-C) e 200 (Fig. 13F-H)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B apresentaram alterações ultraestruturais mais evidentes na parede celular e nos cloroplastos (Fig. 13). Nesses tratamentos, houve dissolução da lamela média, desestruturação da parede celular e alteração estrutural dos cloroplastos. Os cloroplastos apresentaram desorganização dos tilacoides do grana e dos tilacoides do estroma, diferindo da dose de 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B, na qual as plantas apresentaram cloroplastos com tilacoides íntegros e formação de granum bem definido (Fig. 13D e E). Sob 0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de B, a desorganização dos tilacoides foi mais intensa que nos demais tratamentos, mas a formação de grãos de amido ocorreu de maneira irregular sob 0 e 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B (Fig. 13A, C, F e G). O núcleo e as demais organelas, como os dictiossomas, mitocôndrias e retículo endoplasmático, por exemplo, não apresentaram alterações perceptíveis com a aplicação dos tratamentos, demonstrando aspecto semelhante às organelas de cafeeiros submetidos à dose de 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B.

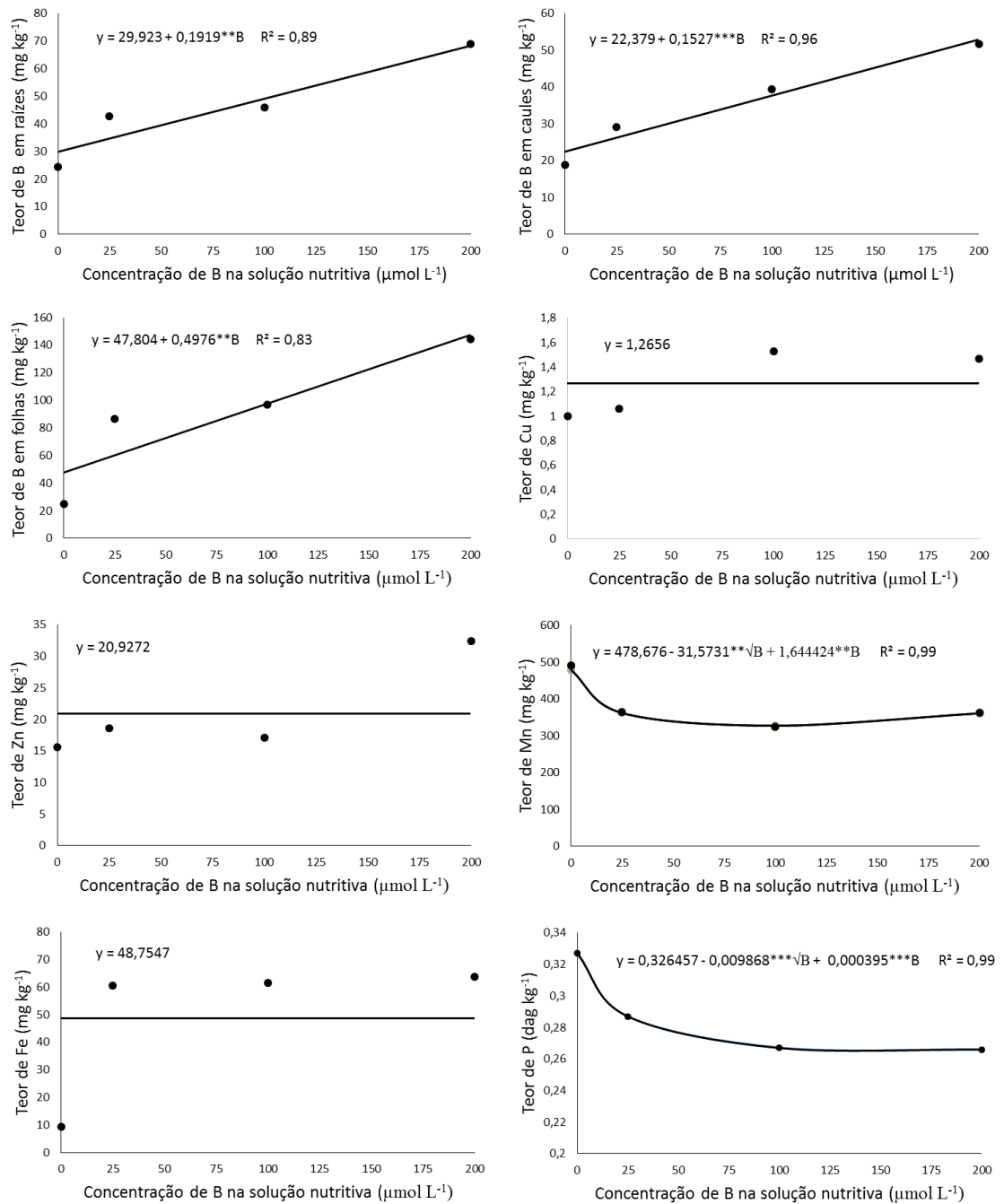


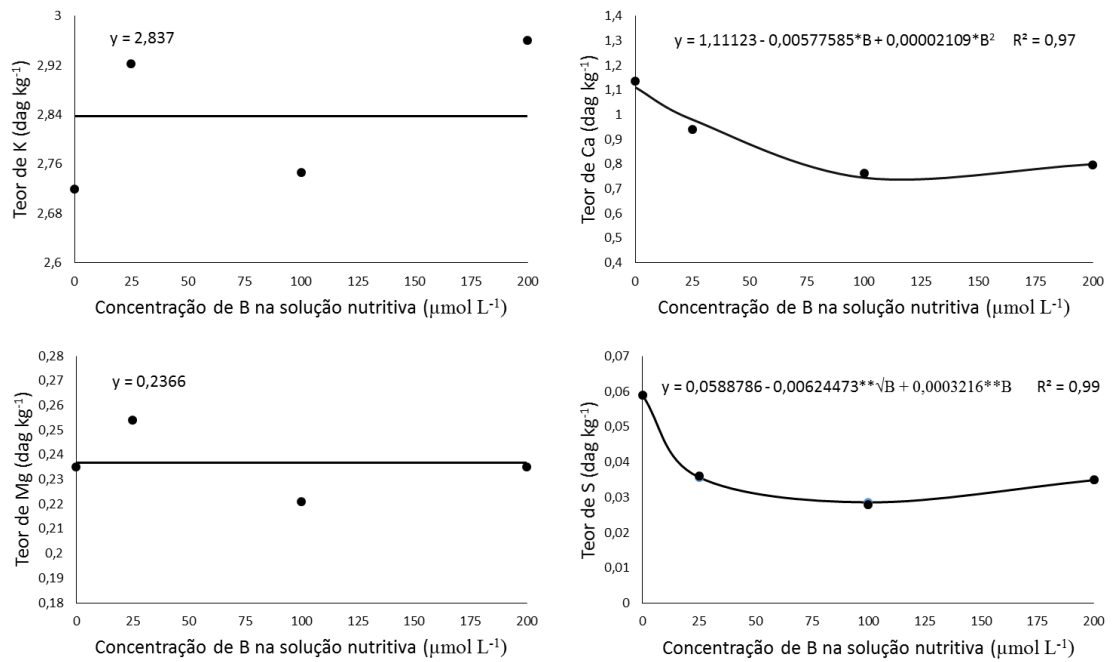
**Fig. 13.** Detalhes de células de folhas maduras de cafeeiros submetidos às doses de B, aos 90 dias de cultivo (eletromicrografias de secções transversais). 0 (A, B e C), 25 (D e E) e 200 (F, G e H)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B. Cloroplastos (c), grão de amido (ga), lamela média (lm), mitocôndrias (m), parede celular (pc), tilacoides do estroma (te) e tilacoides do granum (tg). Barra = 5  $\mu\text{m}$  (D); 1  $\mu\text{m}$  (A, E e F); 500 nm (B, C e H); 200 nm (G).

### 3.4 Teor de nutrientes na planta

A concentração de B na solução nutritiva influenciou significativamente a concentração deste nutriente nos diferentes órgãos de cafeeiros. O aumento da concentração de B na solução elevou significativamente a concentração de B nas raízes, caules e folhas das plantas, apresentando comportamento linear positivo (Fig. 14). Além disto, a concentração de B foi significativamente maior nas folhas, quando comparada àquela em caules e raízes (Fig. 14).

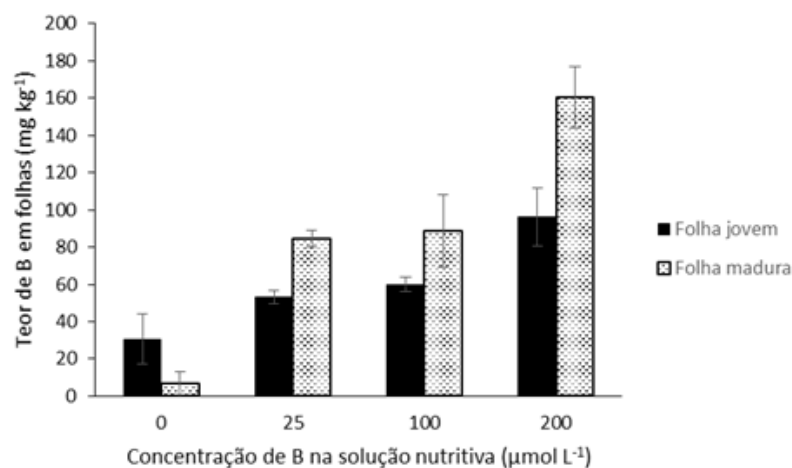
Houve diferença na concentração de nutrientes nas folhas de cafeeiros submetidos às doses de B. Mn (micronutriente) e P, Ca e S (macronutrientes) apresentaram efeito das doses de B, enquanto Cu, Zn e Fe (micronutrientes), e K e Mg (macronutrientes) não foram alterados (Fig. 14).





**Fig. 14.** Teor de B em folhas, caules e raízes de cafeeiros, e teor de macronutrientes (P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Cu, Zn, Mn e Fe) em folhas de cafeeiros após 90 dias sob doses de B. Os símbolos “\*”, “\*\*” e “\*\*\*” indicam valores significativos a 10, 5% e 1% de probabilidade pelo teste “t”, respectivamente.

Os teores de B em folhas jovens e maduras de cafeeiros diferiram entre os tratamentos (Fig. 15). Sob  $0 \mu\text{mol L}^{-1}$  B, as folhas jovens apresentaram teores maiores do que as folhas maduras. Nos demais tratamentos, os maiores teores de B foram encontrados em folhas maduras.



**Fig. 13.** Teor de B em folhas jovens e maduras de cafeeiros submetidos a doses de B. Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão.

#### 4. DISCUSSÃO

O excesso e a deficiência de B em plantas podem ser identificados pelo aparecimento de sintomas macroscópicos característicos nos órgãos vegetativos (MARSCHNER, 2012). Os sintomas macroscópicos mais típicos de excesso de B são clorose na margem ou na ponta de folhas completamente expandidas e a necrose (MARSCHNER, 2012). No caso dos cafeeiros submetidos a  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  B, os sintomas macroscópicos são praticamente imperceptíveis até os 90 dias de cultivo. Apenas pequenas alterações ultraestruturais foram verificadas nos cloroplastos, como dissolução dos tilacoides do grana e pequena quantidade de amido primário, dissolução da lamela média e desestruturação da parede celular. Algumas espécies podem ser mais tolerantes que outras em situação de excesso de B e haver atraso no aparecimento dos sintomas característicos de toxidez, que depende da demanda pelo nutriente (HUANG et al., 2014).

Em condições de deficiência de B, a quantidade de nutriente que chega aos órgãos aéreos pelo xilema (via apoplasto) parece ser insuficiente para promover o desenvolvimento normal da planta. O primeiro e mais marcante sintoma macroscópico da deficiência de B em cafeeiros, já aos 50 dias de cultivo, foi verificado nas folhas jovens em início de expansão. Ocorreu amarelecimento, necrose e deformação de folhas jovens, além de pequena deformação em folhas completamente expandidas. Essas alterações, já descritas para outras espécies (ZHOU et al., 2014), restringiram a expansão foliar e progrediram até a abscisão dessas folhas, enquanto o meristema apical se manteve íntegro. As áreas necróticas iniciaram-se nas células do mesofilo e do floema da nervura principal, com a degradação da lamela média e alterações na estrutura da parede primária até a fenolização e colapso das células. Sabe-se que o B pode ocorrer na forma solúvel ou insolúvel em água e, neste último caso, pode estar associado à cadeia pectica da parede celular, ligado ao ramnogalacturonano II, formando uma rede de polissacarídeos pecticos que garante a estabilidade à parede celular (MATOH, 1997). Portanto, a deficiência de B teria como primeiro efeito a desestruturação das pectinas, resultando na degradação da lamela média e das paredes primárias adjacentes. Essas anormalidades estruturais na parede celular, associadas a prejuízos no processo de alongamento celular, causariam restrições à expansão foliar sob deficiência de B (LIU et al., 2014).

É interessante notar que, em condições de deficiência de B mais prolongada, há brotação de novos pares de folhas, como neste experimento, ou uma superbrotção de ramos laterais após a necrose do meristema apical (DELL; HUANG, 1997). Isso sugere que a deficiência de B afeta inicialmente os primórdios foliares em expansão e, só com a continuidade severa da deficiência, o meristema apical seria afetado, tornando-se necrosado e causando a perda da dominância apical. Porém, essa brotação também indica a possibilidade de retranslocação de B das folhas mais velhas para regiões mais novas pelo floema, ou seja, via simplasto, com o auxílio de moléculas complexantes, como os açúcares-álcoois (REID, 2014). Alguns açúcares-álcoois (sorbitol e manitol), descritos como polióis, podem se complexar com o B e, assim, torná-lo móvel no floema (BROWN; HU, 1996). Diversas plantas economicamente importantes produzem manitol, como o alho, a oliveira, o feijão, a ervilha e até mesmo o café (BROWN; SHELPS, 1997). A presença de manitol poderia explicar a retranslocação de B em cafeeiros sob deficiência de B, uma vez que as folhas jovens apresentaram teores de B superiores às folhas maduras. No entanto, as informações sobre a distribuição de manitol em cafeeiros ainda são escassas e, conseqüentemente, seu papel na retranslocação de B ainda é pouco compreendido.

Como houve rápida brotação de novos pares de folhas, a avaliação geral dos cafeeiros submetidos às doses de B só foi realizada após 90 dias de cultivo. Nessa avaliação, as folhas maduras em plantas sob deficiência de B não apresentaram sintomas macroscópicos muito característicos da deficiência, mas algumas alterações anatômicas foram observadas. Essas folhas apresentaram redução do número de camadas de células cambiais da nervura principal, e outras alterações quantitativas na região intervenal, como o espessamento foliar. Além do espessamento foliar, consequência do aumento da espessura da epiderme da face adaxial da folha e dos parênquimas paliçádico e lacunoso, também houve discreto aumento da densidade estomática. Outras espécies, como *Raphanus sativus* (CONG et al., 2015) e *Medicago sativa* (ÇETIN, 2009), também apresentaram folhas com pequenas alterações anatômicas quantitativas em decorrência da deficiência de B. Porém, as alterações anatômicas qualitativas verificadas no floema dos cafeeiros sob deficiência de B merecem destaque, pois poderiam se relacionar com a restrição ou a facilitação do transporte simplástico de diversos compostos a partir de folhas mais velhas.

Além das alterações anatômicas, algumas alterações ultraestruturais foram evidentes nas folhas maduras em plantas sob deficiência de B, como a desestruturação da parede celular e alterações nos cloroplastos. Entre as paredes primárias de células adjacentes, a lamela média era imperceptível nas plantas sob deficiência de B, enquanto na dose controle esta camada era bastante conspícua. Essa análise ultraestrutural confirma as observações anatômicas a respeito da perda da integridade da parede celular nas folhas maduras e também nas primeiras folhas emitidas sob deficiência de B que acabaram sofrendo abscisão. Nos cloroplastos, houve desestruturação dos tilacoides do grana e do estroma, e ocorrência de grãos de amido primário de forma irregular. A desestruturação dos tilacoides pode estar relacionada a problemas no processo fotossintético que levariam ao amarelecimento das folhas jovens brotadas, uma vez que as alterações ultraestruturais precedem os sintomas macroscópicos da deficiência (LEE; ARONOFF, 1966). Alguns autores atribuem a maior concentração de amido nos cloroplastos de plantas com deficiência de B à inibição do crescimento das plantas e, conseqüentemente, ao acúmulo de amido não metabolizado (HAN et al., 2008).

Nos caules de cafeeiros sob deficiência de B, na região cambial, verificou-se maior número de camadas de células iniciais e de células derivadas ainda pouco diferenciadas, quando comparadas aos demais tratamentos. Porém, nenhuma alteração mais expressiva foi observada no caule, provavelmente por se tratar de uma região mais distante do ápice, já diferenciada e em início de crescimento secundário.

Os danos ocorridos nos primórdios foliares, que são regiões de síntese de fitorreguladores como as auxinas (AIA) (TAIZ; ZEIGER, 2004), levariam a um desbalanço hormonal na planta. Esse efeito secundário da deficiência de B, intimamente relacionado ao desbalanço de AIA, causaram alterações morfoanatômicas drásticas nos ápices radiculares de cafeeiros. Essas alterações se iniciaram com a redução da área da região meristemática e de alongamento celular, e resultaram na diferenciação precoce de células e tecidos, em raízes mais espessas, muito ramificadas e encurtadas. Vários autores relatam alterações semelhantes em raízes de espécies submetidas à deficiência de B, como a emissão de raízes laterais próximas ao ápice, a inibição do alongamento das raízes (DELL; HUANG, 1997), o espessamento das raízes (HAJIBOLAND; FARHANGHI, 2010), o escurecimento e morte do meristema apical das raízes e escassez de pelos radiculares (GOLDBACH et al., 2001). Porém, nos cafeeiros

submetidos à deficiência de B, a ausência de pelos radiculares foi verificada em todos os tratamentos e atribuída ao sistema hidropônico de cultivo, e não à deficiência do nutriente. Essas alterações parecem ser consequência da restrição do alongamento celular pelo estabelecimento de níveis inadequados de AIA na raiz. A formação de elementos de vaso tortuosos, em raízes de cafeeiros sob deficiência de B, parece ser um bom indício de que o depósito de parede secundária e a lignificação tenham ocorrido antes do processo de alongamento celular se completar. Apesar da inibição do alongamento celular em raízes de plantas sob deficiência de B, o processo de divisão celular nos meristemas radiculares não seria afetado (MARTÍN-REJANO et al., 2011).

Em geral, a concentração de AIA nos ápices radiculares é relativamente menor que na parte aérea, porém, tanto a diminuição como o aumento excessivo da concentração de AIA pode restringir o alongamento celular nessa região (TAIZ; ZEIGER, 2004). A questão a ser respondida é se a restrição no alongamento celular nos ápices radiculares de plantas sob deficiência de B ocorre pelo aumento ou pela diminuição excessiva dos níveis de AIA. Alguns autores entendem que a deficiência de B aumentaria a síntese de AIA em regiões meristemáticas da raiz, e mesmo seu transporte para a zona de alongamento, e o acúmulo de AIA nessa região inibiria o alongamento celular (MARTÍN-REJANO et al., 2011). Porém, há relato do aumento da atividade da enzima AIA-oxidase, responsável pela destruição de AIA nas células, e a diminuição dos níveis de AIA e do alongamento celular nessas condições (MARSCHNER, 2012). Outra possibilidade da diminuição dos níveis de AIA na raiz é a menor síntese e translocação deste fitorregulador dos ápices aéreos para os ápices radiculares.

Por meio da análise química verificou-se que o estado nutricional dos cafeeiros submetidos às diferentes doses de B estava próximo às faixas críticas propostas para a cultura (MARTINEZ et al., 2003), certificando-se o estado nutricional satisfatório durante a execução do experimento. Porém, diferentes concentrações de B podem ser responsáveis por alterar a absorção de diversos macronutrientes e micronutrientes (ZHOU et al., 2014). Neste experimento, houve alteração na concentração de P, Ca, S (macronutrientes) e Mn (micronutriente). As maiores concentrações de P, Ca, S e Mn em cafeeiros ocorreu em condição de deficiência de B na solução nutritiva. No entanto, os cafeeiros submetidos à deficiência de B,



apresentaram porte mais reduzido, e com isso alguns nutrientes podem ficar mais concentrados nas folhas. A relação antagônica entre B e P em cafeeiros já foi descrita em tomate, onde altas concentrações de B reduziram significativamente as concentrações de P (KAYA et al., 2009). Essa relação antagônica também é descrita entre B e Ca, pois a deficiência de B pode facilitar a abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e aumentar a concentração deste cátion no citoplasma (QUILES-PANDO et al., 2013). Apesar de já descrito anteriormente, o antagonismo entre o B e o S, ainda é pouco compreendido (BARKER; PILBEAM, 2007).

## 5. CONCLUSÕES

A deficiência de B foi mais prejudicial ao cafeeiro que doses acima da faixa ótima, causando alterações morfoanatômicas e ultraestruturais qualitativas e quantitativas. Em condições de deficiência, menor quantidade de B chega aos ápices caulinares pelo xilema (via apoplástica) e isso promove uma série de alterações morfoanatômicas e ultraestruturais nas plantas, além de alterações no estado nutricional dos cafeeiros. O sintoma macroscópico da deficiência de B ocorreu inicialmente nas folhas jovens. Em folhas maduras de cafeeiros sob deficiência de B, há alterações ultraestruturais em cloroplastos e na síntese de pectinas em paredes celulares de células do mesofilo em folhas maduras. Houve também alterações anatômicas quantitativas e qualitativas em folhas, caules e raízes de cafeeiros. Em folhas, houve alteração na espessura da epiderme da face adaxial da folha, dos parênquimas paliçádico e lacunoso, e conseqüentemente na espessura total da folha. Nos caules, houve aumento no número de camadas da faixa cambial e em raízes houve dano na região meristemática e diferenciação precoce de células e tecidos. As alterações estruturais em raízes, a morte do meristema apical das raízes e a redução do sistema radicular e, conseqüentemente, do potencial de absorção de água e nutrientes, pode ter prejudicado o crescimento e desenvolvimento dos cafeeiros. Como não houve danos ao meristema apical do caule e a concentração de B em folhas jovens foi superior às folhas maduras em plantas sob deficiência de B, possivelmente há um indicativo de translocação deste nutriente pelo floema (via simplástica).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barker AV, Pilbeam DJ. 2007.** *Handbook of Plant Nutrition*. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis Group.
- Brangança SM, Silva EB, Martins AG, Santos LP, Lani JA, Volpi OS. 2009.** Resposta do cafeeiro conilon à adubação NPK em sistema de plantio adensado. *Coffee Science* **4**: 67-75.
- Brown PH, Hu H. 1996.** Phloem mobility of boron is species dependent. Evidence for phloem mobility in sorbitol rich species. *Annals of Botany* **77**: 497–505.
- Brown PH, Shelp BJ. 1997.** Boron mobility in plants. *Plant and Soil* **193**: 85- 101.
- Çetin E. 2009.** Effects of boron stress on the anatomical structure of *Medicago sativa* L. *IUFS Journal of Biology* **68**: 27-35.
- Clemente JM, Martinez HEP, Alves LC, Lara MCR. 2013.** Effect of N and K doses in nutritive solution on growth, production and coffee bean size. *Revista Ceres* **60**: 279-285.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB).** *Acompanhamento da safra brasileira de café, safra 2015, quarto levantamento, dezembro 2015*. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_12\\_17\\_09\\_02\\_47\\_boletim\\_cafe\\_dezembro\\_2015\\_2.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_02_47_boletim_cafe_dezembro_2015_2.pdf)>. Acesso em: 21 dez. 2015.
- Cong X, Jing H, Xia Z, Huang M, Jiang X. 2015.** Boron deficiency affects cell morphology and structure of young leaves of radish. *Acta Physiologiae Plantarum* **37**: 247.
- Dell B, Huang L. 1997.** Physiological response of plants to low boron. *Plant and Soil* **193**: 103-120.
- Dias KGL, Furtini-Neto AE, Guimarães PTG, Reis THP, Oliveira CHC. 2015.** Coffee yield and phosphate nutrition provided to plants by various phosphorus sources and levels. *Ciência e Agrotecnologia* **39**: 110-120.
- Estrada F, Gay C, Conde C. 2012.** A methodology for the risk assessment of climate variability and change under uncertainty. A case study: coffee production in Veracruz, Mexico. *Climatic Change* **113**: 455-479.
- Goldbach HE, Yu Q, Wingender R, Schulz M, Wimmer M, Findeklee P, Baluska F. 2001.** Rapid response reactions of roots to boron deprivation. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **164**: 173-181.

- Hajiboland R, Farhanghi F. 2010.** Remobilization of boron, photosynthesis, phenolic metabolism and anti-oxidant defense capacity in boron-deficient turnip (*Brassica rapa* L.) plants. *Soil Science and Plant Nutrition* **56**: 427-437.
- Han S, Chen LS, Jiang HX, Smith BR, Yang LT, Xie CY. 2008.** Boron deficiency decreases growth and photosynthesis, and increases starch and hexoses in leaves of citrus seedlings. *Journal of Plant Physiology* **165**: 1331-1341.
- Huang JH, Cai ZJ, Wen SX, Guo P, Ye X, Lin GZ, Chen LS. 2014.** Effects of boron toxicity on root and leaf anatomy in two *Citrus* species differing in boron tolerance. *Tress* **28**: 1653-1666.
- International Coffee Organizatio (ICO). Historical data.** Disponível em: <  
<http://www.ico.org/historical/1990%20onwards/PDF/1a-total-production.pdf>>.  
 Acesso em: 06 jun. 2015.
- Jensen WA. 1962.** *Botanical Histochemistry: Principles and Practice*. San Francisco: W.H. Freeman.
- Johansen DA. 1940.** *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill.
- Kabata-Pendias A. 2010.** *Trace Elements in Soil and Plants*. 4th edn. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Kaya C, Tuna AL, Dikilitas M, Ashraf M, Koskeroglu S, Guneri M. 2009.** Supplementary phosphorus can alleviate boron toxicity in tomato. *Scientia Horticulturae* **121**: 284-288.
- Lavres-Junior J, Malavolta E, Nogueira NL, Moraes MF, Reis AR, Rossi ML, Cabral CP. 2009.** Changes in anatomy and root cell ultrastructure of soybean genotypes under manganese stress. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **33**: 395-403.
- Lee SG, Aronoff S. 1966.** Investigations on the Role of Boron in Plants: III. Anatomical observations. *Plant Physiology*.**41**: 1570-1577.
- Liu G, Dong X, Liu L, Wu L, Peng S, Jiang C. 2014.** Boron deficiency is correlated with changes in cell wall structure that lead to growth defects in the leaves of navel orange plants. *Scientia Horticulturae* **176**: 54-62.
- Malavolta E. 2006.** *Manual de nutrição de plantas*. São Paulo: Agronômica Ceres.
- Marschner H. 2012.** *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3th edn. London: Academic Press.
- Martinez HEP, Menezes JFS, Souza RB, Venegas VHA, Guimarães PTG. 2003.** Faixas críticas de concentrações de nutrientes e avaliação do estado nutricional

de cafeeiros em quatro regiões de Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **38**:703-713.

**Martín-Rejano EM, Camacho-Cristóbal JJ, Herrera-Ridrigués MB, Rexach J, Navarro-Gochicoa MT, Gonzáles-Fontes A. 2011.** Auxin and ethylene are involved in the responses of root system architecture to low boron supply in *Arabidopsis* seedlings. *Physiologia Plantarum* **142**: 170-178.

**Matoh T. 1997.** Boron in plant cell walls. *Plant Soil* **193**: 59-70.

**O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368-373.

**Quiles-Pando C, Rexach J, Navarro-Gochicoa T, Camacho-Cristóbal JJ, Herrera-Rodríguez MB, González-Fontes A. 2013.** Boron deficiency increases the levels of cytosolic Ca<sup>2+</sup> and expression of Ca<sup>2+</sup>-related genes in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Physiology and Biochemistry* **65**: 55-60.

**Reid R. 2014.** Understanding the boron transport network in plants. *Plant and Soil* **385**: 1-13.

**Reynolds ES. 1963.** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electronmicroscopy. *Journal of Cell Biology* **17**: 208-212.

**Ribeyre F, Avelino J. 2012.** *Impact of field pests and diseases on coffee quality*. In: Oberthür T, Läderach P, Pohlman HAJ, Cock J (eds). **Specialty coffee: managing quality**. International Plant Nutrition Institute: Northcross, GA.

**Simpson CR, Rapone A. 2000.** Community development from the ground up: social-justice coffee. *Human Ecology Review* **7**: 46-57.

**Spurr AR. 1969.** A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* **26**: 31-43.

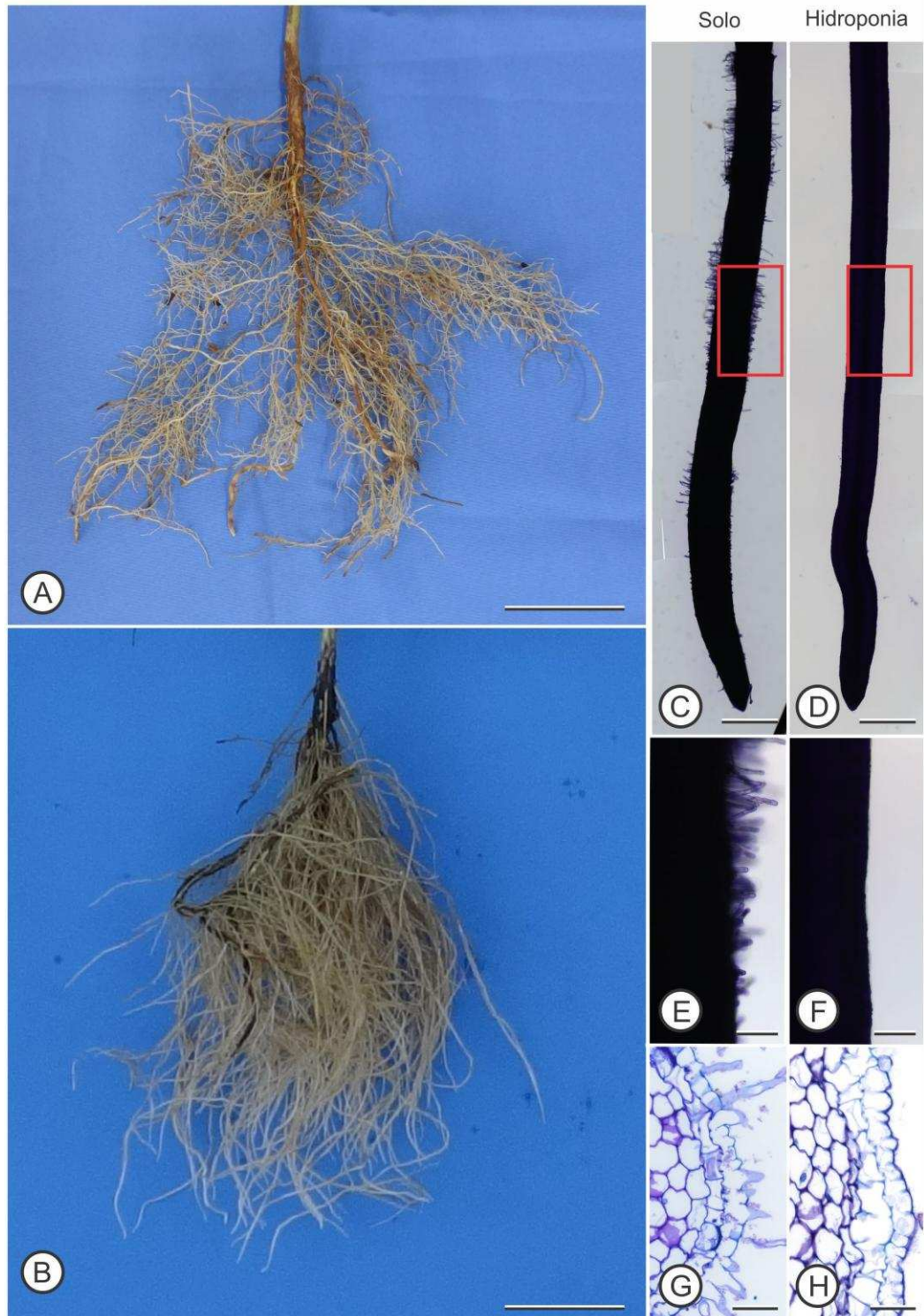
**Taiz L, Zeiger E. 2004.** *Fisiologia Vegetal*. 3ed. Porto Alegre: Artmed.

**Truzzi OMS, Bassanezi MSB. 2009.** População, grupos étnico-raciais e economia cafeeira: São Carlos, 1907. *Revista Brasileira de Estudos de População* **26**: 197-218.

**Wolf B. 1974.** Improvements in the azomethine-H method for determination of boron. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **5**: 39-44.

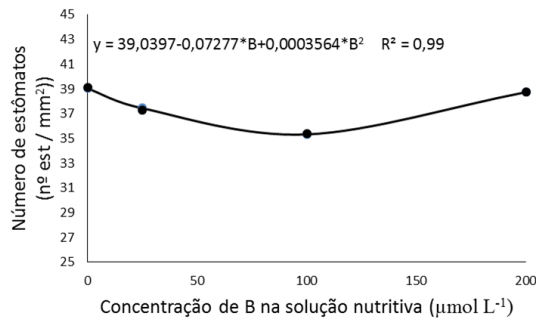
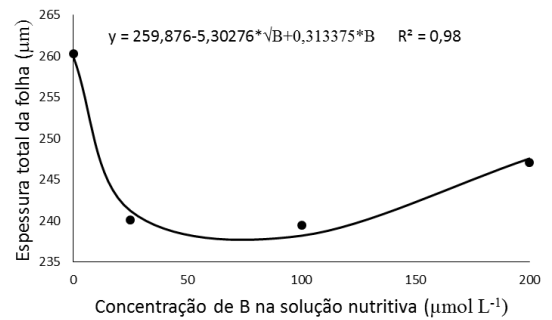
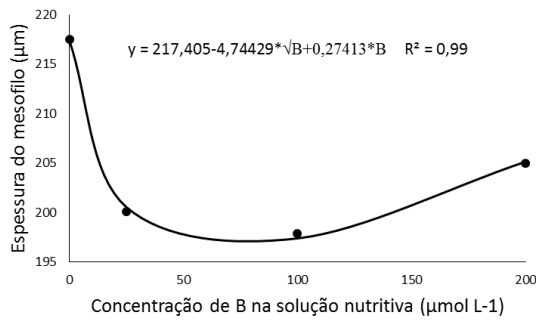
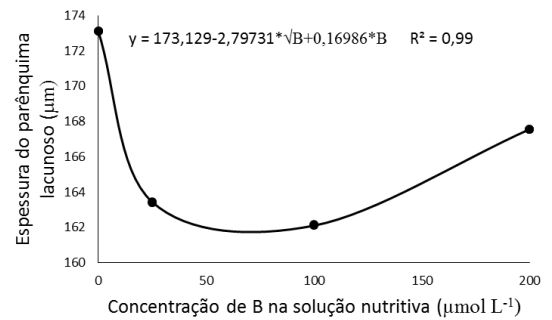
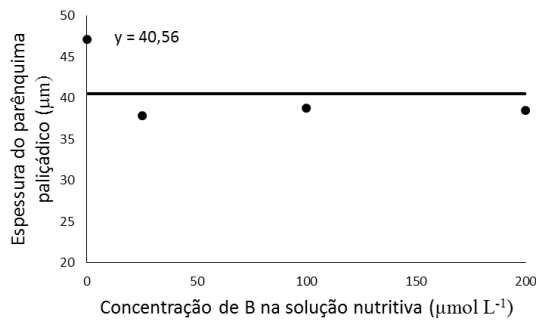
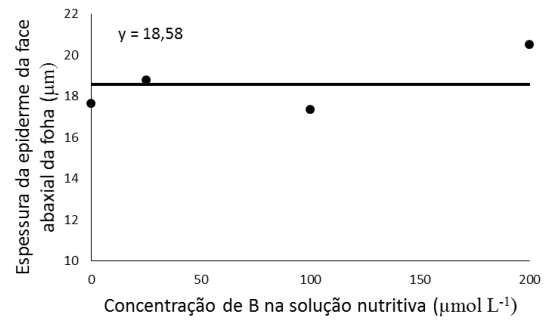
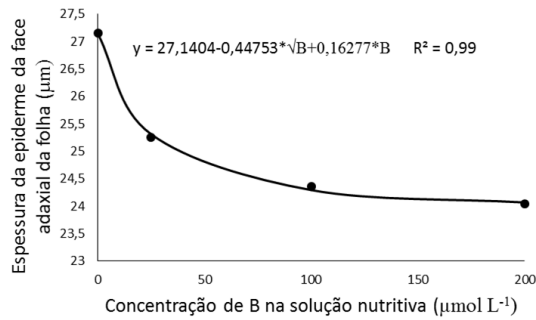
**Zhou GF, Peng SA, Liu YZ, Wei QJ, Han J, Islan Z. 2014.** The physical and nutrition responses of seven different citrus rootstock seedlings to boron deficiency. *Tress* **28**: 295-307.

## ANEXO A



Características morfológicas e anatômicas de raízes de *C. arabica* cultivada em solo e em hidroponia. (A, C, E e G) Raízes de plantas cultivadas em solo. (B, D, F e H) Raízes de plantas cultivadas em hidroponia. (A e B) Aspecto geral do sistema radicular. (C-F) Comparação macroscópica entre raízes cultivadas em solo e em hidroponia, evidenciando a presença de pelos em raízes cultivadas em solo. (G e H) Aspectos anatômicos das raízes. Notar presença de pelos apenas em raízes de plantas cultivadas em solo. Barra: A e B: 5 cm; C e D: 600  $\mu\text{m}$ ; E e F: 100  $\mu\text{m}$ ; G e H: 50  $\mu\text{m}$ .

## ANEXO B



Equações de regressão ajustadas da espessura da epiderme da face adaxial e abaxial da folha, espessura do parênquima paliçádico e lacunoso, espessura do mesófilo, espessura total da folha e número de estômatos em folhas de cafeeiros submetidos a doses de B, com os respectivos coeficientes de determinação. O símbolo “\*” indica valores significativos a 5% probabilidade pelo teste “t”.

## CAPÍTULO II

### EFEITOS DE DOSES DE COBRE SOBRE A ANATOMIA E ULTRAESTRUTURA DE ÓRGÃOS VEGETATIVOS DE CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)

**RESUMO:** A deficiência e o excesso de cobre (Cu) ocorrem naturalmente nos solos e podem causar desordens no crescimento e desenvolvimento das plantas. Lavouras cafeeiras frequentemente apresentam desequilíbrios nutricionais que envolvem esse micronutriente essencial. O objetivo foi estabelecer a relação entre os sintomas morfológicos, anatômicos e ultraestruturais associados à deficiência e ao excesso de Cu em cafeeiros, e a mobilidade de Cu nos órgãos vegetativos. Cafeeiros (*Coffea arabica* L.) foram cultivados em sistema hidropônico sob diferentes doses de Cu: 0 (deficiência), 1,5 (dose controle), 10 e 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Cu (excesso). Foram avaliados os aspectos morfoanatômicos, ultraestruturais e o teor de nutrientes dos órgãos vegetativos. Ocorreu alteração dos teores de Zn, Mn e S nas folhas de cafeeiros submetidos às diferentes doses de Cu, com efeito antagonico em relação ao Zn e ao Mn. A alteração nos cloroplastos foi o sintoma primordial da deficiência ou do excesso de Cu em folhas de cafeeiros, o que reforça a importância desse nutriente no processo fotossintético. Porém, o atraso no surgimento de sintomas morfoanatômicos da deficiência e do excesso de Cu em cafeeiros pode ser consequência do acúmulo desse nutriente nas raízes e da retranslocação para as folhas mais novas, favorecendo o reequilíbrio na planta.

**PALAVRAS-CHAVE:** Deficiência, excesso, nutrição mineral, cloroplasto.

## 1. INTRODUÇÃO

Assim como os demais micronutrientes, o Cu é essencial ao desenvolvimento das plantas, mas requerido em pequenas quantidades. A zona de deficiência de Cu na planta com deficiência está entre 1-5 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto teores foliares de 20-30 mg kg<sup>-1</sup> de massa de matéria seca são considerados excessivos. No entanto, as concentrações críticas de qualquer nutriente podem variar com a espécie, o órgão avaliado e o estágio de desenvolvimento da planta (MARSCHNER, 2012). Nos solos, a concentração de Cu pode variar entre 14-109 mg kg<sup>-1</sup> (KABATA-PENDIAS, 2010). A deficiência de Cu pode ocorrer naturalmente nos solos, ou pelo Cu ser complexado com a matéria orgânica, tornando-se indisponível para absorção pelas plantas (BARKER; PILBEAM, 2007). A toxidez de Cu também pode ocorrer naturalmente nos solos ou pode ser causada por atividades antrópicas como uso de fungicidas cúpricos, aplicação excessiva de fertilizantes e outras atividades urbanas e industriais (SONMEZ et al., 2006; BARKER; PILBEAM, 2007).

Culturas comercialmente importantes como arroz, soja e milho desenvolvem sintomas característicos da deficiência e da toxidez de Cu, incluindo alterações na taxa fotossintética, no crescimento de raízes, no desenvolvimento de folhas e na produção (LIDON et al., 1993; MOCQUOT et al., 1996; LIN; CHEN; LIU, 2005; XU et al., 2006). A deficiência de Cu mostra sintomas macroscópicos típicos, como deformação, clorose e necrose de folhas e alterações morfológicas de raízes, enquanto o excesso de Cu causa inibição do crescimento, redução de biomassa e clorose em folhas. Alterações nos cloroplastos também ocorrem em condições de deficiência e excesso de Cu (YRUELA, 2005). Porém, os sintomas anatômicos e ultraestruturais que antecedem os sintomas macroscópicos são conhecidos apenas em um pequeno número de espécies, apesar de auxiliarem no entendimento dos aspectos fisiológicos das desordens nutricionais de maneira geral. A mobilidade do Cu na planta é considerada baixa e os primeiros sintomas da deficiência ocorrem nas folhas jovens (LONERAGAN et al., 1980). No entanto, a mobilidade do Cu pode variar com o estado nutricional das plantas, e em plantas melhor nutridas o Cu pode ser mobilizado.

A cultura cafeeira se instala em diferentes regiões do país, com diferenças marcantes de fertilidade do solo e manejo, o que resulta em lavouras com situações nutricionais distintas, e por vezes com desequilíbrios acentuados no teor de



micronutrientes, incluindo o Cu (MARTINEZ et al., 2003). Pouco se sabe a respeito das alterações anatômicas e ultraestruturais causadas por doses inadequadas de Cu em cafeeiros.

Neste estudo, cafeeiros (*Coffea arabica* L.) foram cultivados em sistema hidropônico sob diferentes doses de Cu, e avaliados os aspectos morfoanatômicos, ultraestruturais e o teor de nutrientes dos órgãos vegetativos. O objetivo foi estabelecer a relação entre os sintomas morfológicos, anatômicos e ultraestruturais associados à deficiência e ao excesso de Cu em cafeeiros, e a mobilidade de Cu nos órgãos vegetativos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Sistema de cultivo e condução do experimento**

O experimento foi conduzido em sistema hidropônico com uma fase líquida, composta por água e nutrientes, e uma fase gasosa, correspondente ao ar misturado à solução por injeção de ar comprimido. O sistema hidropônico foi montado em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), situada no município de Viçosa (MG), localizada nas coordenadas 20° 45' 14'' S e 42° 52' 55'' O, com altitude média de 648 m.

Sementes de *Coffea arabica* da variedade Catuaí Vermelho IAC 44 foram semeadas sobre folhas de papel Germitest® umedecidas com água (06/09/2013). Após trinta e oito dias da semeadura, as plântulas (com um par de folhas) foram transplantadas para bandejas plásticas com capacidade de 50 L com solução nutritiva contendo 6; 0,5; 3,23; 2,25; 1; 1,75 mmol L<sup>-1</sup> de N, P, K, Ca, Mg e S e 80; 12; 25; 1,5; 2; 0,3 µmol L<sup>-1</sup> de Fe, Mn, B, Cu, Zn e Mo, respectivamente (CLEMENTE et al., 2013) com modificações de acordo com as necessidades apresentadas pelas plantas. Durante nove meses, as plantas foram mantidas nessas bandejas plásticas de 50 L, e conforme cresciam aumentava-se o espaçamento entre as plantas, reduzindo o número de plantas por bandeja.

Após nove meses cultivadas em bandejas plásticas de 50 L, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 4 L, mantendo-se a solução nutritiva inicial com modificação apenas da concentração de Cu. As plantas foram submetidas às doses 0 (deficiência), 1,5 (controle), 10 e 40 (excesso) µmol L<sup>-1</sup> Cu por

90 dias. A duração do experimento (90 dias) foi determinada pela expansão completa das folhas que seriam utilizadas para as análises. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por um vaso plástico com uma planta.

A solução nutritiva foi monitorada por meio de aferição do pH, utilizando-se pHmetro digital, mantendo-o entre 5,5 e 6. Adicionalmente, foram utilizadas soluções de correção à base de hidróxido de sódio ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e ácido clorídrico ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ). Para determinar o momento da troca da solução nutritiva, utilizaram-se os valores de condutividade elétrica, obtidos por meio de condutivímetro digital, com depleção de 30% da concentração inicial.

Para a amostragem foram escolhidos os ramos plagiotrópicos, no terço médio das plantas. As folhas foram separadas em folhas jovens (que foram emitidas após o início do experimento) e folhas maduras (que existiam antes do início do experimento, mas se expandiram completamente durante o experimento).

## **2.2 Quantificação do teor de nutrientes na planta**

As amostras de raízes, caule e folhas jovens e maduras foram coletadas aos 90 dias de exposição às doses de B, lavadas em água deionizada e secas em estufa de ventilação forçada de ar a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 72 h. Posteriormente, foram moídas em moinho tipo Wiley, equipado com peneira de 20 mesh, para posterior digestão via úmida nítrico-perclórica em bloco digestor e quantificação dos teores de Cu, Zn, Mn, Fe, Ca e Mg por espectrofotometria de absorção atômica, dos teores de K por espectrofotometria de emissão de chama, dos teores de S por turbidimetria do sulfato e dos teores de P por colorimetria. O B foi determinado colorimetricamente pela Azometina H após incineração do material vegetal em mufla.

Os teores de Cu foram quantificados em raízes, caules e folhas jovens e maduras, enquanto os teores de B, Zn, Mn, Fe, P, K, Ca, Mg e S apenas nas folhas maduras. Para a quantificação dos elementos utilizou-se o método de digestão via úmida nítrico-perclórica em bloco digestor. Foram pesados 0,200 g de material vegetal, acrescentado-se 4 mL de ácido nítrico e 2 mL de ácido perclórico. Ao final, adicionaram-se 23 mL de água deionizada, completando-se o volume para 25 mL. O método de digestão empregado para quantificação de B foi por via seca em forno mufla,

utilizando-se 0,250 g de material vegetal e 10 mL de ácido clorídrico para dissolução do resíduo orgânico. Para realização da leitura, preparou-se uma solução de 6 mL, constituída por 2 mL da solução da digestão seca juntamente com 2 mL de solução tampão e 2 mL de solução de Azometina H (WOLF, 1974).

### **2.3 Processamento das amostras para análise morfoanatômica**

Para avaliar a morfologia das raízes coletaram-se porções terminais das raízes, as quais foram lavadas em água corrente e coradas com violeta cristal (1%).

Para as análises anatômicas em microscopia de luz foram coletados ápices radiculares e porções de raízes próximas ao ápice. Caules e folhas foram coletados do 3º ramo plagiotrópico a partir do ápice. Foram coletados o ápice de caule, porções de caule do 3º entrenó a partir do ápice, além de fragmentos do terço mediano de folhas jovens e folhas maduras, considerando a nervura principal e fragmentos da região mediana da folha (entre a margem e a nervura principal).

Todo material vegetal coletado foi fixado em FAA<sub>50</sub> por 48 h e conservado em álcool 70% (JENSEN, 1962). Posteriormente, o material foi desidratado em série etílica, incluído em metacrilato (Historesin-Leica, Instruments, Heidelberg, Germany), seccionado transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155, Leica, Deerfield, Illinois, USA) com 5 µm de espessura, corado com azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1964 modificado) e montado em resina sintética (Permount, Fisher, Fair Lawn, New Jersey, USA). Em secções de folhas jovens com sintoma macroscópico de deficiência de B (necrose) realizou-se teste histoquímico com Cloreto Férrico 10% para detecção de compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940).

O registro fotográfico das plantas, bem como dos aspectos morfológicos das raízes, foi realizado com câmera fotográfica digital (SONY DSC-WX80). Os registros anatômicos foram obtidos com câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRx, Göttinger, Germany) acoplada a microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) e computador com o programa de captura de imagens Axion Vision.

Foram avaliadas alterações qualitativas, como degradação de células, hipertrofia e hiperplasia celular, entre outras características. Já as alterações quantitativas foram avaliadas por meio de análises micromorfométricas com o programa

computacional Image Pro-Plus 4.5. Foram realizadas medidas lineares (distância, a partir do ápice, de inserção das raízes laterais; distância, a partir do ápice, de elementos de vaso já diferenciados em raízes; espessura da região cortical de raízes; diâmetro das células da região cortical das raízes; espessura da epiderme das faces adaxial e abaxial da folha, dos parênquimas paliçádico e lacunoso e espessura total da folha) e medidas de contagem (número de camadas de células da região cortical das raízes, número de camadas da faixa cambial em caules, densidade de estômatos/mm<sup>2</sup> na epiderme da face abaxial da folha) em secções transversal e longitudinal de raízes, caules e folhas, realizando 10 medições por repetição.

A análise anatômica de secções transversais de raízes de cafeeiros submetidos às doses de B foi realizada por meio da padronização de raízes em estágio semelhante de maturação do xilema e com o mesmo número de polos de protoxilema.

### **2.3 Processamento das amostras para análise ultraestrutural**

Para a avaliação ultraestrutural em microscopia eletrônica de transmissão foram utilizados fragmentos do terço mediano das folhas, os quais foram fixados em glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2%, pré-contrastados com acetato de uranila 0,5% por 12 h, desidratados em série de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%, por 10 minutos cada) e embebidos em resina Spurr (SPURR, 1969). Seções ultrafinas, com 60 e 90 nm, foram obtidas em ultramicrotomo MT2-B (Du Pont-Sorval) com lâminas de vidro. As seções ultrafinas foram coletadas com grids de cobre e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963), para observação e obtenção de imagens no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss, EM 109, a 80 kV.

### **2.4 Análise estatística**

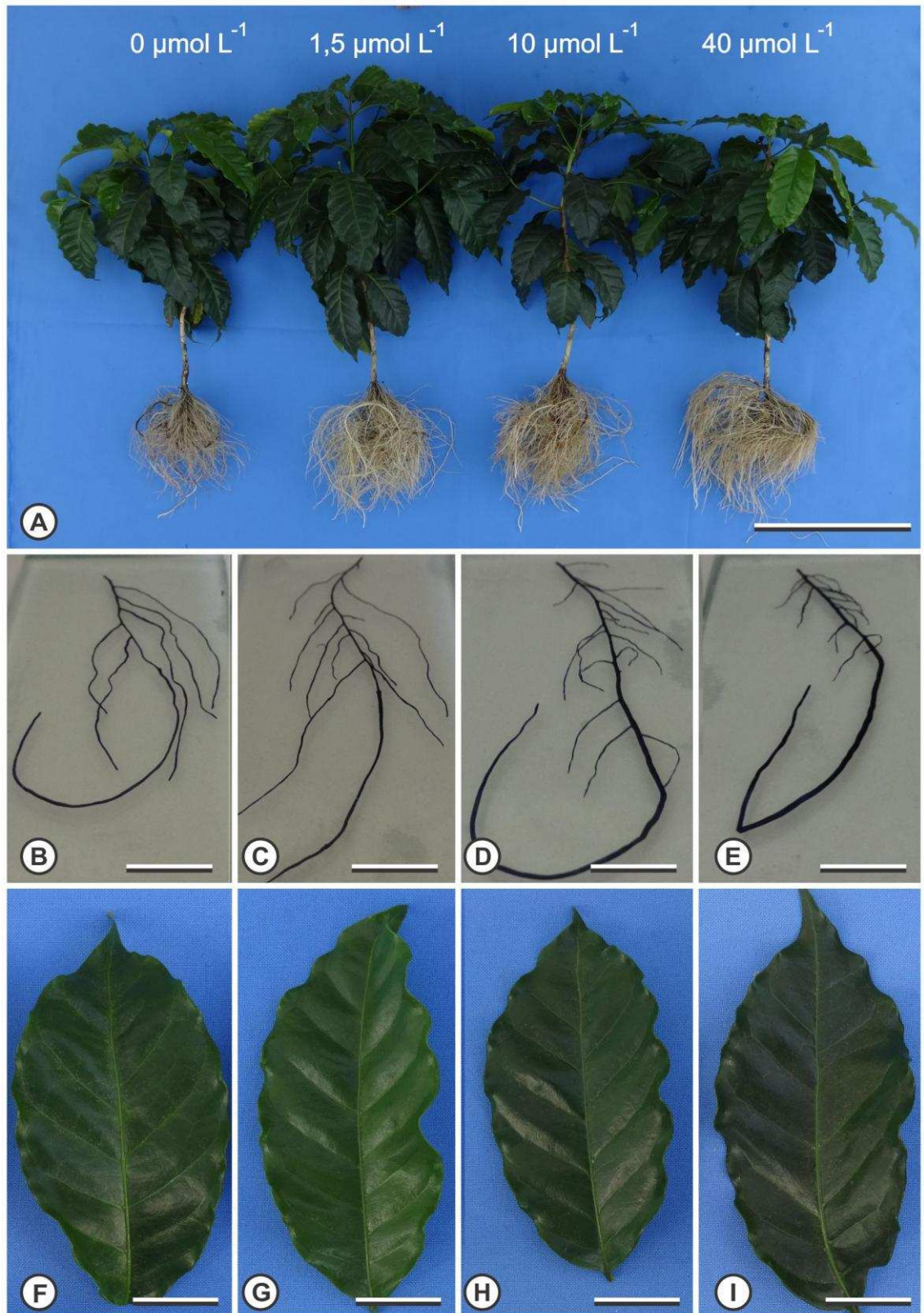
Os dados micromorfométricos foram analisados por meio de análise estatística descritiva, utilizando-se média  $\pm$  desvio padrão. Os dados de teor de nutrientes foram submetidos à análise de regressão. Os modelos foram escolhidos com base na significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se o teste de Student, adotando-se o nível de 5%, no coeficiente de determinação ( $R^2$ :

S.Q.Regressão/S.Q.Tratamento) e no comportamento do fenômeno. Os dados foram analisados utilizando-se o software estatístico SAEG.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Sintomas macroscópicos em relação às doses de Cu**

Houve uma tênue diferença no desenvolvimento de raízes de cafeeiros sob as diferentes doses de Cu (Fig. 1). As raízes de cafeeiros submetidos a  $0 \mu\text{mol L}^{-1}$  Cu apresentaram menor desenvolvimento, quando comparadas às raízes dos demais tratamentos (Fig. 1A). Entretanto, o padrão de emissão de raízes laterais foi semelhante entre os tratamentos (Fig. 1B-E; Tabela 1). Além disto, também não houve alteração macroscópica conspícua na parte aérea das plantas. As folhas completamente expandidas apresentaram características morfológicas semelhantes entre os diferentes tratamentos (Fig. 1F-I).



**Fig. 1.** Aspecto geral de cafeeiros após 90 dias de cultivo sob doses de Cu aos 90 dias de cultivo. 0 (B e F), 1,5 (C e G), 10 (D e H) e 40 (E e I)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Cu. (A) Plantas inteiras; (B-E) Padrão de emissão de raízes laterais; (F-I) Folhas completamente expandidas. Barra = 25 cm (A); 1 cm (B-E); 2,5 cm (F-I).

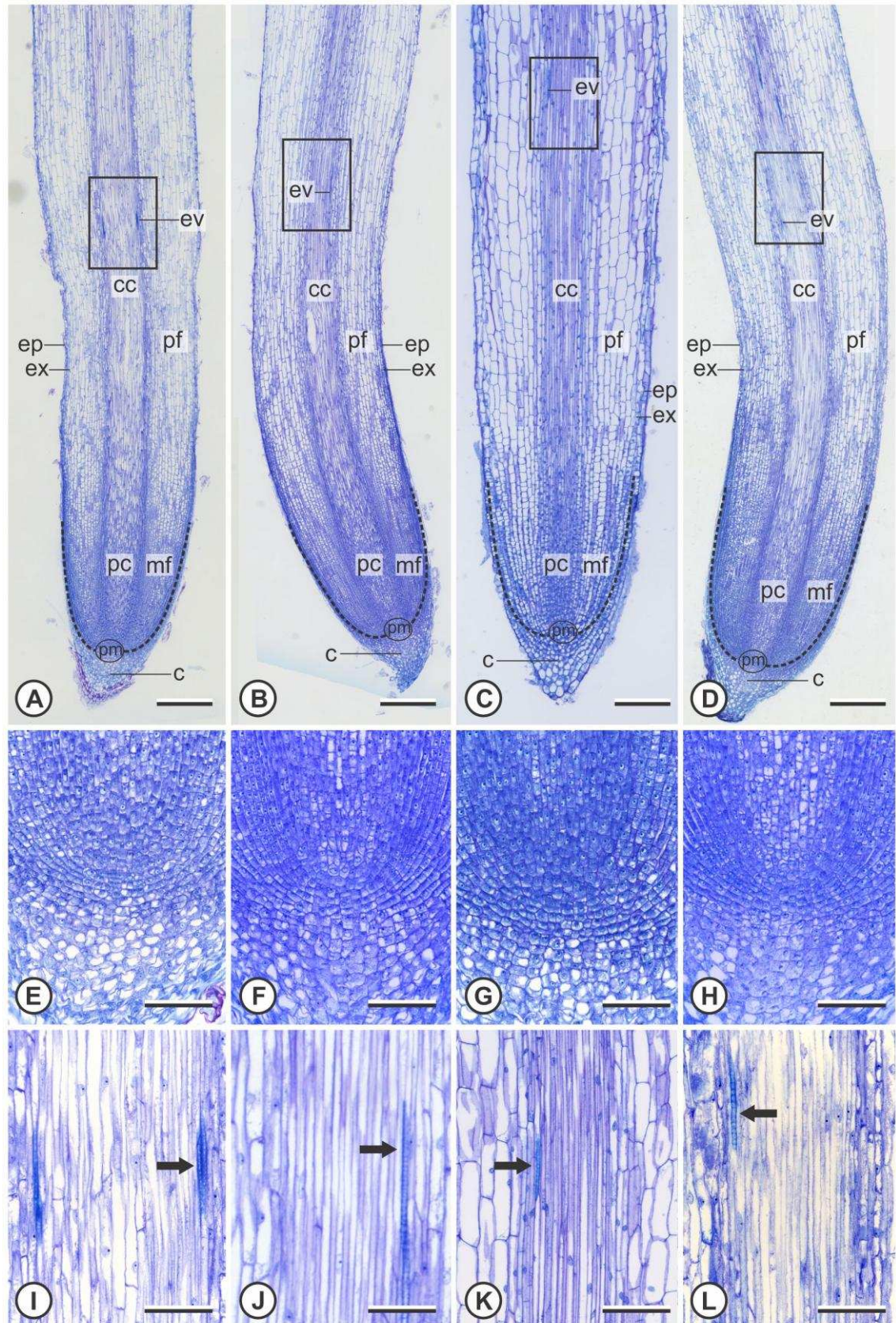
**Tabela 1.** Distância de inserção, a partir do ápice, das raízes laterais de cafeeiros submetidos a doses de Cu. Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão.

Dose	Distância ( $\mu\text{m}$ )
0	$4,28 \pm 0,33$
1,5	$3,75 \pm 0,73$
10	$4,50 \pm 0,74$
40	$3,23 \pm 1,09$

### 3.2 Análise anatômica

Independentemente da dose de Cu na solução nutritiva, os ápices radiculares apresentaram estrutura anatômica semelhante. Coifa, região de promeristema, de meristemas primários, de alongamento e de diferenciação apresentam a mesma estrutura básica. (Fig. 2). A distância entre os primeiros elementos vasculares e a região do promeristema também se manteve constante entre os tratamentos (Tabela 2).

Nas regiões já diferenciadas das raízes, a estrutura e a organização da epiderme, da região cortical e do cilindro vascular, nas diferentes doses de Cu, não apresentou diferenças conspícuas (Fig. 3). A espessura da região cortical (número de camadas de células e diâmetro radial das células) (Tabela 3) apresentou diferenças muito discretas entre os tratamentos que podem ser desconsideradas pelos altos valores de desvio padrão.



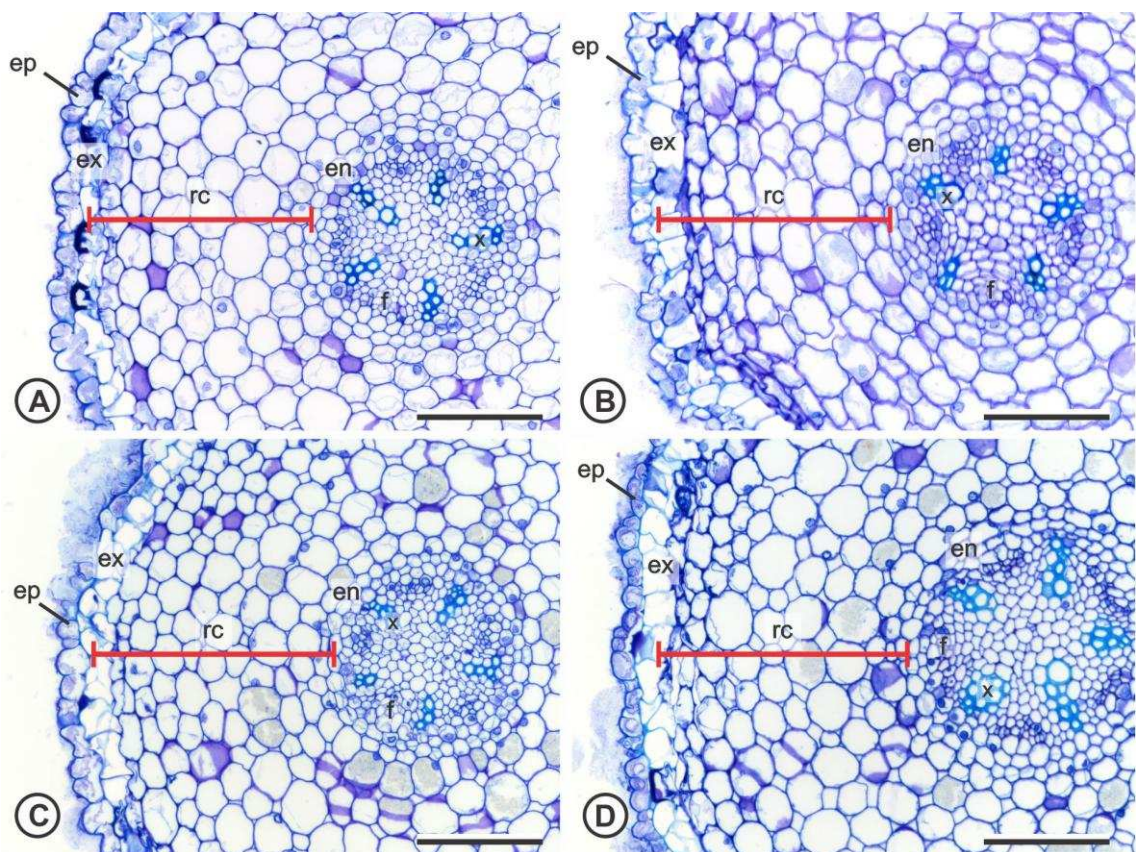
**Fig. 2.** Ápices radiculares de cafeeiros sob doses de Cu, aos 90 dias de cultivo (fotomicrografias de secções longitudinais). 0 (A, E, I), 1,5 (B, F, J), 10 (C, G, K) e 40 (D, H, L)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Cu. Notar



semelhança nas características celulares e tissulares das raízes de cafeeiros submetidos às diferentes doses de Cu, e ausência de alterações anatômicas qualitativas e quantitativas. Retângulos pretos indicam região de diferenciação de elementos de vaso. Setas indicam elementos de vaso. Cilindro central (cc), coifa (c), elementos de vaso (ev), endoderme (en), epiderme (ep), exoderme (ex), meristema fundamental (mf), parênquima fundamental (pf), procâmbio (pc), promeristema (pm), protoderme (linha tracejada). Barra = 400  $\mu\text{m}$  (A-D); 100  $\mu\text{m}$  (E-L).

**Tabela 2.** Distância, a partir do ápice, de elementos de vaso diferenciados em raízes de cafeeiros submetidos a doses de Cu. Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão.

Dose	Distância ( $\mu\text{m}$ )
0	2925,0 $\pm$ 106,1
1,5	3166,7 $\pm$ 862,2
10	2900,0 $\pm$ 1135,8
40	3300,0 $\pm$ 848,5

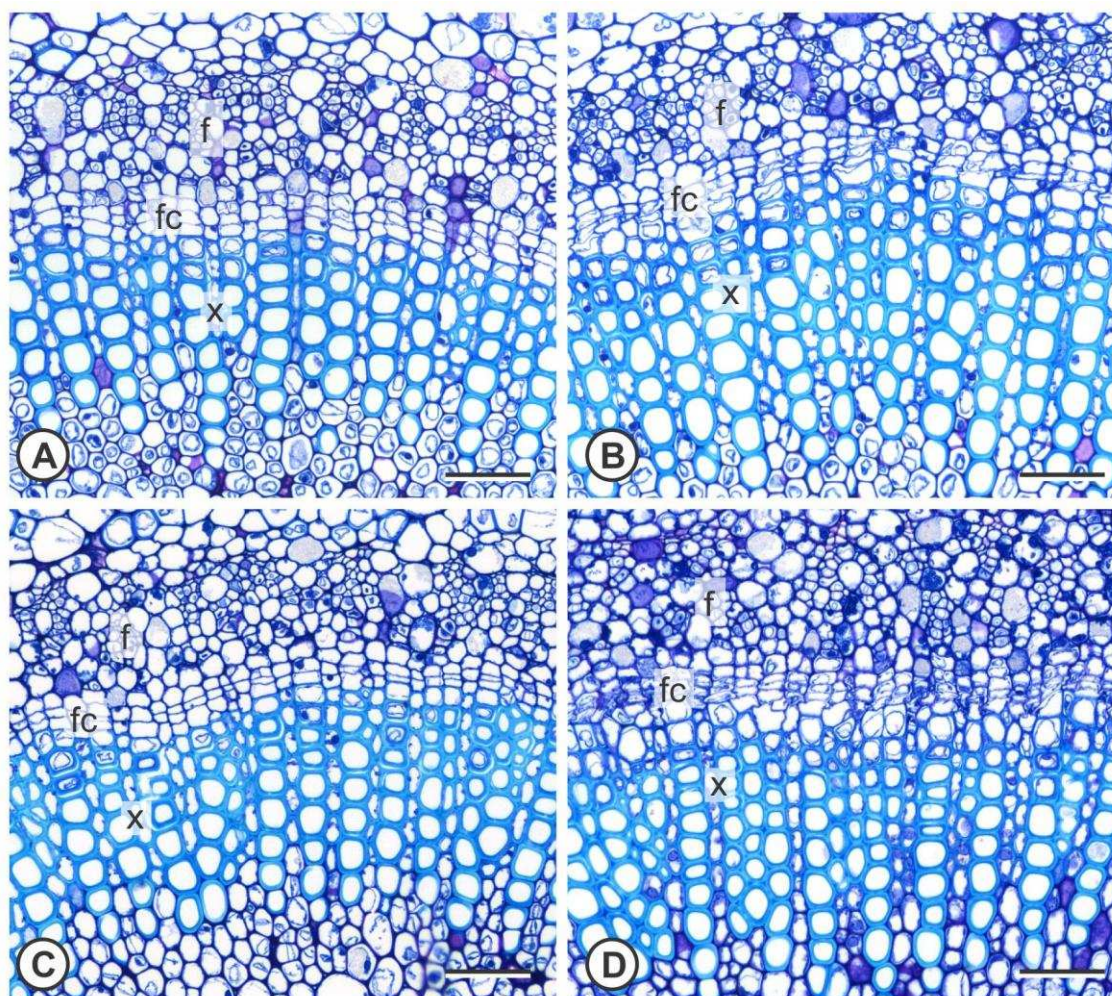


**Fig. 3.** Raízes de cafeeiros sob doses de Cu, aos 90 dias de cultivo (fotomicrografias de secções transversais). 0 (A), 1,5 (B), 10 (C) e 40 (D)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Cu. Endoderme (en), epiderme (ep), exoderme (ex), floema (f), região cortical (rc), xilema (x). Barra = 100  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 3.** Espessura, número de camadas de células e tamanho de células da região cortical de raízes de cafeeiros submetidos a doses de Cu. Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão.

Dose	Espessura ( $\mu\text{m}$ )	Número de camada de células (und)	Diâmetro das células ( $\mu\text{m}$ )
0	171,87 $\pm$ 35,90	9,00 $\pm$ 0,8	0,053 $\pm$ 0,009
1,5	190,63 $\pm$ 27,72	10,00 $\pm$ 1,4	0,053 $\pm$ 0,010
10	178,13 $\pm$ 11,97	9,75 $\pm$ 0,5	0,054 $\pm$ 0,005
40	175,00 $\pm$ 36,80	10,25 $\pm$ 0,9	0,059 $\pm$ 0,015

A avaliação qualitativa e a avaliação quantitativa não indicaram alterações expressivas na estrutura de células e tecidos da região caulinar (Fig. 4). O número de células cambiais (iniciais cambiais) do caule, que poderiam indicar alguma alteração no padrão de desenvolvimento da planta, também se manteve constante sob as diferentes doses de Cu (Tabela 4).



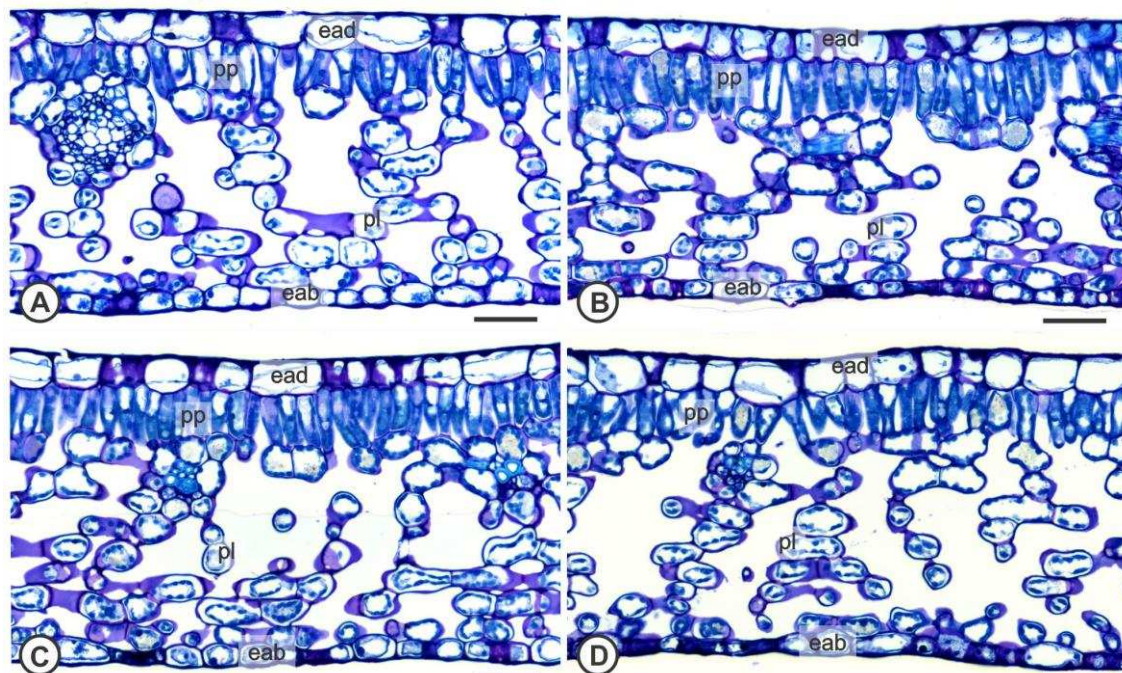
**Fig. 4.** Caule de cafeeiros submetidos às doses de Cu, aos 90 dias de cultivo (fotomicrografias de secções

transversais). 0 (A), 1,5 (B), 10 (C) e 40 (D)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B. Faixa cambial (fc), floema (f), xilema (x). Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 4.** Número de camadas de células da faixa cambial em caules de cafeeiros submetidos a doses de Cu. Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão.

Dose	Camadas de células da faixa cambial (und)
0	2,0
1,5	2,0
10	2,0
40	2,0

As doses de Cu também não influenciaram a estrutura geral de células e tecidos de folhas maduras (Fig. 5), mesmo sob o aspecto quantitativo (Tabela 5). Ocorrem apenas pequenas diferenças na proporção de células e tecidos foliares em relação às doses de Cu, mas que podem ser desconsideradas pelos altos valores do desvio padrão.



**Fig. 5.** Folhas de cafeeiros submetidos às doses de Cu aos 90 dias de cultivo (fotomicrografias de secções transversais). 0 (A), 1,5 (B), 10 (C) e 40 (D)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B. Epiderme da face adaxial (ead) e abaxial (eab) da folha, parênquima lacunoso (pl), parênquima paliçádico (pp). Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 5.** Espessura da epiderme da face adaxial (EAD) e abaxial (EAB) da folha, espessura do parênquima paliádico (PP) e lacunoso (PL), espessura total da folha (ETF) e densidade estomática (EST) em folhas de cafeeiros submetidos a doses de Cu. Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão.

Dose	EAD ( $\mu\text{m}$ )	EAB ( $\mu\text{m}$ )	PP ( $\mu\text{m}$ )	PL ( $\mu\text{m}$ )	ETF ( $\mu\text{m}$ )	EST (n° est / mm <sup>2</sup> )
0	27,29 $\pm$ 3,02	18,48 $\pm$ 1,36	37,33 $\pm$ 3,73	162,32 $\pm$ 5,38	235,01 $\pm$ 9,55	229,2 $\pm$ 20,8
1,5	23,95 $\pm$ 1,52	15,56 $\pm$ 1,01	39,07 $\pm$ 5,04	152,02 $\pm$ 13,46	227,94 $\pm$ 11,37	263,1 $\pm$ 24,0
10	23,85 $\pm$ 0,62	16,69 $\pm$ 1,29	41,42 $\pm$ 2,67	164,73 $\pm$ 17,08	243,41 $\pm$ 23,10	244,1 $\pm$ 13,8
40	25,45 $\pm$ 2,17	16,30 $\pm$ 1,33	41,85 $\pm$ 3,33	154,26 $\pm$ 8,43	234,98 $\pm$ 8,94	209,8 $\pm$ 26,3

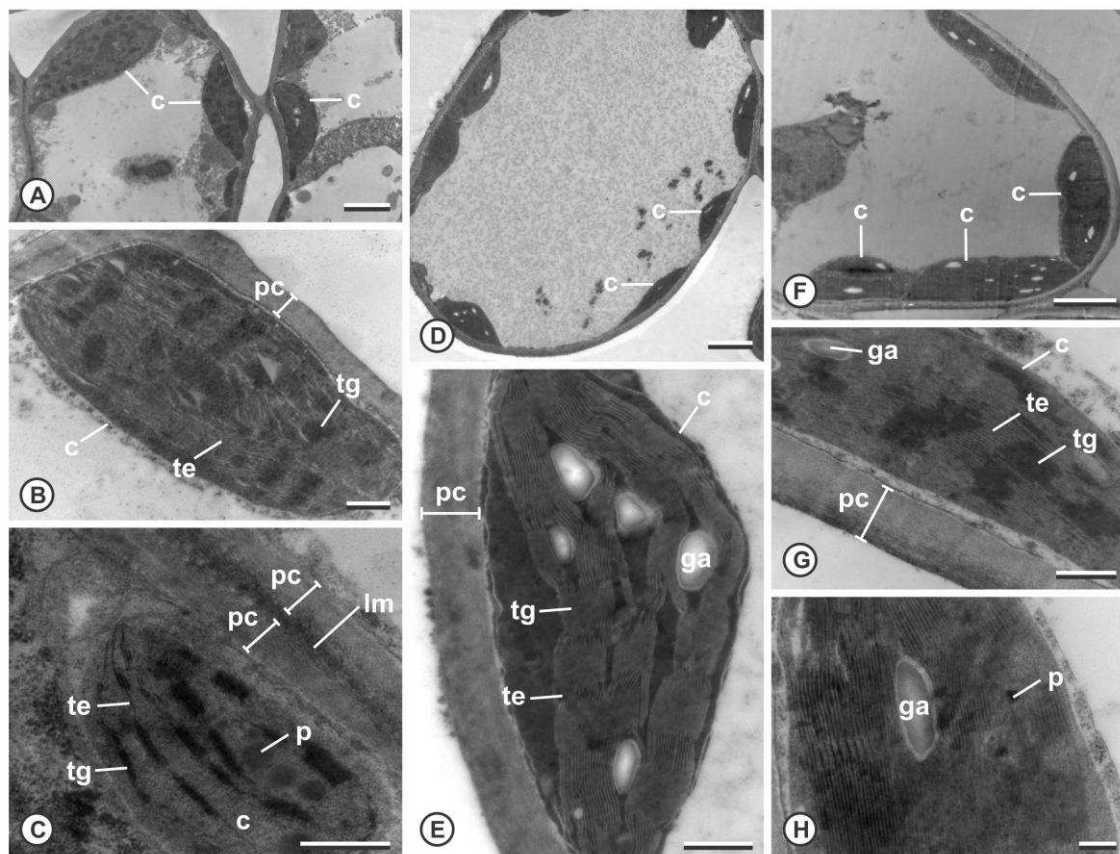
### 3.3 Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica

A alteração ultraestrutural mais evidente no mesofilo de folhas maduras de cafeeiros submetidos às doses de Cu (Fig. 6) ocorreu nos cloroplastos, principalmente sob deficiência de Cu (0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Cu) (Fig. 6A-C). Em folhas de cafeeiros sob deficiência de Cu, os cloroplastos apresentaram tilacoides pouco definidos e mais eletrondensos na região granal (Fig. 6A-B). Plastoglóbulos pouco eletrondensos (Fig. 6C) e pequena quantidade de grãos de amido primário foram encontrados no estroma desses cloroplastos (Fig. 6A-C).

Nas folhas de plantas submetidas à dose de Cu considerada ideal (1,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Cu), os cloroplastos apresentaram tilacoides bem definidos e empilhados, compondo uma região granal extensa ao longo do plastídio. Nesses cloroplastos, os grãos de amido primário eram volumosos e numerosos (Fig. 6D-E).

Sob excesso de Cu (40  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Cu), os cloroplastos também apresentaram alterações na estrutura do granum, com presença de material eletrondenso entre os tilacoides (Fig. 6F-H).

O núcleo e as demais organelas, como as mitocôndrias, retículo endoplasmático e dictiossomos, entre outras, não apresentaram alterações conspícuas com a aplicação dos tratamentos.



**Fig. 6.** Detalhes de células de folhas maduras de cafeeiros submetidos às doses de Cu, aos 90 dias de cultivo (eletromicrografias de secções transversais). 0 (A, B e C), 1,5 (D e E) e 40 (F, G e H)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Cu. Cloroplastos (c), grão de amido (ga), lamela média (lm), mitocôndrias (m), parede celular (pc), plastoglóbulos (p), tilacoides do estroma (te) e tilacoides do granum (tg). Barra = 2,5  $\mu\text{m}$  (A, D e F); 500 nm (B, C, E e G); 200 nm (H).

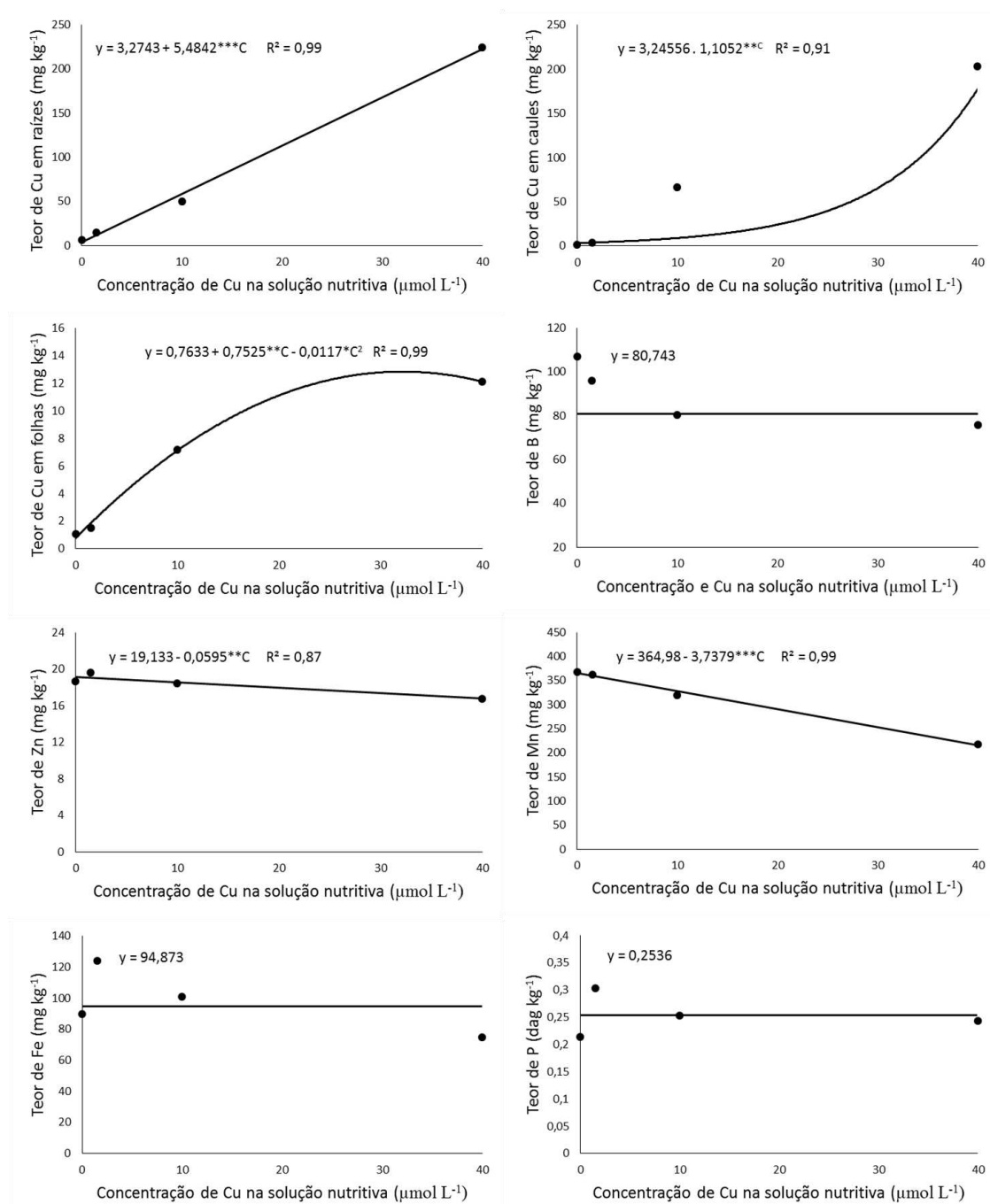
### 3.4 Teor de nutrientes na planta

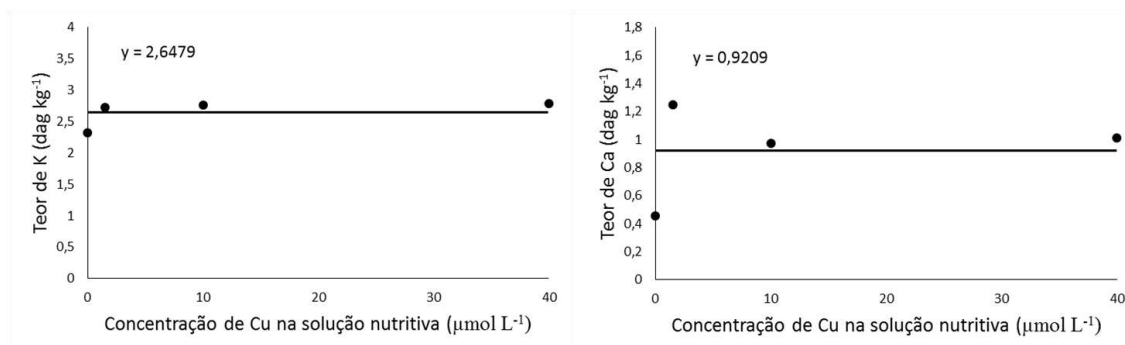
O teor de Cu em raízes, caules e folhas foi significativamente influenciado pela concentração do elemento em solução nutritiva, apresentando ajustes linear positivo e quadrático (Fig. 7). Houve maior concentração de Cu nas raízes, quando comparado ao caule e às folhas (Fig. 7). Além disso, o teor de Cu foi maior em folhas mais jovens do que em folhas mais velhas (Fig. 8).

Os teores de Zn, de Mn (micronutrientes) e de S (macronutriente) apresentaram efeito das doses de Cu em solução nutritiva. Os maiores teores de Zn, Mn e S ocorreram em folhas de cafeeiros sob deficiência de Cu ( $0 \mu\text{mol L}^{-1}$  Cu), enquanto menores teores desses nutrientes ocorreram em folhas de cafeeiros sob excesso de Cu ( $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  Cu). Por outro lado, o B e o Fe (micronutrientes) e o P, o K, o Ca e o Mg

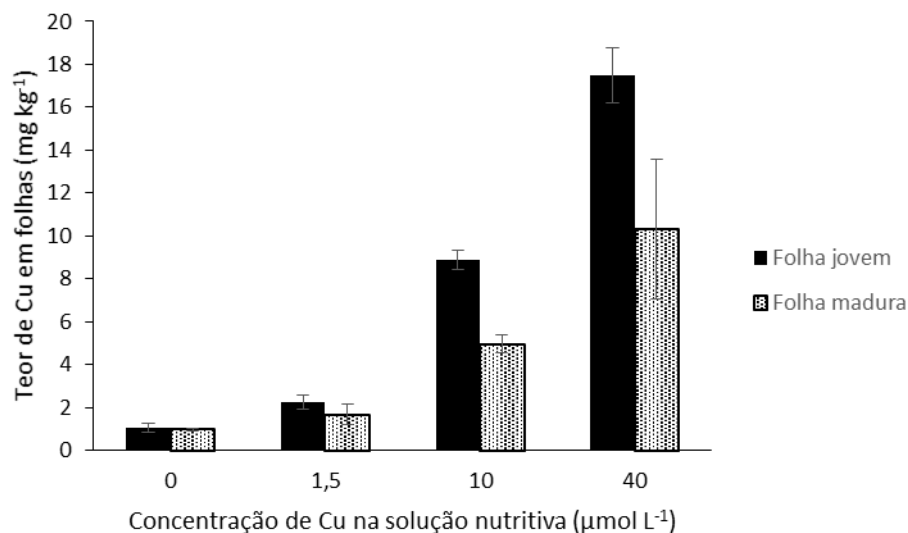
(macronutrientes) não sofreram interferência significativa das doses de Cu em solução nutritiva (Fig. 7).

Sendo assim, a deficiência de Cu favoreceu o aumento dos teores de Zn, Mn e S em folhas de cafeeiros. Por outro lado, o B e o Fe (micronutrientes) e o P, o K, o Ca e o Mg (macronutrientes) não sofreram interferência significativa das doses de Cu em solução nutritiva (Fig. 7).





**Fig. 7.** Equações de regressão ajustadas do teor de Cu (C) em raízes, caules e folhas e do teor de macronutrientes (P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (B, Zn, Mn e Fe) em folhas em função da concentração de Cu na solução nutritiva, com os respectivos coeficientes de determinação. Os símbolos “\*” e “\*\*” indicam valores significativos a 5% e 1% de probabilidade pelo teste “t”, respectivamente.



**Fig. 8.** Teor de Cu em folhas jovens e maduras de cafeeiros submetidos a doses de Cu. Os valores são médias  $\pm$  desvio padrão.

#### 4. DISCUSSÃO

O Cu é um micronutriente essencial e atua como constituinte ou ativador de enzimas, relacionando-se a processos como fotossíntese, respiração, metabolismo do N e do C, e proteção contra o estresse oxidativo (YRUELA, 2005; MARSCHNER, 2012). Portanto, alterações no teor de Cu levariam a desordens nesses processos e à manifestação de sintomas ultraestruturais, anatômicos e, finalmente, morfológicos

ou macroscópicos. Porém, as alterações morfoanatômicas que ocorreram em cafeeiros cultivados sob deficiência ( $0 \mu\text{mol L}^{-1} \text{Cu}$ ) e excesso ( $40 \mu\text{mol L}^{-1} \text{Cu}$ ) de Cu na solução nutritiva não foram acentuadas. Apenas algumas alterações ultraestruturais foram verificadas em células do mesofilo foliar, além de variação no teor de nutrientes, sob condições de deficiência e excesso de Cu.

Os sintomas macroscópicos característicos da deficiência de Cu na parte aérea, como deformação, clorose e necrose de folhas (YRUELA, 2005), não ocorreram nos cafeeiros. Por outro lado, as alterações morfológicas de raízes, também atribuídas à deficiência de Cu (YRUELA, 2005), ocorreram em cafeeiros como uma discreta redução do desenvolvimento do sistema radicular, mas sem nenhuma alteração prévia e perceptível na anatomia das raízes. Porém, as alterações que ocorreram na ultraestrutura dos cloroplastos dos cafeeiros, como alteração nos tilacoides e aumento do número de plastoglóbulos, merecem destaque. Essas alterações, inevitavelmente, se relacionam com a fotossíntese e, portanto, são precursoras de uma cascata de eventos que levariam às alterações anatômicas e morfológicas típicas da parte aérea.

Os sintomas mais característicos do excesso de Cu na parte aérea são inibição do crescimento, redução da biomassa, ocorrência de áreas cloróticas, degradação de tilacoides e aumento do número e tamanho de plastoglóbulos dos cloroplastos, entre outros (YRUELA, 2005). Assim como na condição de deficiência de Cu, o excesso desse nutriente não causou alterações anatômicas e morfológicas conspícuas em cafeeiros, mas sim alterações ultraestruturais nos cloroplastos, que poderiam desencadear os demais sintomas. Portanto, as alterações ultraestruturais dos cloroplastos de cafeeiros submetidos à deficiência e ao excesso de Cu são muito relevantes, tanto por se relacionarem à depreciação do processo fotossintético, mas também por apontarem a origem dos danos, ou seja, a ação direta do Cu no aparelho fotossintético. Considerando outras culturas economicamente importantes, verifica-se que o excesso de Cu causa redução na taxa fotossintética líquida (LIDON et al., 1993), redução da produção e inibição do crescimento em arroz (XU et al., 2006), inibição no crescimento de raízes em soja (LIN; CHEN; LIU, 2005), e redução da produção de folhas e raízes em milho (MOCQUOT et al., 1996).

As raízes são consideradas sítios de acúmulo de Cu em condições de excesso do nutriente no meio externo (MARSCHNER, 2012) e, em cafeeiros, o



acúmulo de Cu nas raízes ocorreu em concentrações muito acima do intervalo considerado tóxico para as plantas (20-30 mg kg<sup>-1</sup> Cu; MARSCHNER, 2012). Devido ao acúmulo na raiz, o Cu poderia ser pouco translocado para a parte aérea, e ter evitado o aparecimento de sintomas mais intensos de toxidez durante o período experimental. O maior acúmulo de Cu em raízes, comparado às folhas, também é relatado em *Zea mays* após 60 dias de exposição aos tratamentos, porém, a toxidez de Cu resultou em alterações morfológicas, fisiológicas e ultraestruturais das raízes (OUZOUNIDOU et al., 1995). Apesar disso, nos cafeeiros submetidos ao excesso de Cu, não ocorreu inibição do crescimento das raízes ou outra alteração aparente.

Ocorreu alteração dos teores de Zn, Mn e S nas folhas de cafeeiros submetidos a diferentes doses de Cu, com efeito antagônico em relação ao Zn e ao Mn. O Zn e o Cu podem competir pelo mesmo transportador da membrana celular (BOWEN, 1969), o que justificaria a relação antagônica entre esses nutrientes observada em cafeeiros. A ação antagônica (KABATA-PENDIAS, 2010) e a ação sinérgica (BARKER; PILBEAM, 2007) entre Cu e Mn já foram descritas. Em cafeeiros, o aumento da concentração de Cu na solução nutritiva levou à redução do teor de Mn nas plantas, portanto, estabelecendo relação antagônica entre esses nutrientes. Apenas pequenas concentrações de Cu favoreceram a absorção do S, enquanto concentrações um pouco mais elevadas de Cu desfavoreceram a absorção do S. De qualquer forma, a relação entre Cu e S ainda é pouco entendida. Apesar das condições experimentais impostas, o estado nutricional dos cafeeiros foi satisfatório em todos os tratamentos, com teores próximos aos das faixas críticas descritas para cafeeiros (MARTINEZ et al., 2003).

O Cu é considerado pouco móvel na planta e, em condições de deficiência, os sintomas aparecem primeiro nas folhas jovens e, só posteriormente, ocorrem nas folhas mais velhas, que permanecem saudáveis e com concentrações de Cu relativamente altas por mais tempo (LONERAGAN et al., 1980). Surpreendentemente, as folhas mais jovens dos cafeeiros apresentaram concentrações de Cu superiores às folhas maduras, sob as diferentes doses de Cu. Esse fato indica a possibilidade de alguma forma de translocação de Cu na planta, e o retardo do aparecimento de sintomas nas folhas mais jovens.

Durante o período experimental de 90 dias, sintomas mais evidentes da deficiência e do excesso de Cu em cafeeiros não foram observados, porém, em experimentos com outras espécies, como *Ocimum vulgare* (PANOU-FILATHEOU et al., 2001) e *Zea mays* (OUZOUNIDOU et al., 1995), ocorreram sintomas característicos da toxidez ou da deficiência em períodos bem mais curtos. Deve-se considerar, também, que as exigências nutricionais e o potencial de acúmulo de Cu nos diferentes órgãos antes e depois da aplicação dos tratamentos, provavelmente, variam entre espécies. Por outro lado, os 90 dias de condução do experimento com cafeeiros submetidos a diferentes doses de Cu já permitiram a observação de diversos eventos relacionados à dinâmica de acúmulo e translocação do nutriente na planta, além das primeiras alterações ultraestruturais. Portanto, a prolongação do período experimental, provavelmente, possibilitaria a observação de sintomas mais conspícuos, mas pouca informação seria acrescentada no aspecto da dinâmica do Cu na planta.

## **5. CONCLUSÃO**

A alteração dos cloroplastos é o principal sintoma ultraestrutural da deficiência ou do excesso de Cu em folhas de cafeeiros, o que reforça a importância desse nutriente no processo fotossintético. Porém, o atraso no surgimento de sintomas morfoanatômicos da deficiência e do excesso de Cu em cafeeiros pode ser consequência do acúmulo deste nutriente na planta, antes da instalação do experimento, e da retranslocação das folhas mais velhas para as folhas mais novas em cafeeiros submetidos ao excesso de Cu.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barker AV, Pilbeam DJ. 2007.** *Handbook of Plant Nutrition*. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis Group.
- Bowen JE. 1969.** Absorption of copper, zinc, and manganese by sugarcane leaf tissue. *Plant Physiology* **44**: 255-261.
- Jensen WA. 1962.** *Botanical Histochemistry: Principles and Practice*. San Francisco: W.H. Freeman.
- Kabata-Pendias A. 2010.** *Trace Elements in Soil and Plants*. 4th edn. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Lidon FC, Ramalho JC, Henriques FS. 1993.** Copper inhibition of rice photosynthesis. *Journal of Plant Physiology* **142**: 12-17.
- Lin CC, Chen LM, Liu ZH. 2005.** Rapid effect of copper on lignin biosynthesis in soybean roots. *Plant Science* **168**: 855-861.
- Loneragan JF, Snowball K, Robson AD. 1980.** Copper supply in relation to content and redistribution of copper among organs of the wheat plant. *Annals of Botany* **45**: 621-632.
- Malavolta E, Haag HP, Johnson M. 1961.** Estudos sobre a alimentação mineral do cafeeiro. VI Efeitos das deficiências de micronutrientes em *Coffea arabica* L. var. Mundo Novo cultivado e m solução nutritiva. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz* **18**: 147-167.
- Marschner H. 2012.** *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3th edn. London: Academic Press.
- Martínez HEP, Menezes JFS, Souza RB, Venegas VHA, Guimarães PTG. 2003.** Faixas críticas de concentrações de nutrientes e avaliação do estado nutricional de cafeeiros em quatro regiões de Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **38**: 703-713.
- Ouzounidou G, Čiamporová M, Moustakas M, Karataglis S. 1995.** Responses of maize (*Zea mays* L.) plants to copper stress -- I. growth, mineral content and ultrastructure of roots. *Environmental and Experimental Botany* **35**: 167-176.
- Panou-Filatheou H, Bosabalidis AM, Karaglis S. 2001.** Effects of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). *Annals of Botany* **88**: 207-214.

**Reynolds ES. 1963.** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electronmicroscopy. *Journal of Cell Biology* **17**: 208-212.

**Sonmez S, Kaplan M, Sonmez NK, Kaya H, Uz I. 2006.** High level of copper application to soil and leaves reduce the growth and yield of tomato plants. *Scientia Agricola* **63**: 213-218.

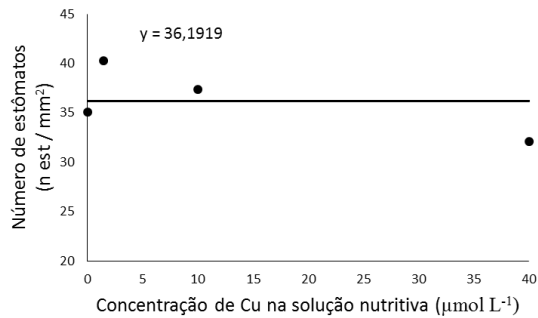
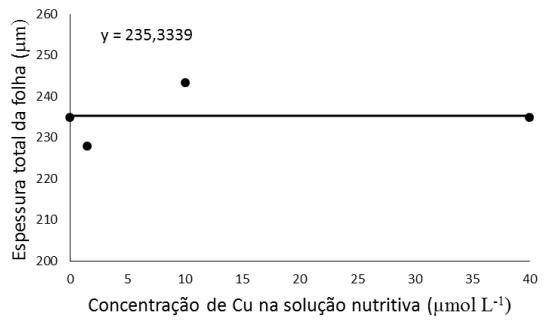
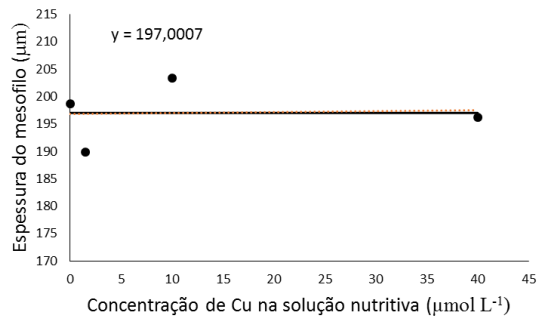
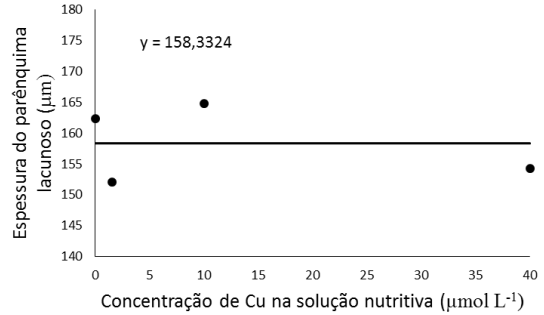
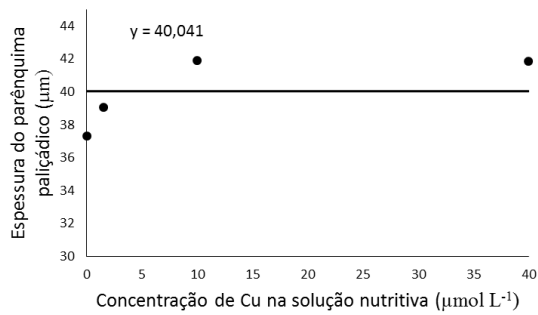
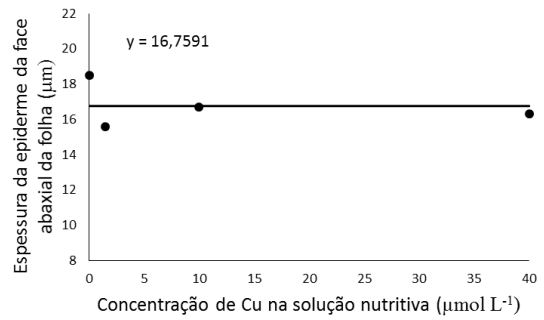
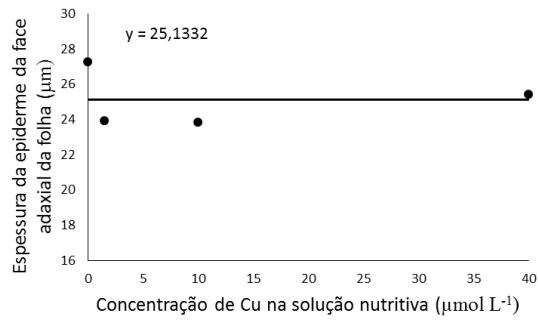
**Spurr AR. 1969.** A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* **26**: 31-43.

**Wolf B. 1974.** Improvements in the azomethine-H method for determination of boron. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **5**: 39-44.

**Xu J, Yang L, Wang Z, Dong G, Huang J, Wang Y. 2006.** Toxicity of copper on rice growth and accumulation of copper in rice grain in copper contaminated soil. *Chemosphere* **62**: 602-607.

**Yruela I. 2005.** Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**: 145-156.

## ANEXO A



Equações de regressão ajustadas da espessura da epiderme da face adaxial e abaxial da folha, espessura do parênquima paliçádico e lacunoso, espessura do mesofilo, espessura total da folha e número de estômatos em folhas de cafeeiros submetidos a doses de Cu, com os respectivos coeficientes de determinação.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa se propôs, como objetivo geral, avaliar e interpretar as possíveis alterações morfoanatômicas e ultraestruturais em folhas, caules e raízes de cafeeiros (*C. arabica* L.) em estágio vegetativo submetidos à deficiência e ao excesso de B e Cu, em sistema hidropônico, e o estado nutricional das plantas nessas condições. Com a metodologia empregada foi possível alcançar resultados capazes de responder às questões levantadas anteriormente à execução dos experimentos:

- Quais alterações morfoanatômicas e ultraestruturais qualitativas e, ou quantitativas ocorrem em raízes, caules e folhas de cafeeiro submetidos à deficiência e ao excesso de B e Cu?
- Qual a sequência e o significado fisiológico dessas alterações em plantas submetidas à deficiência e ao excesso de B e Cu?
- O que é mais prejudicial para o cafeeiro, a deficiência ou o excesso de B e Cu?

Análises complementares poderiam esclarecer ainda mais os efeitos da deficiência e do excesso de B sobre as características morfoanatômicas e ultraestruturais de cafeeiros. Dentre elas, citam-se:

- Analisar ultraestruturalmente os meristemas apicais de caule e primórdios foliares para observar o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático em diferentes situações, pois são esses conjuntos de organelas que estão relacionados com a síntese da pectina;
- Analisar alterações ultraestruturais no floema da região da nervura principal para descobrir se o transporte é dificultado ou favorecido na deficiência de B;
- Analisar alterações ultraestruturais no ápice radicular para observar o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático em diferentes situações.