

Metodologia para determinação da zona de abscisão foliar em pomáceas

Methodology to determine abscission zone in apple trees

Geraldine de Andrade Meyer^I Thaysi Ventura de Souza^{II} Rosa Maria Valdebenito Sanhueza^{III}
Andrea De Rossi Rufato^{IV} Leo Rufato^V Marisa Santos^{VI}

RESUMO

Estudos anatômicos e de ontogênese da abscisão foliar em pomáceas são escassos. A queda foliar promovida após formada a zona de abscisão é um processo natural nas pomáceas, e prolonga-se durante o outono, até que ocorram as primeiras geadas no Sul do Brasil. Ainda não se conhece até quando as folhas de macieiras permanecem funcionais. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia que permita estudar o início e o fim das zonas de abscisão foliar de macieiras. O trabalho foi realizado nas cultivares 'Galaxy' e 'Fuji' em pomares comerciais de macieira, de Vacaria, Rio Grande do Sul. O método proposto consistiu em coletar ramos do ano, com 10cm a 20cm de comprimento, e utilizar um segmento contendo uma parte do caule, uma gema axilar e a base do pecíolo, descartando a parte das quatro folhas do ápice. Os segmentos foram fixados, seccionados e corados para a observação da zona de abscisão em microscopia óptica. Os resultados mostraram que a metodologia utilizada permitiu descrever a zona de abscisão em macieiras e que ela é formada por células alongadas com parede celular delgada, apresentando lignificação junto à parede celular. O processo manteve a gema intacta e ocorreu no sentido adaxial para o abaxial. A abscisão foliar natural, em plantas de Galaxy e Fuji em sintomas de doença e em condições ambientais favoráveis, pode ser acompanhada 7 e 14 dias antes e depois da colheita, e após, com intervalos de 14 e 21 dias até maio. A partir de maio, as coletas devem ser feitas semanalmente. Essas informações serão úteis na tomada de decisão para realizar práticas culturais e/ou de controle químico, para a manutenção das folhas saudáveis, resultando no maior acúmulo de reservas de carboidratos e/ou redução do número de aplicações de fungicidas.

Palavras-chave: macieira, queda de folhas, lignificação.

ABSTRACT

Studies about anatomical and ontogeny of leaf abscission in pome fruit trees are scarce. The leaf fall occurs after the abscission zone is promoted, being a natural process in pome fruit, and it lasted from the fall until the first frost in southern Brazil. It is not known yet how long the leaves of apple trees remained functional. The aim of this study was to develop a methodology to study the beginning and the end zones of leaf abscission of Galaxy and Fuji apple trees. The study was conducted in commercial apple orchards in Vacaria, Rio Grande do Sul. The proposed method consisted of collecting branches to 10cm to 20cm in length, and use a segment containing a portion of the stem, an axillary bud and the base of the petiole, discarding the part of the four-leaf apex. The segments were fixed, sectioned and stained for observation of the abscission zone in optical microscopy. The methodology allowed the understanding of the abscission zone on apple trees. The abscission zone was formed by elongated cells with thin walls, presenting cell wall lignification. The process kept the bud intact and occurred from the adaxial to abaxial surface. The natural leaf abscission in Galaxy and Fuji plants without symptoms of disease and favorable environmental conditions, can be accompanied by 7 and 14 days before and after harvest, and after intervals of 14 and 21 days until May. From May, collections should be weekly. This information will be useful in making a decision to carry out cultural practices and / or chemical control, for the maintenance of healthy leaves, resulting in greater accumulation of carbohydrate reserves and / or reducing the number of fungicide applications.

Key words: apple, leaf fall, lignifications.

^IPrograma de Pós-graduação em Produção Vegetal, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), 88520-000, Lages, SC, Brasil. E-mail: ge_meyer@hotmail.com. Autor para correspondência.

^{II}Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil.

^{III}Proterra Engenharia Agrônômica Ltda., Vacaria, RS, Brasil.

^{IV}Embrapa Uva e Vinho, Estação Experimental de Fruticultura de Clima Temperado (EFCT), Vacaria, RS, Brasil.

^VCAV, UDESC, Lages, SC, Brasil.

^{VI}Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

INTRODUÇÃO

Na macieira, cultura de clima temperado, as folhas podem estar presentes em ramos de diferentes idades e esporões (PETRI & LEITE, 2006). As folhas estão presentes da primavera até o outono quando inicia o processo de senescência. Durante a senescência, a zona de abscisão (ZA) é definida como a região da base dos órgãos em que eventualmente ocorre a abscisão (ABS) e, no caso de folhas, normalmente está presente na base do pecíolo (ADDICOTT & LYNCH, 1955). A ABS natural é a consequência do processo de senescência e inclui as funções de separação e proteção. No processo de separação das partes, ocorre a troca de metabólitos das paredes celulares e da estrutura química das pectinas que formam a lamela média (SEXTON, 2001). A função de proteção está relacionada com o processo de cicatrização dos tecidos que permanecem nas plantas, ocorrendo a formação da camada primária e posterior produção de felogênio (BIGGS & NORTHOVER, 1985). Estas camadas conferem o isolamento do sistema vascular, contra a entrada de patógenos a partir da formação de tiloses e caloses (SEXTON & ROBERTS, 1982).

Segundo ADDICOTT & LYNCH (1955), a Abs é controlada por um balanço hormonal entre o etileno (principal responsável pelo início do processo) e a auxina (inibidor da ação do etileno), e também o ácido abscísico (SEXTON & ROBERTS, 1982). A Abs é o resultado final do processo de senescência das folhas, ocorrendo conforme o avanço da idade do órgão. Nesse caso, a senescência é caracterizada pelo amarelecimento das folhas, ocasionado pela degeneração dos cloroplastos e da conversão das demais organelas em proteínas para serem translocadas e armazenadas em outros órgãos (LIM et al., 2007).

O processo de Abs pode ser afetado por fatores ambientais, como frio, calor, estresse hídrico, presença de patógenos, injúrias e nutrição (ADDICOTT & LYNCH, 1955). Geralmente, a senescência do órgão distal precede a Abs, mas quando o processo é induzido rapidamente, a partir de fontes artificiais ou de tecidos doentes, a Abs pode ocorrer quando a senescência ainda está em fase inicial (SEXTON & ROBERTS, 1982).

Segundo PATTERSON (2001), o modelo de Abs está definido em três momentos. No primeiro, ocorre a diferenciação das células, caracterizando a ZA; no segundo, o tecido está pronto para receber a ação de sinais, endógenos e exógenos para ativar o processo de separação, por meio de genes; e, por

fim, sucede a diferenciação da camada de proteção do órgão que sofreu a Abs. Recentemente, ESTORNELL et al. (2013) descreveu o processo considerando a parte fisiológica que consiste na hidrólise das paredes celulares, a partir da expressão de genes que resultam no início do programa de morte celular (início do processo de senescência) e o estabelecimento do sistema de defesa, seja através da formação da camada de proteção e proteínas relacionadas à patogênese.

Nas condições climáticas do Sul do Brasil, a queda de folhas das macieiras pode ocorrer precocemente devido à incidência de fungos (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Marssonina mali*, e *Entomosporium mespi*) (SHARMA et al., 2003; SANHUEZA et al., 2006). Por outro lado, a desfolha natural ocorre muito lentamente durante o outono, requerendo também inúmeras pulverizações com fungicidas para manter as folhas saudáveis, até que todas as folhas tenham caído (SANHUEZA et al., 2006). Este manejo de sucessivas pulverizações de fungicidas tende a diminuir a eficiência dos ingredientes ativos, seleciona populações de fungos resistentes, além de manter por mais tempo a fonte de inóculo.

Estudos dessa natureza poderão servir de base na tomada de decisão em realizar ou parar o controle químico, ou o manejo da desfolha, relacionando a intensidade de doenças e a funcionalidade das folhas. As ações pautadas em bases científicas poderão refletir em maior produção, devido à desfolha no momento em que a perda das folhas não influencia mais no acúmulo de carboidratos. Por fim, poderá haver ganhos para o produtor na redução dos custos e impacto ambiental, por um menor número de pulverizações fungicidas.

O objetivo deste trabalho foi definir uma metodologia para caracterizar e determinar a zona de abscisão em folhas de macieira.

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada foi adaptada da descrita por CLEMENTS & ATKINS (2001) e foram utilizadas macieiras Galaxy (com cinco anos de plantio) e Fuji (com 12 anos de plantio) em Vacaria, Rio Grande do Sul. As coordenadas dos locais foram 28°25'17,9"S e 50°53'39,6"W para a Galaxy, e 28°25'17,8"S e 50°53'38,8"W para a Fuji, ambas em altitude de 930 metros. Foram marcadas quatro plantas homogêneas dispostas aleatoriamente em uma fileira de plantio, para cada cultivar, e delas foram retirados os materiais analisados durante este estudo.

As coletas foram semanais, de 16 de fevereiro a 8 de maio para a Galaxy e de 7 de março

a 16 de maio de 2012 para a Fuji. Foram amostradas três datas: 22 de fevereiro, 7 de março e 8 de maio na Galaxy. Para Fuji, as datas foram, respectivamente: 7 de março, 8 e 16 de maio. A amostragem foi restrita a folhas de ramos do ano (RA). De cada quadrante, da parte mediana da copa sem sintomas de doença, foram coletados quatro RA (com 10 e 20cm de comprimento).

Os RA do ano foram armazenados a 5°C até o início dos procedimentos, por cerca de 24 horas. De cada ramo, foram desprezadas as quatro folhas do ápice, pois têm maior concentração de auxina que as folhas mais distantes do ápice, e por isso permanecem nas plantas por maior período, iniciando assim mais tardiamente a senescência (SEXTON & ROBERTS, 1982). Posteriormente, foram separadas duas amostras, dos nós seguintes, de aproximadamente 0,5cm de comprimento, contendo um segmento do caule, uma gema axilar e a parte proximal do pecíolo (Figura 1).

Cada amostra foi seccionada longitudinalmente ao meio e fixada em glutaraldeído

2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2, por três horas, (FEDER & O'BRIEN, 1968). Os segmentos foram lavados por três vezes na mesma solução tampão, desidratados em série etílica gradual e conservados em etanol 70°GL, podendo permanecer por até dois anos (RUZIN, 1999). Para análise histológica, foram preparadas lâminas temporárias e permanentes. Para as temporárias, secções longitudinais foram utilizadas em testes histoquímicos, montadas em água e coradas com Sudan IV, para verificação da presença de suberina (COSTA, 1982); Floroglucinol acidificado (COSTA, 1982) e Azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1964) para detecção de lignina. Para as lâminas permanentes, os segmentos foram desidratados em série etílica até etanol 96°GL, e mantidos em solução de pré-infiltração, por pelo menos 12 horas, e foram infiltradas por mais três horas em hidroxietilmetacrilato (conforme metodologia de *Jung'sHistoresin*[®] – marca Leica). Posteriormente, foram montados blocos com solução endurecedora, conforme instruções do fabricante (*Jung'sHistoresin*[®] – marca Leica[®]). Os blocos foram seccionados com 5 µm



Figura 1 - Secções de ramos do ano de folha de macieira Galaxy (A, B, C) e Fuji (D, E, F), analisadas para a constatação da zona de abscisão (ZA). A, E e F - amostra *in vivo* e B, C, e D fixadas em glutaraldeído, contendo um segmento do pecíolo (Pe) e xilema (Xi), uma gema axilar (Ge) e um segmento do caule (Ca). A - destacado no retângulo branco sem evidência da ZA, em fevereiro de 2012. B - Vista detalhada da ZA foliar e as setas indicam células alongadas, com paredes delgadas e em processo de divisão, corada com azul de toluidina, encontradas em fevereiro e março de 2012. C - Destacada a ZA, caracterizada com a coloração esverdeada, assim como as escamas da gema (Esc), devido à reação com azul de toluidina, em 8/05/2012. D - delimitada região ainda sem evidências da ZA, em 7/03/2012. E - Setas indicam a zona de abscisão parcial, sentido adaxial (Ada) para o abaxial (Aba), caracterizada pela presença de lignina nas paredes celulares, identificada pela reação positiva com azul de toluidina, em 8/05/2012. F - ZA total de coloração esverdeada, encontrada em 16/06/2012.

de espessura, em micrótomo de rotação Leica®- RM 2125 RT. As secções foram distendidas sobre lâminas contendo água potável, em chapa aquecedora (40°C) e, quando secas, o material foi corado com azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1965).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia adotada permitiu a identificação da zona de abscisão (ZA) em folhas de macieiras, e a análise da gênese histológica do processo em Galaxy e Fuji (Figura 1). Os testes histológicos indicaram a presença de lignina nas paredes celulares, quando coradas com azul de toluidina e com Floroglucinol acidificado. A presença de suberina na ZA foliar não foi constatada durante este estudo. No entanto, não se descarta a possibilidade de sua presença na camada de proteção, pois poderia ter sido formada posteriormente ao processo de ABS, conforme descrito por BIGGS & NORTHOVER (1985) em pessegueiros. Estes autores observaram que as camadas de proteção (primária e secundária) formam-se após as camadas de separação, sendo dependentes da temperatura ambiente, podendo ocorrer em 6, 9 e 18 dias para a primária e em 12, 18 e 30 dias para a secundária (formação do tecido denominado de felogênio). A presença de lignina foi observada a partir da coloração esverdeada das células da ZA (Figura 1C e 1E e 1F), quando coradas com azul de toluidina, concordando com o observado por CLEMENTS & ATKINS (2001), em cotilédones de *Lupinus angustifolius* tratados com etileno.

Nas duas cultivares analisadas, a ZA localizou-se na porção proximal do pecíolo com o caule, um pouco abaixo da gema apical, e é constituída de várias camadas de células. Neste local, as células apresentaram uma conformação diferenciada, são mais alongadas e estreitas, havendo um espessamento da parede celular. Os tecidos que constituem as escamas (folhas modificadas que protegem as gemas) bem como os tecidos periféricos adaxiais (face adaxial), epiderme e outros tecidos até o xilema, inclusive, mostraram reação positiva à lignina (cor verde, com azul de toluidina) (Figura 1C, 1E e 1F).

Durante as primeiras coletas na cultivar 'Galaxy', após a colheita no final de fevereiro e em março, junto a ZA, foram vistas células se dividindo, indicando uma elevada atividade meristemática (Figura 1A). Nessa mesma época, também foram observados grânulos de amido (Prancha não apresentada). Acredita-se que estes podem ser utilizados durante a elevada atividade meristemática

de divisão celular, já que são substâncias de reserva (SEXTON, 2001), caracterizando as primeiras etapas do processo de ABS. Esses resultados indicam que o processo de ABS teve início no início de fevereiro para as folhas dos RA nesta cultivar. Durante o período de março e abril, o processo de senescência continuou ocorrendo, de maneira que, em maio, pôde-se encontrar a ZA caracterizada nesta cultivar pela coloração esverdeada, devido à lignificação das células. Essas diferenciações anatômicas na ZA concordam com o relatado por ADDICOTT E LYNCH (1955), que citam a presença de células menores e distintas durante os primeiros estágios do processo de ABS natural. PATTERSON (2001) também encontrou mesma configuração celular em um estudo da ABS e deiscência em *Arabidopsis thaliana*.

Na Fuji, foi possível verificar o mesmo comportamento e caracterização do processo de ABS observado na Galaxy, porém mais tardiamente, também após a colheita em 20 de abril. Observa-se, na figura 1D, que, em março, não havia sinais de formação da ZA, porém, no início maio, já foi possível visualizar a formação parcial da ZA (Figura 1E).

Conforme ADDICOTT (1982) e LIM et al. (2007), o processo de senescência das folhas inicia após a maturação dos frutos e, no caso da macieira, é acelerado pelo menor fotoperíodo e as baixas temperaturas que iniciam no outono. Desse modo, entre as cultivares estudadas, a Fuji por ter sido colhida em abril, teve sua ABS foliar posterior que a Galaxy colhida em fevereiro. Em função disso, as amostras da Galaxy foram coletadas até maio, enquanto havia as últimas folhas, e da Fuji até metade de maio, encerrada principalmente pela ocorrência de geadas.

Na figura 1E, observa-se na Fuji que a ZA está parcialmente formada e atinge o xilema, de modo que os tecidos que constituem o floema ainda se mantiveram não lignificados na ZA, permitindo a funcionalidade do tecido em transportar os carboidratos sintetizados na folha. Os tecidos abaxiais também não estavam lignificados, devido à ausência de células esverdeadas da reação com o azul de toluidina. Portanto, constata-se que paralelamente à lignificação dos tecidos protetores das gemas, ocorre o início da lignificação que segue da epiderme em direção ao xilema. Durante o processo da formação da ZA, observou-se que a lignificação não afetou os tecidos que mantêm a comunicação entre a gema e o caule. Estudos complementares do processo de formação da ZA em macieiras, natural e induzido, poderão definir até quando a folha apresenta-se funcional.

Observou-se que, nas condições de Vacaria, RS, sem a influência de fatores externos que aceleram a senescência (ROBERTS et al, 2002), para a Galaxy e Fuji, a abscisão natural da folha é lenta e, dessa forma, futuras pesquisas não requererão avaliações semanais, podendo ser de 14 a 21 dias. No entanto, para detecção do início do processo de ABS, as coletas devem ser de 7 e 14 dias antes e depois da colheita e, após maio, devem ser a cada 7 dias, devido às baixas temperaturas, que podem resultar na ocorrência de geadas, acelerando o processo de ABS. Contrariamente, quando o processo de ABS é induzido, ele pode ocorrer em horas (CLEMENTS & ATKINS, 2001; SEXTON, 2001; SHARMA et al., 2003; SANHUEZA et al., 2006).

CONCLUSÃO

A metodologia utilizada permitiu observar e caracterizar a zona de abscisão foliar em macieiras Galaxy e Fuji desde seu início até o fim. Nas condições deste estudo, para a observação do processo natural de abscisão, devem ser feitas coletas 7 e 14 dias antes e depois da colheita, seguindo até maio a cada 14 e 21 dias. A partir de maio devem ser feitas semanalmente.

AGRADECIMENTOS

À Empresa Rasip Agropastoril SA, pela concessão do pomar para execução do trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Bolsa de Doutorado para primeira autora, sendo este trabalho parte da sua Tese de Doutorado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Bolsa de Produtividade de Pesquisa do terceiro, quarto, quinto e sexto co-autores citados.

REFERÊNCIAS

- ADDICOTT, F.T.; LYNCH, R.S. Physiology of abscission. **Annual Reviews Plant Physiology**, v.6, p.211-238, 1955. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pp.06.06.0155.001235?journalCode=arplant.1>>. Acesso em: 27 jun. 2012. doi: 10.1146/annurev.pp.06.06.0155.001235.
- ADDICOTT, F.T. **Abscission**. California: University of California Press, Berkeley, 1982. Disponível em: <<http://www.ucpress.edu/op.php?isbn=9780520042889>>. Acesso em: 21 out. 2013.
- BIGGS, A.R.; NORTHOVER, J. Formation of the primary protective layer and phellogen after leaf abscission in peach. **Canadian Journal of Botany**, v.63, p.1547-1550, 1985.
- CLEMENTS, J.; ATKINS, C. Characterization of a non-abscission mutant in *Lupinus angustifolius*. I. Genetic and structural aspects. **American Journal of Botany**, v.88, n.1, p.31-42, 2001.
- COSTA, A.F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982. 3v.
- ESTORNELL, L.H. et al. Elucidating mechanisms underlying organ abscission. **Plant Science**, v.199-200, p.48-60, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.10.008>>. Acesso em: 26 abr. 2013. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.10.008.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principals and new methods. **American Journal of Botany**, v.55, n.1, p.123-142, 1968. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2440500>>. Acesso em: 02 set. 2013. doi: 10.2307/ajb.2440500.
- LIM, P.O. et al. Leaf senescence. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.115-136, 2007. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105316>>. Acesso em: 05 mar. 2013. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105316.
- O'BRIEN, T.P. et al. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **O. Protoplasma**, v.59, n.2, p.368-373, 1964. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2F01248568>>. Acesso em: 02 set. 2013.
- PATERSON, S. Cutting, loose. Abscission and dehiscence in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.126, n.2, p.494-500, 2001. Disponível: <www.plantphysiology.org/content/126/2/494.full.pdf+html>. Acesso em: 27 jun. 2013. doi:10.1104/pp.126.2.494.
- PETRI, J. et al. Análise de gemas de macieira como subsídio para orientação da poda. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.19, p.53-56, 2006.
- ROBERTS, J.A. et al. Abscission, deiscence, and other cell separation processes. **Annual Review of Plant Biology**, v.53, p.131-58, 2002. Disponível em: <www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.53.092701.180236?journalCode=arplant>. Acesso em: 27 jun. 2012.. doi: 10.1146/annurev.arplant.53.092701.180236.
- RUZIN, S.E. **Plant microtechnique and microscopy**. NewYork: Oxford University, 1999. 322p.
- SANHUEZA, R.M.V. et al. Características e controle das doenças de verão na produção integrada de maçã. In: SANHUEZA, R.M.V. et al. **Manejo da macieira no sistema de produção integrada de frutas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2006. Cap.4 , p.51-60.
- SEXTON, R.; ROBERTS, J. Cell biology of abscission. **Annual Review of Plant Physiology**, v.33, p.133-162, 1982. Disponível em: <www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.pp.33.060182.001025>. Acesso em: 09 nov. 2011. doi: 10.1146/annurev.pp.33.060182.001025.
- SEXTON, R. Abscission. In: PESSARAKLI, M. **Handbook of plant and crop physiology**. Tucson, Arizona: Marcel Dekker, 2001. Cap.10, p.205 -228.
- SHARMA, J, N.; et al., A. Studies on epidemiology and management of Marssonina blotch, the cause of premature leaf fall in apple. In: _____. **Integrated plant disease management**. Challenging problems in horticultural and forest pathology, Scientific Publishers: Jodhpur, 2003. p.1-7.