

**EXPRESSÃO DE CARACTERES FISIOLÓGICOS
INDUZIDA POR ESTRESSE SALINO EM TRÊS PROGÊNIES
DE CAJUEIRO**

JOSE MENÊSES JUNIOR

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

**Tese submetida à Coordenação do Curso
de Pós-Graduação em Bioquímica, como
requisito para obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica, área de
concentração: Bioquímica Vegetal.**

Universidade Federal do Ceará

FORTALEZA – CE

NOVEMBRO/2002

Esta Tese foi apresentada à coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários a obtenção do título de Doutor em Bioquímica, outorgado por esta instituição, encontrando-se à disposição dos interessados na Biblioteca da referida Universidade.

Jose Meneses Junior

TESE APROVADA EM 06 /11/ 2002

Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira
Orientador

Prof. Dr. Francisco Aécio Guedes Almeida (UFC)
Conselheiro

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos (UFC)
Conselheiro

Prof^ª . Dra. Rejane J. Mansur C. Nogueira (UFRPE)
Conselheira

Prof. Dr. Ricardo Almeida Viégas (UFPb)
Conselheiro

“A verdade nunca deixou de ser o que foi outrora e o que ainda é hoje, já que é eterna! Por isso aprendamos a conhecer as leis que se encontram no grande livro da criação”
(ABDRUCHIN).

AGRADECIMENTOS

A Deus, Fonte eterna de Luz e Sabedoria em todos os momentos da vida !

Aos meus pais, Jose Meneses (*in memoriam*) e Luiza Meneses,

À minha esposa Márcia e meus filhos Felipe e Lara,

Dedico

Aos meus amigos estudantes e bolsistas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC e, em especial, a Batista Freitas, Iza Rocha, Roberta Chagas, Tânia Almeida, Leticia Rivero, Sergio da Silva, Osnan Ferreira, Jean Brilhante, Ricardo Viégas, Roberto Barreto, Benedito Cardoso, Roberot Lobo e Nilson Matos, pela amizade, apoio e sugestões.

A FUNCAP, pela concessão da minha bolsa de estudo e financiamento ao projeto de pesquisa. Ao CNPq pelo auxílio financeiro às pesquisas do LabPlant, do departamento de bioquímica da UFC.

Ao professor e orientador Dr. Joaquim Albenisio Gomes da Silveira, pela paciência e orientação prestada durante o curso de doutorado,

Ao Dr. Francisco Aécio Guedes Almeida, pelo apoio sempre prestado,

Ao Dr. Ricardo Almeida Viégas, pela inestimável contribuição científica ao LabPlant.

Aos membros da Banca Examinadora, pelas valiosas sugestões.

A todos que contribuíram de alguma forma facilitando a realização deste trabalho o meu “muito obrigado”.

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE TABELAS</u>	11
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	13
<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	16
<u>RESUMO</u>	17
<u>ABSTRACT</u>	19
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	20
1.1. <u>Justificativa e hipótese</u>	20
1.2. <u>O cajueiro e sua importância</u>	21
1.3. <u>A salinidade e suas consequências</u>	24
1.3.1. Efeitos sobre os solos	24
1.3.2.. Efeitos sobre as plantas	27
1.3.2.1. Classificação das plantas segundo o ambiente em que se desenvolvem	27
1.3.2.2. Principais componentes de estresse para o crescimento da planta em meio salino.	28
1.3.2.2.1. Déficit hídrico	28
1.3.2.2.2. Toxicidade e desbalanço iônico	29
1.3.2.2.3. Papel do cálcio, desequilíbrios relacionadas ao cálcio	30
1.3.2.3. Efeitos do estresse salino na fisiologia e nos mecanismos de adaptação e tolerância	31

1.3.2.4. Mecanismos de adaptação ao estrato salino	33
1.3.2.5. Acumulação de solutos orgânicos	35
1.3.2.6. Fotossíntese e respiração	37
1.3.2.7. Síntese protéica	38
1.3.2.8. Efeitos do estresse salino sobre a atividade de enzimas limitantes do crescimento: redutase de nitrato	39
1.3.2.9. Resposta do cajueiro à salinidade	40
2. <u>OBJETIVOS</u>	42
2.1. <u>Objetivo Geral</u>	42
2.2. <u>Objetivos Específicos</u>	42
3. <u>TRABALHOS DESENVOLVIDOS</u>	43
3.1. <u>TRABALHO I</u> : Crescimento comparativo de mudas de três genótipos de cajueiro submetidas a diferentes níveis de NaCl.	43
3.1.1. Introdução	42
3.1.2. Material e Métodos	45
3.1.2.1. Material vegetal	46
3.1.2.2. Substrato e solução nutritiva de crescimento das mudas	48
3.1.2.3. Condições ambientais do experimento	49
3.1.2.4. Condução das plantas	49
3.1.2.5. Tratamentos e colheitas	50

3.1.2.6. Delineamento experimental e tratamento estatístico	51
3.1.2.7. Determinação das variáveis de crescimento	51
3.1.2.7.1. Massa seca acumulada em raiz, caule e folha	51
3.1.2.7.2. Taxa de incremento da altura da planta (TIAP)	51
3.1.2.7.3. Conteúdo de água (CA) e transpiração total (TT)	52
3.1.2.7.4. Determinação dos teores de clorofilas	52
3.1.3 . Resultados e Discussão	53
3.2. <u>TRABALHO II</u> : Acumulação de solutos inorgânicos e orgânicos em folhas e raízes de mudas de três genótipos de cajueiro em resposta a diferentes níveis de NaCl.	73
3.2.1. Introdução	73
3.2.2 . Material e Métodos	75
3.2.2.1. Material vegetal	75
3.2.2.2. Substrato e solução nutritiva de crescimento das mudas	76
3.2.2. 3. Condições ambientais do experimento	77
3.2.2.4. Condução das mudas	77
3.2.2.5. Tratamentos e colheitas	78
3.2.2.6. Delineamento experimental e tratamento estatístico	79
3.2.2.7. Concentrações de sódio e de potássio	79
3.2.2.8. Concentração de cloreto	79
3.2.2.9. Concentração de cálcio e magnésio	80
3.2.2.10. Concentração de prolina livre	80

3.2.2.11. Concentração de aminoácidos livres totais (N- α -amino livre)	81
3.2.2.12. Concentração de proteínas solúveis totais	82
3.2.2.13. Açúcares solúveis totais	82
3.2.3. Resultados e Discussão	83
3.2.3.1. Solutos inorgânicos (Na ⁺ , Cl ⁻ , K ⁺ , Ca ⁺² e Mg ⁺²)	83
3.2.3.2. Solutos orgânicos	100
3.3. <u>TRABALHO III</u> : Atividade de enzimas envolvidas com a assimilação do N inorgânico em mudas de três tenótipos de cajueiro em resposta a diferentes níveis de NaCl.	108
3.3.1. Introdução	108
3.3.2. Material e Métodos	110
3.3.2.1. Material vegetal	110
3.3.2.2. Substrato e solução nutritiva de crescimento das mudas	110
3.3.2.3. Condições ambientais do experimento	111
3.3.2.4. Condução das mudas	111
3.3.2.5. Tratamentos e colheitas	112
3.3.2.6. Delineamento experimental e tratamento estatístico	113
3.3.2.7. Determinação do conteúdo de N total nas folhas	113
3.3.2.8. Atividade <i>in vivo</i> de redutase de nitrato (RN)	114
3.3.2.9. Determinação da concentração de nitrato	114
3.3.2.10. Atividade de glutamina sintetase (GS)	115

3.3.2.11. Concentração de proteínas solúveis	115
3.3.3. Resultados e Discussão	116
3.4. <u>TRABALHO IV</u> : Índices porométricos e acumulação de Na ⁺ em mudas de três genótipos de cajueiro em resposta ao estresse salino.	125
3.4.1. Introdução	125
3.4.2. Material e Métodos	126
3.4.2.1. Material vegetal	127
3.4.2.2. Substrato e solução nutritiva de crescimento das mudas	127
3.4.2.3. Condições ambientais do experimento	127
3.4.2.4. Condução das mudas	128
3.4.2.5. Tratamentos e colheitas	128
3.4.2.6. Delineamento experimental e tratamento estatístico	129
3.4.2.7. Determinações das variáveis	129
3.4.2.7.1. Massa foliar	129
3.4.2.7.2. Concentrações de sódio na folha	129
3.4.2.7.3. Teste de condutividade elétrica	130
3.4.2.7.4. Determinações Porométricas	130
3.4.3. Resultados e Discussões	130
4. <u>CONCLUSÃO GERAL</u>	138
5. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	139

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Massa fresca total e massa da raiz de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl.	56
TABELA 2. Massa da folha e do caule de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl	60
TABELA 3. Taxa de crescimento, taxa de transpiração e conteúdo de água de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl.	63
TABELA 4. Clorofila <u>a</u> e clorofila <u>b</u> de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl.	67
TABELA 5. Concentração de cloreto em raízes e folhas de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl.	86
TABELA 6. Concentração de sódio em raízes e folhas de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl	88
TABELA 7. Concentração de potássio em raízes e folhas de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl.	92
TABELA 8. Concentração de cálcio e magnésio de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl.	95
TABELA 9. Concentração de prolina em raízes e de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl.	101

TABELA 10. Concentração de aminoácidos e açúcares em folhas de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl. 104

TABELA 11. Conteúdo de nitrogênio, concentração de nitrato e atividade de redutase de nitrato em folhas de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl. 118

TABELA 12. Concentração de proteínas solúveis totais e atividade de GS em folhas de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl. 123

TABELA 13. Concentração de massa foliar, Na^+ e condutividade elétrica de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl. 133

TABELA 14. Condutância estomática, temperatura foliar e transpiração foliar de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a 0 e 200 mM de NaCl. 136

LISTA DE FIGURAS

- | | Página |
|---|--------|
| FIGURA 1. Plantas matrizes de cajueiro (A) anão (<i>Anacardium occidentale</i> , var. <i>nanum</i>); (B) microcarpo (<i>A. microcarpum</i>); (C-1, C-2) ecótipos de comum (<i>A. occidentale</i> L.) e (D) castanhas das matrizes : (D1) anão, (D2) microcarpo e (D3) comum. | 47 |
| FIGURA 2. Massa total (A) e massa da raiz (B) de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl. Valores expressos em % do controle. | 57 |
| FIGURA 3. Raízes de mudas de cajueiro (A) anão e (B) comum – <i>A. occidentale</i> L.com 68 DAP e (C) microcarpo – <i>A. microcarpo</i> Ducke, com 121 DAP, submetidas a 0 e 200 mM de NaCl. | 58 |
| FIGURA 4. Massa da folha - MF (A) e massa do caule - MC (B) de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl. Valores expressos em % do controle. | 61 |
| FIGURA 5. Taxa de crescimento - TC (A), taxa de transpiração total - TTT (B) e conteúdo de água – CA (C) de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl. Valores expressos em % do controle. | 64 |
| FIGURA 6. Concentração de clorofila <u>a</u> – Chl <u>a</u> (A) e de clorofila <u>b</u> – Chl <u>b</u> (B) de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl.. Valores expressos em % do controle. | 68 |
| FIGURA 7. Mudas de cajueiro anão com 68 DAP, após exposição à diferentes níveis de NaCl (0 a 200 mM), durante 24 dias. Fortaleza, Ceará , Brasil, 2002. | 69 |

FIGURA 8. Mudanças de cajueiro comum com 68 DAP, após exposição à diferentes níveis de NaCl (0, 50, 100, 150 e 200 mM), durante 24 dias. Fortaleza, Ceará , Brasil, 2002. 70

FIGURA 9. Mudanças de cajueiro microcarpo com 121 DAP, após exposição à diferentes níveis de NaCl (0, 50, 100, 150 e 200 mM), durante 24 dias. Fortaleza, Ceará , Brasil, 2002. 71

FIGURA 10 – Acumulação de Cloreto – Cl^- em raízes (A) e folhas (B) de mudas de cajueiros, submetidas a doses crescentes de NaCl. Valores expressos em % do controle. 85

FIGURA 11 – Acumulação de Sódio – Na^+ em raízes (A) e folhas (B) de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl. Valores expressos em % do controle. 92

FIGURA 12. Acumulação de potássio – K^+ em raízes (A) e folhas (B) de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl. 96

FIGURA 13. Acumulação de cálcio – Ca^{+2} (A) e magnésio – Mg^{+2} em folhas (B) de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl. Valores expressos em % do controle. 99

FIGURA 14 – Concentração de prolina nas raízes – Pro (A) e folhas de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl. Valores expressos em % do controle. 102

FIGURA 15 – Concentração de aminoácido (A) e de açúcares totais (B) em folhas de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl. Valores expressos em % do controle. 105

FIGURA 16 – Conteúdo de nitrogênio – N (A), concentração de nitrato - NO_3^- (B) e atividade de redutase de nitrato – ARN (C) em folhas de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl. Valores expressos em % do controle. 119

FIGURA 17 – Concentração de proteínas solúveis totais – PST (A) e atividade de 124 glutamina sintetase – AGS (B) em folhas de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl. Valores expressos em % do controle.

FIGURA 18 – Massa, em mg.planta^{-1} – MF (A), Acumulação de Sódio - Na^+ , em $134 \text{ mmol.planta}^{-1}$ (B) e condutividade elétrica - gs, em dS.m^{-1} (C) em folhas de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a 0 e 200 mM de NaCl.

FIGURA 19. Mudanças de cajueiro (A) anão, (C) comum e (M) microcarpo, com 44 135 DAP, submetidas a 0 e 200 mM, durante 14 dias. Fortaleza, Ceará, Brasil, 2002.

FIGURA 20. Condutância estomática – gs, em cm.s^{-1} (A); temperatura - $^{\circ}\text{C}$ (B) e 137 transpiração – T, em $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (C) em folhas de mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a 0 e 200 mM de NaCl.

LISTA DE ABREVIATURAS

ARN – Atividade de redutase de nitrato

CP – Caju de Pacajus - CE

DAP/DAS – Dias após plantio/semeadura

EMBRAPA/CNPAT – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Centro Nacional de Pesquisa de Agricultura Tropical

GDH – Glutamato desidrogenase

GS – Glutamina sintetase

GOGAT – Glutamato sintase

MS – Massa seca

RN – Redutase de nitrato

RN mRNA – RNA mensageiro de formação da enzima RN

TIAP – Taxa de incremento da altura das plantas

CA - Conteúdo de água

TT – Transpiração total

Chl – Clorofila

PST – Proteína solúvel total

AALT – Aminoácidos livres totais

AST – Açúcares solúveis totais

RESUMO

Autor: José Meneses Junior. M.S.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

O presente estudo teve como objetivo testar a hipótese de que mudas de cajueiro oriundas de sementes de matrizes expostas a condições ambientais diversas expressam caracteres bioquímicos e fisiológicos contrastantes em resposta ao estresse salino. Foram utilizadas mudas de progênies de cajueiro comum (*Anacardium occidentale* L.) originado do ambiente de dunas costeira sujeita a salinização, de cajueiro anão-precoce comercial CP76 (*Anacardium occidentale* L.) e de cajueiro microcarpo, uma espécie nativa de cajueiro (*Anacardium microcarpum* Ducke.). As mudas foram cultivadas em substrato de areia lavada ou de vermiculita na presença de diferentes níveis de NaCl (0, 50, 100, 150 e 200 mM) e diferentes tempos de exposição. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, com valores médios de temperatura diurna e noturna de 27 °C e 24 °C, respectivamente, umidade relativa média do ar de 40% a 80% e um fotoperíodo médio de 12 horas de insolação e quantidade máxima média de radiação fotossinteticamente ativa de aproximadamente 1000 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os resultados obtidos mostraram que dentre as três genótipos estudadas, as mudas do “microcarpo” foram as mais sensíveis ao estresse salino em termos de decréscimo relativo na produção de massa seca e de exibição de sintomas visuais de toxicidade nas folhas. A sensibilidade desse genótipo foi diretamente relacionada com as concentrações de Cl^- e Na^+ nas folhas e com maior relação folha/raiz em termos de concentração de Cl^- . Também, a maior sensibilidade do “microcarpo” foi associada com menor capacidade de acumulação de prolina em suas folhas na presença do NaCl. Apesar das plantas matrizes do “comum” e do “anão” apresentarem grandes diferenças fenotípicas, suas mudas não exibiram grandes contrastes em termos de tolerância ao estresse salino apesar do “anão” apresentar maior quantidade de biomassa seca em raízes, caule e folhas tanto no controle quanto na condição de estresse. Apesar dos caracteres fisiológicos estudados (acumulação e partição de íons inorgânicos, acumulação de osmo-solutos orgânicos, atividade de enzimas da assimilação do N inorgânico e índices porométricos – condutância estomática e taxa de transpiração) mostrarem grande alteração em resposta ao estresse salino, os mesmos não foram capazes de explicar as diferenças de sensibilidade ao NaCl apresentadas pelos três genótipos. De qualquer maneira, o estresse salino afetou mais decisivamente o nível endógeno de K^+ nas raízes, a emissão e a taxa de expansão foliar, a atividade de redutase de nitrato, a condutância estomática e os níveis de Ca^{+2} e Mg^{+2} das folhas. Ao contrário, a atividade de glutamina sintetase e a concentração de açúcares solúveis foram pouco afetadas pela salinidade. Assim, a análise das variáveis estudadas revela que somente a intensidade de acumulação de Na^+ e Cl^- e o nível de prolina nas folhas foram capazes de explicar parcialmente a maior sensibilidade ao estresse salino. No todo, os resultados revelam que a resposta ao NaCl por

mudas de cajueiro é extremamente complexa e sugerem que os caracteres que podem conferir tolerância são interativos e que a maior ou menor tolerância ao estresse salino entre as progênies estudadas não é devida à expressão de caracteres isolados, mas sim devido à interação entre os mesmos.

ABSTRACT

The main aim of this study was to test the hypothesis that cashew seedlings from diverse environmental conditions show different biochemical and physiological characters in response to salt stress. Different cashew plant genotypes regionally known as “comum” (*Anacardium occidentale* L.) from coastal dunes subjected to salinization, “anão-precoce CP76” (*Anacardium occidentale* L. var. *nanum*) and “microcarpo” (*Anacardium microcarpum* Ducke) – a native cashew plant species were evaluated in relation to their response to NaCl salinity during the initial growth. Plants were grown either in sand culture or on vermiculite, under different NaCl levels (0, 50, 100, 150 e 200 mM) and at different time exposure. Plants were cultured under greenhouse condition at a 12 h photoperiod, reaching the maximal photosynthetic active radiation of $1,000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Average temperatures were 27 °C at night and 24 °C by day, while average air humidity ranged between 40% and 80%. The results show that microcarpo cashew plants was the most sensitive of the three genotypes studied, concerning dry mass decrease and leaf visual toxicity symptoms. Microcarpo sensitiveness to NaCl was directly related to leaf Cl^- and Na^+ content, to a higher Cl^- leaf/root relation, and also to a lower leaf proline accumulation. In spite of the fact that “comum” and “anão” cashew stock plants show great phenotypical differences, the derived seedlings did not exhibit much contrast as to salt tolerance, although “anão” presented more root and shoot biomass on both control and salt treatment. Although the physiological characters studied (inorganic ion accumulation and partitioning, organic ion accumulation, enzyme activities of inorganic N assimilation, porometric measurements – stomatal behaviour and leaf transpiration rate) exhibit outstanding alterations in response to salt stress, they could not explain the the distinct NaCl sensibility presented by the three genotypes. Anyways, salt stress affected more decisively root endogenous K^+ level, leaf expansion, nitrate reductase activity, stomatal conductance and Ca^{+2} and Mg^{+2} in leaf. On the other way, glutamine synthetase and soluble sugar content were less affected by salinity. Consequently, only Na^+ and Cl^- accumulation as well as proline level could partially explain NaCl sensibility. In general, cashew seedling responses to NaCl are extremely complex and suggest that the characters that may confer tolerance do not act isolatedely but are rather interactive.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Justificativa e hipótese

A cultura do cajueiro é uma das mais importantes no nordeste brasileiro, quer seja no aspecto social (grande número de empregos) quer seja no econômico, através da exportação da castanha. Infelizmente, a produtividade dessa cultura, atualmente, é extremamente baixa quando comparada com o potencial de sua produção. O baixo emprego de mudas de qualidade superior tem sido um dos principais fatores para essa situação. Outro problema é sua estreita base genética (BARROS; CAVALCANTI; PAIVA, 2000) o que acarreta uma situação de vulnerabilidade e que pode comprometer sua expansão, principalmente para áreas marginais, sujeitas a problemas de estresse ambiental. Associado a isso, o principal método de propagação vegetativa (enxertia) utiliza um número extremamente reduzido de materiais como porta-enxertos dos clones mais produtivos. É conhecido em outras culturas, particularmente em *Citrus*, que o tipo de porta-enxerto exerce forte influência na qualidade da muda, especialmente, para condições de estresse (BAÑULS; PRIMO-MILO, 1995).

No caso do cajueiro, existe um número muito reduzido de pesquisas sobre a variabilidade genética dos atuais materiais disponíveis, especialmente para condições de estresse ambiental tais como a salinidade. O cajueiro é freqüentemente cultivado em área costeira sujeita a problemas de salinização (VIÉGAS; MELO; SILVEIRA, 1999). Além disso, com a expansão das áreas irrigadas, esse problema tende a se agravar em razão das condições existentes no semi-árido tropical tais como evapotranspiração elevada e baixa qualidade da água. Portanto, a seleção de porta-enxertos mais tolerantes ao estresse salino representa um passo fundamental para a expansão e sustentabilidade da cultura do cajueiro. Entretanto, a tolerância aos estresses abióticos é uma característica quantitativa que envolve a expressão de diversos genes (BOHNERT; JENSEN, 1996). Por sua vez, o conhecimento dos caracteres fisiológicos mais importantes na tolerância ao estresse salino é essencial para programas de seleção e melhoramento genético.

A expressão de caracteres bioquímicos e fisiológicos ligados à tolerância ao estresse salino envolve fatores genéticos e ambientais. No caso de mudas enxertadas, é importante

definir quais características são transferidas por cada parte envolvida. Uma das estratégias empregadas na seleção de porta-enxertos mais tolerantes, como no caso do tomateiro, é uso de materiais selvagens como fonte de resistência (FAGERIA; GHEYI, 1997). No caso do cajueiro, a utilização de outras espécies tais como o *A. microcarpum* poderia ser uma opção tendo em vista que vegeta espontaneamente nas condições do nordeste brasileiro (BARROS, 1998a). Além disso, outras matrizes de cajueiro desenvolvidas sob condições de salinidade, tais como aquelas existentes em áreas de dunas, poderiam servir como fonte de diversidade genética para tolerância ao estresse salino.

Neste trabalho foi testada a hipótese de que mudas de cajueiro oriundas de matrizes expostas a condições ambientais distintas expressam caracteres bioquímicos e fisiológicos contrastantes em resposta ao estresse salino.

1.2. O cajueiro e sua importância

De acordo com os dados do Centro Internacional de Negócios da FIEC (2002), a castanha de caju, que antes liderava a pauta das vendas externas do Estado do Ceará, na safra de 2001/2002 rendeu apenas US\$ 87,9 milhões, refletindo uma queda de 36% em relação ao ano anterior. Infelizmente faltou produção para ofertar, pois a produtividade caiu para menos de 100 Kg/ha, havendo dessa forma, importação de castanha de péssima qualidade.

Dessa maneira, o aumento da produção e da produtividade da cultura, através de tecnologias apropriadas, é uma das alternativas para aumentar a safra brasileira e, conseqüentemente a oferta de nossos produtos no mercado externo. Por sua vez, o aumento da produtividade da cultura requer o uso de técnicas modernas, já disponíveis no Estado, envolvendo, principalmente, a utilização de mudas originadas de clones com características genéticas comprovadas de precocidade e elevada produtividade.

Está em desenvolvimento no Estado, no sentido de promover o aumento da produção e produtividade dos atuais plantios, um programa de substituição de copas de cajueiros de baixa produtividade e/ou improdutivo através da utilização de clones superiores de cajueiro anão precoce. Outro programa importante se refere aos projetos de irrigação em áreas novas

cultivadas com mudas enxertadas de cajueiro anão precoce onde a produtividade alcançada chega a ser várias vezes superior às aquelas obtidas em condições de sequeiro (ALMEIDA, 1986; ALMEIDA, ALMEIDA, MARTINS JR., ALMEIDA et al., 1998 e 2000; ALMEIDA, 2002). Como ilustração, pudemos citar que a produtividade das atuais áreas comerciais plantadas com cajueiro comum oriundo de sementes alcança no máximo 220 kg ha⁻¹, enquanto que as cultivadas com cajueiro anão precoce pode alcançar até 7000 kg ha⁻¹ (ALMEIDA et al., 1992). Deve ser ressaltado que a cultura do cajueiro apresenta um grande impacto social no Estado do Ceará chegando a gerar cerca de 300.000 empregos diretos e indiretos através de sua cadeia produtiva.

O cajueiro encontra-se disperso em larga faixa do mundo tropical, compreendida entre os paralelos 27° N, no sul da Flórida, e 28° S, na África do Sul (FROTA; PARENTE, 1995). O principal centro de diversidade do gênero *Anacardium* é a região amazônica (florestas úmidas, matas de galeria e cerrado), com um centro secundário de diversidade nos cerrados (Planalto Central). A maior diversidade de *Anacardium occidentale* L., única espécie cultivada e a de maior dispersão do gênero (JOHNSON, 1973; MITCHELL; MORI, 1987), é no nordeste brasileiro, onde pode ser encontrada em diversos ecossistemas (DUCKE, 1960), principalmente nas zonas costeiras, fazendo parte da vegetação de praias e dunas e nas formações de restinga (BARROS, 1998a). Essa espécie encontra-se em quase todo mundo tropical (BARROS; CRISÓSTOMO, 1995). Toda discussão sobre sua origem fundamenta-se em provas circunstanciais, tais como, primeiras referências bibliográficas, distribuição geográfica, comportamento ecológico, padrões de variação da espécie, utilização humana e outras, que indicam o Brasil como centro de origem da espécie (SOARES, 1986; BARROS et al., 1993), ou pelo menos todo o norte da América do Sul e parte da América Central (BARROS; CRISÓSTOMO, 1995).

O cajueiro pertence à família *Anacardeaceae*, constituído por árvores e arbustos tropicais e subtropicais que apresentam ramos sempre providos de canais resiníferos e folhas alternadas, coriáceas, sem estipulas sendo composta por mais de 60 gêneros e 400 espécies (BARKLEY, 1977). Etimologicamente, Anacardia provém do idioma Tupi e significa fruto amarelo (açã=pomo; yu= marelo) (SAMPAIO, 1914). A denominação binominal de *Anacardium occidentale* foi dada por Linneaus por volta de 1753 (JOHNSON, 1973; MITCHELL; MORI, 1987). Além de *A. occidentale* foram descritas 20 outras espécies de *Anacardium* pela taxonomia clássica. As 21 espécies foram agrupadas, por meio do uso de

taxonomia numérica, em apenas nove espécies que, juntamente com *A. fruticosum*, totalizam 10 espécies, de acordo com Mitchell e Mori (1987). Há necessidade, contudo, de novos estudos e entendimentos em relação à classificação de espécies do gênero *Anacardium*.

Depois da espécie cultivada, *Anacardium microcarpum* Ducke é a mais encontrada na região nordeste, principalmente nos cerrados do Estado do Piauí e Maranhão, não obstante classificada por Mitchell e Mori (1987), como sendo variabilidade de *A. occidentale*, que difere desta, por apresentar folha mais dura com pecíolo mais aplainado e costa muito grossa e a castanha é muito pequena, excedida em tamanho pelo pedúnculo vermelho, ácido, aproveitável quando começa a secar depois de muito maduro. São nomes comuns cajuí e caju do campo (CORRÊA, 1926; DUCKE, 1960). Não existem variedades definidas de cajueiro e o agrupamento de determinadas características divide a espécie em dois grupos: o tipo comum e o tipo anão precoce (BARROS, 1998a). Essa espécie apresenta características agrônômicas próprias, com diferenciações das do cajueiro comum e tem como principais vantagens o porte reduzido, a precocidade e a duração do período de floração. Botanicamente ainda não possui uma classificação definida, pois tanto é citado como *A. occidentale* var. *nanum* (BRAGA, 1976) como *Anacardium nanum* (BARROS et al., 1993). É a espécie de maior importância econômica, sendo que as demais carecem de melhores conhecimentos (MITCHELL; MORI, 1987). O que ocorre na realidade, é que a propagação do cajueiro, feita essencialmente por via seminípara e associada a um elevado percentual de polinização cruzada, conduz a geração de indivíduos com alto grau de heterozigose, com grandes variações em suas características morfológicas, tornando muito difícil a fixação de uma variedade botânica, caso ela exista.

O trabalho inicial de melhoramento do cajueiro anão precoce no Brasil constou de uma seleção fenotípica individual, seguido pelo controle anual da produção nas plantas selecionadas. Esse trabalho teve início em 1965 na Estação Experimental de Pacajus. Essa metodologia, embora simples e de ganhos genéticos esperados reduzidos, permitiu o lançamento comercial dos atuais clones CP 06 e CP 76, em 1983, CP 09 e CP 1001, em 1987, FAGA 1 e 11 (ALMEIDA ALMEIDA, SOARES, 1990; ALMEIDA 2002), EMBRAPA 50 e 51 (ALMEIDA; ARAÚJO.; BARROS, 1992). A existência de poucos clones comerciais de cajueiro anão, recomendados para o plantio comercial na região associado com a base genética excessivamente estreita que originou esses clones (ALMEIDA; ARAÚJO; BARROS, 1992; BARROS et al., 1993) caracterizam claramente uma situação de vulnerabilidade genética.

Na cajucultura moderna, as mudas são, normalmente, obtidas tanto a partir de sementes (propagação sexuada), como através de mudas enxertadas (propagação assexuada). O maior esforço da pesquisa com o cajueiro no Brasil tem sido com a propagação vegetativa, no sentido de pesquisar a cultura especialmente através da enxertia. No Brasil é adotada por facilidade de operação, a garfagem em bisel. Ao contrário de outras frutíferas, as mudas comerciais de cajueiro anão são produzidas a partir da enxertia em poucos tipos de porta-enxerto, sendo o clone CP-76 aquele utilizado em maior escala. Pesquisa sobre enxertia de alguns clones não mostrou efeito contrastante nas mudas enxertadas, que possa ser atribuído ao tipo de porta-enxerto tais como variações de crescimento ou incompatibilidade entre porta-enxerto e enxerto (ARGELS, 1976). Informações técnico-científicas para escolha de porta-enxertos, da interação porta-enxertos x clones e dos seus comportamentos em diversas condições ambientais são escassas, sendo, no entanto, imprescindíveis para o sucesso da cultura.

A utilização da espécie botânica *A. microcarpum* Ducke, que vegeta espontaneamente no nordeste brasileiro, Planalto Central e Amazônia, como porta enxerto, permitiu a obtenção de índices elevados de pegamento (92%), na garfagem em bisel. As mudas enxertadas sobre *A. microcarpum* Ducke são vigorosas, demonstram resistência à seca e apresentam copas homogêneas (BARROS, 1988a). Portanto, existe a possibilidade de exploração dessa espécie como fonte de variabilidade genética em programas de melhoramento de cajueiro anão precoce, além de sua utilização como porta-enxerto.

1.3. A salinidade e suas conseqüências

1.3.1. Efeitos sobre os solos

O halomorfismo naturalmente induzido ao solo é conseqüência de processos pedogenéticos específicos. A concentração salina da solução do solo, antes da ação antrópica, é definida como salinização primária. A salinização, decorrente quase sempre do manejo inadequado do solo e da água, dá-se o nome de salinização induzida ou salinização secundária

(SANTOS; MURAOKA, 1997). Em alguns casos, a salinização secundária é responsável por perdas irreparáveis na qualidade de vida no solo, tornando estéreis grandes extensões de terras cultivadas. Assim sendo, águas de qualidade duvidosa (com elevados riscos de salinidade e sodicidade), adubos com elevado índice salino, drenagem ineficiente dentre outros, são fatores que podem acelerar o processo de salinização secundária. CARTER (1975) atribui à irrigação uma das principais causas da salinização induzida.

Os solos são considerados salinos se eles contêm sais solúveis em quantidades suficientes para interferir no desenvolvimento da maioria das espécies cultivadas. Isto não se refere a uma quantidade determinada de sais, mas depende da espécie da planta, da textura, da capacidade de armazenagem de água no solo e da composição dos sais. Portanto, o critério para se distinguir solos salinos de não salinos é arbitrário. De acordo com a definição do laboratório de salinidade dos Estados Unidos, o extrato de saturação de um solo salino tem uma condutividade elétrica (CE) maior que 4 mmho.cm^{-1} ou $4 \text{ deciSiemens.m}^{-1}$ (equivalente a $40 \text{ mM NaCl.l}^{-1}$) e uma percentagem de sódio trocável (PST) menor que 15. Embora o pH de solos salinos possa variar bastante, ele normalmente, se situa próximo a neutralidade, com uma ligeira tendência a alcalinidade. Solos salinos com PST maior que 15 são denominados de salino sódicos e apresentam pH elevado e são, normalmente, impermeáveis a água e a aeração, quando os sais solúveis são removidos por lixiviação. A CE do extrato de saturação não é um indicador suficiente para o cultivo de plantas em solos salinos por dois motivos principais: (1) a concentração real de sais na superfície radicular pode ser maior que no solo propriamente dito e (2) A CE caracteriza apenas o conteúdo total de sais, mas não expressa sua composição (SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMÉRICA, 1987).

Os sais solúveis consistem, normalmente de várias proporções dos cátions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , dos ânions Cl^{-} , SO_4^{2-} , HCO_3^{-} e, às vezes de K^{+} , CO_3^{2-} e NO_3^{-} . As principais alterações químicas provocadas pela salinização dos solos são na composição e balanço de cátions nos complexos de troca e na solução do solo, com reflexos no pH e na capacidade de troca iônica e disponibilidade de nutrientes (SANTOS; MURAOKA, 1997). No caso dos solos sódicos, o excesso de Na^{+} provoca alterações nas propriedades físicas do solo, reduzindo a floculação das argilas e a estabilidade dos agregados, provocando reduções na porosidade e capacidade de retenção de água (BARROS, 1998b). O excesso de sais provoca diminuição na pressão osmótica e toxicidade para o desenvolvimento da fauna e flora, diminuindo as taxas de

mineralização e humificação da matéria orgânica, favorecendo a redução na fertilidade dos solos (SANTOS; MURAOKA, 1997).

A ocorrência de solos salinos e sódicos é comum nas regiões áridas e semi-áridas, devido à baixa precipitação e à alta taxa de evaporação. Por isso, os sais não são lixiviados, acumulando-se em quantidades prejudiciais ao crescimento normal das plantas. A salinização também ocorre em regiões do litoral em consequência da inundação do solo pela água salgada dos mares ou oceanos. Segundo Carvalho (1973), o potencial de áreas irrigáveis com recursos hídricos locais no Semi-árido nordestino, aí incluídas as terras do vale do São Francisco inseridas no Polígono das Secas, é de cerca de 15.000 km². Alvargonzalez (1984) não considera que esse potencial supere 25.000 km². Tomando-se por base essa última estimativa mais otimista, chega-se a conclusão de que menos de 2% da área total do Nordeste (aproximadamente 1.640.000 km²) são passíveis de irrigação. Esses números não são difíceis de entender, porquanto 70% da superfície do nordeste semi-árido se localizam sobre o embasamento cristalino. Sua estrutura é caracterizada por solos na maioria das vezes rasos, pois, a rocha que lhes dá origem está localizada próxima à superfície e é por isso, de difícil drenagem.

Molinier et al. (1989), trabalhando em parcelas de solo Bruno não Cálcico na região de Sumé, nos Cariris Velhos da Paraíba, observaram que a água da chuva, após escoamento superficial, tem sua concentração salina aumentada em até quatro vezes. No mesmo solo, após infiltração e coleta no nível dos drenos, essa concentração pode aumentar mais de cinquenta vezes. Mesmo a água de boa qualidade pode conter 100 a 1.000 g sal.m⁻³. Na aplicação anual de 100.000 m³ha⁻¹, entre 1 e 10 t de sais são adicionadas ao solo. Em decorrência da transpiração e evaporação da água, os sais solúveis se acumulam no solo e têm que ser removidos periodicamente pela lixiviação e drenagem. Mas mesmo quando se aplica tecnologia apropriada a esse tipo de solo, eles apresentam concentrações salinas que frequentemente impedem o crescimento das culturas de baixa tolerância ao sal.

Embora a tolerância salina seja relativamente baixa na maioria das espécies cultivadas, pode ocorrer grande variabilidade genética não apenas entre espécies, mas também, entre cultivares dentro de uma espécie. Portanto, a seleção de espécies tolerantes não é apenas um fator importante para a produção agrícola em regiões áridas e semiáridas, mas ela pode servir de potencial para o aproveitamento da água do mar na irrigação. Exemplos dessa natureza tem sido dado por Epstein et al (1980), que mostraram que, com determinados tipos de cevada,

produções de grãos de até 1 t ha^{-1} podem ser obtidas quando é usada água do mar, suplementada com N e P, na irrigação.

1.3.2.. Efeitos sobre as plantas

1.3.2.1. Classificação das plantas segundo o ambiente em que se desenvolvem

As plantas quando classificadas de acordo com o tipo de ambiente em que se desenvolvem podem ser divididas em: hidrófitas, quando crescem em ambientes que sempre apresentam ampla disponibilidade de água; mesófitas, em ambientes com disponibilidade intermediária de água; xerófitas em ambientes com escassez de água; halófitas, em ambientes com alta concentração de sal e glicófitas, quando não são capazes de se desenvolvem em ambientes com alta concentração salina (PRISCO, 1989). Esta classificação nem sempre satisfaz aos fisiologistas de plantas devido ela não considerar o mecanismo pelo qual as plantas resistem o ambiente estressante. Por exemplo, todas as plantas que se desenvolvem no deserto são consideradas xerófitas, mas cada espécie desenvolveu, ao longo da evolução, suas próprias adaptações para a sobrevivência no ambiente árido. As halófitas possuem características morfo-fisiológicas específicas que permitem realizar suas funções vitais na presença de altas concentrações de sais, sem muita dificuldade, e superar baixos potenciais osmóticos no ambiente radicular (POLJAKOFF-MAYBER, 1975).

As glicófitas, onde se enquadra a maioria das plantas exploradas economicamente, ao contrário das halófitas, são caracterizadas por uma reação negativa à presença excessiva de sais solúveis na solução do solo. Essas plantas não apresentam as características morfo-fisiológicas das halófitas, sendo a capacidade que possuem para crescerem e produzirem em solos salinos bastante limitada (GREENWAY e MUNNS, 1980).

1.3.2.2. Principais componentes de estresse para o crescimento da planta em meio salino.

Existem três componentes de estresse principais para o crescimento da planta em meio salino: (1) déficit hídrico, proveniente do potencial de água mais baixo na raiz; (2) toxicidade iônica associada à absorção excessiva, principalmente, de Cl^- e Na^+ ; (3) desbalanço nutricional de nutrientes através da redução na absorção e/ou transporte para a parte aérea da planta. Normalmente, não é possível prever a contribuição relativa destes 3 componentes, tendo em vista que muitos fatores estão envolvidos, podendo-se incluir: a concentração iônica e sua relação com o substrato, a duração do tempo de exposição, espécie/cultivar, o estágio de desenvolvimento da planta, parte da planta e condições ambientais. A exposição em longo prazo de uma planta pode, por exemplo, resultar na toxicidade iônica nas folhas mais velhas e em déficit hídrico nas folhas mais novas (MUNNS, 2002).

1.3.2.2.1. Déficit Hídrico

De um modo geral, o crescimento da parte aérea da planta cultivada em substrato salino é mais intensamente afetado do que o crescimento da raiz (MUNNS, 2002). A rápida resposta na taxa do crescimento foliar em planta submetidas ao estresse salino é atribuída a mudanças no estatus hídrico da folha. Em folhas de feijão (NEUMANN; VOLKENBURGH; CLELAND, 1988) um decréscimo no turgor das células foliares é o principal fator responsável pela inibição da taxa de crescimento foliar. A salinização diminui a disponibilidade e a absorção de água, causando redução no transporte de água e nutrientes através do xilema. Em plantas de tomate e pimenta, após 27 dias de aplicação de estresse salino (50 mM), o fluxo xilemático decresceu por um fator de 17-20 comparado ao controle (0 mM), enquanto que a concentração iônica no xilema aumentou apenas 2-3 vezes (KAFKAKI, 1991). Portanto, o suprimento de água e de nutrientes minerais tornam-se restritos em substratos salinos.

1.3.2.2.2. Toxicidade e desbalanço iônico

Em substratos salinos o Na^+ e o Cl^- são, freqüentemente, os íons dominantes. Apesar da necessidade de Cl^- como micronutriente para as plantas superiores e do Na^+ para muitas halófitas e algumas espécies C_4 , a concentração de ambos os íons em substratos salinos excede esta demanda e leva a toxicidade em plantas não tolerantes ao sal. Em diversas culturas herbáceas e frutíferas a inibição do crescimento e a injúria à folhagem (clorose marginais e necroses nas folhas maduras) ocorrem mesmo em baixos níveis de salinização de NaCl (MAAS, 1993). Sob tais condições o déficit hídrico não é um obstáculo (MUNNS, 1980) e, pelo menos em *Citrus*, a sensibilidade e toxicidade ao Cl^- é o principal responsável. Muitas espécies leguminosas são, também, muito sensíveis a altos níveis de cloreto. Concentrações isomóticas de Cl^- , comparado à salinidade com SO_4^{2-} , causam clorose foliar severa e redução na fotossíntese e são mais tóxicas ao crescimento de plantas de amendoim do que de feijão (CHAVAN; KARADGE, 1980). Embora a toxicidade ao Cl^- seja muito comum em muitas espécies de plantas cultivadas em substratos salinos com algumas espécies de plantas, tais como o sorgo, comparado ao cloreto (NaCl), a salinização com o sulfato (Na_2SO_4) pode reduzir o crescimento do mesmo modo que o NaCl em baixas concentrações. Esse decréscimo no crescimento é, em parte, devido à redução na concentração de potássio e magnésio em salinização elevada com sulfato (BOURSIER; LAUCHLI, 1990). Com exceção de algumas gramíneas tais como o trigo, sorgo e arroz, a toxicidade do Na^+ não parece ser tão acentuada quanto à do Cl^- e está mais relacionada à baixa concentração de cálcio ou aeração deficiente no substrato. Diversas culturas com baixa tolerância ao sal são “excluidoras” de Na^+ e capazes de restringir, em níveis baixos e moderados de salinidade, o transporte de Na^+ para as folhas, onde ele é altamente tóxico em espécies sensíveis ao sal (YEO, 1993).

Atualmente, é reconhecida a importância do acúmulo salino no apoplasto foliar como um componente importante na toxicidade salina, levando a desidratação e perda de turgor e morte de células e tecidos foliares (FLOWERS, 1988). Em planta de arroz, por exemplo, a murcha é um sintoma precoce que ocorre com apenas 50 mM de NaCl , embora o acúmulo de íons nas folhas seja mais do que suficiente para o ajustamento osmótico. No apoplasto foliar, no entanto, as concentrações de Na^+ podem alcançar 500 mM, o que causa desidratação das células foliares (FLOWERS; TROKE; YEO, 1991).

Em salinidade elevada, a redução do crescimento pode, também, se originar de absorção, transporte e utilização deficiente de nutrientes. Por exemplo, altas concentrações de NaCl no substrato de plantas de cevadas, supridas com baixas concentrações de magnésio, causaram reduções no crescimento devido, principalmente, à inibição da absorção e deficiência induzida de magnésio (CRAMER; NOWAK, 1992). Em substratos com uma disponibilidade razoável de fósforo a salinidade com NaCl pode aumentar a absorção de fósforo e reduzir o crescimento das plantas devido à alta toxicidade em fósforo (ROBERTS et al., 1984).

1.3.2.2.3. Papel do cálcio, desequilíbrios.

O papel do cálcio no aumento da tolerância à salinidade está bem documentado, assim como a indução da deficiência deste íon em plantas cultivadas em substratos salinos. A aplicação de gesso é uma prática comum em solos afetados por sais. Sob essas condições a aplicação de gesso pode aumentar consideravelmente a tolerância salina. Soja cultivado sob condições salinas e sódicas (COALE et al., 1984) a adição de gesso tem um efeito duplo: (1) melhora a estrutura e, conseqüentemente, a aeração do solo (2) e favorece o aumento da relação $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$, capacitando a raiz na restrição do influxo de Na^+ .

A importância do cálcio na tolerância das plantas ao sal foi enfatizada por La Haye e Epstein (1971) que demonstraram que o aumento do suprimento de CaSO_4 de 0,1 para 10 mM em feijão (*Phaseolous vulgaris*), submetido a 50 mM de NaCl causou um incremento na massa seca foliar de 0,46 para 0,74 g por planta e isto foi associado a um decréscimo drástico no conteúdo de Na^+ foliar de 1,4 para menos de 0,1 mmol.g^{-1} MS. De modo semelhante em *Citrus* a tolerância ao sal pode ser elevada através da aplicação de altas concentrações de cálcio no substrato, que suprime o transporte de Na^+ e Cl^- para as folhas (BANULS et al., 1991). Este efeito benéfico do cálcio está de acordo com sua função na integridade da membrana e controle de seletividade na absorção e transporte de íons. Por outro lado, altas concentrações de Na^+ podem inibir a absorção e o transporte de Ca^{2+} , levando a deficiência desse elemento em plantas cultivadas em substratos com baixa concentração de Ca^{2+} ou alta relação $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (LYNCH; LAUCHLI, 1985). Todavia, ainda de acordo como os mesmos autores, as espécies de plantas diferem consideravelmente em sua sensibilidade à deficiência de Ca^{2+} induzido. O suprimento de 80 mM de NaCl em *Brassica*

inibiu severamente o desenvolvimento das plantas, não podendo ser melhorado com o aumento da concentração de Ca^{2+} de 1 para 10 mM.

O incremento da salinidade em culturas irrigadas causa um aumento nas desordens fisiológicas relacionadas com o cálcio; como a queima nas extremidades das folhas do repolho (*Brassica pekinensis*). Ressalte-se que o aumento da umidade relativa durante a noite amenizou, em parte, este efeito negativo do cálcio (MIZRAHI; PASTERNAK, 1985).

Recentemente, a deficiência de cálcio induzida por sais levou vários autores (LAZOF; LAUCHLI, 1991; ZHU et al., 1998) a discutirem sobre a homeostase celular do Ca^{2+} na raiz bem como a transmissão de sinal de estresse salino da raiz para a parte aérea. ZHU et al. (1998) sugerem que concentrações elevadas de Na^+ podem deslocar o Ca^{2+} dos sítios de ligação das membranas plasmáticas intracelulares, impedindo a homeostase do Ca^{2+} nas células.

1.3.2.3. Efeitos do estresse salino na fisiologia e nos mecanismos de adaptação e tolerância

O termo “adaptação” segundo o GLOSSÁRIO - Módulo ecologia (2002) significa “acomodação de um organismo a condições adversas”. Amzallag et al., (1993) se referem à adaptação como uma resposta em longo prazo, envolvendo muitas gerações durante a qual a planta ajusta sua fisiologia às condições ambientais. Segundo esses autores, quando existe falta de informações precisas sobre a resposta da planta após a fase de indução, ou quando a resposta não é específica, não é possível dizer que a planta se adaptou especificamente às condições ambientais. Deve-se utilizar, neste caso, o termo aclimatação para descrever a acomodação da planta ao ambiente. Vários autores verificaram adaptações de células vegetais de diversas espécies tais como *Nicotina tabacum* (WATAD et al. 1985), *Citrus sinensis* (BEM-HAYYIM et al., 1989) *Medicago sativa* (Mc Coy, 1987), *Daucus carota* (CELLA et al., 1989) e *Solanum commersonii* (LEE et al., 1992), quando submetidas a diversas condições de estresse ambientais (sal, calor, frio, etc). Para que a adaptação ocorra, a célula ou o organismo deve estar no estado fisiológico próprio, mostrando-se “competente” para se submeter à mudança.

Amzallag et al. (1993) demonstraram que em sorgo (*Sorghum bicolor*), a planta está “competente” para se submeter à adaptação à salinidade somente durante um curto período, denominando-o de janela aberta, cerca de 5 a 10 dias após a germinação. Enquanto esta “janela do desenvolvimento” está aberta, a resposta adaptativa da planta é função da intensidade do estresse e da estabilidade do ambiente. Amzallag et al. (1993) e Sims e Pearcy (1992) verificaram, também, que a adaptação anatômica e fisiológica à intensidade luminosa só foi possível nas folhas que não alcançaram um estágio avançado de desenvolvimento. No sorgo, quando a “janela do desenvolvimento” está fechada, a planta não se adapta, mas responde à salinidade através de mecanismos de resistência pré-existentes. A resistência pré-existente resulta da expressão de mecanismos de defesa da planta contra o NaCl, mas não inclui nenhum aumento da tolerância à salinidade.

Os mecanismos de resistência, desenvolvidos ao longo da evolução, são muito importantes para a sobrevivência das plantas em ambientes estressantes. No entanto, ao se tentar “domesticar” as plantas visando a produção agrícola, deve-se ter bastante cuidado, porque a maioria das adaptações desenvolvida por elas resulta na redução da taxa líquida da fotossíntese, e conseqüentemente, na baixa produtividade da cultura (JONES; TURNER; OSMOND, 1981; PRISCO, 1986; TURNER, 1986).

Geralmente, a classificação de tolerância ou sensibilidade ao sal das espécies cultivadas é baseada em 2 parâmetros: no limite de CE e na percentagem de decréscimo da produção. A variabilidade genética dentro de uma espécie não é apenas uma ferramenta fundamental no estudo dos mecanismos de tolerância ao sal, mas, também, representa um papel fundamental na seleção de espécies tolerantes ao sal. Um certo progresso já foi alcançado neste sentido com o arroz irrigado e a cevada (EPSTEIN, 1980). A tolerância a salinidade de uma espécie ou cultivar pode variar durante a ontogênese. Ela pode diminuir ou aumentar, dependendo da espécie/cultivar ou de fatores ambientais. A beterraba, por exemplo é altamente tolerante durante maior parte do seu ciclo de vida, mas se mostra sensível durante a germinação. Por outro lado, a sensibilidade do arroz, tomate, trigo e cevada, normalmente, aumentam após a germinação (MAAS; HOFFMAN, 1977).

É muito difícil quantificar diferenças de tolerância à salinidade entre espécies intimamente relacionadas, tendo em vista que a redução no crescimento depende do período em que as plantas se desenvolveram nas condições salinas. A resposta à salinidade aplicada

durante um período curto pode ser a mesma entre variedades tolerantes e não tolerantes de uma mesma espécie. Por exemplo, em trigo a variedade “darium wheat”, considerada mais sensível ao sal que a “bread wheat” não apresentou diferença de resposta à aplicação de sal em curto prazo (MUNNS; SCHACHTMAN; CONDON, 1995). Isto permite deduzir que é necessário se considerar os diferentes mecanismos envolvidos no controle do crescimento da planta bem como o tempo de exposição à salinidade. Pesquisas envolvendo o tempo de exposição ao NaCl durante o estágio de desenvolvimento da planta levam a concluir a existência de dois tipos de respostas: (1) a primeira fase de redução do crescimento é devido à presença de sal no meio externo da raiz, podendo ser considerada como fase osmótica ou de estresse hídrico, onde a redução do crescimento é regulada por sinais hormonais provenientes da raiz. (2) a segunda fase resulta de danos internos, devido ao acúmulo de sais nas folhas com alta taxa de transpiração, excedendo a capacidade das células em compartimentar estes sais no vacúolo. Isto irá inibir o crescimento das folhas mais jovens através da redução do suprimento de carboidratos às células em desenvolvimento (MUNNS; SCHACHTMAN; CONDON, 1995).

1.3.2.4. Mecanismos de adaptação ao estrato salino

A princípio, a tolerância ao sal pode ser alcançada através da exclusão ou inclusão do sal. A adaptação por meio da exclusão do sal requer mecanismos para evitar um déficit hídrico interno. A adaptação por meio da inclusão pode ocorrer através de uma alta tolerância ao Na^+ e Cl^- , ou evitando-se altas concentrações salinas no tecido. Embora possa se fazer uma distinção clara entre “incluidoras” e “excluidoras” de sais, existe, na realidade, um espectro contínuo de diferentes graus de inclusões e exclusões, entre Na^+ e Cl^- e entre diferentes partes e órgãos das plantas. Na beterraba a tolerância se baseia, principalmente, na inclusão de sais e sua utilização para manutenção do turgor ou na substituição do K^+ pelo Na^+ em várias funções metabólicas (GORHAM et al., 1985). O crescimento aumenta com a salinidade e os níveis de Na^+ e Cl^- aumentam nos tecidos mas os níveis de K^+ e Ca^{2+} diminuem devido a competição catiônica.

Nas glicófitas o mecanismo predominante é o de exclusão (GREENWAY e MUNNS, 1980). Todavia a classificação das glicófitas como “excludoras” é apenas um termo relativo, isto é, significa uma absorção salina mais baixa, comparada às “includoras”. Este termo é aplicado, em geral, para o transporte salino das raízes para as folhas. O feijoeiro apresenta baixa tolerância ao estresse salino e a toxicidade com Cl^- é a principal causa da redução do crescimento em baixos níveis salinos. Ao contrário do Cl^- , o transporte do Na^+ para a parte aérea da planta é bastante restrito no feijoeiro. O feijoeiro, assim como muitas outras culturas sensíveis ao sal, é um eficiente excludor de Na^+ mas não de Cl^- (CARDOSO, 2000).

Diferenças na capacidade de exclusão de Na^+ e Cl^- existe entre os diversos cultivares de uma espécie. Por exemplo, a maior tolerância de certos cultivares de trigo (BERNAL; BINGHAM ; OERTLEI, 1974), cevada (GREENWAY; MUNNS, 1980) e *Citrus* (MAAS, 1993) está relacionada a uma restrição mais eficiente no transporte de Na^+ e Cl^- para a parte aérea da planta.

Os mecanismos que restringem o transporte excessivo de Na^+ e Cl^- para a parte aérea das plantas cultivadas em substratos salinos operam em nível de raiz (tais como propriedades da raiz, características anatômicas) e no percurso da raiz para a parte aérea. A retranslocação do Na^+ da parte aérea para as raízes pode contribuir para diminuir o conteúdo de Na^+ foliar em espécies sensíveis como o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*).

Nas halófitas como a *Avicenia marin*, exposta a água do mar, cerca de 80% do sal depositado na superfície radicular através de fluxo de massa é excluído (WAISEL et al., 1986). Em muitas halófitas as barreiras contra o influxo passivo de sais são particularmente desenvolvidas na raiz, podendo-se citar, por exemplo, a banda de Caspari que é 2-3 vezes mais desenvolvida do que nas glicófitas. Nas glicófitas as diferenças na permeabilidade da membrana ao Na^+ e Cl^- ou bombas excludoras na membrana plasmática são os principais mecanismos em nível de raiz que restringem a absorção e o fluxo raiz-parte aérea (MUNNS, 1993). Em resposta ao estresse salino, o aumento da membrana plasmática e da atividade da ATPase da bomba de H^+ podem ser observados em raízes de cevada (MATSU-MOTO; CHUNG, 1988).

Em estudo com o tomateiro, a tolerância entre cultivares sebaseou em diferentes mecanismos: o cultivar mais tolerante restringiu efetivamente a translocação de Na^+ e Cl^- para a parte aérea, enquanto que o cultivar menos tolerante acumulou Na^+ e Cl^- na parte aérea e,

simultaneamente, apresentou menor conteúdo de K^+ do que o primeiro (PÉREZ-ALFOCEA et al., 1993).

Nos tipos “includores”, a partição de Na^+ e Cl^- em vários tecidos e órgãos da parte aérea é um mecanismo de grande importância. Essa partição pode ocorrer entre folhas jovens e velhas, entre tipos de células e entre órgãos vegetativos e reprodutivos. A restrição à importação de Na^+ e Cl^- para folhas jovens é uma característica para espécies tolerantes ao sal. Para a tolerância à salinidade não é apenas a quantidade de sais totais na parte aérea da planta que deve ser levado em conta, mas, principalmente, a capacidade de manter um gradiente de Na^+ e Cl^- entre as folhas velhas e novas, restringindo a importação para as folhas jovens, inflorescências e sementes, como foi demonstrado para o trigo e milho (GORHAM et al., 1986).

1.3.2.5. Acumulação de solutos orgânicos

A maioria das plantas acumula solutos orgânicos quando submetidas ao estresse osmótico. Vários estudos indicam que as concentrações elevadas de solutos orgânicos no citoplasma podem conferir as seguintes funções: (1) contribuição no balanço osmótico quando os eletrólitos no citoplasma estão em menor concentração do que no vacúolo (STEWART; LEE, 1974) e (2) um efeito protetor nas proteínas e estruturas celulares quando na presença de uma concentração elevada de eletrólitos no citoplasma (POLLARD; WYN, 1979). As enzimas das plantas podem ser protegidas contra os efeitos deletérios do NaCl (HELLEBUST, 1976), como foi mostrado para a malatodesidrogenase em cevada (POLLARD e WYN JONES, 1979), para a fosfoenolpiruvato carboxilase na glicófito *Zea mays* e nas halófitas *Suaeda monoic* (SHOMER-LLAN; WAISEL, 1986) e *Salsolka soda* (MANETAS, 1990).

Os aminoácidos são fatores chaves no desenvolvimento das plantas superiores. Além do mais, eles agem como moléculas sinalizadoras, controlando seu próprio metabolismo e a expressão de diversos gens (NIELSEN et al., 1998). Sob condições de estresses ambientais muitas plantas acumulam solutos tais como a prolina e a glicina-betaina. A Prolina é sintetizada no citosol, principalmente a partir do Glutamato via 1-pirroline-5-carboxilato

(P5C), catalizado pelo P5C-sintetase (P5CS) e P5C-reductase (RENTSCH et al., 1996; SCHWACKE et al., 1999). Sua função sob condições de estresse não está totalmente esclarecida. Esse iminoácido é tido como um osmólito compatível, que pode servir como um protetor de moléculas ou mesmo um eliminador de radicais livres (SMIRNOFF; CUMBES, 1989). Além do mais, a prolina pode servir como uma fonte de nitrogênio, carbono e equivalentes redutores durante a recuperação do estresse (BLUM; EBERCON, 1976; AHMAD; HELLEBUST, 1988).

Apesar de *Vigna unguiculata* ser considerada uma espécie de baixo potencial de ajustamento osmótico (McCREE; RICHARDSON, 1987), trabalho recente em nossas condições, tem mostrado que sob condições de estresse hídrico essa espécie apresentou um incremento de cerca de 30 vezes na concentração de prolina nas raízes. O aumento foi rápido, assim como o decréscimo após a rehidratação (COSTA, 1999). Foi proposto que esse aminoácido participa do ajustamento osmótico de plantas de feijão-de-corda submetidas ao estresse hídrico. Entretanto, a efetividade da prolina como um agente que pode conferir tolerância diferencial a essa espécie ainda permanece como uma questão em aberto, inclusive para condições de estresse salino (SILVEIRA et al., 2000).

A via do glutamina que conduz a prolina foi primeiramente estabelecida em bactéria, sendo depois identificada em plantas. Os primeiros passos envolvem uma enzima bifuncional 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) com a γ -glutamyl kinase (GK) e a glutamic- γ -semialdehyde dehidrogenase (GSAD) (DELAUNEY; VERMA, 1993; HU et al., 1992). O estímulo da biossíntese da prolina sob estresse salino foi primeiramente associado a um aumento dos níveis da P5CR e do mRNA da P5CS (HU et al., 1992; YOSHIBA et al., 1995). Diversos estudos têm indicado que a P5CS é a enzima crítica na biossíntese da prolina (SZOKE et al., 1992; KAVI et al., 1995). A atividade da GK nas plantas, como foi demonstrado em cevada (KUEH et al., 1984) e *Vigna aconitifolia* (ZHANG et al., 1995) é retro inibida pela prolina, o produto final (FUJITA et al., 1998). A contribuição da via ornitina na acumulação da prolina, durante o estresse, ainda é uma questão em discussão (HERVIEU et al., 1995).

A acumulação de prolina e de outros solutos orgânicos compatíveis pode contribuir para o ajustamento osmótico do citosol. Essa adaptação pode resultar numa tolerância maior ao estresse hídrico e salino que pode ocorrer em xerófitas, halófitas e mesófitas. O

ajustamento osmótico é definido como diminuição do potencial osmótico em resposta ao déficit hídrico ou à salinidade (TURNER, 1979 e 1986), que permite a manutenção de uma turgescência positiva em potenciais hídricos relativamente mais baixos (JONES; TURNER, 1980).

1.3.2.6. Fotossíntese e respiração

Os níveis de salinidade e a área foliar geralmente estão inversamente relacionados. Portanto, com o aumento da salinidade a perda de água pela planta através da transpiração tende a diminuir, enquanto que a respiração aumenta, levando a reduções drásticas na acumulação de CO₂ por unidade de área foliar. Menores taxas de fixação de CO₂ durante o período luminoso podem ser causadas pelo déficit hídrico, fechamento parcial dos estômatos, perda de turgor das células mesofílicas através da acumulação de sais no apoplasto ou pelo efeito tóxico dos íons (REDMANN, 1995).

A salinidade reduziu a assimilação de CO₂, a condutância estomática e o potencial hídrico em folhas de citrus (BEHBOUDIAN; TÖRÖKFALVY; WALKER, 1982, WALKER et al., 1982). Huang, Murray e Yang (1994) observaram decréscimos significativos na condutância estomática e na taxa fotossintética em trigo (*Triticum aestivum* L.) exposto a 50 mM de NaCl.

O acúmulo tóxico de Na e Cl nas folhas tem sido correlacionado ao fechamento de estômatos e a fatores não estomatais, tais como redução no conteúdo clorofílico, ambos limitando a quantidade de produção de fotoassimilatos (ROMERO; SYVERTSEN, 1996). Em arroz, a baixa concentração de NaCl não afetou a taxa fotossintética exceto nas folhas mais velhas, onde o decréscimo na fotossíntese líquida foi inversamente relacionado com a concentração de Na⁺ foliar (YEO et al., 1991).

Nas plantas submetidas ao estresse salino em experimentos a longo prazo, a resposta ao NaCl pode ser estimada pela concentração salina máxima tolerada pelas folhas em expansão. Se a taxa das folhas mortas se aproximar da taxa de expansão das folhas novas a área fotossintética se tornará bastante reduzida para suportar um crescimento contínuo (MUNSS; TERMAAT, 1986).

1.3.2.7. Síntese proteica

A síntese proteica nas folhas das plantas submetidas ao estresse salino, normalmente, diminui em resposta ao déficit hídrico ou a um efeito iônico específico. Os efeitos do NaCl na síntese proteica podem ser devido a toxicidade ao Cl^- em espécies sensíveis (soja, por exemplo), enquanto que nas plantas mais tolerantes (cevada, por exemplo) o principal responsável é o desbalanço Na^+/K^+ nas folhas. O efeito adverso de altas concentrações de NaCl sobre o conteúdo de K^+ e síntese proteica na cevada pode ser contrabalançado pelo KCl, a despeito de um decréscimo posterior no potencial osmótico e aumento na concentração de Cl^- do substrato. Na cevada a troca de Na^+ por K^+ pode levar a um ajustamento osmótico nas folhas em expansão, mas não a manutenção da síntese proteica. Exceto em algumas halófitas, o Na^+ não pode substituir K^+ em sua função na síntese proteica, independentemente da tolerância do cultivar dentro de uma determinada espécie (GIBSON et al., 1984).

Estudos sobre a senescência em folhas de arroz (KAO; YANG, 1983), e de aveia (SATLER; THIMANN, 1983) mostraram reduções no conteúdo de clorofila, nos níveis de carotenóides e nas concentrações de proteínas solúveis. Segundo a literatura, o estresse salino pode provocar reações diversas na concentração de proteínas solúveis, a nível radicular e foliar. Vários trabalhos se reportam sobre os efeitos do estresse na redução do conteúdo de proteínas solúveis nas plantas (HECKATHORN; DE LUCIA; ZIELINSKI, 1997; CARDOSO, 2000). Outros autores verificaram que o estresse salino pode não influenciar na concentração de proteínas solúveis (MELO, 1999; FERREIRA, 2000) ou pode incrementá-la (SILVA, 2002, MATOS, 2001). Diversos trabalhos mostram que o decréscimo na concentração de proteínas solúveis totais é uma resposta típica ao estresse salino (BARNETT; NAYLOR, 1966; ABUL-KADIR; PAULSEN, 1982). Todavia, de acordo com Helal e Mengel (1979) não foi encontrada nenhuma relação entre o conteúdo protéico, o N-total e o decréscimo em biomassa, sendo o decréscimo no conteúdo protéico resultante do processo de senescência e da degradação dos substratos respiratórios (KANG; TITUS, 1989).

1.3.2.8. Efeitos do estresse salino sobre a atividade de enzimas limitantes do crescimento: redutase de nitrato

O nitrogênio é o nutriente mineral mais importante para o crescimento e produção das plantas (SILVEIRA, 1987). Sob condições de salinidade, a aquisição e assimilação de nitrato frequentemente limitam o crescimento e o ajustamento osmótico das plantas cultivadas (RABER, 1993; SILVEIRA et al., 1998). A redução assimilatória do nitrato, através de redutase de nitrato (EC.1.6.6.1), representa o principal ponto de controle quando a fonte externa é o nitrato, enquanto que a atividade de glutamina sintetase (EC.6.3.1.2) representa o mais importante passo de controle da assimilação de amônia até aminoácidos (LEA, 1997). Esses processos do metabolismo do nitrogênio são fortemente interdependentes e estão sob forte regulação metabólica por fatores endógenos e fatores exógenos da planta.

A redutase de nitrato (RN) nas plantas superiores apresenta mecanismos de regulação bastante complexos. A enzima encontra-se principalmente na forma reduzível pelo seu substrato, RN-NADH-dependente (SILVEIRA, 1985). Diversos fatores bioquímicos (níveis de trioses-fosfato e hexoses-fosfato, Mg^{2+} , ATP, citocininas, etc, além de fatores externos (luz, temperatura, umidade) regulam sua atividade (LEA, 1997). A atividade de RN é extremamente sensível ao déficit hídrico na planta (FOYER et al., 1998). Por outro lado, sua resposta ao estresse salino é bastante contraditória (MELO et al., 1999). O tipo de resposta de RN à salinidade depende da espécie vegetal, da intensidade do estresse e do nível de nitrato (SILVEIRA et al., 1997). Aparentemente, a enzima é pouco sensível à presença de Na^{+} e Cl^{-} , sendo os efeitos indiretos da salinidade mais importantes sobre a atividade da enzima que os efeitos tóxicos dos íons salinos. Por outro lado, as outras enzimas que atuam na assimilação do N (glutamina sintetase e glutamato sintase) são menos sensíveis ao déficit hídrico (FOYER et al., 1998).

Nas plantas superiores a glutamina sintetase (GS) é a enzima chave envolvida na assimilação do nitrogênio inorgânico (NH_3) em formas orgânicas (MIFLIN, 1974). A GS cataliza a condensação da amônia com o glutamato até a glutamina que depois fornece grupos de nitrogênio, diretamente ou via glutamato, para a síntese de todos os compostos nitrogenados na planta (LEA et al., 1989). Dois grupos de isoenzimas de GS, plastídica (GS_2)

e citosólica (GS₁) foram s nas plantas superiores (HIREL et al., 1993). Na maioria das plantas superiores a GS₂ predomina nos cloroplastos e está localizada no estroma (DUBOIS et al., 1996). Em um número limitado de espécies, tais como legumes, a GS₂ mostrou-se presente, também, nos plastídios das raízes (VEZINA; LANGLOIS, 1989). A GS₂ é indispensável para a reassimilação da amônia proveniente do ciclo do nitrogênio da fotorespiração. O papel fisiológico da GS₁ ainda não foi elucidado.

Quando ocorre uma alta taxa de síntese de prolina em plantas submetidas ao estresse salino, torna-se imprescindível um suprimento significativo de glutamato (BERTELI; NISSEN, 1995). RHODES, HANDA e BRESSAN (1986) demonstraram que, sob condições de estresse osmótico, o ciclo da GS-GOGAT é a fonte mais importante de glutamato. Plantas de tomates cultivadas sob condições de estresse, apresentaram maior atividade de GOGAT, enquanto que a atividade da GS diminuiu ligeiramente (BERTLELI et al., 1995). Esses resultados evidenciam que o acúmulo de prolina no tecido depende da disponibilidade de glutamato. Por outro lado, estudos em células de tabaco tolerantes à salinidade bem como a super-expressão da enzima P5CR, que cataliza o último passo na síntese de prolina, mostraram que esta enzima não está correlacionada com a tolerância à salinidade. Esses autores sugeriram que outras reações na via do glutamato parecem ser mais limitantes para o aumento na síntese da prolina. Recentemente, Costa (1999) e Cardoso (2000), trabalhando com plantas de *Vigna unguiculata*, submetidas ao estresse salino, observaram um aumento paralelo entre a atividade de GS e a concentração de prolina nas folhas. Por outro lado, é possível que condições de estresses ambientais, como o estresse hídrico e salino, possam conduzir ao aumento do catabolismo de proteínas (RABE, 1993), produzindo altas quantidades de amônia e aminoácidos. A amônia produzida sob estas condições pode ser reassimilada através do ciclo GS/GOGAT (LEA, 1997).

1.3.2.9. Resposta do cajueiro à salinidade

Apesar do cajueiro ser cultivado intensivamente na faixa litorânea da região nordeste do Brasil, portanto em condições sujeitas à salinidade, são escassos os trabalhos sobre as respostas da espécie ao estresse salino. Viegas et al. (1999) e Matos (2000), trabalhando com muda de cajueiro anão em casa de vegetação submetida a diferentes níveis de estresse, chegaram a conclusão que as plantas jovens de cajueiro mostraram-se moderadamente

sensíveis ao estresse salino. Essa espécie é capaz de acumular grande quantidade de prolina nas suas folhas em resposta ao NaCl (VIÉGAS; SILVEIRA, 1999; SILVEIRA et al. 2002). As atividades de RN e GS em folhas de mudas de cajueiro submetidas a 50 e 100 mM de NaCl apresentaram respostas opostas: enquanto a primeira enzima se mostrou sensível a segunda teve sua atividade estimulada (VIÉGAS; MELO; SILVEIRA, 1999), indicando que RN esteve relacionada com o crescimento e GS envolvida com o suprimento de glutamato para a síntese de prolina.

A sensibilidade de mudas de cajueiro anão ao NaCl foi fortemente relacionada com o rápido fechamento estomático e acumulação progressiva de Na^+ e Cl^- nas folhas (MATOS, 2001). Após longa exposição ao NaCl observou-se redução nas concentrações de K^+ , Ca^{+2} e Mg^{+2} , especialmente nas raízes do clone CP09, enquanto que no CP06 verificou-se um decréscimo apenas na concentração de K^+ (SILVA, 2002). O decréscimo no conteúdo relativo de água e senescência seguida de abscisão nas folhas mais velhas das plantas de cajueiro anão cultivadas em vermiculita e estressadas com NaCl (SILVA, 2001; MATOS, 2001) sugerem que o efeito osmótico foi mais importante do que o efeito de toxicidade iônica como aqueles observados por Viégas (1999), trabalhando em condições de solução nutritiva. Portanto, o tipo de substrato deve influenciar no tipo de resposta de mudas de cajueiro expostas ao excesso de sais no sistema radicular. Essas respostas (osmótica versus iônica) aparentemente dependem da homeostase estabelecida entre a taxa de crescimento e a taxa de absorção dos íons salinos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo comparar a tolerância ao estresse salino e a expressão de caracteres fisiológicos, entre mudas de três genótipos de cajueiro, submetidas a doses crescentes de NaCl.

2.2. Objetivos específicos

1. Comparar a tolerância diferencial das mudas em termos do crescimento e partição da biomassa das partes das plantas;
2. Analisar a acumulação de solutos inorgânicos e orgânicos em folhas e raízes e relacioná-la com a tolerância;
3. Estudar o efeito de níveis de NaCl sobre as atividades de redutase de nitrato e glutamina sintetase e relacioná-la com a tolerância ao estresse salino;
4. Verificar os efeitos do NaCl em variáveis relacionadas com o uso da água: condutância estomática, transpiração, temperatura foliar, conteúdo de água e transpiração total e relacioná-las com a tolerância ao estresse salino.

3. TRABALHOS DESENVOLVIDAS

As atividades desenvolvidas nesta tese foram realizadas obedecendo quatro trabalhos específicos a seguir relacionados e conforme os objetivos específicos anteriormente relacionados.

3.1 - TRABALHO I – Crescimento comparativo de mudas de três ecótipos de cajueiro (comum, anão e microcarpo) submetidos a diferentes níveis de NaCl.

3.1.1. Introdução

A seleção de porta-enxertos na formação de mudas de frutíferas é um fator importante na produtividade e qualidade do produto, especialmente para as condições de estresse originadas no meio de crescimento do sistema radicular (MATOS, 2001). No caso de *Citrus*, diversos trabalhos têm demonstrado que o tipo de porta-enxerto exerce forte influência no crescimento da muda sob condições de estresse salino (BEHBOUDIAN; TÖRÖKFALVY; WALKER, 1986; BEM-HAYYIM, 1989; GARCÍA-LEGAZ, 1993). No caso do cajueiro, ocorrem, atualmente, dois problemas sérios: (1) baixa disponibilidade de espécies vegetais, incluindo *A. occidentale* L. que apresentem qualidades superiores para servirem de porta-enxerto para o cajueiro anão; (2) baixa variabilidade genética entre as atuais progênies de cajueiro anão (BARROS; CAVALCANTI; PAIVA, 2000). Com a expansão da cultura do cajueiro, nas áreas irrigadas na região semi-árida tropical, o problema da salinização dos solos tende a se agravar (VIÉGAS e SILVEIRA, 1999). Portanto, a seleção de materiais tolerantes ao estresse salino é fundamental para se alcançar produtividades elevadas e sustentáveis nessas regiões.

As plantas nativas são frequentemente usadas como fonte de resistência ou tolerância nos programas de melhoramento genético. Assim, vários órgãos internacionais são responsáveis pela coleção, manutenção e distribuição destes tipos de germoplasma para

pesquisadores em nível mundial com vistas à utilização em programas de melhoramento. Vários estudos mostram que algumas plantas nativas e exóticas possuem alta tolerância à salinidade e que tais características podem ser transferidas para culturas cultivadas através de melhoramento (FAGERIA; GHEYI, 1997). Por exemplo, *Lycopersicon cheesmani*, planta exótica de tomate possui alta tolerância à salinidade e pode produzir satisfatoriamente, mesmo quando se utiliza água do mar, com nível de salinidade considerado altamente tóxico para tomateiros cultivados (WOODS, 1996).

Os resultados de avaliação de progênies para tolerância à salinidade devem ser analisados e interpretados adequadamente antes de serem aplicados na prática. Os critérios de avaliação podem ser as características morfológicas (folhas mortas, redução em peso da matéria seca, etc) e as características fisiológicas (acumulação e exclusão de íons, ajustamento osmótico, etc). A seleção baseada em parâmetros fisiológicos resulta em maior sucesso no desenvolvimento de cultivares tolerantes à salinidade. Alguns trabalhos de revisão, publicados neste sentido (LAUCHLI; EPSTEIN, 1990; FAGERIA; GHEYI, 1997), mostram que vários mecanismos de tolerância são envolvidos. Ainda mais, a importância relativa de muitos mecanismos varia entre espécies de plantas (RUSH; EPSTEIN, 1981) e entre cultivares de uma mesma espécie (YEO; FLOEWERS, 1983). Faltam informações sobre o controle genético destes mecanismos assim como da interação do ambiente com a expressão de genes envolvidos com os mecanismos de tolerância.

A tolerância à salinidade é determinada normalmente em função da percentagem de biomassa produzida em solos salinizados versus as condições controle, durante um período de tempo prolongado. Por exemplo, a aplicação de 200 mM de NaCl durante determinado tempo em uma espécie tolerante ao sal, como a beterraba, pode causar uma redução de apenas 20% na sua matéria seca. Numa espécie de tolerância moderada, como o algodão, pode resultar numa redução de 60% e numa espécie sensível, como a soja, pode conduzir a morte da planta. Por outro lado, a *Suaeda maritima*, nas mesmas condições citadas (sob 200 mM), pode estar se desenvolvendo normalmente (MUNNS, 2002). Ainda de acordo com o mesmo autor, a tolerância ao sal pode ser mensurada em termos de sobrevivência, sendo uma medida apropriada para espécies perenes, mas para espécies anuais a taxa de crescimento é uma medida mais prática por se correlacionar melhor com a produção. É muito difícil quantificar diferenças de tolerância à salinidade entre espécies relacionadas, tendo em vista

que a redução no crescimento depende do período em que as plantas se desenvolveram nas condições salinas.

A resposta à salinidade, durante um período curto, pode ser a mesma quando se compara variedades tolerantes e não tolerantes de uma mesma espécie. Por exemplo, plantas de trigo da variedade “darium wheat”, considerada mais sensível ao sal que a “bread wheat” não apresentou diferença de resposta à aplicação de sal em curto prazo (MUNNS; SCHACHTMAN; CONDON, 1995). Isto permite deduzir que é necessário se considerar os diferentes mecanismos envolvidos no controle do crescimento da planta bem como o tempo de exposição à salinidade. Pesquisas envolvendo o tempo de exposição ao NaCl durante o estágio de desenvolvimento da planta sugerem a existência de dois tipos de respostas: A primeira fase de redução do crescimento é devido à presença de sais no meio externo da raiz, podendo ser considerada como fase osmótica ou de estresse hídrico, onde a redução do crescimento é regulada por sinais hormonais provenientes da raiz. A segunda fase resulta de danos internos, devido ao acúmulo de sais nas folhas com alta taxa de transpiração, excedendo a capacidade das células em compartimentar estes sais no vacúolo. Isto irá inibir o crescimento das folhas mais jovens através da redução do suprimento de carboidratos às células em desenvolvimento (MUNNS; SCHACHTMAN; CONDON, 1995).

Neste trabalho, comparou-se a tolerância diferenciada a diferentes níveis de NaCl, em três progênies de cajueiro (“cajueiro anão”, *Anacardium occidentale* L., “cajueiro comum” *Anacardium occidentale* L., e “cajueiro microcarpo”, *Anacardium microcarpum* DUKE). As progênies foram oriundas de sementes de árvores cultivadas ou desenvolvidas em ambientes bastante distintos visando obter variabilidade genética. A tolerância ao estresse salino foi estimada através da capacidade de produção e distribuição da fitomassa, assim como através da dose de NaCl capaz de reduzir em 50% a massa das folhas.

3.1.2 – Materiais e Métodos

3.1.2.1. Material vegetal

As mudas, utilizadas neste trabalho, foram obtidas a partir de sementes de cajueiros de três diferentes genótipos (FIGURA 1), que apresentam características distintas quanto ao fenótipo (tipo de porte, tamanho de castanha, precocidade de floração etc), especialmente o tipo comum que pode apresentar uma redução de seu porte, quando habita áreas costeiras de dunas móveis (FIGURA 1C-2).

As castanhas do cajueiro comum - conhecido popularmente como “comum da praia” (*Anacardium occidentale* L), foram provenientes da praia do Barro Preto, município de Aquiraz/Ceará. As castanhas do cajueiro anão (*Anacardium occidentale* L.) CP76, e as do microcarpo (*Anacardium microcarpum* Ducke) foram provenientes da Unidade Experimental da Universidade Federal do Ceará – UFC, situada na região litorânea do município de Caucaia/Ceará. As castanhas dos três genótipos (FIGURA 1D) apresentam aspectos morfológicos diferentes. O microcarpo, apesar de seu porte elevado, apresenta castanhas bem menores, conhecidas na região como “cajui”. Dessa maneira, as três progênies utilizadas no presente estudo se caracterizam por apresentar diferenças marcantes de suas fenofases a despeito de existirem evidências de baixa variabilidade genética entre eles (CUNHA, 2002).

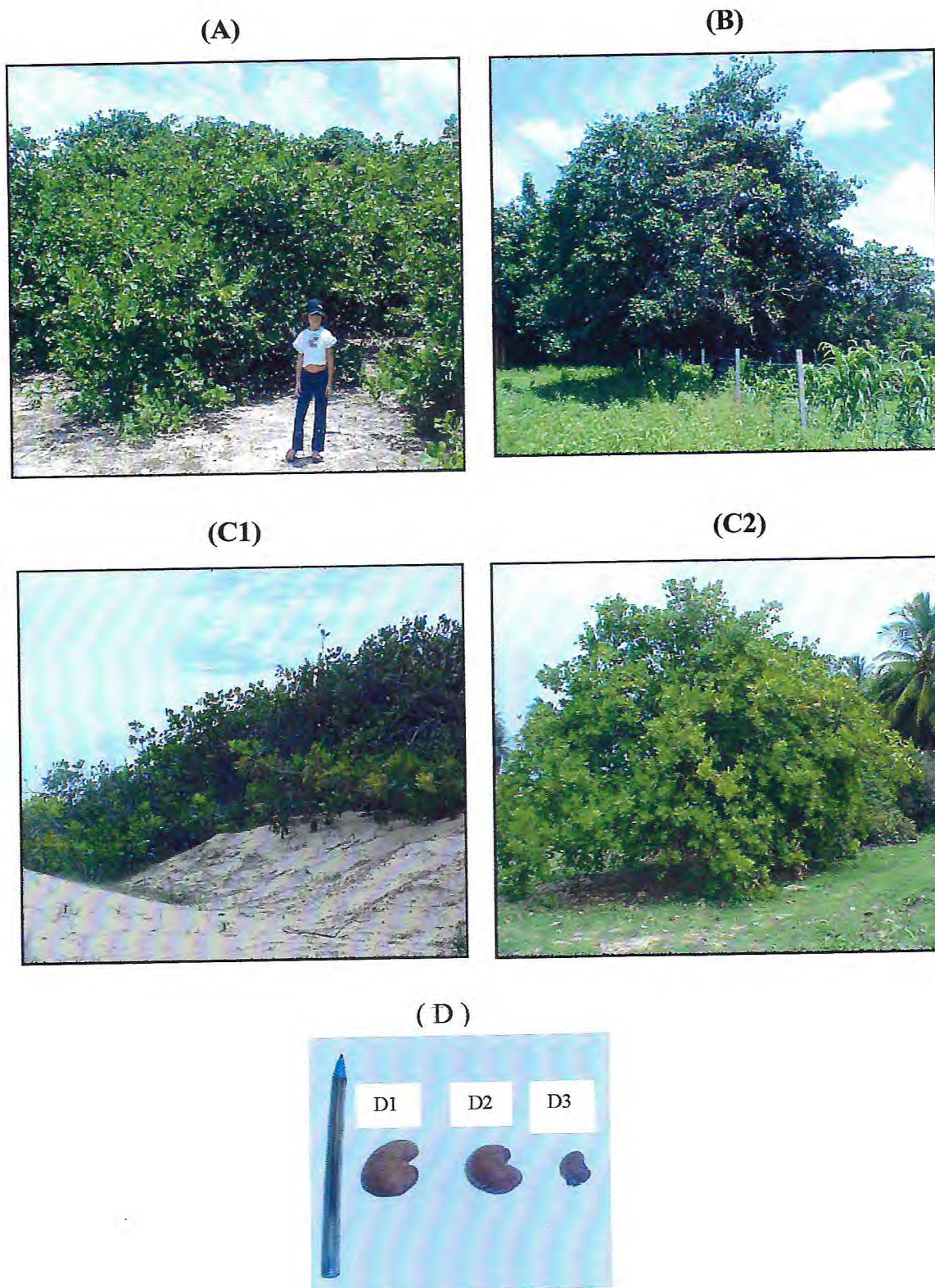


FIGURA 1. Plantas matrizes de cajueiro (A) anão (*Anacardium occidentale*, var. *nanum*); (B) microcarpo (*A. microcarpum*) e (C-1, C-2) comum (*A. occidentale* L.) e (D) castanhas das matrizes : (D1) anão, (D2) microcarpo e (D3) comum.

3.1.2.2. Substrato e solução nutritiva para crescimento das mudas

Para germinação, foi utilizada vermiculita de textura média, acondicionada em bandejas plásticas do tipo “leiteira”, com dimensões de 55 cm x 35cm x 20 cm. Após o período de germinação, as mudas foram transferidas para vasos de Leonardo contendo areia grossa ($\text{Ø} \geq 2\text{mm}$). A areia foi previamente lavada com água corrente e, em seguida, por 5 vezes com água destilada. Esse substrato foi acondicionado em vasos de Leonard modificados, produzidos a partir de recipientes de vidro, com capacidade para de 1 litro. Os recipientes foram cortados nas duas extremidades opostas, ajustados um sobre o outro em sentido contrário, sendo a parte externa pintada com tinta cor prata. As partes inferior e superior dos vasos apresentaram 20 cm de altura e 9 cm de diâmetro, perfazendo um volume de aproximadamente 800 cm^3 em cada parte. Os recipientes utilizados para a confecção dos vasos de Leonardo foram do tipo reagente químico. Foram necessários dois recipientes para produzir cada vaso de Leonard.

A nutrição das plantas foi conduzida por meio de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada por Viégas (1999) para cultivo de mudas de cajueiro, com a seguinte composição: $4,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$ em KNO_3 ; $3,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$ em $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; $1,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$ em CaCl_2 ; $1,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$ em MgSO_4 ; $1,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$ em K_2HPO_4 ; $1,0 \text{ }\mu\text{mol.dm}^{-3}$ em B^{3+} ; $0,9 \text{ }\mu\text{mol.dm}^{-3}$ em Mn^{2+} ; $1,8 \text{ }\mu\text{mol.dm}^{-3}$ em Cl_2^- ; $0,03 \text{ }\mu\text{mol.dm}^{-3}$ em Cu^{2+} ; $0,07 \text{ }\mu\text{mol.dm}^{-3}$ em Zn^{2+} e $10,0 \text{ }\mu\text{mol.dm}^{-3}$ em Fe^{3+} -EDTA. A solução nutritiva foi fornecida com 1/5 da concentração iônica original durante as duas primeiras semanas de estabelecimento das mudas. Após essa fase, a solução foi fornecida sem diluição. As soluções nutritivas das plantas controle e tratadas com NaCl foram renovadas a cada dois dias e o seu pH mantido próximo a $5,5 (\pm 0,5)$ mediante utilização de soluções estoque contendo $0,10 \text{ mol m}^{-3}$ de NaOH ou HCl.

3.1.2. 3. Condições ambientais do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, situada no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil, nas coordenadas geográficas com latitude $3^{\circ}44'S$ e longitude $38^{\circ}33'W$ e clima do tipo AW na classificação de KÖEPPEN. O trabalho foi desenvolvido no período de maio a setembro de 1999. Os valores médios de temperatura diurna e noturna foram de 27 e 24 °C, respectivamente. A variação de umidade relativa média do ar de 40 a 80% e fotoperíodo médio de 12 horas de insolação. A quantidade máxima média de radiação fotossinteticamente ativa foi, aproximadamente, $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (às 12:00 hs), mensurada com um “quantun sensor” acoplado ao porômetro LI-160, “steady state porometer”, LI-Cor, USA).

3.1.2.4. Condução das plantas

As sementes dos três genótipos foram, inicialmente, esterilizadas em solução comercial de hipoclorito de sódio comercial 10% (v/v), durante 10 minutos, quando então foram exaustivamente lavadas com água destilada de forma a permitir uma completa remoção do agente esterilizante. Logo após, as sementes foram imersas em água destilada, por um período de 24 horas, com vistas a acelerar o processo da germinação (VIÉGAS, 1999). Em seguida, as mesmas foram acondicionadas para germinar em um leito contendo vermiculita saturada com solução de $0,10 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}$ de CaSO_4 (VIÉGAS, 1990). Após a emergência, 15 dias para o anão e o comum, e 25 dias para o microcarpo, as mudas permaneceram na vermiculita e foram irrigadas com água destilada até atingir uma altura de aproximadamente 15 cm, cerca de 10 dias após a emergência. Em seguida, foram selecionadas pela uniformidade de altura para o transplante. As plantas jovens foram cuidadosamente retiradas da vermiculita, através de lavagem das raízes, seguidas de imersão em bandejas contendo CaSO_4 $0,10 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}$, para evitar choque osmótico e danos nas membranas. Em seguida, foram transplantadas para os vasos de Leonard modificados contendo areia lavada. As mudas transplantadas foram irrigadas duas vezes ao dia, com a

solução nutritiva modificada de Hoagland e Arnon (1950), inicialmente diluída 1/5, durante oito dias, para aclimatação (VIÉGAS, 1999). A irrigação foi conduzida adicionando-se a solução na parte superior dos vasos. O volume evapotranspirado foi diariamente completado com água destilada para 800 cm³. Neste caso, a adição da água destilada foi na parte inferior dos vasos. A solução nutritiva foi trocada totalmente duas vezes por semana. As mudas de cada genótipo de cajueiro permaneceram nesse sistema por diferentes períodos: os cajueiros comum e anão foram mantidos até atingirem uma idade fisiológica de 44 dias após emergência. Nesta idade as plantas possuíam semelhante estágio de desenvolvimento indicado pela altura (média de 25 cm) e número de folhas (média igual a 12). O cajueiro microcarpo, por ser mais tardio, permaneceu naquele substrato até atingir uma idade de 68 dias após emergência; ocasião em que apresentava o mesmo padrão de desenvolvimento dos demais (altura e número de folhas).

3.1.2.5. Tratamentos e colheitas

Visando avaliar a performance das três progênies na presença de diferentes condições de estresse salino, concentrações de 50, 100, 150 e 200 mM de NaCl foram adicionadas a solução nutritiva. De acordo com Viégas (1999), estas concentrações correspondem, aproximadamente, aos níveis baixo, médio, alto e muito alto, respectivamente. A intensidade e periodicidade da aplicação das soluções contendo NaCl foram feitas conforme descrito anteriormente (sub-item 2.4). O tratamento com solução nutritiva sem adição de NaCl foi tomado como controle. O critério adotado para o tempo de exposição à salinidade baseou-se na mortalidade de mais que 50% das folhas nas plantas submetidas a 200 mM de NaCl, o que ocorreu após 24 dias de estresse para o cajueiro comum e anão e após 14 dias para o microcarpo. Após esses períodos, os vasos foram transferidos às 8:00 para aclimatação em laboratório, durante duas horas. Após limpeza superficial das folhas com pano tipo “perfex”, coletaram-se discos e amostras de folhas para mensuração imediata da atividade de redutase de nitrato e do conteúdo de água. Em seguida, as partes folhas, caules e raízes foram separadas, pesadas, imediatamente acondicionadas em N₂ líquido, armazenadas a -20 °C, liofilizadas, moídas e passadas em peneira com abertura de malha de 100 mesh para obtenção da farinha. O material foi adequadamente armazenado para posteriores análises.

3.1.2.6. Delineamento experimental e tratamento estatístico

Os tratamentos foram distribuídos de acordo com o delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial 5 x 3 X 3, correspondendo, nessa ordem, aos 5 níveis de NaCl, 3 progênies e 3 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (GOMES et al 1997).

3.1.2.7. Determinação das variáveis de crescimento

3.1.2.7.1. Massa seca acumulada em raiz, caule e folha

Após a coleta, as partes raiz, caule e folhas foram separadas e determinadas as respectivas massas frescas. As massas secas de caule e raiz foram determinadas diretamente após completa liofilização. No caso da massa seca das folhas, a determinação foi conduzida em estufa a 90 °C, com circulação de ar quente.

3.1.2.7.2. Taxa de incremento da altura da planta (TIAP)

A TIAP foi estimada através da diferença do incremento da altura do caule no intervalo de uma semana, conforme a seguinte relação:

$$TIAP = \frac{\text{altura final} - \text{altura inicial (mm)}}{\text{tempo final} - \text{tempo inicial (dias)}}$$

A altura da planta foi mensurada a partir do colo até a gema apical, em períodos de 7 dias. Para cada tratamento, utilizou-se a média das mensurações durante o período experimental e os resultados foram expressos em mm. dia^{-1} .

3.1.2.7.3. Conteúdo de água (CA) e transpiração total (TT)

Amostras de folhas de cada tratamento foram coletadas, determinado-se a massa fresca. Em seguida, essas amostras foram submetidas a estufa com circulação forçada de ar, temperatura de 90 °C até atingir peso constante, para determinação do conteúdo de água.

A taxa de transpiração total das plantas foi estimada mediante a diferença entre os volumes inicial e final da solução nutritiva, após 24 horas de transpiração. Os valores finais foram obtidos a partir da média geral de todos os dias de tratamento (24 para cajueiro comum e anão e 14 dias para microcarpo). Devido à vedação do vaso inferior, o volume evaporado em cada vaso foi desprezível e não computado na média da transpiração.

3.1.2.7.4. Determinação dos teores de clorofilas

A extração de clorofilas foi feita pelo método descrito por Engel e Poggiani (1991). Foram maceradas 7 mg de folhas secas liofilizadas, em almofariz, contendo 20 cm^3 de acetona 80% (v/v) durante 5 minutos. Em seguida, o extrato foi submetido a 8.000 rpm por 5 minutos. A quantificação de clorofilas foi realizada, diretamente, no sobrenadante, após leitura em espectrofotômetro a 645, 652 e 663 nm. As concentrações de Clorofila *a* (Chl*a*) e Clorofila *b* (Chl*b*) foram determinadas conforme as relações descritas por WHITHAM et al., (1971). Os resultados foram expressos em $\text{mg de clorofila. g}^{-1}$ massa seca.

3.1.3. Resultados e Discussão

Após uma prévia aclimação em solução nutritiva diluída e substrato sólido (areia lavada), as mudas dos três genótipos (cajueiros comum, anão, e microcarpo), com idades fisiológicas semelhantes - altura média de 25 cm e 12 folhas, foram submetidas à doses crescentes de NaCl: 0 (controle), 50 (dose baixa), 100 (média), 150 (alta) e 200 mM (muito elevada), de acordo com Viégas (1999). No fim do experimento, os dois primeiros genótipos apresentavam 68 dias após a semeadura enquanto que o microcarpo, por apresentar um crescimento mais lento, estava com 118 dias. O cajueiro comum e o anão apresentaram tempo de emergência (aproximadamente 15 dias) e taxas de crescimentos semelhantes entre si. Por outro lado o microcarpo apresentou germinação mais tardia (aproximadamente 25 dias) e crescimento mais lento durante todo o período experimental.

O período de tratamento com NaCl para o cajueiro anão e o comum foi de 24 dias enquanto que para o microcarpo esse período foi de apenas 14 dias, tendo em vista o critério utilizado para o tempo de exposição à salinidade: mortalidade em mais de 50 % das folhas no tratamento de 200 mM de NaCl. Considerando este critério, o microcarpo mostrou maior sensibilidade às doses mais elevadas de NaCl, quando comparado aos dois outros genótipos. O crescimento relativo dos genótipos foi estimado através da fitomassa total acumulada e distribuição da massa entre raiz, caule e folha. Ao se comparar à massa fresca total das plantas controle dos três genótipos (TABELA 1 e FIGURA 2A), verifica-se que as médias obtidas para o comum, anão e microcarpo foram de: 30,30, 42,30 e 33,20 g.planta⁻¹, respectivamente. Denota-se que as médias entre genótipos diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey, sendo que a massa fresca do anão superou a do comum em 39,6% e a do microcarpo em 30,0%.

A massa fresca total do anão e do microcarpo foram significativamente reduzidas ($p < 0,05$) em relação aos seus respectivos controles a partir de 50 mM, enquanto que o comum apresentou massa fresca estatisticamente menor que o controle somente a partir de 150 mM, mostrando, aparentemente, uma menor sensibilidade ao sal. Como esperado, o decréscimo da massa fresca total ocorreu com o aumento dos níveis de NaCl, sendo que a maior redução da massa fresca total para os três genótipos ocorreu com a aplicação da dose

mais alta de NaCl (200mM), que acarretou decréscimos de 57%, 60% e 47% para o comum, anão e microcarpo, respectivamente. Apesar dos sucessivos decréscimos da massa fresca total com o aumento da concentração salina, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os genótipos nos diversos níveis de NaCl. Outros autores comprovaram o efeito do NaCl sobre a redução na massa de mudas de cajueiro (VIÉGAS, 1999; MATOS, 2001; FERREIRA, 2000; SILVA, 2002).

Ao se comparar à massa da raiz das plantas sem tratamento salino (controles) dos três genótipos (TABELA 1 e FIGURA 2B), observa-se que elas diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre si na seguinte ordem de grandeza: anão > microcarpo > comum. O anão, no controle, se destacou dos demais genótipos em termos de massa de raiz, folha e total. Isso se deve, provavelmente, ao fato do anão ser uma planta mais precoce que os outros genótipos estudados e apresentar, normalmente, desenvolvimento inicial mais rápido que o comum e microcarpo. A massa da raiz, em 200 mM de NaCl, decresceu 47%, 34% e 27 % no comum, anão e microcarpo, respectivamente, quando comparada aos respectivos controlês, mostrando que o microcarpo sofreu uma redução significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais genótipos. A massa da raiz do microcarpo diminuiu no tratamento 50 mM, quando comparada ao controle e manteve-se praticamente constante para os demais níveis salinos, enquanto que o anão e o comum mostraram um decréscimo linear com o aumento dos níveis salinos. Portanto, o microcarpo mostrou-se mais sensível ao tratamento salino, em termos de crescimento da raiz. A capacidade de crescimento radicular dos porta-enxertos sob condições de estresse abiótico é um importante fator a ser considerado na seleção (MATOS, 2001).

Durante a condução do experimento observou-se que as mudas do comum apresentaram raízes menos desenvolvidas que as demais e com disposição predominantemente fascicular, enquanto que o anão e o microcarpo apresentaram raízes de maior porte e com disposição predominantemente axial (FIGURA 3). Ressalte-se que as plantas de cajueiro comum foram provenientes de plantas de ambiente de dunas costeiras, onde, naturalmente, ocorre propagação vegetativa do tipo mergulhia, o que pode ter contribuído para geração de indivíduos geneticamente dotados de raízes predominantemente fasciculadas (ALMEIDA et al, 1992). Entretanto, apesar do comum apresentar uma menor alocação de fitomassa para suas raízes, quando comparado com o anão, em termos de quantidade absoluta, sua % de redução de massa fresca total, comparado ao controle, foi

menor. Isso pode evidenciar que esse genótipo foi mais capaz de suportar altos níveis de NaCl nas suas raízes – fato bastante importante na seleção de porta-enxertos.

TABELA 1 – Massa fresca total e massa da raiz em mudas de cajueiro comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os resultados são a Média de três repetições.

Massa fresca total (g.planta ⁻¹)					
NaCl				CV ¹	
(Mm)	Comum	Anão	Microcarpo	(%)	
0	30,30a B	42,30a A	33,20a AB	15	
50	24,00a A	27,00ab A	24,00b A	17	
100	26,30a A	26,00b A	22,10b A	17	
150	13,70b B	20,30b A	22,00b A	18	
200	13,00b B	16,80b A	17,60c A	17	
CV ² (%)	12	15	13		

Massa fresca da raiz (g.planta ⁻¹)					
NaCl				CV ¹	
(mM)	Comum	Anão	Microcarpo	(%)	
0	10,24a B	16,81a A	13,60a A	14	
50	8,41ab A	11,58b A	7,29b B	15	
100	7,84ab A	10,24b A	4,41b B	12	
150	6,00b A	6,25b A	4,48b A	16	
200	4,80b A	5,76c A	3,61b A	15	
CV ² (%)	18	17	11		

- Entre tratamentos, letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

- Entre genótipos, letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

¹ Coeficiente de variação entre os genótipos (colunas).

² Coeficiente de variação entre os tratamentos (linhas).

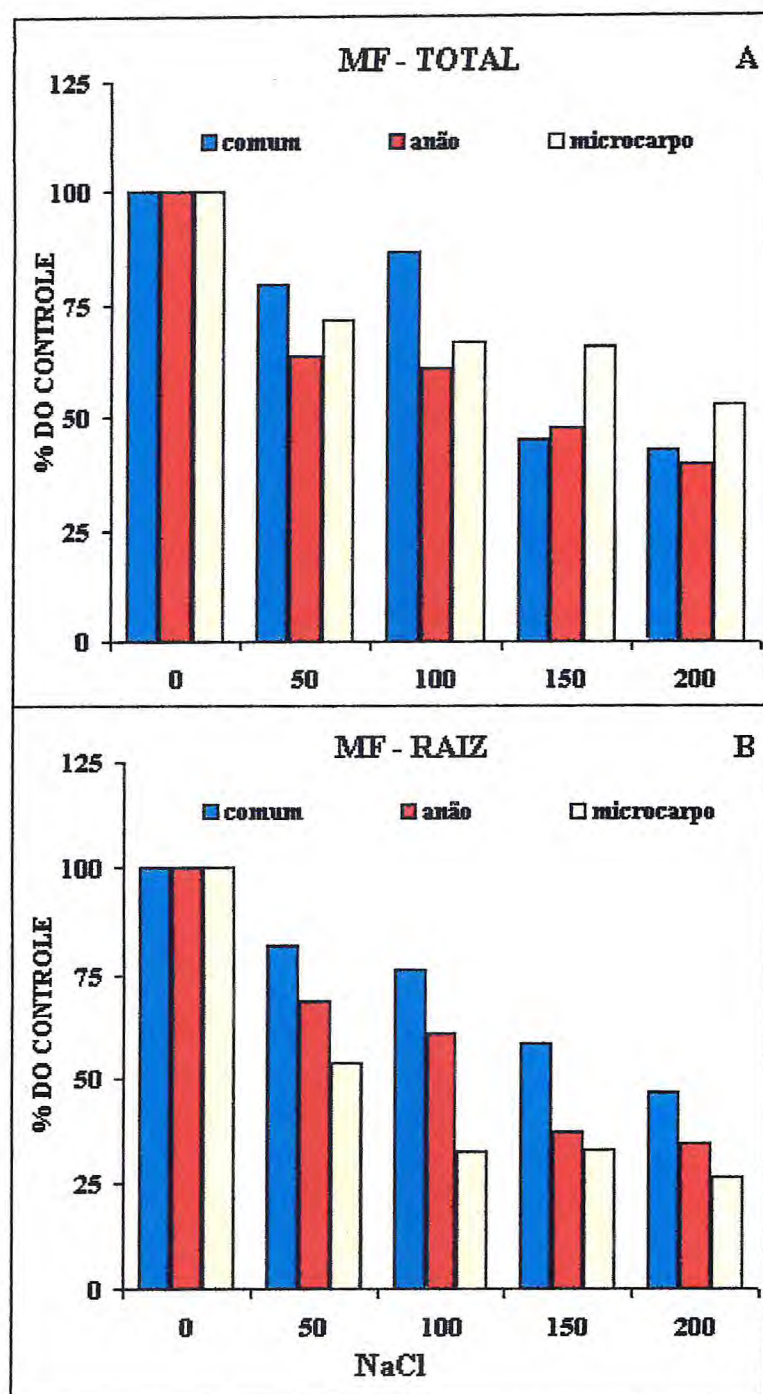


FIGURA 2. Massa fresca total – MF total (A) e massa fresca da raiz –MF da raiz (B) de mudas de cajueiros comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os valores correspondentes a 100% dae MF total foram 30,30; 42,30 e 33,20 g.planta⁻¹ e MF da raiz foram 10,24; 16,81 e 13,60 g.planta⁻¹, para os três genótipos, respectivamente.

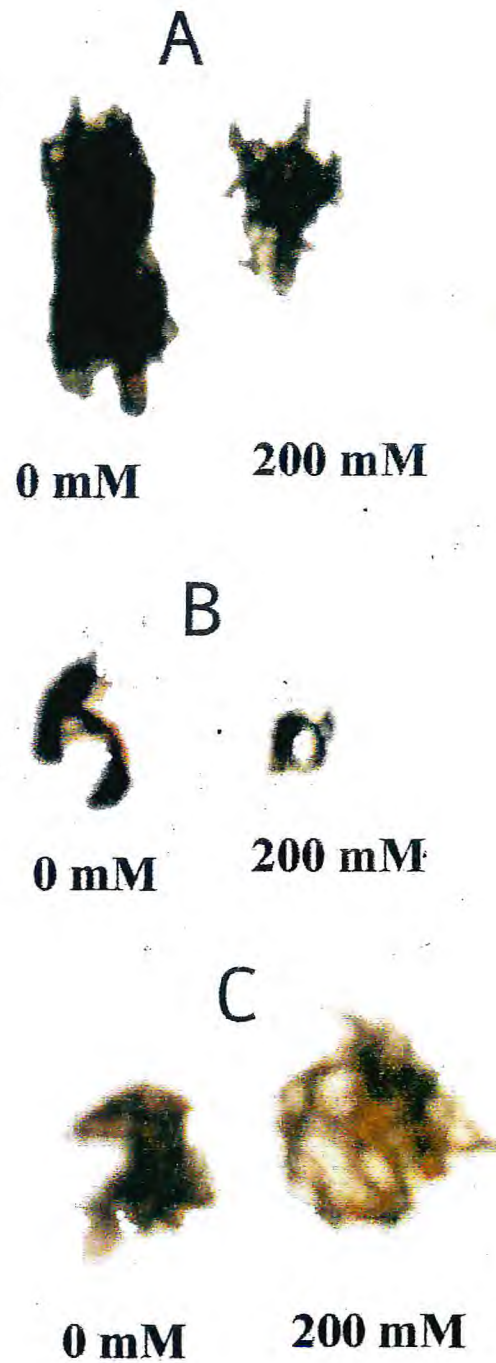


Figura 3. Raízes de mudas de cajueiro (A) anão e (B) comum – *A. occidentale* L. com 68 DAP e (C) microcarpo – *A. microcarpum* Ductke, com 121 DAP, submetidas a 0 e 200 mM

Na maioria das glicófitas as folhas são as partes mais sensíveis ao estresse salino (MUNNS, 2002). No presente trabalho, essa tendência foi mantida tanto para massa alocada nas folhas quanto para a taxa de expansão foliar dos três genótipos. Foi observado um decréscimo linear na massa fresca da folha (TABELA 2 e FIGURA 4A) em todos os genótipos com o aumento dos níveis de NaCl. Ao se comparar as médias entre os genótipos nos diversos níveis de NaCl, observou-se que o microcarpo apresentou a menor massa foliar nos diversos tratamentos com diferenças significativas em 50 mM e 200 mM, comparado com os dois outros genótipos. Portanto, novamente, o microcarpo apresentou menor massa foliar em relação aos demais genótipos. Este resultado foi corroborado pelos valores de taxa de expansão foliar (Dados não apresentados). Quando se comparou o comum com o anão, em termos de redução relativa na massa das folhas, nos diversos níveis de NaCl, observou-se que os dois genótipos apresentaram sensibilidades similares ao NaCl, a despeito do comum apresentar maior massa absoluta (g. planta^{-1}) em todos os níveis de salinidade (TABELA 2). A massa da raiz (TABELA 1 e FIGURA 2B) nas plantas submetidas ao estresse salino, apresentou um comportamento semelhante ao da massa foliar, tendo o microcarpo apresentado a menor massa em relação aos demais genótipos. Todavia as raízes se mostraram mais tolerantes ao NaCl do que as folhas. A massa do caule (TABELA 2 e FIGURA 4B) também decresceu linearmente com o aumento do estresse salino nos três genótipos, mas não se detectou diferenças estatísticas entre os três genótipos nos diversos níveis de NaCl.

TABELA 2 – Massa da folha e do caule em mudas de cajueiro comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os resultados são a Média de três repetições.

Massa fresca da folha (g.planta ⁻¹)				
NaCl (mM)	Comum	Anão	Microcarpo	CV ¹ (%)
0	12,25a B	16,81a A	13,69a B	14
50	8,99ab AB	11,56ab A	7,29ab B	14
100	7,84ab A	10,24bc A	4,41bc B	18
150	4,20b A	6,25c A	4,84c A	18
200	4,10b AB	6,00c A	2,89c B	17
CV ² (%)	20	25	10	
Massa fresca do caule (g.planta ⁻¹)				
NaCl (mM)	Comum	Anão	Microcarpo	CV ¹ (%)
0	7,29a A	9,00a A	9,61a A	15
50	5,76ab A	7,29ab A	6,76ab A	15
100	4,41bc B	5,76bc A	6,60ab A	16
150	2,56c B	4,84bc A	5,29ab A	15
200	3,24c A	4,00c A	4,40b A	12
CV ² (%)	17	18	16	

- Entre tratamentos, letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

- Entre genótipos, letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

¹ Coeficiente de variação entre os genótipos (colunas).

² Coeficiente de variação entre os tratamentos (linhas).

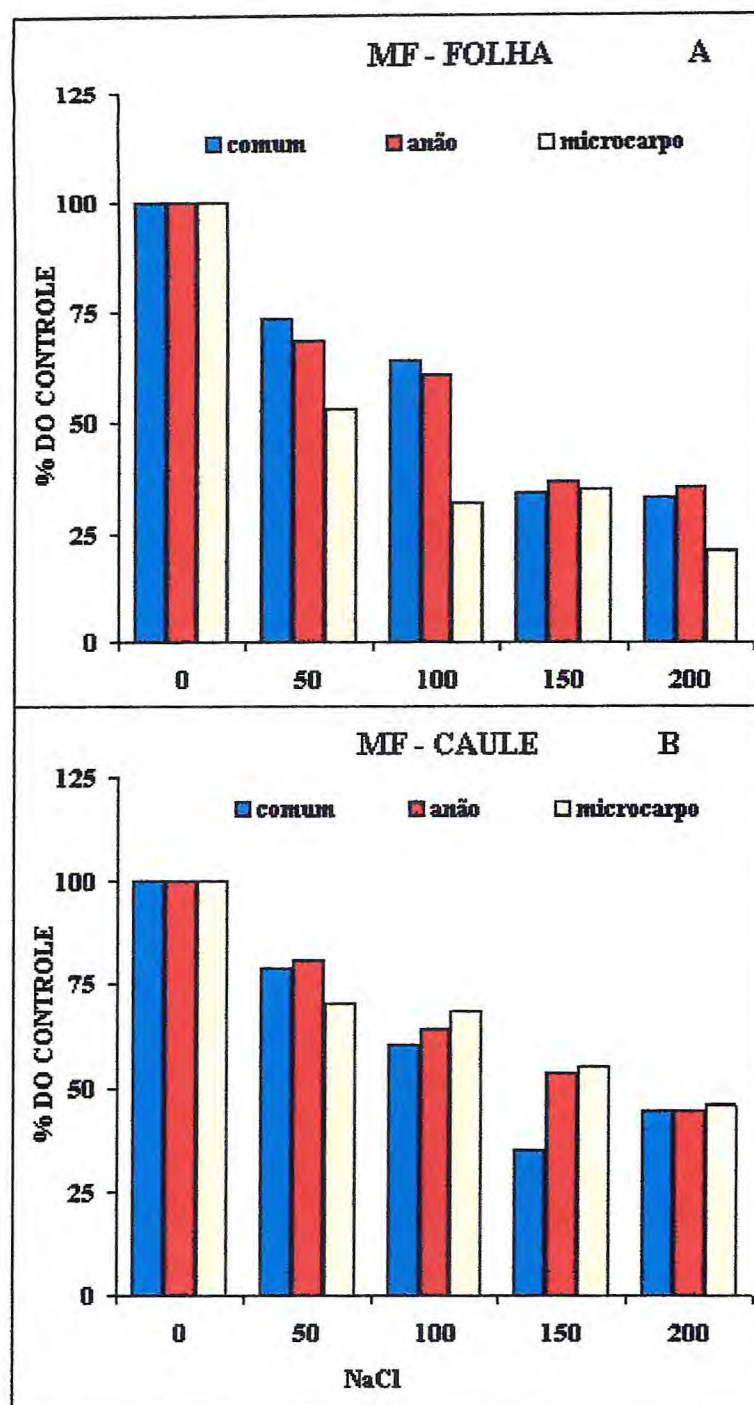


FIGURA 4 – Massa fresca da folha – MF da folha (A) e massa fresca do caule – MF do caule (B) de mudas de cajueiros comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os valores de 100% de MF da folha foram 12,25, 16,81 e 13,69 g/planta e de MF do caule foram 10,24; 16,81 e 13,60 g.planta⁻¹, para os três genótipos, respectivamente.

É interessante observar que a salinidade causou efeitos drásticos sobre o crescimento das mudas dos três genótipos de cajueiro estudados (TABELA 3 e FIGURA 3A). Deve ser destacada a maior sensibilidade do microcarpo para todas as variáveis analisadas, inclusive se for observado que as mudas resistiram somente 14 dias de tratamento com 200 mM de NaCl

TABELA 3 –Taxa de crescimento, taxa de transpiração e conteúdo de água em mudas de cajueiro comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os resultados são a Média de três repetições.

Taxa de crescimento (mm.planta ⁻¹ .dia ⁻¹)				
NaCl (Mm)	Comum	Anão	Microcarpo	CV ¹ (%)
0	2,90a A	1,93a AB	0,85 a B	18
50	1,30b A	0,83b AB	0,13 B B	17
100	1,13b A	0,50bc B	0,00 c B	20
150	0,57b A	0,27c B	0,00 c C	20
200	0,30b A	0,23c A	0,00 c B	19
CV ² (%)	22	20	20	
Taxa de transpiração total (g H ₂ O.planta ⁻¹ .dia ⁻¹)				
NaCl (Mm)	Comum	Anão	Microcarpo	CV ¹ (%)
0	82,7a A	92,7a A	84,5a A	16
50	55,8b A	57,5b A	52,4B A	13
100	38,1bc A	48,9Bc A	44,8B A	15
150	29,5c A	33,7Bc A	39,5B A	15
200	23,7c A	25,6c A	31,2c A	14
CV ² (%)	17	20	12	
Conteúdo de água (g ⁻¹ .planta)				
NaCl (mM)	Comum	Anão	Microcarpo	CV ¹ (%)
0	75,3	73,7a A	72,9a A	5
50	74,6a A	69,2a A	68,7a A	8
100	74,0a A	66,5a A	66,5a A	9
150	66,9a A	62,8a A	63,6B A	8
200	63,1b A	64,7b A	60,3B A	12
CV ² (%)	11	10	11	

- Entre tratamentos, letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

- Entre genótipos, letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

¹ Coeficiente de variação entre os genótipos (colunas).

² Coeficiente de variação entre os tratamentos (linhas).

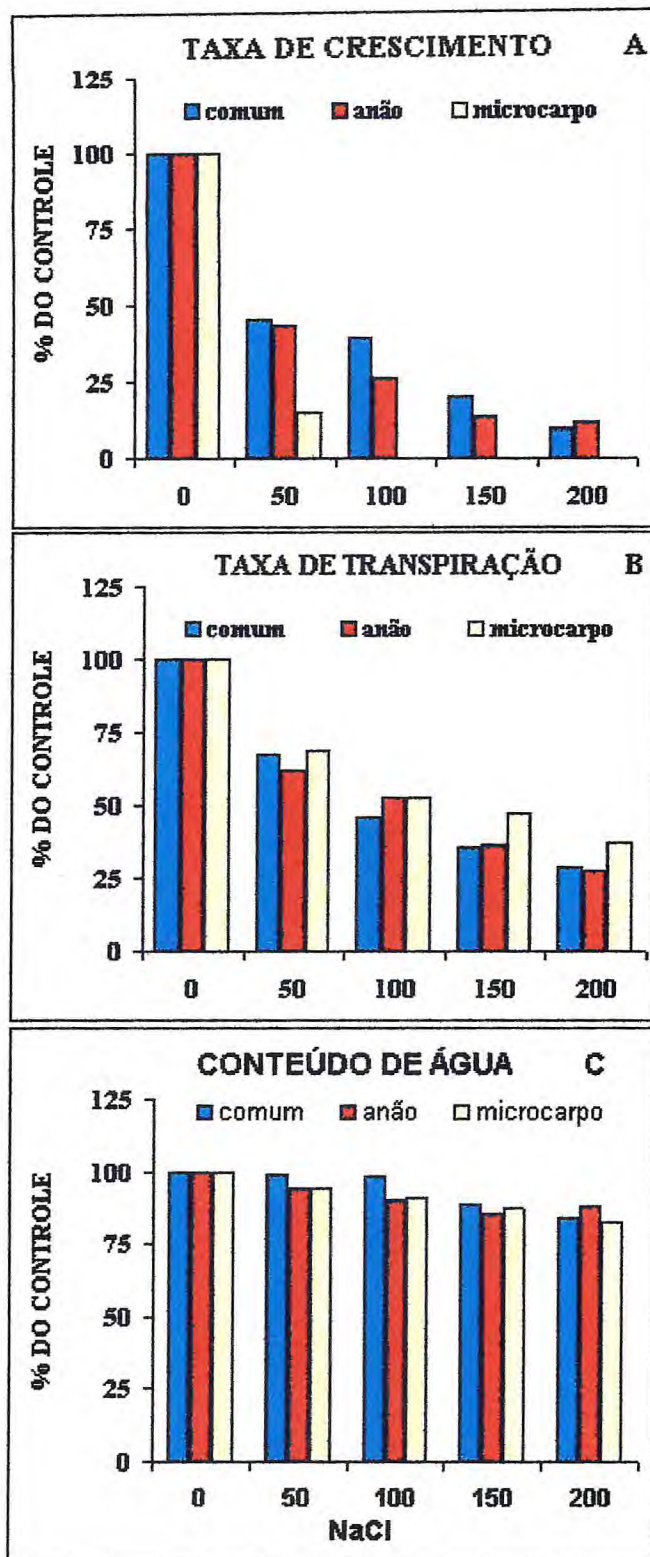


FIGURA 5 - (A) Taxa de crescimento - TC (A), taxa de transpiração total - TTT (B) e conteúdo de água - CA (C) de mudas de cajueiros comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os valores de 100% de TC foram 2,90, 1,93 e 0,85 mm. planta⁻¹.dia⁻¹; de TTT foram 82,7, 92,7 e 84,5 g H₂O.planta⁻¹.dia⁻¹ e de CA foram 75,3, 73,7 e 72,9 g.planta⁻¹, para os três genótipos, respectivamente.

As intensidades dos estresses osmótico e iônico nas folhas de cajueiro se concentraram nas folhas mais velhas, as quais apresentam sintomas visuais de secamento nas pontas, pontos cloróticos e início de senescência (SILVEIRA et al., 2002). Entretanto, foi visível, também, sintoma de “queima” nas folhas mais jovens, ainda em fase de início de lançamento (gemmas axilares). Neste caso, a degradação das clorofilas *a* e *b* ocorreu, principalmente, nas folhas mais velhas e na presença de níveis elevados de NaCl, conforme pode ser observado na TABELA 4 e FIGURAS 6A e 6B. Também neste caso, o microcarpo mostrou-se como o genótipo mais sensível particularmente quanto à degradação de clorofila *a*, que foi reduzida cerca de 50% no nível de 100 mM de NaCl. Em geral, o comum se mostrou menos sensível em termos de manutenção dos níveis de clorofila *a* e *b* nos diversos níveis de NaCl. A redução da fotossíntese com o aumento da salinidade é atribuída ao fechamento estomático, o que leva a uma redução da pressão parcial de CO₂, ou a fatores não estomatais (BETHKE; DREW, 1992). Segundo Tanaka et al (1997) o estresse salino pode levar a perda da atividade do PS II, o que está associado a mudanças na distribuição de energia entre os fotossistemas I e II.

Os sintomas visuais causados pelo excesso de sais em folhas de mudas de cajueiro variam bastante. Em substrato de vermiculita, os sintomas são semelhantes aos induzidos por deficiência hídrica progressiva: clorose nas folhas mais velhas, necrose generalizada nessas folhas seguida por abscisão (MATOS, 2001; SILVA, 2002). Quando o estresse salino é imposto em mudas cultivada diretamente em solução nutritiva (VIÉGAS, 1999), os sintomas são mais semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Na realidade, o tipo de sintomatologia está relacionado com a intensidade de acumulação de Na⁺ e Cl⁻ nas folhas.

Os sintomas visuais de toxicidade causados pelo estresse salino em folhas e raízes podem ser observados através das FIGURAS 7, 8 e 9. Observou-se que, de modo geral, os tratamentos nos níveis mais elevados de NaCl (150 a 200 mM) induziram sintomas de toxicidade nas folhas (clorose generalizada, “queima” nas extremidades dos folíolos jovens e manchas necróticas no limbo) nos três genótipos. Estes sintomas ocorreram com maior frequência na parte superior e inferior das plantas, ou seja, nas folhas apicais mais jovens e também nas folhas mais velhas causando abortos frequentes nessas últimas. Um exame mais acurado das FIGURAS 7, 8 e 9 permitem concluir que o aparecimento de manchas necróticas foliares variou bastante entre plantas dentro de cada tratamento e apareceram primeiro no microcarpo – a partir de 50 mM, depois no anão – a partir de 100 mM, e por último, no comum – a partir de 150 mM. Deve-se ressaltar, ainda, que os sintomas de toxicidade entre

plantas nos três genótipos variaram bastante nos últimos níveis salinos, sendo que no nível de 200 mM observou-se queda de mais de 50% das folhas nos três genótipos.

A determinação da concentração de NaCl que causou redução de 50% na massa fresca das folhas (CL_{50}), realizada através do ajustamento por regressão polinomial do 2º grau, mostrou valores de aproximadamente 100, 74 e 65 mM de NaCl para o comum, anão e microcarpo, respectivamente. Apesar desses valores terem sido obtidos a partir de funções ajustadas somente com 5 níveis de NaCl (0, 50, 100, 150 e 200 mM), os coeficientes de correlação (R^2) foram altamente significativos: 0,9684** (comum), 0,9736** (anão) e 0,9386** (microcarpo). Dessa forma, esses valores ratificam que o microcarpo foi muito mais sensível ao NaCl, enquanto que, o comum apresentou evidências de maior tolerância relativa quando comparado ao anão. Entretanto, deve ser observado, que esse último genótipo apresentou maior produção de massa foliar (em termos absolutos – g/planta), especialmente nos níveis de 0, 50 e 100 mM de NaCl quando comparado aos dois outros genótipos (TABELA 2 e FIGURA 4A).

TABELA 4 – Clorofila *a* e clorofila *b* em mudas de cajueiro comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os resultados são a Média de três repetições.

Clorofila <i>a</i> (g.Kg ⁻¹ MS)						
NaCl				CV ¹		
(mM)	Comum	Anão	Micro	(%)		
0	1,36a A	1,02a A	1,15a A	15		
50	1,34a A	0,91a AB	0,75a B	16		
100	1,02ab A	0,80ab AB	0,49b B	15		
150	0,54c AB	0,77b AB	0,49b B	11		
200	0,41c B	0,75b A	0,47b B	15		
CV ² (%)	15	13	12			

Clorofila <i>b</i> (g.Kg ⁻¹ MS)				
NaCl				CV ¹
(mM)	Comum	Anão	Micro	(%)
0	0,56a B	0,64a A	0,70a A	14
50	0,59a A	0,53a A	0,63ab A	15
100	0,60a A	0,54a B	0,48b B	15
150	0,53a A	0,42a B	0,44b B	10
200	0,30b A	0,40b A	0,42b A	15
CV ² (%)	16	19	14	

- Entre tratamentos, letras minúsculas iguais, indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

- Entre genótipos, letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

¹ Coeficiente de variação entre os genótipos (colunas).

² Coeficiente de variação entre os tratamentos (linhas).

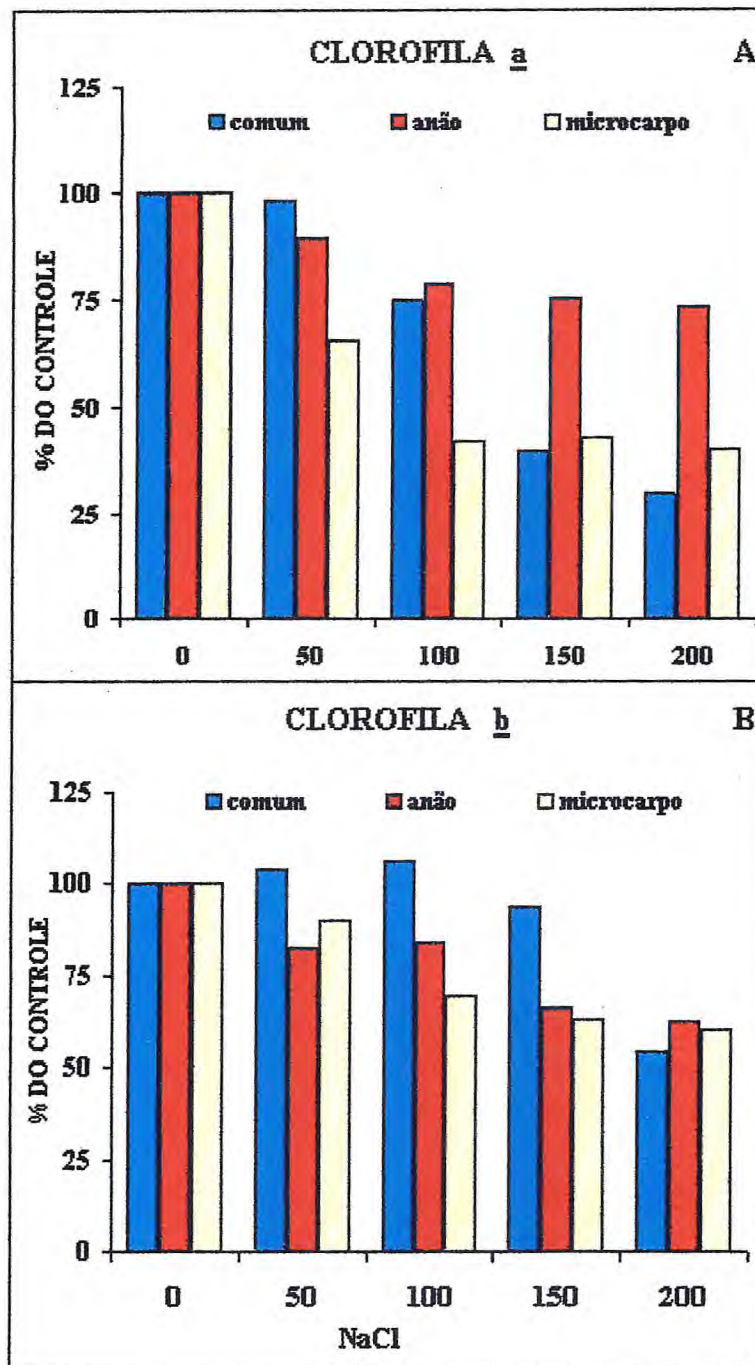


FIGURA 6 – Concentração de clorofila a – Chl a (A) e clorofila b – Chl b (B) em mudas de cajueiro comum, anão precoce e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os valores de 100% de Chl A foram 1,36, 1,02 e 1,15 g.kg⁻¹ MS e de Chl B foram 0,56, 0,64 e 0,70 g.kg⁻¹ MS, para os três genótipos, respectivamente.

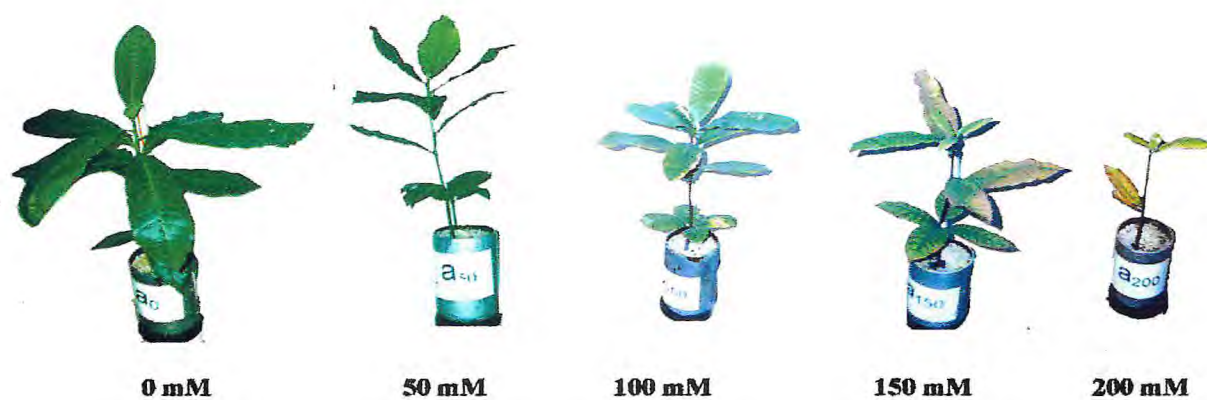


FIGURA 7 – Mudanças de cajueiro anão com 68 DAP, após exposição a diferentes níveis de NaCl (0, 50, 100, 150 e 200 mM), durante 24 dias. Fortaleza, Ceará, Brasil, 2002.

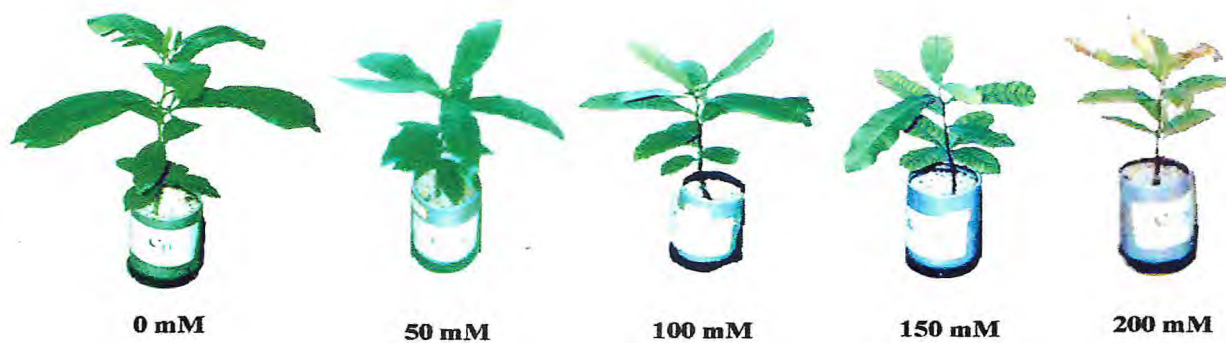


FIGURA 8– Mudas de cajueiro comum com 68 DAP, após exposição à diferentes níveis de NaCl (0, 50, 100, 150 e 200 mM), durante 24 dias. Fortaleza, Ceará, Brasil, 2002.



FIGURA 9 - Mudax de cajueiro microcarpo com 121 DAP, após exposição à diferentes níveis de NaCl (0, 50, 100, 150 e 200 mM), durante 24 dias. Fortaleza, Ceará, Brasil.

mecanismos de adaptação que de forma sincronizada irão determinar o grau de tolerância sob determinadas condições de idade fisiológica, intensidade de estresse, modo de indução do estresse, estado fisiológico geral da planta, condições ambientais, etc (MUNNS, 2002). Dessa maneira, o próprio conceito de tolerância e/ou adaptação à condição de estresse é bastante complexo. Alguns autores definem tolerância como a capacidade de sobreviver sob determinadas condições de salinidade (FAGERIA; GHEYI, 1997). Outros, mais ligados à questão agrônômica, definem tolerância como a capacidade de se adaptar e crescer sob condições de salinidade. No caso da seleção de porta-enxerto, onde está inserido o presente estudo, a questão é ainda mais complexa pois os caracteres de tolerância do porta-enxerto podem interagir com o enxerto determinando a performance final da muda (BEHBOUDIAN; TÖRÖKFALVY; WALKER, 1986; SYVERTSEN; LLOYD, 1994). Alguns trabalhos com porta-enxertos de laranjeira, expostos ao estresse salino, têm demonstrado que algumas características fisiológicas do porta-enxerto podem ser passadas para a muda enxertada independente do tipo de enxerto (SYVERTSEN; LLOYD, 1994).

Assim, no caso do presente estudo, é possível concluir que as mudas de cajueiro microcarpo são mais sensíveis ao NaCl do que os genótipos comum e anão. Quanto à performance desses dois últimos, o resultado não é conclusivo para indicar o material menos sensíveis, apesar do comum ter mostrado um CL_{50} menor que o apresentado pelo anão. Entretanto, em termos de utilização dessas mudas como porta-enxerto, o tipo anão expressou algumas características mais favoráveis tais como maior crescimento do sistema radicular e do caule nas condições do presente estudo.

3.2. TRABALHO II – Acumulação de solutos inorgânicos e orgânicos em folhas e raízes de mudas de três genótipos de cajueiro em resposta a diferentes níveis de NaCl.

3.2.1. Introdução

Quando da exposição da planta ao estresse salino o crescimento foliar é rapidamente e intensamente inibido em decorrência de mudanças no potencial osmótico nas proximidades das raízes (MUNNS; SCHACHTMAN; CONDON, 1995, NEUMAN, 1993). Em seguida, alguns íons presentes na solução externa alcançam as folhas, em quantidade que depende da habilidade do sistema radicular em controlar o fluxo de íons para o xilema e da taxa de transpiração. O efeito iônico sobre o crescimento foliar, depende da capacidade da planta em acomodar esses íons nos compartimentos das células onde eles não causem danos. Esta habilidade, por sua vez, é função da intensidade do transporte iônico e do volume foliar. Normalmente, os íons que alcançam as folhas são acumulados nos vacúolos (FRICKEW; LEIGH; TOMOS, 1996). Se esses íons não se acumularem nos vacúolos e suas concentrações aumentarem no apoplasto das folhas, então ocorrerão efeitos osmóticos que afetarão o crescimento foliar (FLOWERS; TROKE; YEO, 1991). Caso a concentração de íons aumente no citoplasma haverá reflexos negativos no metabolismo celular (FLOWERS et al., 1977).

A redução no crescimento da planta devido, por exemplo, a mudanças no balanço hormonal, causado pelos efeitos iniciais da exposição à salinidade, irá aumentar o efeito da acumulação iônica, devido à redução na capacidade de acomodação dos íons na folha, tendo em vista sua menor taxa de crescimento. Por fim, os efeitos da salinização dependerão da habilidade das folhas em acomodarem a quantidade de íons provenientes das raízes (MUNNS; TERMATT, 1986). O suprimento de íons para a parte aérea da planta depende do fluxo e da concentração de íons na seiva do xilema. Flowers, Troke e Yeo (1991) sugerem que a concentração de íons de sódio no simplasto da raiz influi na intensidade do transporte iônico para a parte aérea da planta e que, essa concentração será maior em um genótipo sensível à salinidade do que em um tolerante.

Uma das adaptações que resulta numa tolerância maior aos estresses hídrico e salino é o ajustamento osmótico, que pode ocorrer em xerófitas, halófitas e mesófitas. A resistência à

salinidade nas halófitas pode ser por acumulação de cloreto e sódio no vacúolo; por resistência à entrada desses íons para o citoplasma e por diluição desses íons, após sua entrada na planta, devido ao incremento em sua biomassa. Uma das características bioquímicas relacionadas com a adaptação das plantas halófitas à salinidade é a acumulação intensa de duas substâncias nitrogenadas: a prolina e a glicinobetaína no citoplasma e organelas. A acumulação desses compostos que contribui para o ajustamento osmótico e proteção de estruturas celulares (Melo, 1999). Em condições de estresse salino as plantas do tipo glicófitas desenvolvem, em geral, como mecanismo de adaptação à salinidade, em primeira instância, aumentos nas taxas de absorção dos próprios íons salinos em excesso na solução externa (GREENWAY; MUNNS, 1980). Dessa forma, verifica-se uma diminuição no potencial osmótico das raízes e das outras partes da planta, favorecendo a entrada e a manutenção da água nas células (NIU et al., 1995).

A redução no influxo de água poderá acarretar diminuições no potencial de turgor nas células (SALISBURY; ROSSI, 1992). Apesar dos mecanismos moleculares que desencadeiam os processos envolvidos com a redução drástica no crescimento das plantas sob estresse salino ainda não serem conhecidos, especula-se que sob essas condições ocorrem decréscimos na intensidade de crescimento, provocados, provavelmente, por reduções nas taxas de síntese de parede celular e de proteínas (SALISBURY; ROSSI, 1992). Dessa maneira, é possível que algumas espécies possam compatibilizar suas taxas de crescimento com as taxas de absorção de íons. Nesse caso, as concentrações dos íons salinos seriam mantidas aproximadamente constantes ao longo do desenvolvimento (TAIZ; ZEIGER, 1991). Num segundo estágio de adaptação à salinidade, algumas espécies promovem uma eficiente compartimentalização dos sais em células e órgãos, através da acumulação preferencial nos vacúolos de raízes, caules e folhas (GREENWAY; MUNNS, 1980).

Algumas espécies podem incrementar a biossíntese de solutos osmoticamente compatíveis, promovendo ajustamento osmótico para a manutenção de um estado hídrico compatível com os níveis de crescimento necessários para o desenvolvimento (BOHNERT; JENSEN, 1996). Por outro lado, na presença de concentrações elevadas de sais ou para plantas não adaptadas, verificam-se, comumente, descompassos entre as taxas de absorção de íons e as de crescimento, ocorrendo acumulação progressiva de sais tóxicos, com diminuição acentuada na fotossíntese e de síntese de proteínas e o surgimento de diversos efeitos indiretos sobre o crescimento (SALISBURY; ROSSI, 1992). Nesses casos, os diferentes efeitos da salinidade -deficiência hídrica induzida, toxicidade direta dos íons e o desbalanço nutricional,

ocorrem, provavelmente, como efeitos em cascata (NIU et al., 1995), acarretando o surgimento do processo de senescência induzida, redução do crescimento e início da necrose dos tecidos.

As mudas de cajueiro são, relativamente, sensíveis ao excesso de NaCl (VIÉGAS, 1999). Quando se comparou a performance de 6 clones de cajueiro anão contra 4 genótipos de “cajueiro comum” não foi verificada diferença significativa nas acumulações de Na⁺ entre todos os genótipos (FERREIRA et al., 2001). As mudas apresentam rápida e intensa absorção de Na⁺ e Cl⁻ que se acumulam inicialmente em maiores quantidades nas raízes e em, seguida migram intensamente para a parte aérea, atingindo concentrações tóxicas, inicialmente, nas folhas mais velhas (VIÉGAS, 1999). A absorção de Na⁺ causa redução intensa na concentração de K⁺ das raízes (VIÉGAS et al., 2001). Existe uma correlação estreita entre a acumulação de Na⁺ e a síntese de prolina em folhas de cajueiro (VIÉGAS et al., 1999). É interessante observar que as mudas de cajueiro podem apresentar um mecanismo completamente diferente quando são cultivadas em vermiculita (que contém níveis elevados de Ca²⁺-trocável). Neste caso, as plantas apresentam claramente um mecanismo de exclusão de Na⁺ e Cl⁻ mantendo baixíssimas concentrações desses íons e de prolina nas folhas (SILVA, 2002).

Neste trabalho, se procurou correlacionar a tolerância ao estresse salino entre três genótipos de cajueiro (anão, *Anacardium occidentale* L., “cajueiro comum” *Anacardium occidentale* L., e “cajueiro microcarpo”, *Anacardium microcarpum* DUKE) com a acumulação de solutos em raízes e folhas de mudas crescidas em diferentes níveis de NaCl.

3.2.2 . Material e Métodos

3.2.2.1. Material Vegetal

As mudas, utilizadas neste trabalho, foram obtidas a partir de sementes de cajueiros de três diferentes genótipos (FIGURA 1), que apresentam características distintas quanto ao fenótipo (tipo de porte, tamanho de castanha, precocidade de floração etc), especialmente o

tipo comum que pode apresentar uma redução de seu porte, quando habita áreas costeiras de dunas móveis (FIGURA 1C-2).

As castanhas do cajueiro comum - conhecido popularmente como “comum da praia” (*Anacardium occidentale* L), foram provenientes da praia do Barro Preto, município de Aquiraz/Ceará. As castanhas do cajueiro anão (*Anacardium occidentale* L.) CP76, e as do microcarpo (*Anacardium microcarpum* Ducke) foram provenientes da Unidade Experimental da Universidade Federal do Ceará – UFC, situada na região litorânea do município de Caucaia/Ceará. As castanhas dos três genótipos (FIGURA 1D) apresentam aspectos morfológicos diferentes.

3.2.2.2. Substrato e solução nutritiva de crescimento das mudas

Para germinação, foi utilizada vermiculita de textura média, acondicionada em bandejas plásticas do tipo “leiteira”, com dimensões de 55 cm x 35cm x 20 cm. Após o período de germinação, as mudas foram transferidas para vasos de Leonardo contendo areia grossa ($\text{Ø} \geq 2\text{mm}$). A areia foi previamente lavada com água corrente e, em seguida, por 5 vezes com água destilada. Esse substrato foi acondicionado em vasos de Leonard modificados, produzidos a partir de recipientes de vidro, com capacidade para de 1 litro. Os recipientes foram cortados nas duas extremidades opostas, ajustados um sobre o outro em sentido contrário, sendo a parte externa pintada com tinta cor prata. As partes inferior e superior dos vasos apresentaram 20 cm de altura e 9 cm de diâmetro, perfazendo um volume de aproximadamente 800 cm^3 em cada parte. Os recipientes utilizados para a confecção dos vasos de Leonardo foram do tipo reagente químico. Foram necessários dois recipientes para produzir cada vaso de Leonard.

A nutrição das plantas foi conduzida por meio de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada por Viégas (1999) para cultivo de mudas de cajueiro, com a seguinte composição: $4,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$ em KNO_3 ; $3,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$ em $\text{Ca(NO}_3)_2$; $1,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$ em CaCl_2 ; $1,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$ em MgSO_4 ; $1,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$ em K_2HPO_4 ; $1,0 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$ em B^{3+} ; $0,9 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$ em Mn^{2+} ; $1,8 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$ em Cl_2^- ; $0,03 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$ em Cu^{2+} ; $0,07 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$ em Zn^{2+} e $10,0 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$ em Fe^{3+} -EDTA. A solução nutritiva foi fornecida com 1/5 da

concentração iônica original durante as duas primeiras semanas de estabelecimento das mudas. Após essa fase, a solução foi fornecida sem diluição. As soluções nutritivas das plantas controle e tratadas com NaCl foram renovadas a cada dois dias e o seu pH mantido próximo a 5,5 ($\pm 0,5$) mediante utilização de soluções estoque contendo $0,10 \text{ mol m}^{-3}$ de NaOH ou HCl.

3.2.2.3. Condições ambientais do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, situada no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil, nas coordenadas geográficas com latitude $3^{\circ}44'S$ e longitude $38^{\circ}33'W$ e clima do tipo AW na classificação de KÖEPPEN. O trabalho foi desenvolvido no período de maio a setembro de 1999. Os valores médios de temperatura diurna e noturna foram de 27 e 24 °C, respectivamente. A variação de umidade relativa média do ar de 40 a 80% e fotoperíodo médio de 12 horas de insolação. A quantidade máxima média de radiação fotossinteticamente ativa foi, aproximadamente, $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (as 12:00 hs), mensurada com um “quantun sensor” acoplado ao porômetro LI-160, “steady state porometer”, LI-Cor, USA).

3.2.2.4. Condução das mudas

As sementes dos três genótipos foram, inicialmente, esterilizadas em solução comercial de hipoclorito de sódio comercial 10% (v/v), durante 10 minutos, quando então foram exaustivamente lavadas com água destilada de forma a permitir uma completa remoção do agente esterilizante. Logo após, as sementes foram imersas em água destilada, por um período de 24 horas, com vistas a acelerar o processo da germinação (VIÉGAS, 1999). Em seguida, as mesmas foram acondicionadas para germinar em um leito contendo vermiculita saturada com solução de $0,10 \text{ mol.m}^{-3}$ de CaSO_4 (VIÉGAS, 1990). Após a emergência, 15 dias para o anão e o comum, e 25 dias para o microcarpo, as mudas permaneceram na vermiculita e foram irrigadas com água destilada até atingir uma altura de

aproximadamente 15 cm, cerca de 10 dias após a emergência. Em seguida, foram selecionadas pela uniformidade de altura para o transplante. As plantas jovens foram cuidadosamente retiradas da vermiculita, através de lavagem das raízes, seguidas de imersão em bandejas contendo CaSO_4 0,10 mol. m^{-3} , para evitar choque osmótico e danos nas membranas. Em seguida, foram transplantadas para os vasos de Leonard modificados contendo areia lavada. As mudas transplantadas foram irrigadas duas vezes ao dia, com a solução nutritiva modificada de Hoagland e Arnon (1950), inicialmente diluída 1/5, durante oito dias, para aclimação (VIÉGAS, 1999). A irrigação foi conduzida adicionando-se a solução na parte superior dos vasos. O volume evapotranspirado foi diariamente completado com água destilada para 800 cm^3 . Neste caso, a adição da água destilada foi na parte inferior dos vasos. A solução nutritiva foi trocada totalmente duas vezes por semana. As mudas de cada genótipo de cajueiro permaneceram nesse sistema por diferentes períodos: os cajueiros comum e anão foram mantidos até atingirem uma idade fisiológica de 44 dias após emergência. Nesta idade as plantas possuíam semelhante estágio de desenvolvimento indicado pela altura (média de 25 cm) e número de folhas (média igual a 12). O cajueiro microcarpo, por ser mais tardio, permaneceu naquele substrato até atingir uma idade de 68 dias após emergência; ocasião em que apresentava o mesmo padrão de desenvolvimento dos demais (altura e número de folhas).

3.2.2.5. Tratamentos e colheitas

Visando avaliar a performance das três progênies na presença de diferentes condições de estresse salino, concentrações de 50, 100, 150 e 200 mM de NaCl foram adicionadas a solução nutritiva. De acordo com Viégas (1999), estas concentrações correspondem, aproximadamente, aos níveis baixo, médio, alto e muito alto, respectivamente. A intensidade e periodicidade da aplicação das soluções contendo NaCl foram feitas conforme descrito anteriormente (sub-ítem 2.4). O tratamento com solução nutritiva sem adição de NaCl foi tomado como controle. O critério adotado para o tempo de exposição à salinidade baseou-se na mortalidade de mais que 50% das folhas nas plantas submetidas a 200 mM de NaCl, o que ocorreu após 24 dias de estresse para o cajueiro comum e anão e após 14 dias para o microcarpo. Após esses períodos, os vasos foram transferidos às 8:00 para aclimação em

laboratório, durante duas horas. Após limpeza superficial das folhas com pano tipo “perfex”, coletaram-se discos e amostras de folhas para mensuração imediata da atividade de redutase de nitrato e do conteúdo de água. Em seguida, as partes folhas, caules e raízes foram separadas, pesadas, imediatamente acondicionadas em N₂ líquido, armazenadas a -20 °C, liofilizadas, moídas e passadas em peneira com abertura de malha de 100 mesh para obtenção da farinha. O material foi adequadamente armazenado para posteriores análises.

3.2.2.6 .Delineamento experimental e tratamento estatístico

Os tratamentos foram distribuídos de acordo com o delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial 5 X 3 X 3, correspondendo, nessa ordem, aos 5 níveis de NaCl, 3 progênies e 3 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (GOMES et al 1997).

3.2.2.7. Concentrações de sódio e de potássio

Após liofilização do material vegetal -folhas e raízes, tomaram-se amostras de 100 mg que, depois de mineralizadas por via úmida, empregando-se a digestão nítrico-perclórica, determinaram-se os teores de sódio e de potássio por fotometria de chama, conforme descrito em Sarruge e Haag (1974). Os resultados foram expressos em mmol kg⁻¹ massa seca.

3.2.2.8 . Concentração de cloreto

O método utilizado para estimativa do teor de cloreto na planta, foi o da titulação com nitrato de prata, descrito por Malavolta et al., 1989. Amostras previamente liofilizadas (100mg) de tecido vegetal (folhas e raízes), foram acondicionadas em frasco de vidro e,

posteriormente, submetidas a uma extração, em 25 mL de água destilada, em agitador horizontal, a 100 rpm, por 10 minutos. Após filtração, alíquotas de 10 mL do sobrenadante foram tratadas com 1 mL do indicador cromato de potássio (K_2CrO_4) a 5%, quando então deu-se início aos procedimentos de titulação com nitrato de prata ($AgNO_3$) 28 mM, até obtenção de uma coloração marron pálida. Cada mL de nitrato de prata gasto na titulação correspondeu a 2,5 mg de cloreto em 100 mg de massa seca (MS). Os resultados foram expressos em $mmol\ kg^{-1}$ massa seca.

3.2.2.9. Concentração de Ca^{+2} e Mg^{+2}

Após liofilização do material vegetal - folhas e raízes, tomaram-se amostras de 100 mg que, depois de mineralizadas por via úmida, empregando-se a digestão nítrico-perclórica, determinaram-se os teores de cálcio e magnésio por espectrofotometria de absorção atômica conforme descrito em Malavolta et al., (1989). Os resultados foram expressos em $mmol\ kg^{-1}$ massa seca.

3.2.2.10. Concentração de prolina livre

A estimativa do teor de prolina livre seguiu a metodologia de Bates (1973). Amostras de tecido vegetal, previamente liofilizadas, foram maceradas em almofariz em presença de 3,0 mL de ácido sulfossalicílico 3%. Em seguida, 2 mL do extrato foram transferidos para tubos tipo "eppendorf" e centrifugação a 12.000 g. O sobrenadante foi coletado e alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos de ensaio com tampa de enroscar contendo 1 mL de ninhidrina ácida (1 g do reagente de ninhidrina dissolvida em 24 mL de ácido acético glacial + 16mL de ácido fosfórico 6 M) e 1,0mL de ácido acético glacial concentrado. Após homogeneização, os tubos, hermeticamente fechados, foram acondicionados em banho-maria, a 100°C, durante 1 hora. A reação foi interrompida por meio de uma imediata redução da temperatura mediante contato dos tubos de ensaio com água a 2°C. Em seguida, 2 mL de tolueno foram adicionados ao meio de reação. Após

agitação vigorosa, por aproximadamente 15 segundos, duas fases foram formadas. A fase aquosa superior, de coloração avermelhada (cromóforo + tolueno), foi recuperada e submetida a uma leitura em espectrofotômetro, a 520 nm. Os teores de prolina livre foram estimados com base em uma reta padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de L-prolina p.a. (sigma). Os resultados foram expressos em mmol kg^{-1} massa seca de tecido.

3.2.2.11 Concentração de amino ácidos livres totais (N- α -amino livre)

A concentração dos aminoácidos livres totais foi estimada pelo método de Peoples *et al.*(1989). Amostras, previamente liofilizadas, de 100 mg de tecido vegetal foram acondicionadas em tubos de ensaio, hermeticamente fechados, contendo 5 mL de água destilada, os quais foram acomodados em banho-maria, a uma temperatura de 100°C, durante 30 minutos. Em seguida, os tubos foram submetidos a uma centrifugação a 3.000 rpm, por 10 minutos. Ao término desta fase procedeu-se à coleta do sobrenadante, quando então a fase precipitada foi ressuspensa em 5 mL de água destilada, com procedimento de extração similar àquele listado anteriormente. Após aferição com água destilada, em tubos de ensaio graduado, o volume final dos extratos provenientes das duas etapas de extração, foi de 10 mL. A reação para análise e estimativa da concentração de aminoácidos livres totais foi conduzida em tubos de ensaio contendo uma alíquota de 0,1 mL de extrato, em presença de 1 mL de uma solução tamponada a pH 5,0 contendo 0,2 M de citrato de sódio + 1 mL do reagente de ninhidrina (KCN 0,01 M e ninhidrina 5% em methoxy etanol). Após homogeneização, os tubos, hermeticamente fechados, foram acondicionados em banho-maria, a 90°C, por um período de 15 minutos. A reação foi interrompida por meio de uma abrupta redução da temperatura, do meio de reação, mediante contato dos tubos de ensaio com água, a 2°C. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 570 nm. Os teores de aminoácidos livres totais foram estimados com base em uma reta padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de uma mistura padronizada de L-asparagina e L-glutamina. Os resultados foram expressos em mmol kg^{-1} de massa seca de tecido.

3.2.2.12 - Concentração de proteínas solúveis totais

Para a determinação das concentrações das proteínas solúveis totais em tecidos de folhas e raízes foi utilizado o método descrito por BRADFORD (1976). Amostras de tecidos congelados íntegros de folhas ou raízes (12g), foram separadamente macerados em almofariz, na presença de nitrogênio líquido. Em seguida, essas amostras foram submetidas a uma extração em presença de 12 mL de uma solução tampão (Tris-HCl 100 mM; EDTA-Na 5 mM ; polyvinylpyrrolidone 5% m/v e mercaptoethanol 5 mM), por cinco minutos, a uma temperatura de 4 °C. Após filtração, o extrato foi submetido a uma centrifugação (15.000 g) em condições de temperatura similar àquela da extração, durante um período de 15 minutos. As concentrações das proteínas solúveis totais foram estimadas com base em uma reta padrão ajustada a partir de doses crescentes de albumina sérica bovina (Sigma) e leituras em espectrofotômetro a 595 nm. Os resultados foram expressos em mg de proteína g⁻¹. massa seca de tecido.

3.2.2.13 . Açúcares solúveis totais

A extração dos açúcares solúveis totais foi feita com etanol 80%. Para 100 mg de MS foram adicionados 4 mL de etanol 80% durante 15 minutos e centrifugado a 5000 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e o precipitado resuspenso em 3 mL de etanol 80%, por duas vezes. Após junção dos sobrenadantes o volume foi aferido com água deionizada para 10 mL. A dosagem foi feita espectrofotometricamente pelo método “fenol-sulfúrico”, descrito por DUBOIS (1956). Os extratos foram diluídos convenientemente antes da dosagem para a obtenção de leituras na faixa entre 0,2 e 0,5 unidades de absorvância. As leituras foram efetuadas a 490 nm. Foi utilizada glicose (Sigma) como padrão. Os resultados foram expressos em mmol kg⁻¹ massa seca de tecido.

3.2.3. Resultados e Discussão

3.2.3.1. Solutos inorgânicos (Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{+2} e Mg^{+2})

Como esperado, observa-se através das TABELAS 5 e 6 e das FIGURAS 10 A e 11 A, que o acúmulo de Cl^- e Na^+ na raiz aumentou progressivamente em função dos níveis de NaCl externo, nos três genótipos. No caso do Cl^- , houve uma acumulação mais intensa deste íon nas folhas do que nas raízes, nos três genótipos e nos diferentes níveis de NaCl. As concentrações de Cl^- chegaram a atingir valores duas vezes aquelas alcançadas pelo Na^+ . Deve ser destacado que o genótipo microcarpo foi o que exibiu maiores concentrações de Cl^- em todos os níveis de NaCl. A concentração desse íon nesse genótipo atingiu valores em média duas vezes superiores aos encontrados no anão. É interessante observar que a relação folha/raiz para Cl^- foi bastante superior no microcarpo seguido do cajueiro comum. Esses dados evidenciam que nesses dois materiais, especialmente no primeiro, a estratégia de compartimentação desse íon foi desfavorável para prevenir a toxicidade. Nesse caso, a estratégia apresentada pelo anão foi mais adequada no sentido de evitar intensa acumulação de Cl^- nas suas folhas.

TABELA 5 – Concentração de cloreto em raízes e folhas em mudas de cajueiro comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os resultados são a Média de três repetições.

Cl ⁻ Raiz (mmol .kg ⁻¹ MS)							
NaCl							CV ¹
(mM)	Comum		Anão		Microcarpo		(%)
0	187,79	b A	258,22	b A	277,00	b A	8
50	427,23	a A	352,11	a B	469,48	a A	8
100	552,11	a A	439,91	a A	586,85	a A	9
150	563,38	a A	375,59	a A	610,33	a A	9
200	446,01	a A	375,59	a A	573,71	a A	12
CV ² (%)	15		15		14		

Cl ⁻ Folha (mmol .kg ⁻¹ MS)							
NaCl							CV ¹
(mM)	Comum,		Anão		Microcarpo		(%)
0	281,69	b B	234,74	c B	727,70	c A	10
50	633,80	a AB	352,11	c B	1032,86	b A	6
100	774,65	a B	680,75	b B	1342,72	a A	10
150	915,49	a B	1032,86	a B	1338,03	a A	9
200	821,60	a B	1220,66	a A	1366,20	a A	15
CV ² (%)	15		13		15		

- Entre tratamentos, letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

-Entre genótipos, letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

¹ Coeficiente de variação entre os genótipos (colunas).

² Coeficiente de variação entre os tratamentos (linhas).

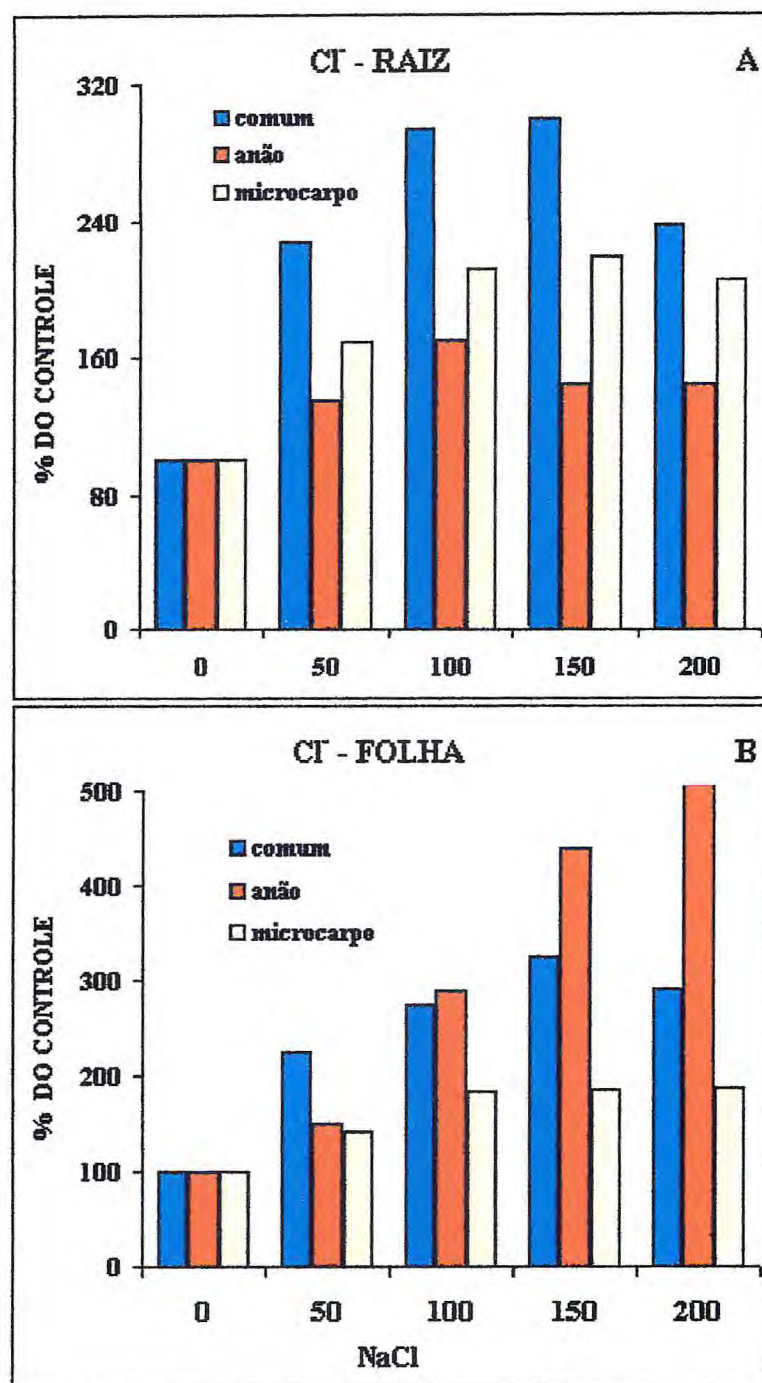


FIGURA 10 – Acumulação de Cloreto – Cl^{-1} em raízes (A) e folhas (B) em mudas de cajueiro comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os valores de 100% de Cl^{-1} em raízes foram 187,79, 258,22 e 277,00 $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ e em folhas foram 281,69, 234,74 e 727,70 $\text{mmol} \cdot \text{Kg}^{-1}$ MS, para os três genótipos, respectivamente.

Além disso, deve ser ressaltado que o tempo de exposição ao NaCl foi menor no microcarpo (14 dias) comparado com os dois outros genótipos (24 dias).

A maior acumulação de Cl^- nas folhas de microcarpo parece estar diretamente relacionada com a maior sensibilidade desse genótipo e com a intensidade das injúrias causadas pelo excesso de NaCl. Conforme tem sido largamente publicado na literatura (MUNNS, 2002), o excesso de íons salinos (Cl^- e Na^+) nas folhas tem sido o fator mais importante nos efeitos do NaCl sobre as glicófitas em geral. VIÉGAS (1999) trabalhando com cajueiro anão, em solução nutritiva, observou que a acumulação de Na^+ e Cl^- ocorreu intensamente nas folhas e que existiu uma relação estequiométrica de aproximadamente 1:1 entre esses íons. Ainda não está claro em cajueiro qual dos dois íons é mais tóxico para as folhas (Viégas et al., 2001). Apesar da maioria dos trabalhos mostrarem que o Na^+ é mais tóxico, pesquisas com mudas de *Citrus* têm mostrado que o Cl^- é o íon mais tóxico (SILVA, 2002). No presente estudo, o genótipo mais sensível (microcarpo) apresentou acumulação de Cl^- nas folhas bem maior que a de Na^+ especialmente nos níveis mais baixos de NaCl (50 mM) onde já se observavam sintomas visíveis de toxicidade, sugerindo que o Cl^- foi o íon mais tóxico para essa espécie de cajueiro.

Segundo Yeo et al. (1991) a acumulação de Cl^- e Na^+ nas folhas pode provocar redução do crescimento, senescência e necrose. Uma alta concentração de Cl^- em folhas expandias de certas espécies está associada a clorose e morte. O aparecimento de clorose foliar em plantas de cevada, quando submetidas a 100 mM durante 5 dias, foi relacionado a uma alta taxa de absorção de Cl^- (GREENWAY et al., 1966). Estudos com cajueiro anão em condições experimentais idênticas conduziram a resultados semelhantes. Silva (2002) obteve uma concentração de Cl^- no tecido foliar 3,7 vezes maior que o controle em plantas de cajueiro anão CP O9 submetidas a 200 mM de NaCl. Um acúmulo mais surpreendente foi encontrado por Viégas (1999), que ao aplicar 100 mM de NaCl em plantas de cajueiro anão CP 1001 constatou uma concentração de Cl^- no tecido foliar 12 vezes maior que o controle. Nesse último trabalho, as concentrações de Cl^- e Na^+ foram também mais elevadas nas folhas, indicando uma possível mobilização do Cl^- da raiz para a parte aérea.

Existe um grande consenso de que concentrações moderadamente elevadas de Na^+ e Cl^- no meio externo radicular provocam grandes alterações na integridade da plasmalema, abaixamento no potencial osmótico e desequilíbrio no balanço de nutrientes minerais (Viégas et al., 2001). Uma das conseqüências imediatas será o aumento nas taxas de absorção dos íons

salinos e o correspondente aumento na cocentração deles nos tecidos. Com o aumento da concentração, principalmente de Na^+ , para níveis tóxicos ocorre perda significativa de K^+ , Ca^{+2} e Mg^+ especialmente das raízes para o meio externo (Viégas, 1999). Esses cátions atuam não somente na nutrição, mas, também, no ajustamento osmótico do citosol, particularmente o K^+ que pode atingir concentrações em torno de 200 mM (Melo, 1999). Portanto, para adaptação ao estresse salino é essencial compatibilizar os níveis dos íons salinos com os nutrientes inorgânicos através de controles na absorção- influxo e perda dos nutrientes das raízes por efluxo. Dessa maneira, dentre os diversos caracteres fisiológicos que contribuem para a adaptação e tolerância ao estresse salino se destaca a manutenção de níveis adequados das relações K^+/Na^+ e K^+/Cl^- (MUNNS, 2002).

Evidências indiretas para explicar os efeitos do excesso de íons baseiam-se na relação entre a concentração interna de íons e a tolerância ao sal. Uma alta concentração de Cl^- em folhas expandidas de certas espécies está associada a clorose e morte e estas injúrias acontecem mesmo quando a concentração de Na^+ nas folhas é baixa, como é o caso de certas frutíferas como o abacate (BINGHAM et al., 1968.), a videira (BERNSTEIN et al., 1969) e em determinadas espécies florestais (BERNSTEIN, 1975). O aparecimento de clorose foliar em plantas de cevada, quando submetidas a 100 mM durante 5 dias, foi relacionado a uma alta taxa de absorção de Cl^- (GREENWAY et al., 1965). A utilização de spray foliar demonstrou que o Cl^- e o Na^+ podem apresentar efeitos danosos nas folhas de plantas frutíferas e que estes efeitos não são aditivos. Os sais podem variar intra e interespecificamente quanto ao modo de inibição do crescimento das plantas (LAGERWERFF, 1969). Além disso, uma resposta diferente no crescimento causada pelos sais pode não ser devido a um efeito iônico específico no metabolismo, podendo haver diferenças entre íons no grau de compartimentação nas folhas ou no transporte às folhas em expansão (OERTLI, 1966).

A resposta dos sais no crescimento das plantas requer estudos detalhados quanto às relações hídricas e iônicas nas folhas de diferentes idades. Ocorre uma grande diferença quanto à concentração iônica entre as espécies. O aumento da concentração de Na^+ em tecidos de plantas cultivadas em NaCl 100 mM está, geralmente, associado a um decréscimo na concentração de K^+ em espécies sensíveis e a um aumento ou níveis constantes de K^+ nas espécies tolerantes (GREENWAY e MUNNS, 1980). Existem, também, grandes diferenças nas concentrações iônicas entre as diversas partes de uma mesma planta. Folhas velhas de plantas não halófitas cultivadas em meio salino apresentam, normalmente, maiores concentrações de Na^+ do que as folhas jovens, como é o caso do feijão (GREENWAY et al.,

1966), a soja e a pimenta (BERNSTEIN, 1961). Resultados semelhantes ocorrem com o Na^+ naquelas espécies que apresentam um transporte elevado de Na^+ para as folhas (GREENWAY et al., 1965). Isto ocorre, provavelmente, devido à combinação de um rápido aumento nas folhas em expansão e a uma absorção prolongada de íons nas folhas expandidas, através do fluxo transpiratório.

A capacidade de ajustamento osmótico inicial para propiciar adaptação às condições de salinidade está relacionada com o equilíbrio entre as taxas de absorção dos íons salinos e as taxas de crescimento (TALEISNIK e GRUNBERG, 1994). Se o primeiro processo exceder o segundo acima de certos níveis críticos para cada espécie, ocorrerá uma acumulação progressiva de Na^+ e Cl^- até níveis tóxicos para o metabolismo (DURAND e LACAN, 1994). Em tomateiro, a tolerância diferencial entre cultivares está relacionada com a capacidade de manutenção de exclusão de Na^+ e Cl^- dos tecidos foliares através da retenção desses íons nas raízes e caules (TALEISNIK e GRUNBERG, 1994). Além disso, a manutenção de altas relações K^+/Na^+ pode ser um caráter favorável para a adaptação às condições de salinidade (CANO et al., 1991). A baixa tolerância à salinidade de algumas glicófitas está relacionada com a pouca habilidade para tolerar ou evitar altos níveis de NaCl na parte aérea. Portanto, a tolerância pode depender da capacidade das raízes de limitar o acesso de Na^+ e Cl^- até a parte aérea (MUNNS, 1993).

Trabalhando com plantas de soja submetidas ao estresse salino moderado, DURAND; LACAN, (1994), observaram que as plantas apresentaram uma apreciável retenção de Na^+ nos caules e nas folhas mais velhas, contribuindo para o baixo transporte para as folhas mais jovens. Os autores observaram, também, uma elevada recirculação desse íon através do floema, contribuindo para a exclusão foliar. Por outro lado, o Cl^- acumulou-se preferencialmente nas lâminas das folhas. Seguindo-se o processo de salinização, observa-se um forte aumento nas concentrações de Na^+ e Cl^- na seiva do xilema (MUNNS, 1988). É possível que a tolerância apresentada por plantas de cevada esteja relacionada com a limitação do transporte de Na^+ no xilema para a parte aérea (MUNNS, 1993). Em algumas leguminosas, como *Phaseolus vulgaris* e *Glicine max*, o xilema do caule próximo das raízes é progressivamente exaurido de Na^+ , através de troca com o K^+ . A reabsorção de Na^+ pelo caule pode contribuir com a exclusão de íons salinos das folhas (DURAND e LACAN, 1994). Entretanto, em *Lupinus albus*, uma espécie sensível à salinidade, observou-se uma intensa exclusão de Na^+ através das raízes (MUNNS, 1988).

Além do K^+ , o íon Ca^{+2} é intensamente afetado pelo excesso de Na^+ , possivelmente, através de deslocamento da plasmalema e perdas por efluxo devido a redução na integridade da membrana (Viégas, 1999). No caso de mudas de cajueiro, o estresse salino causou perdas intensas de K^+ , Ca^{+2} e Mg^{+2} especialmente a partir das raízes. Essas perdas foram correlacionadas com reduções tanto na integridade das membranas como nas taxas de crescimento das raízes (FERREIRA, 2001). Ainda não está suficientemente claro na literatura, se a redução nas concentrações desses íons por efeito do estresse salino é crítica para a sobrevivência e adaptação das espécies cultivadas (Viégas et al., 2001).

Várias pesquisas já evidenciaram que o efeito primário do estresse salino sobre a membrana celular é a ruptura de sua integridade causada pelo deslocamento do Ca^{2+} da superfície celular pelo Na^+ (CRAMER et al., 1985; LYINCH et al., 1987). CRAMER et al. (1987) apresentaram fortes evidências sobre o deslocamento do Ca^{2+} pelo Na^+ , na membrana plasmática em pelos radiculares de mudas de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), quando em condições de estresse salino. PERERA et al. (1995) concluíram que níveis elevados de Ca^{2+} desempenhavam um papel de proteção nas células de halófitas (*Aster Tripolium*), contra os efeitos adversos da salinidade. Quando as plantas são submetidas ao estresse salino, um aumento na concentração de Ca^{2+} pode, normalmente, diminuir os efeitos inibitórios do crescimento. Embora os mecanismos implicados não tenham sido totalmente explicados, o Ca^{2+} pode desempenhar tanto o papel na sinalização como o de estabilização da membrana. Vários estudos indicam que condições de estresse, incluindo a salinidade, induzem o acúmulo de Ca^{2+} citosólico. O papel do Ca^{2+} como mensageiro secundário, em muitos sistemas biológicos, indica que as plantas são capazes de ajustar-se a ambientes salinos ativando uma transdução de sinal que envolve o este íon (ZHU et al., 1998).

Quanto à acumulação de Na^+ em raiz e folha, nos três genótipos de cajueiro estudados no presente trabalho e nos diferentes níveis de NaCl, não se observou acumulação diferenciada nas folhas conforme observado para o Cl. Isso pode ser verificado pela relação folha/raiz que foi de aproximadamente 1,20 nos três genótipos. De qualquer maneira, a concentração de sódio aumentou progressivamente em função dos níveis de NaCl e de maneira semelhante em suas raízes e folhas (TABELA 5 e FIGURA 11). É necessário, ainda, investigar qual dos dois íons salino é mais tóxico para o cajueiro. Em *Citrus*, o Cl é o íon mais tóxico (BAÑULS; PRIMO-MILLO, 1995). A partir dos dados do presente estudo, o Cl foi o único a apresentar uma acumulação que se relacionou com a menor sensibilidade, indicando que, pelo menos no genótipo microcarpo esse íon pode ser mais tóxico do que o

Na^+ . Na maioria das espécies, entretanto, o Na^+ é aparentemente o íon mais tóxico nas plantas superiores por interferir na absorção de K^+ , apresentar efeitos tóxicos diretos sobre algumas enzimas e deslocar o Ca^{+2} das membranas (VIÉGAS et al., 2001).

TABELA 6 – Concentração de sódio em raízes e folhas em mudas de cajueiro comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os resultados são a Média de três repetições.

Na ⁺ - Raiz (mmol.kg ⁻¹ MS)							
NaCl (mM)	Comum		Anão		Microcarpo		CV ¹ (%)
0	154,52	d A	192,70	c A	140,76	c A	16
50	393,45	c a	447,33	b A	419,80	b A	15
100	495,50	b A	550,56	b A	523,03	b A	17
150	605,62	b A	660,67	ab A	653,79	ab A	18
200	750,14	a A	757,02	a A	812,08	a A	16
CV ² (%)	15		14		16		

Na ⁺ - Folha (mmol.kg ⁻¹ MS)							
NaCl	Comum		Anão		Microcarpo		CV ¹ (%)
0	172,05	c A	192,70	b A	227,11	d A	15
50	461,09	b A	509,27	a A	467,98	c A	11
100	571,21	b A	557,44	a A	640,03	bc A	9
150	674,44	a A	626,26	a A	684,43	b A	16
200	763,90	a A	688,20	a A	820,90	a A	17
CV ² (%)	11		14		15		

- Entre tratamentos, letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

-Entre genótipos, letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

¹ Coeficiente de variação entre os genótipos (colunas).

² Coeficiente de variação entre os tratamentos (linhas).

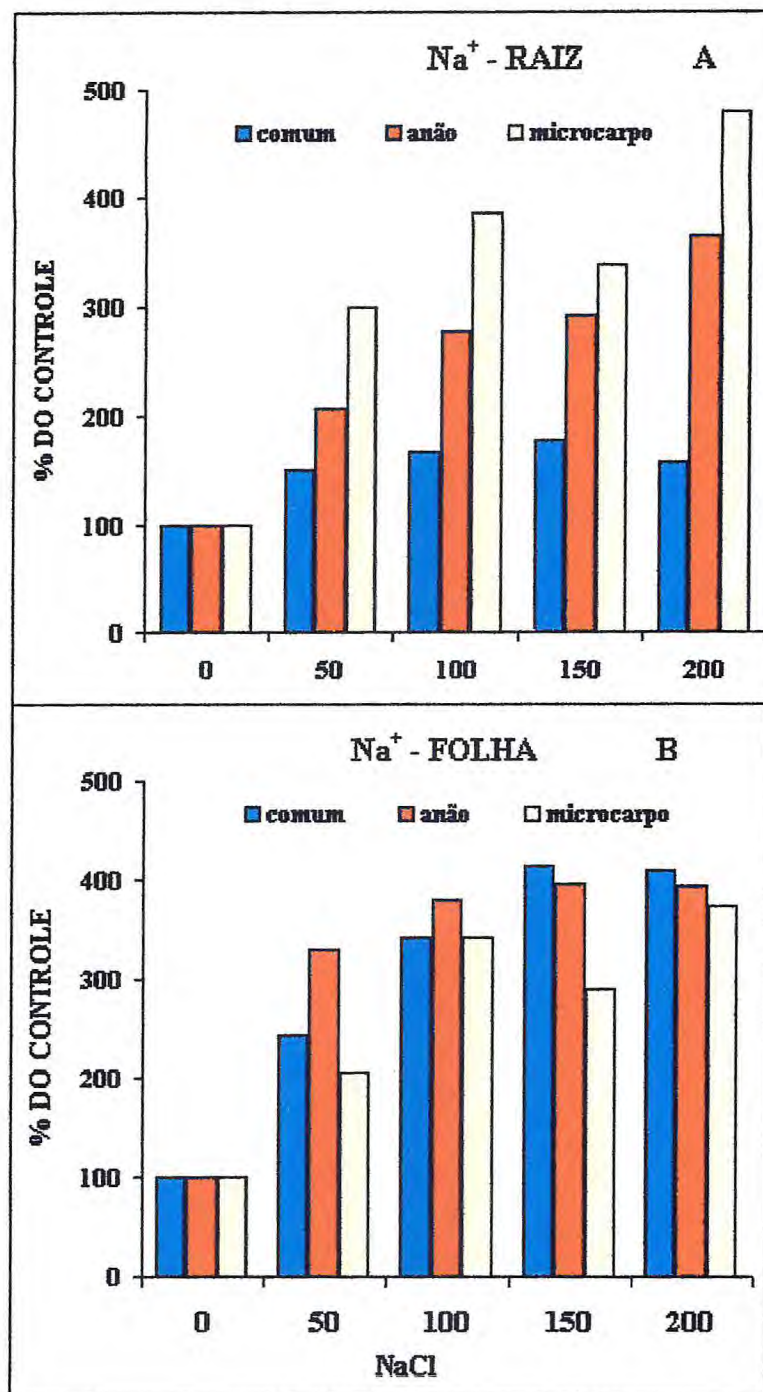


FIGURA 11 – Acumulação de sódio – Na⁺ em raízes (A) e folhas (B) em mudas de cajueiro comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os valores de 100% de Na⁺ em raízes foram 213,58, 148,42 e 103,17 mmol .Kg⁻¹ e em folhas foram 152,04, 152,04 e 179,19 mmol. Kg⁻¹ MS, para os três genótipos, respectivamente.

A concentração de K^+ presente nas raízes dos três genótipos foi reduzida pelo NaCl já a partir de 50 mM (TABELA 7 e FIGURA 12A). Nesse nível de NaCl, os teores de K^+ corresponderam a 70, 59 e 77 %, comparados ao controle, no comum, anão e microcarpo, respectivamente. No nível mais elevado de NaCl (200 mM), a redução foi drástica nos três genótipos: 68, 47 e 36%, na mesma ordem citada anteriormente. Nas folhas, as concentrações de K^+ não foram alteradas significativamente pelos níveis de NaCl, nos três genótipos, apesar do comum mostrar menores concentrações com o aumento dos níveis de NaCl, comparado com os outros genótipos. Resultado semelhante foi observado recentemente em 10 genótipos de cajueiros jovens submetidos a 50 mM de NaCl (FERREIRA, 2000), para o clone CP 1001 cultivado em solução nutritiva com 50 e 100 mM (VIÉGAS et al., 2001). Esse tipo de resposta é, freqüentemente, encontrado na literatura (MUNNS, 1993; DURAND; LACAN, 1994; RODRÍGUEZ et al., 1997) e pode ser explicado pelo fato do NaCl causar danos nas membranas, além de poder acarretar aumentos no efluxo de K^+ para o meio externo (NIU et al. 1995). Resta esclarecer, no entanto, se essas perdas intensas de K^+ do sistema radicular de plantas jovens de cajueiro poderiam comprometer o crescimento, haja vista que esse nutriente é fundamental para diversas reações bioquímicas e manutenção do potencial osmótico do citoplasma (MARSCHNER, 1995).

É interessante observar, que o genótipo mais sensível ao NaCl - o microcarpo apresentou concentrações de K^+ nas raízes significativamente superiores aos dos outros genótipos, especialmente, quando comparada com o comum sob estresse salino (TABELA 7 e FIGURA 12A). Esses resultados evidenciam a dificuldade de estabelecer relações diretas entre a expressão de um caráter e a tolerância ao estresse salino, quando se comparam genótipos diferentes. A questão do envolvimento do K^+ na tolerância ao estresse salino tem sido centralizada na seleção de plantas que possam possuir maior atividade de proteínas específicas de membranas para K^+ (canais iônicos) e manutenção do *status* desse nutriente nos tecidos de plantas sob estresse salino (LAUCHLI; EPSTEIN, 1990). No primeiro caso, a expressão de proteínas com maior seletividade por K^+ , em relação ao Na^+ , poderia garantir menor influxo de Na^+ para o interior das raízes. No segundo caso, plantas mais tolerantes teriam maior seletividade para o efluxo de K^+ a partir do citoplasma, mantendo, assim, maiores níveis desse elemento nos tecidos. Como o NaCl, no presente estudo, foi aplicado após um adequado suprimento de K^+ para as raízes- feito através de solução nutritiva contendo 6 mM de K^+ , durante um período razoável, havia a expectativa de que as mudas de

cajueiro, particularmente as do tipo comum, sofressem significativas perdas de K^+ devido, provavelmente, a aumento no efluxo devido a distúrbios nas membranas (VIÉGAS, 1999).

Quando progênies de clones de cajueiro anão (CP 06 e CP 09) foram expostos a 200 mM de NaCl se observou um grande decréscimo nas concentrações de K^+ somente nas raízes, em torno de 50%. Deve-se ressaltar que somente nas raízes do CP 09 foram observadas reduções significativas nas concentrações de Ca^{+2} e de Mg^{+2} (SILVA, 2002). Apesar dessas diferenças, os dois clones estudados mostraram apenas discretas diferenças de crescimento. Outra variável freqüentemente associada com a tolerância ao estresse salino é a relação Na/K nos tecidos. No presente estudo o genótipo mais sensível apresentou essa relação na raiz, de aproximadamente, 3 vezes inferior àquela apresentada pelo tipo comum, o qual foi mais sensível em termos de variáveis de crescimento, conforme mostrado no trabalho anterior. Aparentemente, a tolerância ao NaCl entre esses três genótipos não pode ser explicada pela intensidade de acumulação de Na^+ e Cl^- nos tecidos de raiz e folha, nem pela manutenção dos níveis de K^+ nas plantas. Desta forma, as estratégias fisiológicas adotadas para superar o estresse salino variam intensamente entre espécies e mesmo entre cultivares (MUNNS, 2002).

TABELA 7 – Concentração de potássio em raízes e folhas em mudas de cajueiro comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os resultados são a Média de três repetições.

K ⁺ - Raiz (mmol.kg ⁻¹ MS)				
NaCl (mM)	Comum	Anão	Microcarpo	CV ¹ (%)
0	193,67a B	262,67a C	328,67a A	10
50	135,00b B	155,67b B	254,00b A	12
100	81,67c C	152,67b B	225,00b A	13
150	60,33c C	131,00b B	211,33b A	12
200	61,67c C	140,00b B	210,67b A	13
CV ² (%)	16	11	9	
K ⁺ - Folha (mmol.kg ⁻¹ MS)				
NaCl (mM)	Comum	Anão	Microcarpo	CV ¹ (%)
0	334,91a A	340,26a A	394,69a A	9
50	297,46a B	291,00a B	422,65a A	12
100	258,94a B	321,00a B	464,38a A	9
150	260,00a B	330,00a B	470,80a A	11
200	280,00a B	338,00a B	500,18a A	12
CV ² (%)	13	12	11	

- Entre tratamentos, letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

-Entre genótipos, letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

¹ Coeficiente de variação entre os genótipos (colunas).

² Coeficiente de variação entre os tratamentos (linhas)

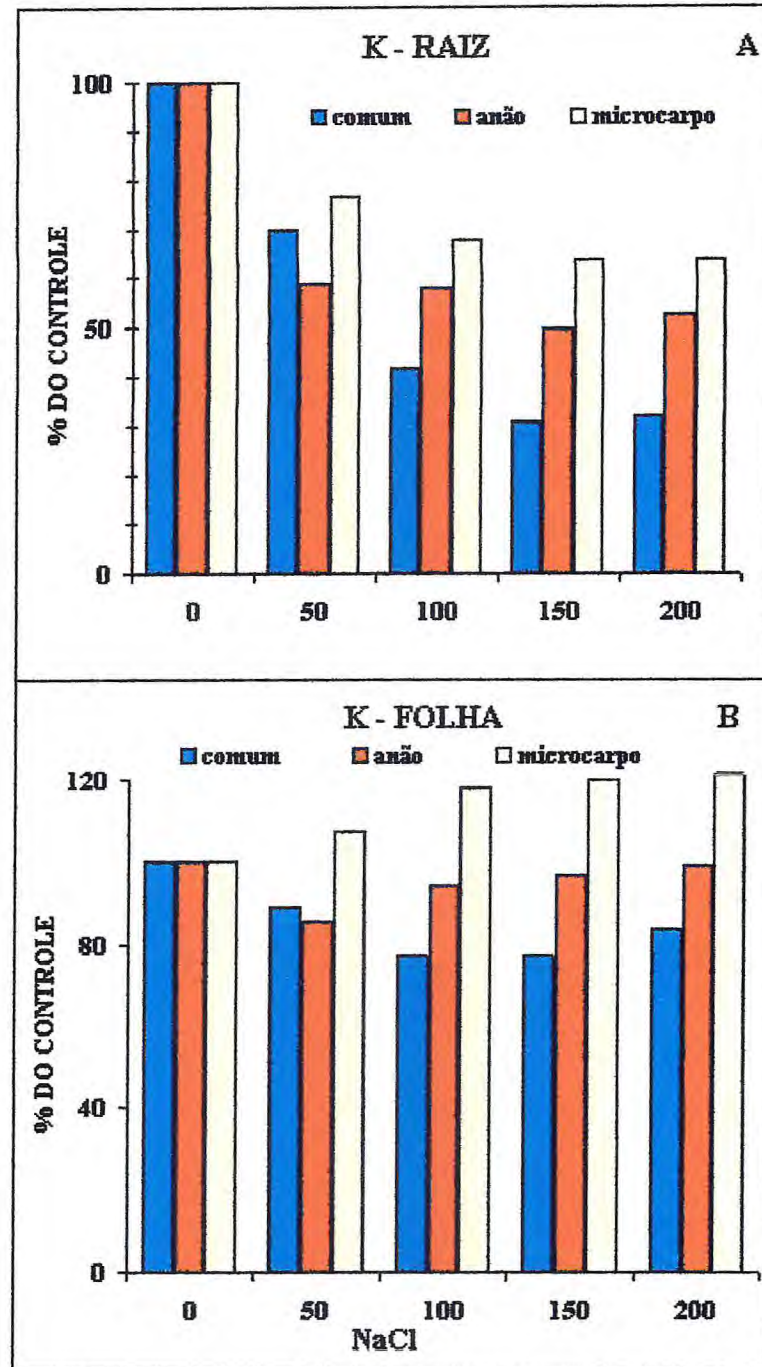


FIGURA 12 – Acumulação de cloreto – K^+ em raízes (A) e folhas (B) em mudas de cajueiro comum, anão e microcarpo submetidas a doses crescentes de NaCl. Os valores de 100% de K^+ em raízes foram 193,07, 262,67 e 328,57 $mmol \cdot kg^{-1}$ e de Na^+ em folhas foram 334,91; 310,26 e 392,69 $mmol \cdot Kg^{-1}$ MS, para os três genótipos, respectivamente.

O genótipo comum, além de mostrar concentrações mais baixas de Na^+ , Cl^- e K^+ (TABELAs 5, 6 e 7), em relação aos dois outros genótipos, também mostrou redução significativa nas concentrações de Ca^{+2} e Mg^{+2} nas folhas das plantas tratadas com NaCl, enquanto que nos dois outros genótipos os níveis desses íons não foram afetados significativamente (TABELA 8 e FIGURA 13). Os níveis desses nutrientes nas folhas das plantas estressadas de comum caíram até 40% em relação ao controle. Apesar da concentração desses nutrientes não ter sido determinada nas raízes, é de se esperar efeitos até mais intensos do NaCl sobre a redução das concentrações de Ca^{+2} e Mg^{+2} no tipo comum, similarmente ao que ocorreu com a concentração de K^+ nas raízes. Os resultados obtidos por SILVA (2002) em mudas de cajueiro mostraram maior perda de Ca^{+2} e Mg^{+2} nas raízes em relação às folhas, corroborando com essa idéia. Os efeitos negativos do Na^+ sobre os níveis de Ca^{+2} na parede celular (apoplasto), membranas e citoplasma são bastante conhecidos (CRAMER; EPSTEIN; LAÜCHLI., 1989; FRANÇOIS et al., 1991).

A despeito do cajueiro comum ter mostrado as maiores reduções nas concentrações de K^+ , Ca^{+2} e Mg^{+2} , não é possível afirmar se tais alterações são capazes, *per se*, de conferirem maior sensibilidade à salinidade em condições de campo, haja vista serem desconhecidos os níveis críticos desses nutrientes nessa espécie. De qualquer maneira, apesar desse genótipo ter mostrado uma boa tolerância ao NaCl em termos de crescimento, os indicadores de acumulação dos solutos inorgânicos sugerem que esse genótipo apresentou menor habilidade para realizar ajustamento osmótico, haja vista que os cátions inorgânicos são os mais importantes na homeostase e potencial osmótico sob condições de estresse hídrico e salino (MUNNS, 2002). É interessante observar que as plantas matrizes das sementes que deram origem as mudas de cajueiro comum no presente trabalho são provenientes de dunas costeiras, portanto, submetidas à condição de salinidade. Como as condições de estresse salino do presente trabalho foram impostas de forma relativamente artificial e somente na fase inicial do desenvolvimento das plantas, associado com a extrema complexidade dos mecanismos de aclimação, adaptação e tolerância, fica difícil generalizar sobre o peso relativo de cada caractere fisiológico sobre grau de tolerância de cada genótipo.

TABELA 8 – Concentração de cálcio e magnésio em mudas de cajueiro comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os resultados são a Média de três repetições.

Ca ²⁺ - Folha (mmol.kg ⁻¹ MS)							
NaCl (mM)	Comum		Anão		Microcarpo	CV ¹ (%)	
0	92,30a	A	68,60b	B	112,44a	A	11
50	67,46ab	B	63,50b	B	107,23a	A	15
100	59,86b	A	63,80b	A	103,47a	B	15
150	52,75b	A	70,80a	A	87,24b	B	15
200	56,32b	A	80,10a	A	93,53a	B	14
CV ² (%)	14		17		16		

Mg ²⁺ - Folha (mmol.kg ⁻¹ MS)							
NaCl (mM)	Comum		Anão		Microcarpo	CV ¹ (%)	
0	96,53a	A	65,76a	B	63,92a	B	10
50	81,19a	A	53,54a	B	60,78a	B	12
100	62,22b	A	53,96a	A	55,97a	A	13
150	44,20c	A	60,10a	A	52,47a	A	12
200	55,97b	A	62,88a	A	58,00a	A	13
CV ² (%)	20		17		18		

- Entre tratamentos, letras minúsculas iguais, indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

-Entre genótipos, letras maiúsculas iguais, indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

¹ Coeficiente de variação entre os genótipos (colunas).

² Coeficiente de variação entre os tratamentos (linhas).

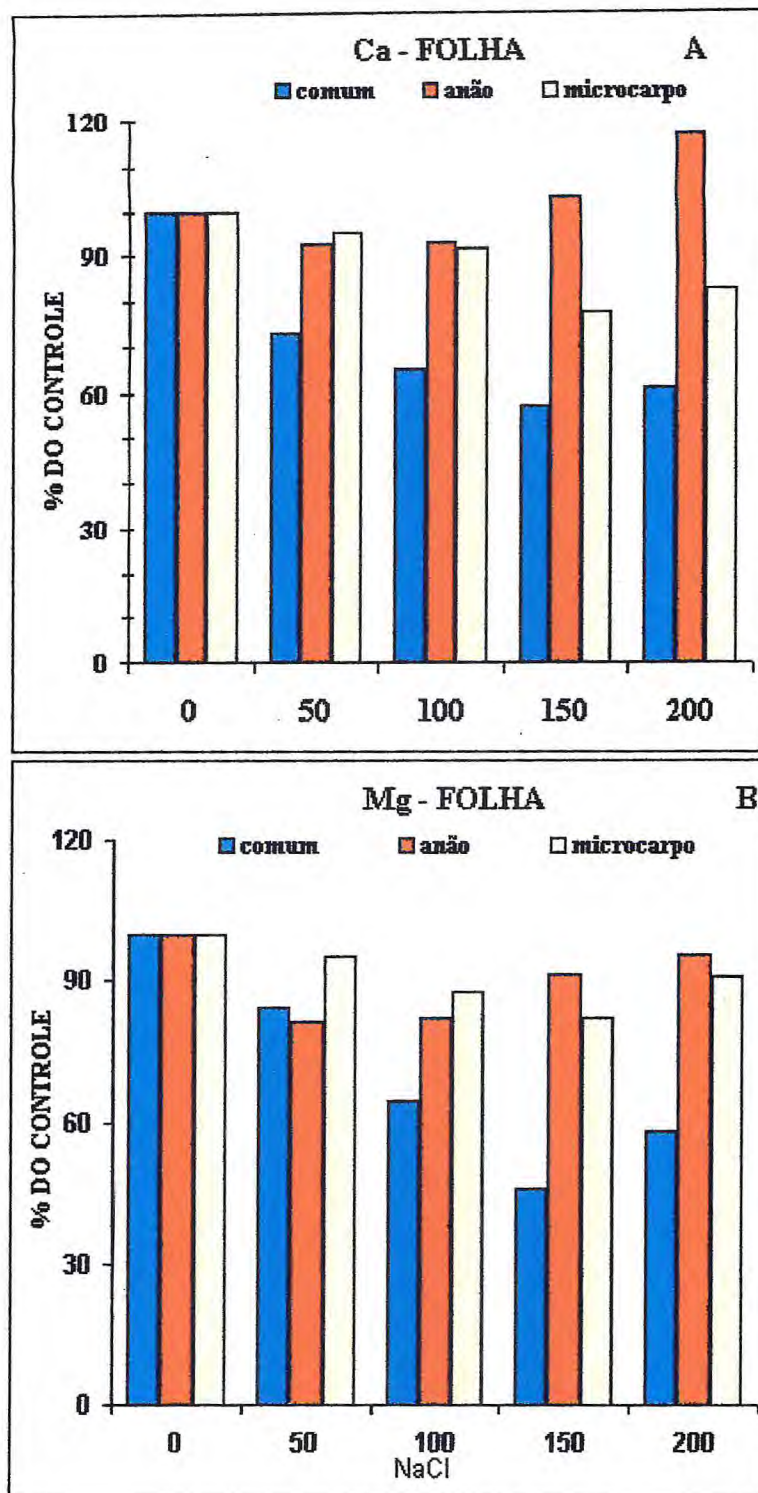


FIGURA 13 – Acumulação de Cálcio – Ca^{+2} (A) e Magnésio – Mg^{+2} em folhas (B) em mudas de cajueiro comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os valores de 100% de Ca^{+2} foram 92,30, 68,60 e 112,44 $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ e de Mg^{+2} foram 96,53, 65,76 e 63,92 $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ MS, para os três genótipos, respectivamente

3.2.3.2. Solutos Orgânicos

Os tratamentos de estresse salino induziram acúmulo intenso de prolina, especialmente nas folhas dos três genótipos de cajueiro (TABELA 9 e FIGURA 14,). As raízes apresentaram menor acumulação desse aminoácido. Como era esperado, a concentração desse aminoácido nas folhas foi proporcional à intensidade das injúrias causadas pelo NaCl (VIÉGAS; SILVEIRA, 1999). Entretanto, quando os genótipos foram comparados entre si, observaram-se diferenças interessantes. No nível mais baixo de NaCl - 50 mM, o tipo comum não apresentou nenhuma acumulação de prolina nas folhas, enquanto que o anão e o microcarpo apresentaram incrementos de aproximadamente 3 e 4 vezes, respectivamente, comparado aos respectivos controles. Em 100 mM de NaCl as plantas do cajueiro comum apresentaram concentração de 13,12 mmol kg⁻¹ contra 18,40 e 19,60 mmol kg⁻¹, para anão e microcarpo, respectivamente. É interessante observar que a genótipo comum apresentou maior acumulação de prolina nos níveis mais elevados de estresse, enquanto que o microcarpo apresentou uma tendência de saturação já a partir de 100 mM. O tipo anão apresentou nitidamente um comportamento intermediário.

O acúmulo de aminoácidos livres totais (excluído prolina e hidroxiprolina) nas folhas dos três genótipos também aumentou em resposta ao estresse salino. Entretanto, esse aumento ocorreu em menor extensão comparado ao observado para prolina (TABELA 10 e FIGURA 15A). O genótipo microcarpo apresentou, também, menor acúmulo de aminoácidos, enquanto que o anão e o comum apresentaram maiores teores dessa fração nitrogenada. É interessante observar que o comum apresentou uma concentração relativa de prolina nas folhas (expressa em relação ao total de aminoácidos) de cerca de 60% contra 26% e 13% no anão e microcarpo, respectivamente, no nível de 200 mM. Esses resultados evidenciam que a prolina teve sua síntese *de novo* intensamente favorecida a partir do *pool* de aminoácidos livres conforme demonstrado recentemente em folhas de cajueiro (SILVEIRA et al., 2002). A questão que envolve a acumulação de prolina em plantas estressadas ainda não está clara em relação a pelo menos dois pontos: (1) Quais os mecanismos de indução e as vias metabólicas que dão origem às concentrações tão elevadas? (2) Essa acumulação está efetivamente relacionada com maior tolerância à salinidade?

Diversos trabalhos evidenciaram papel benéfico da prolina no metabolismo celular. Esses mecanismos envolvem desde a proteção de proteínas e estruturas supramoleculares (membranas) através de diversos mecanismos até o seu envolvimento como fonte de C, N e

TABELA 9 – Concentração de prolina em raízes e folhas em mudas de cajueiro comum, anão e Microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os resultados são a Média de três repetições.

Prolina - Raiz (mmol.kg ⁻¹ MS)				
	Comum	Anão	Microcarpo	CV ¹
0	0,81b B	1,73a B	4,0a B	19
50	1,04b B	1,45a B	6,1a A	10
100	1,58c B	3,71ab AB	6,0a A	19
150	2,32b B	5,23b A	6,2a A	16
200	4,01a B	7,80c A	5,9a AB	19
CV ² (%)	13	22	21	

Prolina – Folha (mmol.kg ⁻¹ MS)				
NaCl	Comum	Anão	Microcarpo	CV ¹
(Mm)				(%)
0	3,60c A	2,70c A	2,80c A	15
50	3,40c B	8,20c A	11,73b A	15
100	13,10b A	18,40b A	19,64a A	14
150	58,40a A	30,30a B	18,19a B	13
200	50,50a A	33,90a B	18,80a C	12
CV ² (%)	13	15	14	

- Entre tratamentos, letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

-Entre genótipos, letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

¹ Coeficiente de variação entre os genótipos (colunas).

² Coeficiente de variação entre os tratamentos (linhas).

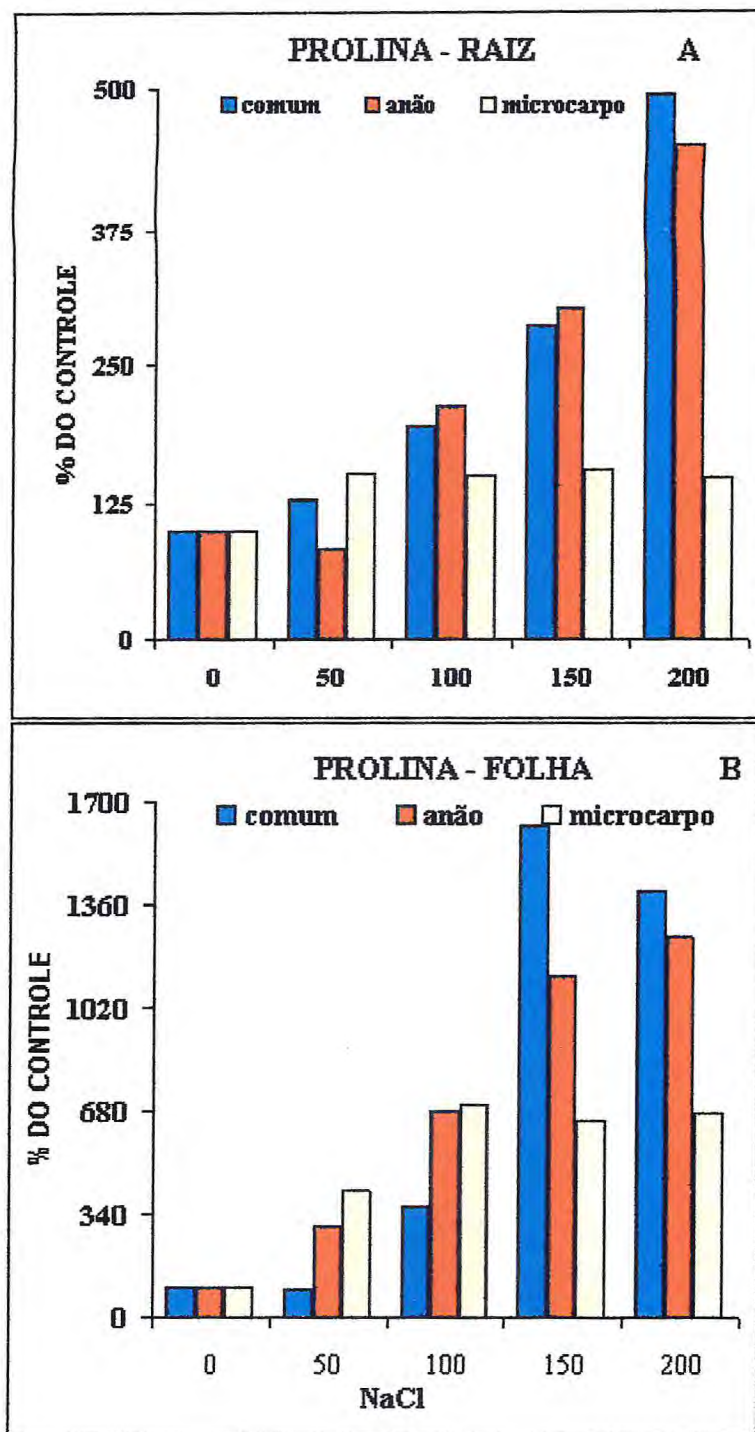


FIGURA 14 – Concentração de prolina nas raízes – Pro (A) e folhas em mudas de cajueiro comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os valores de 100% para Pro na raiz foram 0,81, 1,73 e 4,00 $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ e na folha foram 3,60, 2,70 e 2,80 $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ MS, para os três genótipos, respectivamente.

NADPH, durante o período de recuperação do estresse (SILVEIRA et al., 2002). Por outro lado, seu papel como soluto envolvido com o ajustamento osmótico em plantas sob estresse salino parece ser pouco provável, tendo em vista a magnitude de sua concentração quando comparada com íons inorgânicos. Quanto ao seu envolvimento na tolerância ao estresse salino, existe muita controvérsia na literatura. Mesmo com o grande número de plantas transgênicas obtidas atualmente para superexpressar genes envolvidos com a síntese de prolina, a questão permanece em aberto. Basicamente, duas linhas de pensamento podem ser conduzidas quanto à origem e função da prolina. Num extremo, a prolina estaria diretamente envolvida com a tolerância e seria, principalmente, um produto de expressão gênica induzida por estresse (KRISHNAMURTHY, 1991). Em outro plano, ela seria o produto de distúrbios no metabolismo, especialmente, de aminoácidos e proteínas (SILVEIRA et al., 2002).

Quando se comparam variedades e espécies de plantas superiores submetidas ao estresse salino verifica-se que nem sempre as mais tolerantes acumulam maior quantidade de prolina (VIÉGAS et al., 1999). Ao contrário, em muitos casos os materiais mais sensíveis acumulam mais prolina. Assim, seria possível inclusive relacionar o nível desse aminoácido com a intensidade de injúria ou sensibilidade do tecido (VIÉGAS, 1999). Além disso, a acumulação desse aminoácido frequentemente é associada com redução no crescimento inclusive em organismos cultivados em condições não estressantes (MAGGIO et al., 2002). No caso do presente estudo, o genótipo que acumulou maior quantidade de prolina (o tipo comum) acumulou menores quantidades de solutos inorgânicos nas folhas, inclusive com decréscimos nas concentrações de K^+ , Ca^{+2} e Mg^{+2} (TABELAS 7 e 8). Esse genótipo apresentou reduções no crescimento menores que o genótipo mais sensível, o microcarpo. Os resultados referentes a prolina e aminoácidos associados com os outros obtidos anteriormente ainda não são, contudo, suficientes para explicar a maior sensibilidade ao NaCl exibida por esse último genótipo ao NaCl. Estaria a menor acumulação relativa de prolina (TABELA 9) diretamente envolvida com os mecanismos de tolerância ao estresse salino nas mudas de cajueiro?

Ao contrário dos aminoácidos livres totais, as folhas das mudas de cajueiro não foram capazes de acumular açúcares livres (TABELA 10 e FIGURA 15 B). Na realidade, nos três genótipos se observou uma clara tendência de decréscimo na concentração de açúcares em resposta ao estresse salino. A maioria das plantas pode acumular solutos orgânicos quando submetidas ao estresse osmótico. Vários estudos indicam que as concentrações elevadas de solutos orgânicos no citoplasma podem conferir as seguintes funções: (a) contribuição no

TABELA 10 - Concentração de aminoácidos e açúcares solúveis totais em folhas em plantas de cajueiro comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os resultados são a Média de três repetições.

NaCl (mM)	Aminoácido (mol.Kg ⁻¹ MS)						CV ¹ (%)
	Comum		Anão		Micro		
0	36,38	b B	54,21b	B	74,40	b A	13
50	55,29	b C	90,75b	B	122,90	a A	15
100	102,00	a B	154,97a	A	104,70	a B	12
150	90,20	b B	156,64a	A	126,69	a A	15
200	83,00	b B	131,70a	A	139,92	a A	14
CV ² (%)	15		13		12		

NaCl (mM)	Açúcares totais (mol.kg ⁻¹ MS)						CV ¹ (%)
	Comum		Anão		Micro		
0	0,42	a A	0,45	a A	0,37	a A	16
50	0,42	a A	0,26	a B	0,40	a AB	14
100	0,35	a A	0,22	b B	0,39	a A	10
150	0,34	a A	0,30	b A	0,36	a A	6
200	0,32	a A	0,31	b A	0,35	a A	14
CV ² (%)	15		17		5		

- Entre tratamentos, letras minúsculas iguais, indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

- Entre progênies, letras maiúsculas iguais, indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

1 Coeficiente de variação entre as progênies (colunas).

2 Coeficiente de variação entre os tratamentos (linhas).

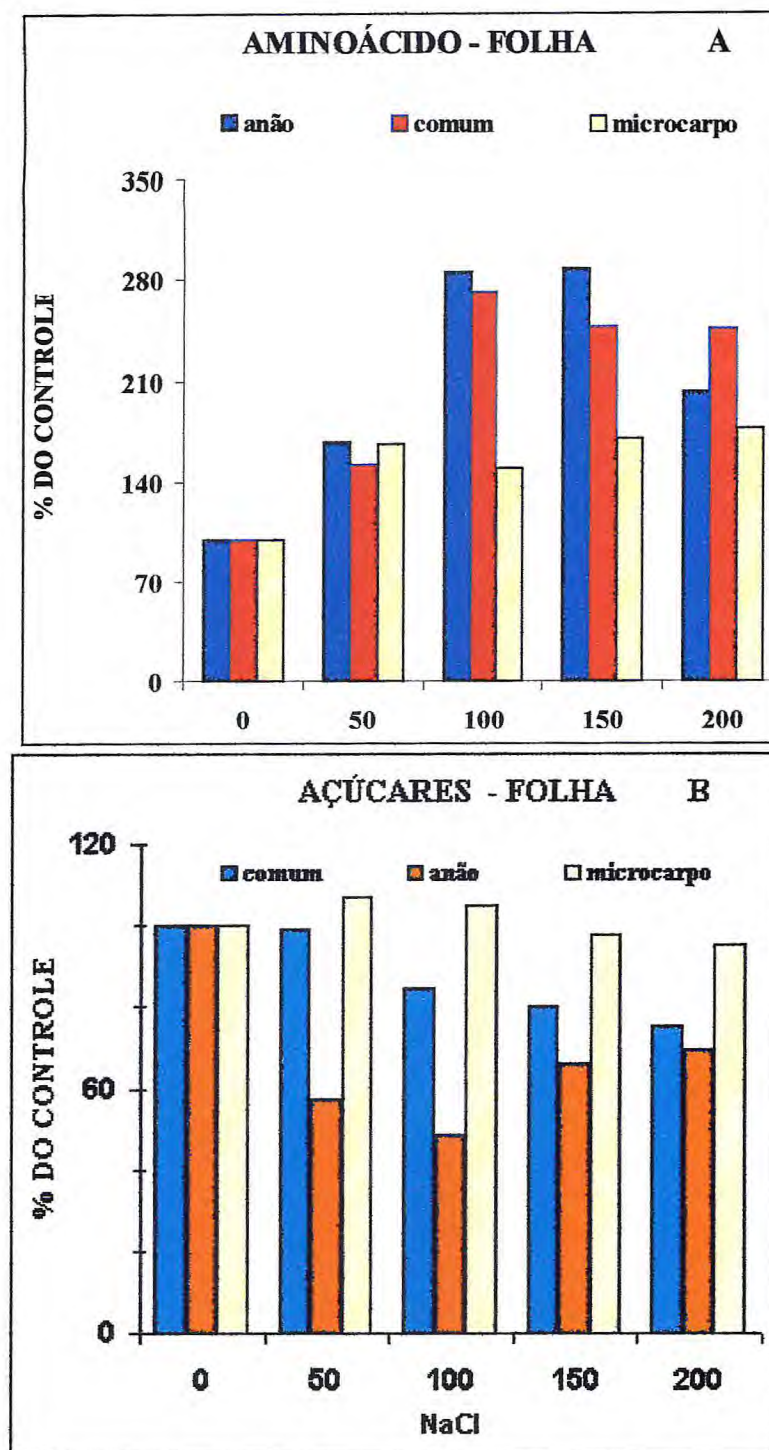


FIGURA 15 – Concentração de aminoácido (A) e de açúcares totais (B) em folhas de mudas de cajueiro comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os valores de 100% para a concentração de aminoácidos foram de 36,38, 54,21 e 74,40 mol.kg⁻¹ e para açúcares foram 0,42, 0,45 e 0,37 mol.kg⁻¹ MS para os três genótipos, respectivamente.

balanço osmótico quando os eletrólitos no citoplasma estão em menor concentração do que no vacúolo (STEWART e LEE, 1974) e (b) um efeito protetor às proteínas e estruturas celulares quando na presença de uma concentração elevada de eletrólitos no citoplasma (POLLARD e WYN, 1979). As enzimas das plantas podem ser protegidas contra os efeitos deletérios do NaCl (HELLEBUST, 1976), como foi mostrado para a malato desidrogenase em cevada (POLLARD; WYN JONES, 1979), para a fosfoenolpiruvato carboxilase na glicófito *Zea mays* e nas halófitas *Suaeda monoic* (SHOMER-LLAN; WAISEL, 1986) e *Salsolka soda* (MANETAS, 1990). Entre os solúveis compatíveis mais comuns que parecem conferir efeito protetor às enzimas, estão a glicina-betaina, prolina, trigonelina e glicerol (SHOMER-ILAN; WAISEL, 1986).

Os aminoácidos são fatores chaves no desenvolvimento das plantas superiores. Além do mais, os aminoácidos agem como moléculas sinalizadoras, controlando seu próprio metabolismo e a expressão de diversos gens (NIELSEN et al., 1998). Sob condições de estresses ambientais muitas plantas acumulam solutos como a prolina e a glicina-betaina. A acumulação de prolina pode ocorrer a partir de quatro diferentes modos: (a) síntese de novo nas células afetadas (RHODES; HANDA; BRESSAN, 1986), (b) diminuição em sua degradação (c) alterações nos sistemas de transporte específico que distribui prolina para os locais necessários e (d) degradação de proteínas. A prolina é sintetizado no citosol, principalmente a partir do glutamato via Δ -pirroline-5-carboxilato (P5C), catalizado pelo P5C-sintetase (P5CS) e P5C-reductase (SCHWACKE et al., 1999).

A acumulação de prolina e de outros solutos orgânicos compatíveis pode contribuir para o ajustamento osmótico do citosol. Essa adaptação pode resultar numa tolerância maior ao estresse hídrico e salino. O ajustamento osmótico é definido como diminuição do potencial osmótico em resposta ao déficit hídrico ou à salinidade (TURNER, 1979 e 1986), que permite a manutenção de uma turgescência positiva em potenciais hídricos relativamente mais baixos (ACKERSON; HERBERT, 1981). A presença de prolina no tecido vegetal tem levado a uma maior tolerância à salinidade em uma grande variedade de espécies de plantas (KAVI et al., 1995; KRISHNAMURTHY, 1991). Mas, por outro lado, a tolerância em várias espécies de plantas de tomate à salinidade foi inversamente correlacionada com o aumento da concentração de prolina (JAMES *et al.*, 1988). A falta de correlação entre o nível de prolina e a tolerância à salinidade em certas espécies de plantas levam vários autores (ZHU et al., 1998; VIÉGAS; SILVEIRA, 1999) a concluir que a acumulação de prolina é meramente uma consequência do estresse e não leva, necessariamente, a uma resistência à salinidade.

Os resultados obtidos nesta pesquisa, sugerem que o acúmulo de prolina em folhas de cajueiro deve estar associado, pelo menos parcialmente, a degradação de proteínas. De fato, comparando os três genótipos, com base nas observações visuais feitas nas folhas ao longo do experimento, observou-se que os primeiros sinais de necrose iniciaram com 50 mM no microcarpo, 100 mM no anão e 150 mM no comum. Além disso, as raízes, quando comparadas com as folhas, exibiram maior tolerância relativa em termos de redução no crescimento dos três genótipos. Assim, os resultados levam a sugerir que a acumulação desse aminoácido em mudas de cajueiro está mais associada com a sensibilidade e/ou injúrias nos tecidos causadas pelo estresse salino.

Analisando a acumulação dos principais solutos inorgânicos (Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{+2} e Mg^{+2}) e solutos orgânicos (prolina, aminoácidos livres e açúcares solúveis), especialmente nas folhas dos três genótipos estudados, é possível concluir que o genótipo mais sensível ao NaCl (o microcarpo) apresentou quantidade de solutos inorgânicos (portanto, possivelmente maior capacidade de ajustamento osmótico) superior ao apresentado por um genótipo mais tolerante (o tipo comum). Não foi possível associar a sensibilidade ao estresse salino com a intensidade de acumulação de Na^+ e Cl^- em raiz e folha. O nível de prolina nas folhas foi proporcional a intensidade de injúria causada pelo NaCl. Entretanto, a capacidade de acumular prolina, em relação ao total de aminoácidos livres, foi menor nas folhas do genótipo mais sensível ao NaCl. Concluindo, é possível afirmar que a acumulação dos solutos, isoladamente, não explica diferenças de sensibilidade ao NaCl entre as mudas dos três genótipos de cajueiro pesquisadas.

3.3. **TRABALHO III** – Atividade de enzimas envolvidas com a assimilação do N inorgânico em mudas de três genótipos de cajueiro em resposta a diferentes níveis de NaCl.

3.3.1. Introdução

A redutase de nitrato (RN) é uma das enzimas mais sensíveis ao estresse hídrico, podendo funcionar como indicador de sensibilidade a esse tipo de estresse (SILVEIRA et al., 2001a). Em termos de estresse salino, a RN também tem mostrado grande sensibilidade a despeito da literatura ter apresentado alguns trabalhos contraditórios (SILVEIRA et al., 2001b). Essa enzima apresenta mecanismos muito complexos para sua regulação incluindo fatores endógenos e fatores ambientais. Sua atividade apresenta correlação positiva com o estado metabólico e crescimento das plantas sendo inclusive utilizada como índice fisiológico para introdução em programas de melhoramento genético (MATOS, 2001). Em cajueiro, a atividade de RN foi intensamente reduzida pelo estresse salino (VIÉGAS et al., 1999). Dessa maneira, pode ser assumido que a atividade dessa enzima pode representar um dos elos fracos no conjunto de reações que determinam o crescimento sob condições de estresse salino e, portanto, diretamente relacionada com a capacidade de adaptação.

O nitrogênio é o nutriente mineral mais importante para o crescimento e produção das plantas (SILVEIRA, 1987). Sob condições de salinidade, a aquisição e assimilação de nitrato freqüentemente limitam o crescimento e o ajustamento osmótico das plantas cultivadas (RABER, 1993; SILVEIRA et al, 1998). A redução assimilatória do nitrato, através da RN (EC.1.6.6.1), representa o principal ponto de controle quando a fonte externa é o nitrato, enquanto que a atividade de glutamina sintetase (EC.6.3.1.2) representa o mais importante passo de controle da assimilação da amônia até aminoácidos (LEA, 1997). Esses processos do metabolismo do nitrogênio são fortemente interdependentes e estão sob forte regulação metabólica. VIÉGAS *et al.* (1999) demonstraram que a salinidade reduz intensamente a atividade da redutase de nitrato em folhas e raízes de plantas jovens de cajueiro. É provável que os mecanismos de ação do NaCl sejam distintos em raízes e folhas. Nas primeiras é possível que possa existir um efeito direto do Cl⁻ sobre a atividade da RN enquanto que nas

folhas o efeito é principalmente indireto através da redução no fluxo de nitrato das raízes até as folhas provocadas pela diminuição nas taxas de transpiração e na absorção de nitrato.

A assimilação de NO_3^- não é apenas necessária ao crescimento das plantas, mas alguns de seus derivados metabólicos podem ser utilizados no ajustamento osmótico das plantas submetidas ao estresse salino. Conseqüentemente, sugere-se que quanto maior a sensibilidade imposta pela salinidade à assimilação de nitrogênio, mais severo é o efeito salino sobre o crescimento das plantas (VIÉGAS; SILVEIRA, 1999). A redutase de nitrato catalisa a redução de NO_3^- a NO_2^- e sua atividade é induzida pelo nitrato. A atividade da RN é o passo limitante da conversão do N-NO_3^- até a síntese de aminoácidos (CAMPBELL, 1999). O processo de assimilação do nitrato é relativamente mais sensível ao estresse hídrico do que à assimilação fotossintética do CO_2 , embora exista uma relação metabólica estreita entre esses processos através da sacarose-fosfato sintetase e a atividade de RN (FOYER et al., 1998). No entanto, sob condições de estresse hídrico, a atividade da RN parece limitar o suprimento de aminoácidos mais do que o ciclo glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT), que é a principal via de assimilação de amônia nas plantas superiores (FOYER et al., 1998). Quando plantas de caupi foram expostas ao estresse salino, a atividade de RN foi mais limitante ao crescimento do que a atividade de GS (SILVEIRA et al., 2001).

Nas plantas superiores a glutamina sintetase (GS) é a enzima chave envolvida na assimilação do nitrogênio inorgânico (NH_3) até as formas orgânicas (LEA e MIFLIN, 1974). A GS cataliza a condensação dependente de ATP da amônia com o glutamato até a glutamina que depois fornece grupos de nitrogênio, diretamente ou via glutamato, para a síntese de todos os compostos nitrogenados na planta (LEA et al., 1989). Quando ocorre uma alta taxa de síntese de prolina em plantas submetidas ao estresse salino, torna-se imprescindível um suprimento significativo de glutamato (BERTLELI et al., 1995). Rhodes, Handa e Bressan, 1986 (1986) demonstraram que, sob condições de estresse osmótico, o ciclo da glutamina sintetase (GS) - glutamato sintase (GOGAT) é a fonte mais importante de glutamato. Plantas de tomate cultivadas sob condições de estresse salino apresentaram maior atividade de GOGAT, enquanto que a atividade da GS diminuiu ligeiramente (BERTLELI et al., 1995). O estresse salino parece ter estimulado a atividade de GS (ROOSENS et al., 1998), sugerindo que o ciclo GS/GOGAT deve desempenhar um importante papel no suprimento de glutamato para a síntese de prolina (BERTLELI et al., 1995; PENG et al., 1996). Recentemente, foi sugerido que a acumulação de prolina em folhas de cajueiro está relacionada com a atividade de GS e proteólise induzida pelo estresse salino (SILVEIRA et al., 2002).

Neste trabalho procurou-se correlacionar a tolerância ao estresse salino em genótipos de cajueiro com a atividade da redutase de nitrato e da glutamina sintetase nas folhas.

3.3.2. Material e Métodos

3.3.2.1. Material Vegetal

As mudas, utilizadas neste trabalho, foram obtidas a partir de sementes de cajueiros de três diferentes genótipos, que apresentam características distintas quanto ao fenótipo (tipo de porte, tamanho de castanha, precocidade de floração etc). As castanhas do cajueiro comum - conhecido popularmente como “comum da praia” (*Anacardium occidentale* L), foram provenientes da praia do Barro Preto, município de Aquiraz/Ceará. As castanhas do cajueiro anão (*Anacardium occidentale* L.) CP76, e as do microcarpo (*Anacardium microcarpum* Ducke) foram provenientes da Unidade Experimental da Universidade Federal do Ceará – UFC, situada na região litorânea do município de Caucaia/Ceará.

3.3.2.2. Substrato e solução nutritiva de crescimento das mudas

Para germinação, foi utilizada vermiculita de textura média, acondicionada em bandejas plásticas do tipo “leiteira”, com dimensões de 55 cm x 35cm x 20 cm. Após o período de germinação, as mudas foram transferidas para vasos de Leonardo contendo areia grossa ($\text{Ø} \geq 2\text{mm}$). A areia foi previamente lavada com água corrente e, em seguida, por 5 vezes com água destilada. Esse substrato foi acondicionado em vasos de Leonard modificados, produzidos a partir de recipientes de vidro, com capacidade para de 1 litro. Os recipientes foram cortados nas duas extremidades opostas, ajustados um sobre o outro em sentido contrário, sendo a parte externa pintada com tinta cor prata. As partes inferior e superior dos vasos apresentaram 20 cm de altura e 9 cm de diâmetro, perfazendo um volume de aproximadamente 800 cm^3 em cada parte. Os recipientes utilizados para a confecção dos vasos de Leonardo foram do tipo reagente químico. Foram necessários dois recipientes para produzir cada vaso de Leonard.

A nutrição das plantas foi conduzida por meio de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada por Viégas (1999) para cultivo de mudas de cajueiro, com a seguinte composição: $4,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$ em KNO_3 ; $3,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$ em $\text{Ca(NO}_3)_2$; $1,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$ em CaCl_2 ; $1,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$ em MgSO_4 ; $1,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$ em K_2HPO_4 ; $1,0 \text{ }\mu\text{mol.dm}^{-3}$ em B^{3+} ; $0,9 \text{ }\mu\text{mol.dm}^{-3}$ em Mn^{2+} ; $1,8 \text{ }\mu\text{mol.dm}^{-3}$ em Cl_2^- ; $0,03 \text{ }\mu\text{mol.dm}^{-3}$ em Cu^{2+} ; $0,07 \text{ }\mu\text{mol.dm}^{-3}$ em Zn^{2+} e $10,0 \text{ }\mu\text{mol.dm}^{-3}$ em Fe^{3+} -EDTA. A solução nutritiva foi fornecida com 1/5 da concentração iônica original durante as duas primeiras semanas de estabelecimento das mudas. Após essa fase, a solução foi fornecida sem diluição. As soluções nutritivas das plantas controle e tratadas com NaCl foram renovadas a cada dois dias e o seu pH mantido próximo a $5,5 (\pm 0,5)$ mediante utilização de soluções estoque contendo $0,10 \text{ mol m}^{-3}$ de NaOH ou HCl.

3.3.2. 3. Condições ambientais do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, situada no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil, nas coordenadas geográficas com latitude $3^{\circ}44'S$ e longitude $38^{\circ}33'W$ e clima do tipo AW na classificação de KÖEPPEN. O trabalho foi desenvolvido no período de maio a setembro de 1999. Os valores médios de temperatura diurna e noturna foram de 27 e 24 °C, respectivamente. A variação de umidade relativa média do ar de 40 a 80% e fotoperíodo médio de 12 horas de insolação. A quantidade máxima média de radiação fotossinteticamente ativa foi, aproximadamente, $1000 \text{ }\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (às 12:00 hs), mensurada com um “quantun sensor” acoplado ao porômetro LI-160, “steady state porometer”, LI-Cor, USA).

3.3.2.4. Condução das mudas

As sementes dos três genótipos foram, inicialmente, esterilizadas em solução comercial de hipoclorito de sódio comercial 10% (v/v), durante 10 minutos, quando então foram exaustivamente lavadas com água destilada de forma a permitir uma completa remoção do agente esterilizante. Logo após, as sementes foram imersas em água destilada,

por um período de 24 horas, com vistas a acelerar o processo da germinação (VIÉGAS, 1999). Em seguida, as mesmas foram acondicionadas para germinar em um leito contendo vermiculita saturada com solução de $0,10 \text{ mol.m}^{-3}$ de CaSO_4 (VIÉGAS, 1990). Após a emergência, 15 dias para o anão e o comum, e 25 dias para o microcarpo, as mudas permaneceram na vermiculita e foram irrigadas com água destilada até atingir uma altura de aproximadamente 15 cm, cerca de 10 dias após a emergência. Em seguida, foram selecionadas pela uniformidade de altura para o transplante. As plantas jovens foram cuidadosamente retiradas da vermiculita, através de lavagem das raízes, seguidas de imersão em bandejas contendo CaSO_4 $0,10 \text{ mol. m}^{-3}$, para evitar choque osmótico e danos nas membranas. Em seguida, foram transplantadas para os vasos de Leonard modificados contendo areia lavada. As mudas transplantadas foram irrigadas duas vezes ao dia, com a solução nutritiva modificada de Hoagland e Arnon (1950), inicialmente diluída 1/5, durante oito dias, para aclimação (VIÉGAS, 1999). A irrigação foi conduzida adicionando-se a solução na parte superior dos vasos. O volume evapotranspirado foi diariamente completado com água destilada para 800 cm^3 . Neste caso, a adição da água destilada foi na parte inferior dos vasos. A solução nutritiva foi trocada totalmente duas vezes por semana. As mudas de cada genótipo de cajueiro permaneceram nesse sistema por diferentes períodos: os cajueiros comum e anão foram mantidos até atingirem uma idade fisiológica de 44 dias após emergência. Nesta idade as plantas possuíam semelhante estágio de desenvolvimento indicado pela altura (média de 25 cm) e número de folhas (média igual a 12). O cajueiro microcarpo, por ser mais tardio, permaneceu naquele substrato até atingir uma idade de 68 dias após emergência; ocasião em que apresentava o mesmo padrão de desenvolvimento dos demais (altura e número de folhas).

3.3.2.5 Tratamentos e colheitas

Visando avaliar a performance das três progênies na presença de diferentes condições de estresse salino, concentrações de 50, 100, 150 e 200 mM de NaCl foram adicionadas a solução nutritiva. De acordo com Viégas (1999), estas concentrações correspondem, aproximadamente, aos níveis baixo, médio, alto e muito alto, respectivamente. O tratamento com solução nutritiva sem adição de NaCl foi tomado como controle. O critério adotado para

o tempo de exposição à salinidade baseou-se na mortalidade de mais que 50% das folhas nas plantas submetidas a 200 mM de NaCl, o que ocorreu após 24 dias de estresse para o cajueiro comum e anão e após 14 dias para o microcarpo. Após esses períodos, os vasos foram transferidos às 8:00 para aclimatação em laboratório, durante duas horas. Após limpeza superficial das folhas com pano tipo “perfex”, coletaram-se discos e amostras de folhas para mensuração imediata da atividade de redutase de nitrato e do conteúdo de água. Em seguida, as partes folhas, caules e raízes foram separadas, pesadas, imediatamente acondicionadas em N₂ líquido, armazenadas a -20 °C, liofilizadas, moídas e passadas em peneira com abertura de malha de 100 mesh para obtenção da farinha. O material foi adequadamente armazenado para posteriores análises.

3.3.2.6 Delineamento experimental e tratamento estatístico

Os tratamentos foram distribuídos de acordo com o delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial 5 X 3 X 3, correspondendo, nessa ordem, aos 5 níveis de NaCl, 3 progênies e 3 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (GOMES et al 1997).

3.3.2.7. Determinação do conteúdo de N total nas folhas

A Determinação do conteúdo de N total em folhas foi obtida através da multiplicação da % N total pela massa seca das folhas. Na determinação do N-total amostras de 50 mg de folhas previamente liofilizadas, foram adicionadas em tubos de microdestilação contendo 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1,10 g de uma mistura catalizadora composta por sulfato de potássio, sulfato de cobre e selênio, na proporção em massa de 100/10/1, respectivamente (MALAVOLTA et al., 1989). Posteriormente, esses tubos foram acondicionados em placa digestora quando então deu-se início ao processo de mineralização. A temperatura da placa foi elevada gradualmente até 350 °C. Ao final do processo de

digestão os extratos foram diluídos com água destilada até 20 mL. A dosagem de N-total foi feita colorimetricamente após reação da amônia com o reagente de fenol-hipoclorito descrito em Viégas (1999).

3.3.2.8 - Atividade *in vivo* de redutase de nitrato (RN)

O método utilizado para estimativa da redutase de nitrato *in vivo* foi o de Hageman e Hucklesby (1971), com modificações. Amostras de 200 mg de tecido vegetal (discos foliares com diâmetro aproximado de 10 mm) foram acondicionadas em tubos de ensaio contendo 5,0 mL da solução de reação (tampão fosfato 100 mM, pH 7,5; isopropanol 10% (v/v); KNO₃ 50 mM). Os tubos foram envolvidos em papel alumínio de forma a proteger da luz o meio de reação. Em seguida, procedeu-se à realização de vácuo, durante dois minutos, de forma a produzir no interior dos tubos de ensaio um ambiente anaeróbico. Logo após, os tubos de ensaio foram acondicionados em banho-maria, durante 30 minutos, a uma temperatura de 30°C. Seguiu-se a retirada de alíquotas de 2 mL as quais foram adicionadas em tubo de ensaio contendo 1,0 mL da solução de reação (1 mL de sulfanilamida 1 % em HCl 2,4 M e 1 mL N- α -naftilenodiamina-dicloridrato (NNEDA) 0,02%). Decorridos 15 minutos do início da reação, as soluções foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade de RN foi estimada a partir da formação de NO₂⁻ no meio de reação, à partir de um reta padrão ajustada com concentrações crescentes de KNO₂ (Sigma). Os resultados foram expressos em mmol NO₂⁻ kg⁻¹ MF h⁻¹.

3.3.2.9 – Determinação da concentração de nitrato

Adicionaram-se amostras, previamente liofilizadas, de 100 mg de tecido vegetal em tubos de ensaio contendo 10 mL de água destilada, os quais foram acondicionados em banho-maria, por 60 minutos, a 100 °C, e em seguida submetidos a uma centrifugação a 3.000 \times g por 10 minutos. Após a aferição, alíquotas foram utilizadas para determinação de nitrato de acordo com o método de Cataldo et al. (1993).

3.3.2.10. Atividade de Glutamina Sintetase (GS)

Inicialmente, amostras de 2 g de tecido vegetal foram trituradas em presença de nitrogênio líquido e maceradas por 5 minutos em um meio contendo 12 mL de tampão de extração (tris-HCl 25 mM, pH 7,6, EDTA-Na 5 mM e mercaptoethanol 10 mM. Após a extração, procedeu-se uma filtração e posterior centrifugação do extrato a 30.000 x g, por um período de 30 minutos, a 4°C. A estimativa da atividade de glutamina sintetase seguiu o método biossintético do hidroxamato descrito por Viégas (1999). Aliquotas de 0,5 mL de extrato foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 0,6 mL de tampão tris-HCl 250 mM pH 7,6, 0,2 mL de glutamato 300 mM, 0,2 mL de ATP 30 mM e 0,2 mL de MgSO₄ 50 mM. A reação foi iniciada por intermédio da adição, no meio de reação, de 0,2 mL hidroxilamina (NH₂OH.HCl 1 M) neutralizada com NaOH 1M. Após incubação em banho-maria, por 30 minutos, a 30 °C, a reação foi paralisada pela adição de FeCl₃ 10% (m/v) em HCl 0,2 M + ácido tricloracético 24 % (m/v) + HCl 50% (v/v). A mistura foi centrifugada a 7.000 X g, por 10 minutos, à temperatura ambiente. O complexo Fe-glutamil-hidroximato (cor marron clara) teve sua absorvância lida em 540 nm. A atividade de glutamina sintetase (GS) foi determinada a partir do ajuste de uma reta padrão com concentrações crescentes de γ -glutamil-hidroximato (Sigma). A atividade de GS foi expressa como mmol de γ -glutamil-hidroximato kg⁻¹ MF h⁻¹.

3.3.2.11. Concentração de proteínas solúveis

A concentração de proteínas solúveis em tecidos de folhas foi determinada no mesmo extrato utilizado para determinação da atividade de GS. Os extratos foram diluídos adequadamente e a concentração de proteínas determinada através do método de Bradford (1976) utilizando albumina bovina (Sigma) como padrão. Os resultados foram expressos em g proteína kg⁻¹ MF.

3.3.3. Resultados e Discussão

A atividade da redutase de nitrato (ARN) na folha diminui sensivelmente com o aumento do estresse salino nos três genótipos estudados (TABELA 11 e FIGURA16), alcançando, em relação ao controle, percentuais de 13%, 14% e 12% para o comum, anão e microcarpo, respectivamente, no nível de 200 mM. O anão foi o mais sensível ao estresse, pois com apenas 50 mM teve sua concentração de nitrato foliar reduzida em 72%, contra 20% no comum e 22% no microcarpo.

A ARN nas folhas dos três genótipos decresceu acentuadamente em resposta aos níveis de NaCl (TABELA 11 e FIGURA16), atingindo, em relação ao controle, percentuais de 22%, 24% e 14% para o comum, anão e microcarpo, respectivamente, no nível de 200 mM de NaCl. Entretanto, os genótipos apresentaram diferenças no tipo de resposta. Enquanto o comum e o microcarpo apresentaram decréscimos progressivos com o aumento do estresse, o anão sofreu uma queda brusca (74% em relação ao controle) na ARN já com 50 mM, mostrando que a ARTN funcionou como um indicador extremamente sensível para o estresse salino. Por outro lado, os valores de RN no microcarpo foram sempre superiores aos dos dois outros genótipos, inclusive no controle, evidenciando ser uma característica possivelmente genética. No tratamento de 100 mM de NaCl a atividade de RN foi reduzida para 53, 25 e 39 % dos respectivos controles de comum, anão e microcarpo. Os decréscimos na atividade de RN causados pelo estresse salino foram muito mais intensos do que os causados sobre a concentração de nitrato nas folhas, enquanto que o conteúdo de N-total foi severamente reduzido nos três genótipos (TABELA 11 e FIGURA 16A).

A concentração de nitrato nas folhas dos três genótipos não foi correlacionada com as atividades de RN (TABELA 11), sugerindo que essa concentração não foi determinante no decréscimo da atividade. De fato, a concentração de NO_3^- total, que reflete principalmente o nitrato armazenado nos vacúolos, freqüentemente não está diretamente envolvido com a indução e atividade de RN. Na realidade, o que determina a indução, síntese e atividade da enzima é o fluxo de nitrato no citoplasma (MELO, 1999). Dessa maneira, o microcarpo – que apresentou os maiores valores de atividade de RN, mostrou as menores concentrações de nitrato nos tratamentos com níveis mais elevados de NaCl, quando comparado aos outros dois genótipos. Além disso, o microcarpo mostrou as maiores reduções relativas nas concentrações de nitrato. O conteúdo de N nas folhas reflete duas variáveis: a concentração de N-total e a

massa seca acumulada nas folhas. Dessa maneira, o seu intenso decréscimo refletiu tanto a redução relativa de massa seca como a taxa de assimilação de N através de RN. Essa variável reflete, em grande extensão, a taxa real de assimilação do nitrato pois no presente estudo o NO_3^- foi a única fonte de N utilizada pelas plantas.

Nessa pesquisa, o conteúdo de N nas folhas (mg N planta^{-1}) não foi totalmente relacionado com a atividade de RN nas folhas, analisando-se essas variáveis nos três genótipos e nos diversos tratamentos. Como esperado, o conteúdo de N foi bem correlacionado com a massa fresca das folhas (FIGURAs 2 e 16), refletindo que os processos de fotossíntese e assimilação de N são integrados e bem correlacionados (FOYER et al., 1998). Na realidade, a atividade de RN funcionou como um indicador extremamente sensível para o estresse salino, não podendo, no entanto, ser correlacionada com uma possível tolerância, haja vista que o anão apresentou uma maior sensibilidade que o microcarpo.

TABELA 11- Conteúdo de Nitrogênio, concentração de Nitrato e Atividade de Redutase de Nitrato em folhas em mudas de cajueiro comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os resultados são a Média de três repetições.

Conteúdo de N				
NaCl (mM)	Comum	Anão	Microcarpo	CV ¹ (%)
0	45,7a B	67,47a A	52,63a B	9
50	36,9a A	37,50b A	35,00b A	7
100	36,3a A	27,50b A	35,00b A	14
150	18,8b B	30,63b A	23,13b B	10
200	14,2b B	24,38b A	21,25b AB	14
CV ² (%)	15,00	13	15	
NO ₃ ⁻ (mol.Kg ⁻¹ MS)				
NaCl (mM)	Comum	Anão	Microcarpo	CV ¹ (%)
0	124,0a A	132,4a A	120,4a A	7
50	90,8b B	125,6a A	102,8b AB	7
100	88,8b B	114,0b A	78,0c B	10
150	95,2b AB	111,2b A	80,0c B	10
200	95,0b B	113,0b A	76,0c C	9
CV ² (%)	14	10	12	
ARN (mol.kg ⁻¹ MS)				
NaCl (mM)	Comum	Anão	Microcarpo	CV ¹ (%)
0	1,45a B	1,59a B	5,45a A	11
50	1,23ab B	0,41b B	4,35b A	12
100	0,77b B	0,40b B	2,11c A	15
150	0,35b B	0,38bc B	1,10cd A	14
200	0,32b B	0,38c B	0,75d A	12
CV ² (%)	15	14	12	

- Entre tratamentos, letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

-Entre genótipos, letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

¹ Coeficiente de variação entre os genótipos (colunas).

² Coeficiente de variação entre os tratamentos (linhas).

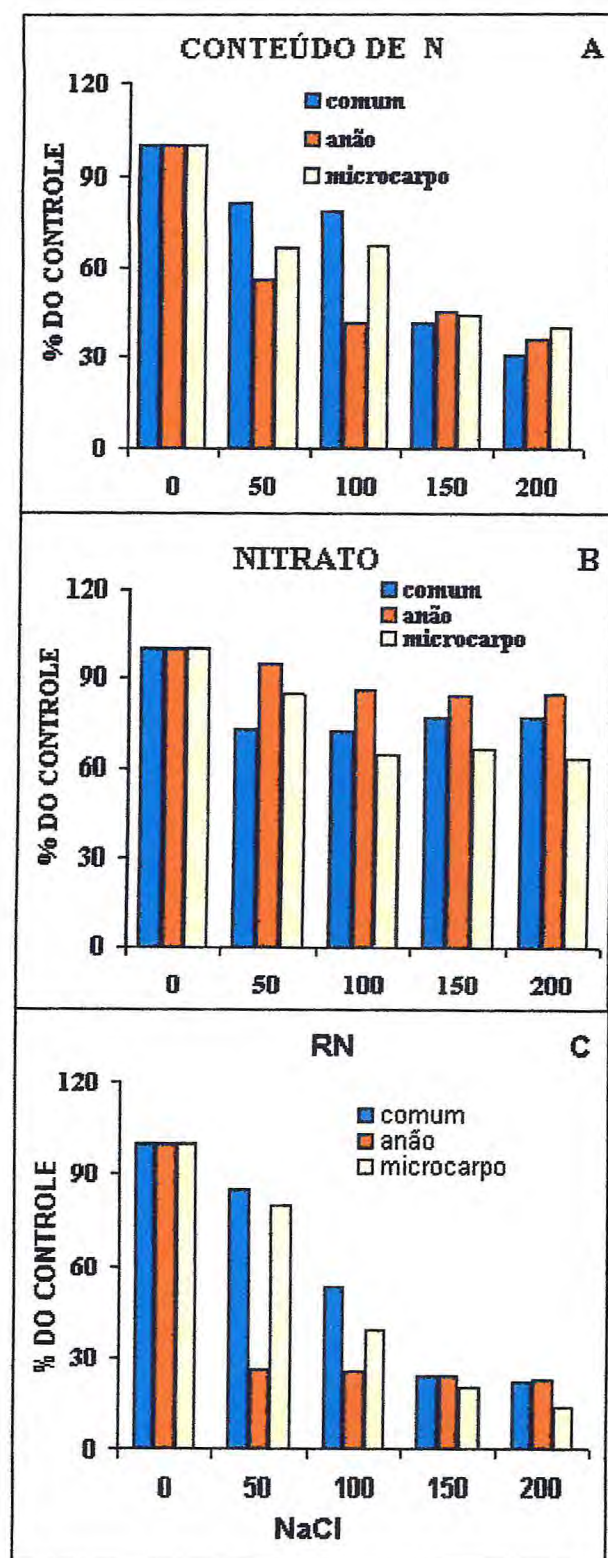


FIGURA 16 – Conteúdo de nitrogênio - N (A), Concentração de nitrato - NO_3^- (B) e atividade de redutase de nitrato - ARN (C) em folhas de mudas de cajueiro comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os valores de 100% para N foram 45,70, 67,47 e 52,63 mg.planta^{-1} , para NO_3^- foram 124,00, 132,40 e 120,40 mmol.Kg^{-1} MS e para RN foram 1,45, 1,59 e 5,45 $\text{mmol de NO}_2^- .\text{Kg}^{-1}$ MF, respectivamente.

67,47 e 52,63 mg.planta⁻¹, para NO₃⁻ foram 124,00, 132,40 e 120,40 mmol.Kg⁻¹ MS e para RN foram 1,45, 1,59 e 5,45 mmol de NO₂⁻.Kg⁻¹ MF, respectivamente.

(genótipo considerada mais sensível). Estes resultados, embora semelhantes aos obtidos em algumas pesquisas citadas no presente estudo, não são facilmente explicados. É esperado, portanto, que as plantas mais sensíveis apresente maior redução na atividade dessa enzima, tendo em vista o envolvimento da RN no crescimento e sua extrema sensibilidade à deficiência hídrica (MATOS, 2001). Na verdade, os efeitos do estresse salino sobre RN ainda são contraditórios (VIÉGAS, 1999). É provável que a maior sensibilidade ao NaCl mostrada pelas plantas de microcarpo deva estar associada com outros fatores bioquímicos e fisiológicos. Ou seja, apesar de RN ter se mostrado extremamente sensível ao NaCl nos três genótipos, sua atividade, isoladamente, não consegue explicar diferenças de tolerância. Diversos fatores estão envolvidos nessa questão.

A atividade de RN mensurada no laboratório nem sempre reflete o nível de atividade endógena da enzima na planta (SILVEIRA et al., 2001). Na cadeia de reações que podem limitar o crescimento a redução assimilatória do nitrato, em mudas de cajueiro, talvez não seja o ponto mais limitante sob estresse salino. De fato, Matos (2001) demonstrou que as trocas estomáticas (transpiração e resistência estomática) foram mais sensíveis do que a atividade de RN, enquanto que, Viégas et al. (1999) demonstraram quedas pronunciadas na atividade da enzima em condições de estresse salino no cajueiro. Entretanto, esses autores demonstraram que os íons salinos *per se* não tiveram nenhum efeito direto sobre a atividade da enzima em ensaios *in vitro*. Resultados semelhantes foram obtidos em outras espécies vegetais (ASLAM; HUKFFAKER; RAINS, 1984; GOUIA; GHORBAL; THOURANIE, 1994). Esses resultados evidenciam que o estresse salino imposto às plantas apresenta extrema complexidade devido

o surgimento de outros estresses derivados tais como deficiência hídrica, estresse osmótico, estresse oxidativo, etc (MUNNS, 2002). Por outro lado, os resultados da FIGURA 16 evidenciam que o NO₃⁻ não foi limitante para a atividade de RN, haja vista que os níveis encontrados nas folhas não foram tão baixos, mesmo no maior nível de NaCl.

Os resultados de atividade de RN e GS, quando analisados conjuntamente com os de concentração de nitrato, conteúdo de N total e aminoácidos livres totais (FIGURAS 16 e 17), mostram claramente que a respostas oposta apresentada pela atividade dessas enzimas, em relação ao estresse salino, foi esperada e estão de acordo com os obtidos por Viégas (1999)

trabalhando com mudas de cajueiro e com Silveira et al. (2001) utilizando plantas de caupi. De fato, a atividade de RN está diretamente envolvida com o suprimento de novos aminoácidos oriundos da assimilação do nitrato. Esse suprimento determina em grande extensão a intensidade de síntese protéica e o crescimento das plantas em geral. Na condição de estresse salino, adotado no presente trabalho, essa atividade foi intensamente reduzida já nos níveis mais baixos de salinidade (50 mM de NaCl). Essa redução deve ter sido causada principalmente por efeitos osmóticos que, por sua vez, causam aumento na resistência estomática e na taxa de assimilação fotossintética de CO₂ (Matos, 2001). A taxa de fotossíntese, através de seus produtos hexoses-fosfato e trioses-fosfato e indiretamente através do nível de NADH, interfere decisivamente na atividade de RN (FOYER et al., 1998).

Quando o fluxo assimilatório do nitrato é inibido – como foi o caso das mudas de cajueiro sob alto nível de NaCl, o *pool* de aminoácidos livres passa a ser dependente diretamente da degradação de proteínas e inversamente da taxa de crescimento. O aumento na quantidade de aminoácidos livres e amônia, contribui para o aumento na atividade de GS ou um decréscimo suave comparado com a taxa de síntese de proteína. Essas condições são favoráveis para aumento nas concentrações dos precursores diretos (aspartato e ornitina) da síntese de prolina (Silveira et al., 2002). Ao contrário de RN, a atividade de GS nas folhas dos três genótipos não foi reduzida pelo NaCl, quando expressa como atividade total – na base de massa de folhas (TABELA 12 e FIGURA 17). Por outro lado, quando expressa como atividade específica (mmol GHG g⁻¹ proteína h⁻¹) a atividade de GS foi estimulada pelo NaCl, haja vista que a concentração de proteínas solúveis foi menor nas plantas estressadas (TABELA 12). A manutenção da atividade de GS em níveis não muito baixos nas plantas estressadas é essencial para o suprimento de glutamato para a síntese de prolina. Deve ser observado que nas plantas estressadas a taxa de síntese de proteínas é extremamente reduzida. Isto implica numa baixíssima demanda por aminoácidos livres, especialmente prolina e glutamato (SILVEIRA et al., 2002). Dessa maneira, a síntese de prolina seria favorecida nessas condições.

Quando se comparam os três genótipos, não se observam diferenças na atividade de GS capazes de explicarem a maior sensibilidade do microcarpo associado com a sua menor acumulação de prolina nesse genótipo. É interessante observar, contudo, que o microcarpo apresentou concentrações de proteínas solúveis mais baixas do que as das duas outras o que implicou em valores de atividade específica de GS maiores (dados não apresentados). De qualquer maneira, as relações entre a atividade de GS, concentração de prolina e tolerância ao

estresse salino não são simples e direta (Silveira et al., 2002). Por outro lado, sob situações fisiológicas normais (não estressantes) a atividade de GS é diretamente relacionada com o crescimento de plantas (MAGALHÃES et al., 1993). De qualquer maneira, os baixos níveis de proteínas solúveis (TABELA 12) e a menor acumulação relativa de prolina (TABELA 9) no genótipo mais sensível pode ser um dos indicadores metabólicos para maior sensibilidade ao NaCl em mudas de cajueiro. Essa observação deve ser tema de novas pesquisas envolvendo a seleção de caracteres bioquímicos para tolerância ao estresse salino.

Apesar da atividade de RN nas folhas ter se mostrado bastante sensível ao estresse salino, mesmo assim ela não foi capaz de indicar as diferenças de sensibilidade ao NaCl observadas entre os três genótipos. Diferentemente, a atividade de GS foi pouco afetada pela salinidade. De modo similar, a atividade desta enzima também não foi relacionada com as diferenças de tolerância.

TABELA 12– Concentração de proteínas solúveis totais e atividade de GS em folhas em mudas de cajueiro cajueiro comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os resultados são a Média de 3 repetições.

Proteínas solúveis totais (mg kg ⁻¹ MF)				
NaCl				CV ¹
(mM)	Comum	Anão	Microcarpo	(%)
0	20,48a A	27,03a A	7,89a B	11
50	18,37a A	22,64a A	10,00a B	9
100	21,09a A	26,14a A	7,39a B	14
150	18,48a A	28,92b B	6,94a C	10
200	16,32a A	20,54b A	6,22a B	14
CV ² (%)	17	16	16	

Atividade de glutamina sintetase (mmol GGH.kg ⁻¹ MS.h ⁻¹)				
NaCl				CV ¹
(mM)	Comum	Anão	Microcarp	(%)
0	24,60a A	32,00a A	34,00a A	13
50	25,80a A	29,60a A	35,20a A	12
100	28,00a A	28,80a A	37,20a A	11
150	32,40a A	24,80a A	28,20a A	10
200	33,20a A	27,00a A	27,40a A	11
CV ² (%)	20	18	19	

- Entre tratamentos, letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

-Entre genótipos, letras maiúsculas iguais, indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

¹ Coeficiente de variação entre os genótipos (colunas).

² Coeficiente de variação entre os tratamentos (linhas).

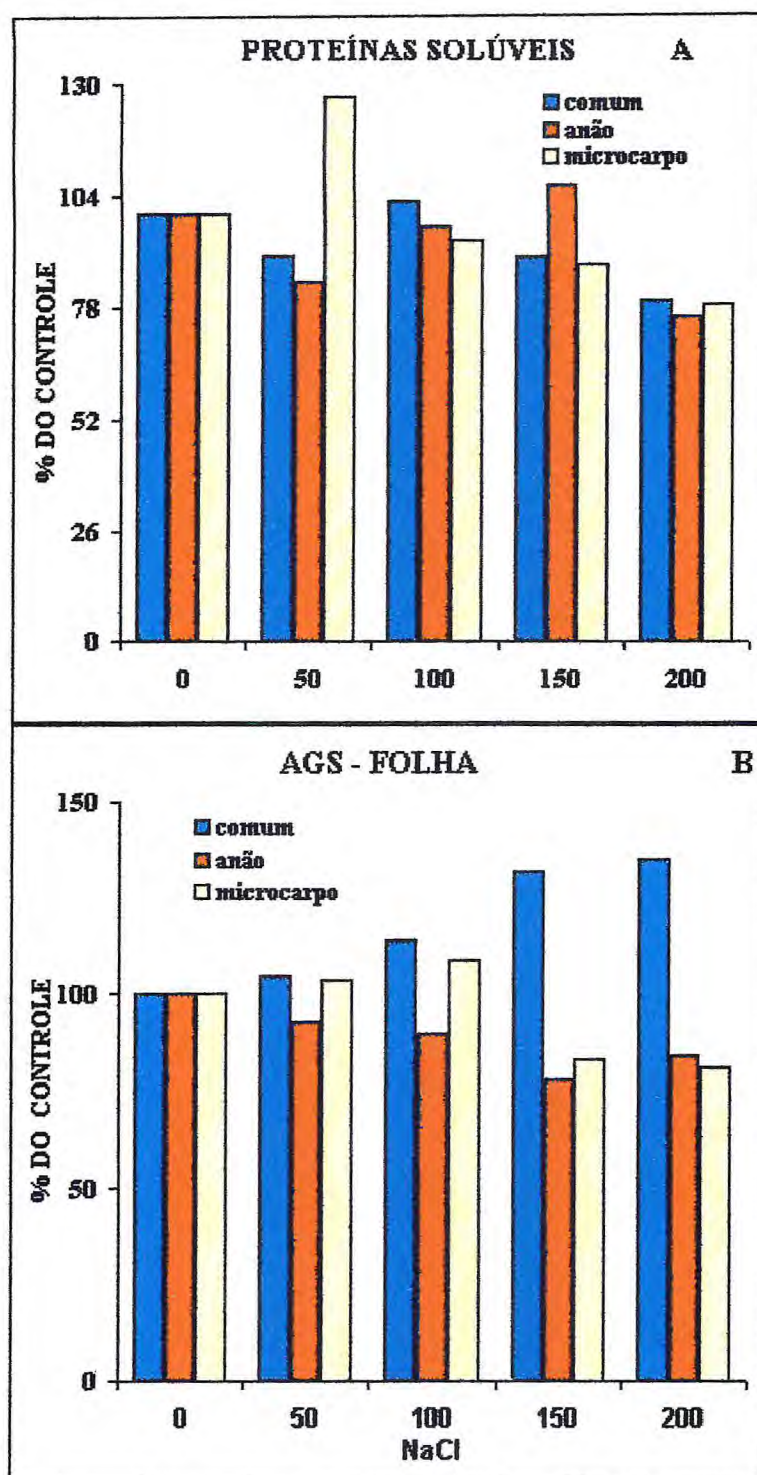


FIGURA 17 – Concentração de proteínas solúveis totais – PST (A) e atividade de glutamina sintetase – AGS (B) em folhas de mudas de cajueiro comum, anão e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os valores de 100% de PST foram 11,20, 32,36 e 3,90 mg.kg⁻¹ MF e de GS foram 26,20, 31,80 e 33,88 mmol GGH.Kg⁻¹ MS. h⁻¹, respectivamente.

3.4. **TRABALHO IV: Índices porométricos e acumulação de Na⁺ em genótipos de cajueiro anão, comum e microcarpo em resposta ao estresse salino.**

3.4.1. Introdução

A salinidade parece afetar intensamente os processos denominados genericamente de relações iônicas e relações hídricas. A redução da fotossíntese causada pela salinidade é atribuída, principalmente, ao aumento na resistência estomática, seguida da redução na pressão parcial do CO₂ intracelular e somente em níveis elevados de estresse a fatores ligados a integridade de clorofilas e atividade de fotossistemas (DELFINE et al., 1999). A salinidade causa redução no estado de energia da água do tecido por diminuir os potenciais hídrico e osmótico. Nessas condições, com o decréscimo na transpiração verificam-se incrementos na temperatura foliar, o que acarreta conseqüências negativas para o metabolismo (SULTANA, IKEDA, ITOH, 1999). O excesso de sais pode afetar, também, os componentes fotossintéticos tais como proteínas, clorofilas e carotenóides. As alterações nessas variáveis dependem da severidade e duração do estresse e da sensibilidade do material vegetal (BETHKE; DREW, 1992).

Várias publicações ressaltam que o efeito primário decorrente da redução na fotossíntese devido ao estresse osmótico é o fechamento estomático seguido de mudanças nas reações fotossintéticas (BRESTIC et al., 1995). Estresses ambientais, como o hídrico (LAUTERI et al., 1997), o salino (BONGI; LORETO, 1989) e o envelhecimento foliar (LORETO et al., 1994) reduzem a condutância à difusão de CO₂ no mesófilo foliar. DELFINE et al (1998) mostraram que baixas concentrações foliares de Na⁺ (menor que 15 mg.g⁻¹) reduzem a condutância estomática e mesofílica, diminuindo a concentração de CO₂ no cloroplasto das plantas estressadas, devido a uma redução nos espaços intracelulares, produzindo um caminho mais tortuoso para o CO₂ e acarretando, desta forma, uma diminuição na fotossíntese. A salinidade reduziu a assimilação de CO₂, a condutância estomática e o potencial hídrico nas folhas de Citrus (WALKER et al., 1982).

Huang, Murray e Yang (1994) observaram decréscimos significantes na condutância estomática e na taxa fotossintética em trigo (*Triticum aestivum* L.) exposto a 50 mM de NaCl.

Observou-se, também, que a condutância estomática foi reduzida em níveis crescentes de NaCl em plantas de *Pine maritime Pinus pinaster L.*, e *Phaseolus vulgaris L.* (CACHORRO et al., 1995; LOUSTAU et al., 1995) e milho (CRAMER; EPSTEIN; LAÜCHLI, 1988). Embora a queda da fotossíntese em *citrus* sob deficiência hídrica seja devida primariamente ao fechamento dos estômatos (SYVERTSEN e LLOYD, 1994), sob condições mais severas de estresse, outros fatores relacionados ao metabolismo do carbono e às reações fotoquímicas são afetados (VU e YELENOSKI, 1988). Sua capacidade de recuperação após a ocorrência de deficiência hídrica é uma característica importante, estando relacionada com a recuperação do potencial da água, da abertura estomática, da condutividade hidráulica das raízes e do funcionamento dos processos bioquímicos e fotoquímicos (LLOYD, 1994).

Sob nossas condições, Matos (2001), trabalhando com mudas de dois clones de cajueiro anão- precoce, observou que tanto as mudas oriundas de sementes quanto aquelas enxertadas foram bastante sensíveis aos estresses hídrico e salino. A condutância estomática foi a variável mais sensível, seguida da transpiração e do potencial hídrico total. A temperatura foliar, na condição de condutância próximo de zero, chegou a aumentar até 2,2 °C. Em termos de relação com a sensibilidade ao estresse salino, entre os dois materiais de cajueiro, o autor observou que o clone menos sensível (CCP 06) apresentou maiores valores de condutância estomática associado com potenciais hídricos mais elevados e menores concentrações de Na⁺ e prolina nas folhas, quando as mudas foram expostas a 200 mM de NaCl durante 4 dias.

Neste trabalho procurou-se relacionar a sensibilidade ou tolerância ao NaCl entre os genótipos comum, anão e microcarpo com variáveis relacionadas com as trocas gasosas das folhas - condutância estomática, transpiração e temperatura foliar e manutenção da integridade de membranas - vazamento de eletrólitos.

3.4.2. Material e Métodos

3.4.2.1. Material Vegetal

As mudas, utilizadas neste trabalho, foram obtidas a partir de sementes de cajueiros de três diferentes genótipos, que apresentam características distintas quanto ao fenótipo (tipo de porte, tamanho de castanha, precocidade de floração etc). As castanhas do cajueiro comum - conhecido popularmente como “comum da praia” (*Anacardium occidentale* L), foram provenientes da praia do Barro Preto, município de Aquiraz/Ceará. As castanhas do cajueiro anão (*Anacardium occidentale* L.) CP76, e as do microcarpo (*Anacardium microcarpum* Ducke) foram provenientes da Unidade Experimental da Universidade Federal do Ceará – UFC, situada na região litorânea do município de Caucaia/Ceará.

3.4.2.2. Substrato e solução nutritiva de crescimento das mudas

O substrato utilizado foi vermiculita comercial de textura média (“tipo média”), previamente lavada intensamente com água de torneira e posteriormente com água destilada. Conforme dados dos fabricantes, esse material possui elevada capacidade de retenção de água e cátions, apresentando teores elevados de Ca^{+2} e Mg^{+2} trocáveis. O substrato foi acondicionado em tubetes comerciais de polietileno de 288 cm^3 de volume. A solução nutritiva fornecida foi a mesma descrita no sub-item 3.1.2.2, página 24, sendo a irrigação fornecida por ascensão capilar a partir de um recipiente plástico de 100 cm^3 ajustado abaixo de cada tubete.

3.4.2.3. Condições ambientais do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, situada no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil, nas coordenadas geográficas com latitude 3°44' S e longitude 38°33' W e clima do tipo AW na classificação de KÖEPPEN. O trabalho foi desenvolvido no período de maio a setembro de 1999. Os valores médios de

temperatura diurna e noturna foram de 27 e 24 °C, respectivamente. A variação de umidade relativa média do ar de 40 a 80% e fotoperíodo médio de 12 horas de insolação. A quantidade máxima média de radiação fotossinteticamente ativa foi, aproximadamente, 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (às 12:00 hs), mensurada com um “quantun sensor” acoplado ao porômetro LI-160, “steady state porometer”, LI-Cor, USA).

3.4.2.4. Condução das mudas

As castanhas foram tratadas conforme descrito no item 3.2.4, página 35, sendo semeadas e germinadas diretamente em tubetes, onde as mudas permaneceram até os 44 dias após o plantio. Nas duas primeiras semanas, as mudas foram irrigadas somente com água destilada e deste período até o 44º dia receberam irrigação com solução nutritiva diluída 10 vezes. Desse período até o 58º dia (durante 14 dias) os tubetes foram irrigados com solução nutritiva (controle) ou com solução nutritiva + 200 mM NaCl (estresse salino). As soluções foram renovadas completamente a cada duas vezes na semana.

3.4.2.5. Tratamentos e colheitas

Visando avaliar a performance dos três genótipos na presença de diferentes condições de estresse salino, utilizou-se o seguinte tratamento na solução nutritiva: 0 e 200 mM. Após esses períodos, os vasos foram transferidos às 8:00 da manhã para aclimação em laboratório durante duas horas. Após limpeza superficial das folhas com pano tipo “perfex”, coletaram-se as folhas quando foram pesadas e imediatamente colocadas em N₂ líquido, mantidas a -20 °C, liofilizadas e moídas em farinha fina de 100 mesh, para posteriores determinações analíticas.

3.4.2.6. Delineamento experimental e tratamento estatístico

Os tratamentos foram distribuídos de acordo com o delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial 2 X 3 X 4, correspondendo, nessa ordem, aos 2 níveis de NaCl, 3 genótipos e 4 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (GOMES et al 1997).

3.4.2.7. Determinações das variáveis

3.4.2.7.1. Massa Foliar

Após a coleta, as partes raiz, caule e folhas foram separadas e determinadas as respectivas massas frescas. As massas secas de caule e raiz foram determinadas diretamente após completa liofilização. No caso da massa seca das folhas, a determinação foi conduzida em estufa a 90 °C, com circulação de ar quente.

4.3.2.7.2. Concentrações de sódio na folha

Após liofilização do material vegetal -folhas e raízes, tomaram-se amostras de 100 mg que, depois de mineralizadas por via úmida, empregando-se a digestão nítrico-perclórica, determinaram-se os teores de sódio e de potássio por fotometria de chama, conforme descrito em Sarruge e Haag (1974). Os resultados foram expressos em mmol kg⁻¹ massa seca.

3.4.2.7.3. Teste de condutividade elétrica

Para o teste de Condutividade Elétrica foi seguida a mesma metodologia adotada na avaliação de “dano nas membranas” utilizada por Silva (2002), consistindo na coleta de dez discos foliares com diâmetro de 10 mm colocados em frascos contendo 20 mL de água destilada e incubados em banho-maria a temperatura de 25°C, durante 24 horas. Em seguida, foi determinada a condutividade elétrica do extrato (25°C) das plantas controle e das plantas sob estresse (200 mM de NaCl), através de um condutivímetro marca DIGIMED. Os resultados foram expressos em dS.m^{-1} .

3.4.2.7.4. Determinações Porométricas

As determinações porométricas - condutância estomática, transpiração e temperatura foliar, foram realizadas no interior da casa de vegetação, com o auxílio do porômetro de equilíbrio dinâmico modelo Li-Cor 1600. O aparelho foi deixado na bancada, onde estavam situadas as plantas, durante 1 h para atingir a estabilização. As determinações foram realizadas entre 8:00 e 9:00 h da manhã, utilizando-se o 2º par de folhas totalmente expandido. A medição de cada variável consistiu de uma média de 3 leituras, sendo o tempo de estabilização de leitura de aproximadamente 3 minutos. Este experimento tomou como base a tendência de variação temporal da condutância estomática em porta-enxertos de cajueiro com e sem estresse, realizada por Matos (2001), onde os estômatos apresentaram picos de máxima abertura pela manhã próximo a 9:00h.

3.4.3. Resultados e Discussões

No presente trabalho, as mudas foram cultivadas em tubetes comerciais e substrato de vermiculita. Sob condições semelhantes, Matos (2001) e Silva (2002) trabalharam com dois genótipos de cajueiro anão submetidos a 200 mM de NaCl. Eles verificaram que nesse tipo de substrato os efeitos do NaCl foram mais brandos do que aqueles observados em substrato de areia ou em contato direto das raízes com a solução nutritiva como observado por Viégas (1999). Talvez a elevada capacidade de retenção de Na^+ da vermiculita, assim como, seu

elevado nível de cátions trocáveis especialmente o Ca^{+2} (dados não apresentados), possa ter contribuído para atenuar os efeitos do NaCl nas mudas de cajueiro. No presente estudo, o tratamento com 200 mM de NaCl durante 14 dias causou menor redução na massa das folhas das mudas de cajueiro anão (36%), comparado com o comum (54%) e o microcarpo (71%). Além disso, o anão também apresentou maiores valores absolutos de massa foliar, tanto no controle como no tratamento com NaCl (TABELA 13 e FIGURA 18A).

O maior crescimento das plantas estressadas de anão, comparado com os dois outros genótipos, foi relacionado com uma maior integridade das membranas das folhas, estimada através da perda de eletrólitos. Por outro lado, o genótipo que se mostrou mais sensível neste experimento, o microcarpo, apresentou também maior concentração de Na^+ nas folhas e maior perda de eletrólitos comparado ao anão. É interessante observar que foram as mudas de microcarpo que apresentaram os sintomas visuais de maiores injúrias nas folhas causadas pelo NaCl (FIGURA 19). Portanto, os efeitos mais drásticos do NaCl nas folhas desse genótipo foram inversamente relacionados com a massa das folhas e diretamente relacionados com a concentração de Na^+ no tecido. É provável que essa relação, de fato, possa explicar a maior sensibilidade do microcarpo ao NaCl, particularmente quando o estresse for imposto sobre mudas de pequeno porte como foi o caso desse trabalho. Nessas condições, o nível de Na^+ das folhas atingiu rapidamente valores tóxicos em função das baixas taxas de crescimento, induzindo um “efeito de concentração” desse íon nos tecidos foliares.

É interessante observar que no Trabalho II as concentrações de Na^+ nas folhas do microcarpo no tratamento com 200 mM (durante 14 dias) foi cerca de 4 vezes maior que o controle, enquanto que no presente trabalho a acumulação de Na^+ foi cerca de 8 vezes maior a do controle (TABELA 13). Portanto, como esperado, a sensibilidade de mudas de cajueiro ao NaCl deve ser diretamente associada à intensidade de acumulação de Na^+ nas folhas (VIÉGAS et al., 2001). No caso do microcarpo essa relação foi muito evidente quando se compara os dados do Trabalho II com os apresentados aqui. No primeiro estudo, as folhas atingiram uma massa de 2,89 g de MS e uma concentração de Na^+ de 673 mmol/kg MS, enquanto que nesse último experimento a massa foi de apenas 1,30 g de MS e uma concentração de Na^+ de 1591 mmol/kg MS. Portanto, a capacidade de exclusão do Na^+ e Cl^- dos tecidos foliares representa, talvez, a principal característica de tolerância ao estresse salino em mudas de cajueiro, conforme já evidenciado entre cultivares de outras diversas espécies cultivadas (MUNNS, 2002). Em mudas de *Citrus*, essa característica é dada pelo

porta-enxerto e o Cl^- é o íon mais tóxico para as folhas do enxerto (BAÑULS; PRIMO-MILLO, 1995).

Outras características importantes de tolerância para porta-enxertos ao estresse salino são as variáveis relacionadas com as relações hídricas e trocas gasosas das folhas. Entretanto, em *Citrus* os caracteres condutância estomática, transpiração e assimilação de CO_2 (fotossíntese) foram mais relacionados com o tipo de enxerto do que com os porta-enxertos (GARCIA-LEGAZ et al., 1993; BAÑULS & PRIMO-MILLO, 1995). Em mudas enxertadas de cajueiro anão precoce, submetidas a 200 mM de NaCl, Matos (2001) observou que o porta-enxerto menos sensível ao NaCl (CP 06) apresentou maior taxa de transpiração e maior condutância estomática do que o clone mais sensível (CP 09). Quando ele comparou as mudas enxertadas CP 76/CP 06 com CP 76/CP 09, verificou que os valores daquelas variáveis foram semelhantes nos dois tipos de mudas enxertadas. Entretanto, o potencial hídrico das folhas foi maior tanto no porta-enxerto CP-06 como na muda enxertada CP 76/CP 06, sob condições de deficiência hídrica e estresse salino, sugerindo que essa variável possa ser mais influenciada pelo o tipo de cavalo do que pelo tipo de enxerto.

No presente trabalho, a menor sensibilidade ao NaCl apresentada pelo genótipo anão foi relacionada com menores valores de incrementos da temperatura foliar, enquanto que o genótipo mais sensível (microcarpo) exibiu valores elevados de temperatura foliar e menores condutância estomática e transpiração (TABELA 14 e FIGURA 21). Entretanto, quando se comparou o anão com o comum, observou-se que o segundo apresentou maiores valores de transpiração o que é, aparentemente, contraditório com os valores mais elevados de temperatura foliar. Na realidade, as variáveis porométricas são de difícil comparação quando realizadas em número reduzido devido a forte influência dos fatores ambientais. Dessa maneira, o conjunto dos resultados desse último trabalho evidencia que a menor sensibilidade apresentada pelo anão possa ser atribuída a maior integridade das membranas de seus tecidos foliares, possivelmente devido a níveis de temperatura foliar compatíveis com a manutenção de processos metabólicos dentro de faixas favoráveis para a ocorrência de taxas de crescimento positivas na condição de estresse salino.

Como conclusão, a maior sensibilidade ao estresse salino apresentada pelo microcarpo foi diretamente relacionada com uma maior acumulação de Na^+ nas folhas, o que acarretou aumento na perda de eletrólitos. Também, mostrou menor condutância estomática e transpiração, que por sua vez, acarretou maiores incrementos na temperatura foliar.

TABELA 13 - Concentração de Massa Foliar, Na⁺ e Condutividade Elétrica em plantas de cajueiro comum, anão precoce e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os resultados são a média de três repetições

NaCl (mM)	Massa da Folha (g.planta ⁻¹)			CV ¹
	Comum	Anão	Micro	
0	8,20 a A	11,40 a A	4,50 a B	7
200	3,80 b AB	7,20 b A	1,30 b B	15
CV ² (%)	8	14	15	

NaCl	Na ⁺ (mol.Kg ⁻¹ MS)			CV ¹
	Comum	Anão	Micro	
0	104,77 a B	115,83 a B	193,00 a A	12
200	583,33 b B	455,00 b B	1591,33 b A	9
CV ² (%)	14	15	7	

NaCl	Condutividade Elétrica (dS.m ⁻¹)			CV ¹
	Comum	Anão	Micro	
0	112,6 b B	115,30 b B	220,93 b A	8
200	617 a A	393,75 a B	756,67 a A	12
CV ² (%)	14	7	12	

- Entre tratamentos, letras minúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

-Entre genótipos, letras maiúsculas iguais indicam semelhança estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

¹ Coeficiente de variação entre os genótipos (colunas).

² Coeficiente de variação entre os tratamentos (linhas).

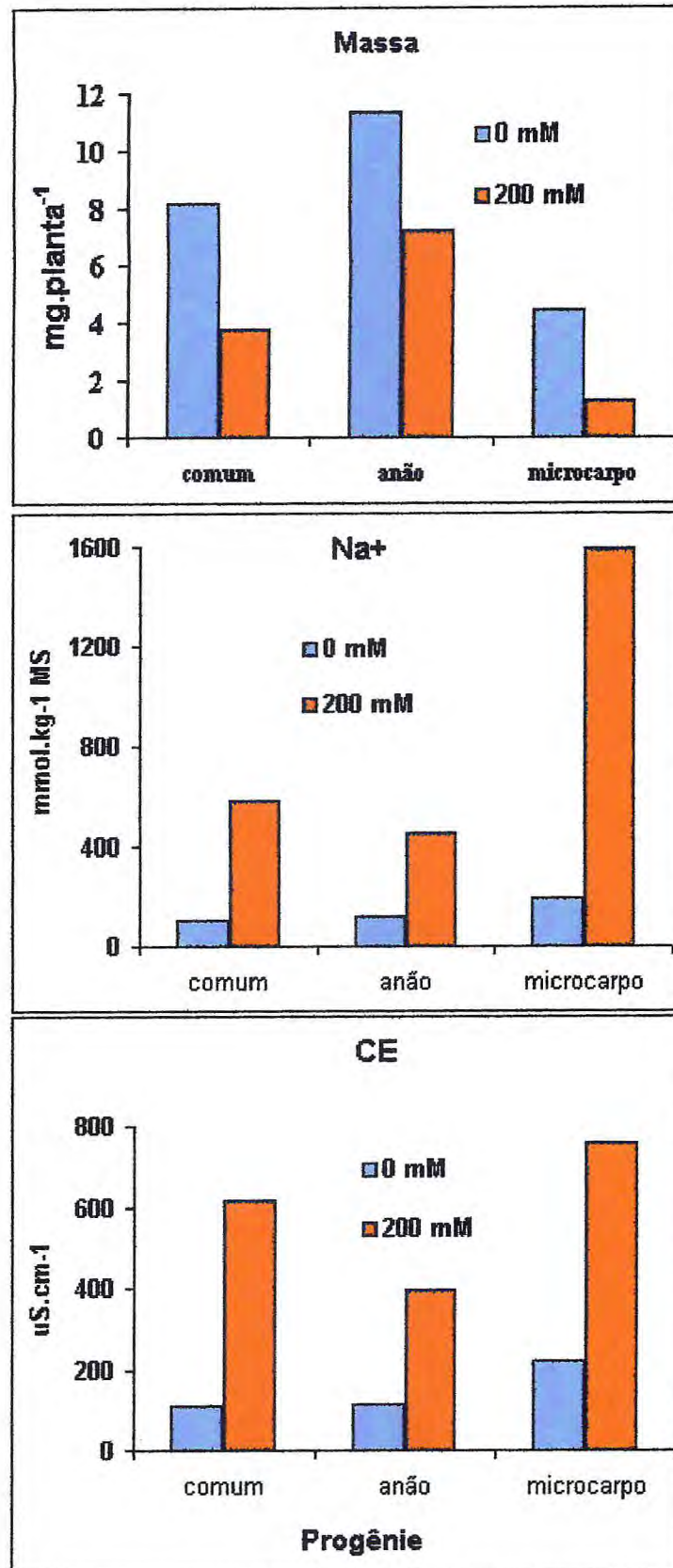


FIGURA 18 – Massa da folha, em mg.planta^{-1} – MF (A), Acumulação de sódio - Na^+ , em mmol.planta^{-1} (B) e Condutividade elétrica – CE., em dS.m^{-1} (C) em folhas de mudas de cajueiro comum, anão precoce e microcarpo, submetidas a 0 e 200 mM de NaCl.

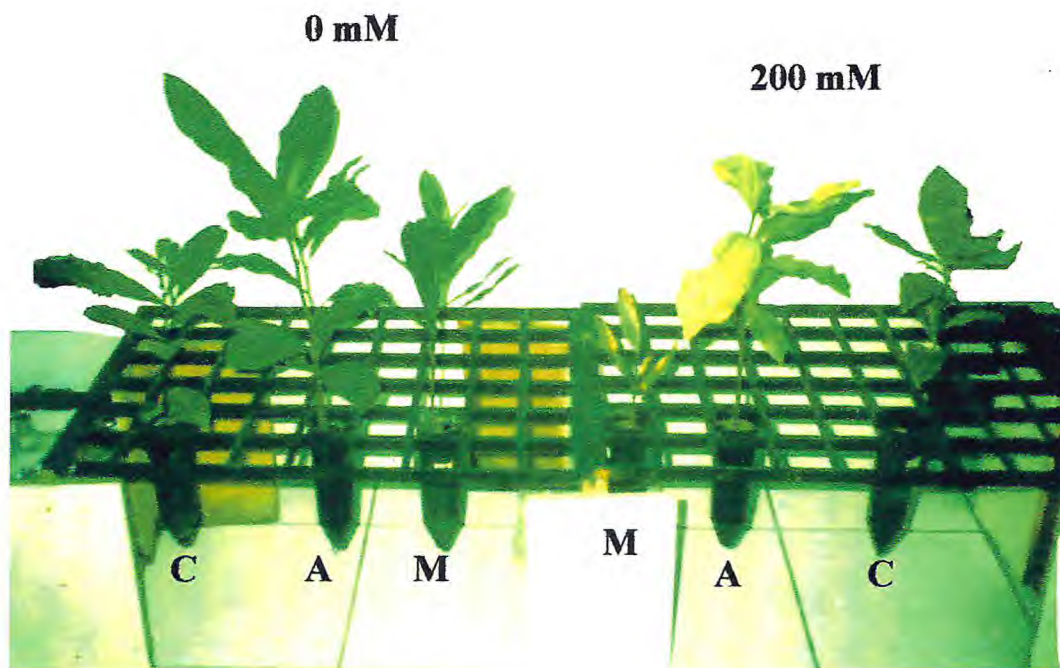


FIGURA 19 – Mudanças de cajueiro (A) anão, (C) comum e (M) microcarpo, com 44 DAP, submetidas a 0 e 200 mM, durante 14 dias. Fortaleza, Ceará, Brasil, 2002.

TABELA 14 - Condutância Estomática, temperatura foliar e transpiração foliar em plantas de cajueiro comum, anão precoce e microcarpo, submetidas a doses crescentes de NaCl. Os resultados são a Média de três repetições.

Condutância Estomática (cm.s ⁻¹)				
NaCl				CV ¹
(mM)	Comum	Anão	Micro	(%)
0	0,98 a A	0,99 a A	1,07 a A	10
200	0,38 b A	0,34 b A	0,21 b B	13
CV ² (%)	13	10	15	
T (°C) Foliar				
NaCl				CV ¹
(mM)	Comum	Anão	Micro	(%)
0	30,23 a A	30,20 a A	29,60 a A	6
200	33,90 b A	31,13 b B	34,23 b A	5
CV ² (%)	4	3	6	
Transpiração Foliar (mmol.m ⁻² .s ⁻¹)				
NaCl				CV ¹
(mM)	Comum	Anão	Micro	(%)
0	8,58 a A	8,00 a A	9,16 a A	7
200	6,00 b A	6,52 BA	5,79 b A	12
CV ² (%)	13	10	16	

- Entre tratamentos, letras minúsculas iguais, indicam semelhança estatística pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

-Entre genótipos, letras maiúsculas iguais, indicam semelhança estatística pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

¹ Coeficiente de Variação entre os genótipos (colunas).

² Coeficiente de Variação entre os tratamentos (linhas).

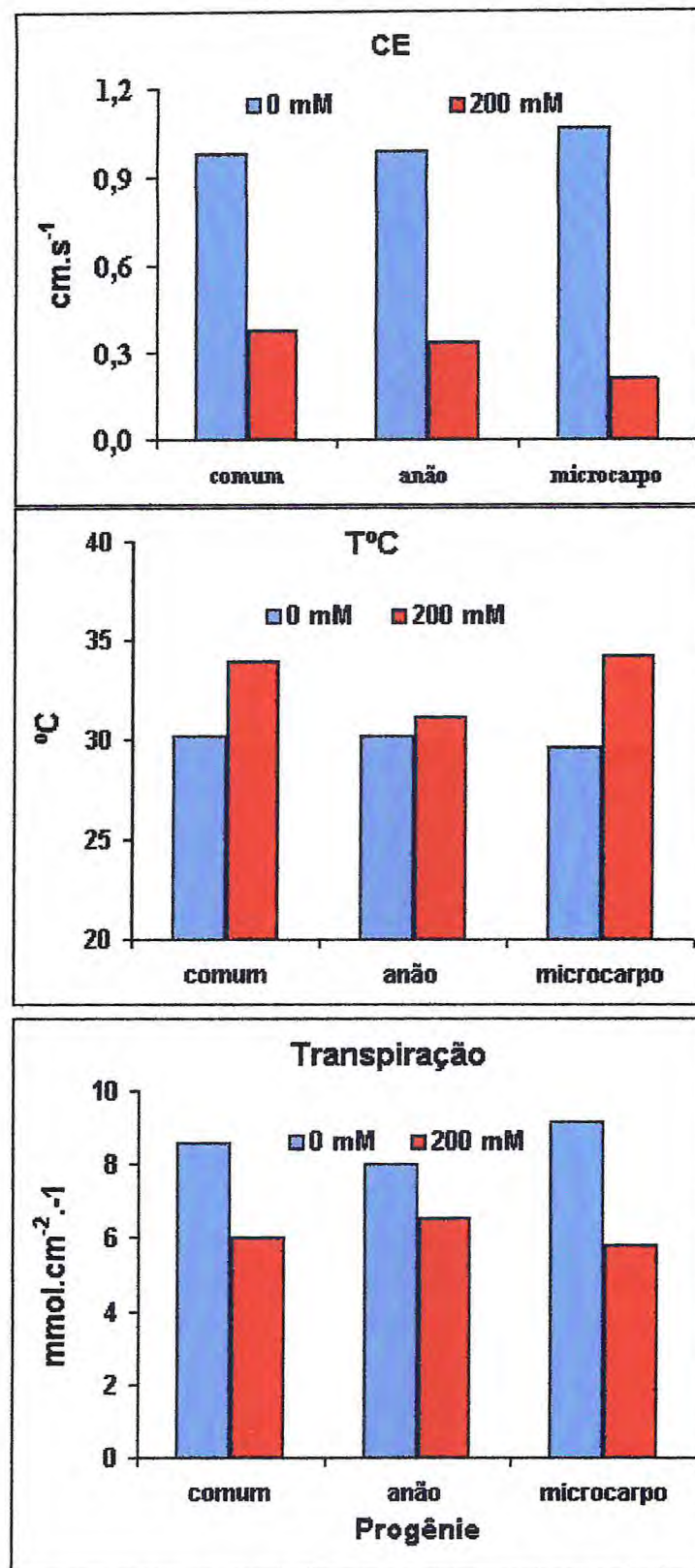


FIGURA 20 – Condutância Estomática – CE, em cm.s^{-1} (A); Temperatura - $T^{\circ}\text{C}$ (B) e Transpiração – T, em $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (C) em folhas de mudas de cajueiro comum, anão precoce e microcarpo, submetidas a 0 e 200 mM de NaCl.

4. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos mostraram que entre os três genótipos estudados, as mudas de microcarpo foram as mais sensíveis ao estresse salino em termos de decréscimo relativo na produção de massa seca e de exibição de sintomas visuais de toxicidade nas folhas. Somente a intensidade de acumulação de Na^+ e Cl^- e o nível de prolina nas folhas foram capazes de explicar parcialmente a maior sensibilidade ao estresse salino. Entre as mudas dos cajueiros “comum de praia” e “anão-precoce”, oriundos de castanhas do clone CP 076, não ficou evidente diferenças de tolerância apesar do anão apresentar maior quantidade de biomassa seca em raízes, caule e folhas tanto no controle quanto na condição de estresse. Apesar dos caracteres fisiológicos estudados mostrarem grande alteração em resposta ao estresse salino, os mesmos não foram capazes de explicar as diferenças de sensibilidade ao NaCl. No todo, os resultados revelam que a resposta ao NaCl por mudas de cajueiro é extremamente complexa e sugerem que os caracteres que podem conferir tolerância são interativos e que a maior ou menor tolerância ao estresse salino entre os genótipos estudados não é devida à expressão de caracteres isolados, mas sim devido à interação entre os mesmos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-KADIR, S.J.M.; PAUSEN, G.M. Phosphoenolpyruvate carboxylase activity in plants grown with either NO₃ or NH₄ as inorganic nitrogen source. **Journal of Plant Nutrition**, v.5, p.1141-51,1982.

ACKERSON, R.C.; HERBERT, R.R. Osmoregulation in cotton in response to water stress. **Plant Physiology**, v.67, v.484-488, 1981.

AHMAD, I.; HELLEBUST, J.A. The relationship between inorganic nitrogen metabolism and proline accumulation in osmoregulatory responses of two euryhaline microalgae. **Plant Physiology**, v. 88, p. 348-354, 1988.

ALMEIDA, J.I.L.; ARAÚJO, F.E.; BARROS, L.M. **Características do clone EPACE CL 49 de cajueiro**. EPACE, 1992. p. 160-165. (Relatório Anual de Pesquisa 1980/1992).

ALMEIDA, F. A. G. et al. Dispersão do sistema radicular de Alporques de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.). XX Reunião Brás. De Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas . Soc. Brás. De Ciências do Solo. Piracicaba, 1992. **Resumos ...Piracicaba, 1992. 2p.**

ALMEIDA, F. A. G. **Estudos fenológicos e de produtividade do cajueiro anão (*Anacardium occidentale* L.) sob condições de irrigação localizada**. Relatório Técnico UFC/CNPq. Fortaleza, Ceará, 1986. 15 p.

ALMEIDA, F. A. G. et al. **Comparação fenológica e de bioprodutividade entre progênies e clones de cajueiro anão precoce**. VI Encontro de Genética do Nordeste, Soc. Bras. de Genética, Fortaleza, mar/1989. Res... 56.

ALMEIDA, F. A. G. et al. **Progênies de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.) com potenciais de clones**. XLI Cong. Nac. de Botânica, Soc. Botânica do Brasil, Fortaleza, jan/1990. Res... p. 324.

ALMEIDA, F. A. G. et al. **Novas progênies de cajueiro anão precoce com potenciais de clones**. XLIV Cong. Nac. de Botânica, Soc. Bras. de Botânica, São Luiz, Maranhão, jan/1993. Res... p. 243.

ALMEIDA, F. A. G. et al. **Ecologia comparativa da produção de dois clones enxertados de cajueiro anão quando em condições de irrigação**. XV Cong. Bras. de Fruticultura, Soc. Bras. de Fruticultura, Poços de Caldas, Minas Gerais, out/1998. Res... p. 178.

ALMEIDA, F. A. G. et al. **Ecologia comparativa da produção de dois clones enxertados de cajueiro anão quando em condições de irrigação**. **Rev. de la Fac. de Agronomia**, Maracay, Venezuela, v. 26, n. 2, 91 - 105. Dez/2000.

ALMEIDA, F. A. G. **O sucesso do cajueiro anão: clones de castanhas grandes e pesadas.**, **FRUTAL 2002**, Fortaleza, Ceará, set/2002. Palestra Técnica... 62 p. CD1.

ALVARGONZALEZ, R. - **O Desenvolvimento do Nordeste Árido**. Fortaleza, Ministério do Interior, DNOCS, 1984. v.1 e 2.

AMZALLAG, G. N. et al. **Induced variability during the process of adaptation in Sorghum bicolor**. **J. Exp. Bot.**, v.46, p.1017-24, 1993.

ARGLES, G. K. *Anacardium occidentale* L. - Cashew. In: **The propagation of tropical trees**. **Horticultural Review**, v. 4, p. 184-222, 1976.

ASLAM, M.; HUKFFAKER, R. C.; RAINS, D. W. **Early effects of salinity on nitrate assimilation in barley seedlings**. **Plant Physiology**, v. 76, p. 321-325, 1984.

BALL, M.C.; MUNNS, R. **Plant Responses to Salinity under Elevated Atmospheric Concentrations of CO₂**. **Australian Journal of Botany**, v. 40, p.515-525. 1992.

BAÑULS, J.; PRIMO-MILLO, E. **Effects of chloride and sodium on gas exchange parameters and water relations of Citrus plants**. - **Physiol. Plant.**, v.85, p. 115-123.1992.

BARKLEY, F. A. **Genetic key to the sumac family (Anacardiaceae)**. **Lloydia**, v. 20, p.255-265, 1977.

- BARNETT, N.M.; NAYLOR, A.W. Amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress. *Plant Physiology*, v. 41, p.1222-30. 1996.
- BARROS, L. de M. et al. **Recomendações técnicas para a cultura do cajueiro anão precoce**. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1993. 65p.
- BARROS, L. de M. et al. **A cultura do cajueiro anão**. Fortaleza. Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará , 1984. 67p.(EPACE. Documentos 3).
- BARROS, L. M. Origem e Distribuição Geográfica. In: Lima, V. P. M. S. **A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: BNB/ETENE, 1998a p.321-355 (Série Estudos Econômicos e Sociais, 35).
- BARROS, L. M. Solos. In: Lima, V. P. M. S. **A cultura do cajueiro no nordeste do Brasil**. Fortaleza, BNB, ETENE, p.81-105. (**Estudos Econômicos Sociais**, 35), 1998b.
- BARROS, L.M. ; CRISÓSTOMO, J.R. **Melhoramento Genético do Cajueiro**. In: ARAÚJO, J.P.P. e SILVA, V.V. **Cajucultura: Modernas Técnicas de Produção**. Fortaleza: EMBRAPA\CNPAT. 1995. p.73-96.
- BARROS, M. L.; CAVALCANTI, J. J. PAIVA, J. R. Seleção de clones de cajueiro-anão para o plantio comercial no Estado do Ceará. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.11.p. 2197-2204, 2000.
- BEHBOUDIAN, M.H.; TÖRÖKFALVY E.; WALKER, R.R.. Effect of salinity on ionic content, water relations and gas exchange parameters in some citrus scion--rootstock combinations. *Sci. Hortic.*, v.28, p.105—116, 1986.
- BEM-HAYYIM, G. et al. Protein associated with salt adaptation in citrus and tomato cells: Involvement of 26 kDa polypeptides. *Physiol. Plant.*, v.77, p.332-340, **Physiol. Plant.**, 1989.
- BERNAL, C.T., BINGHAM, F.T.; OERTLEI, J. Salt tolerance of Mexican wheat.. Relation to variable sodium chloride and length of growing season. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, v. 38, p. 777-780.1974.
- BERNSTEIN, L. Osmotic adjustment of plants to saline medial I. Steady state. *Am. J. Bot.*, v.48, p.909-18, 1961.

- BERNSTEIN, L., EHLIG, C.F., CLARK, R.A. Effect of grape rootstocks on chloride accumulation in leaves. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, v.94, p.584-90, 1969.
- BERTELI, H.; NISSEN, P. Effect of exogenous and endogenous nitrate concentration on nitrate utilization by dwarf bean. **Plant Physiol**, v.70, p.754-759, 1995.
- BETHKE, P.C., DREW, M.C. Stomatal and non-stomatal components to inhibition of photosynthesis in leaves of *Capsicum annuum* during progressive exposure to NaCl salinity. **Plant Physiol.**, v. 99, p. 219-226, 1992.
- BINGHAM, F.T.; FENN, L.B.; OERTLI, J.J. A sandculture study of chloride toxicity to mature avocado trees. **Proc. Soil Sci. Soc Am.**, v.32, p.249-52, 1968.
- BLUM A; EBERCON, A. Genotypic responses in sorghum to drought stress. III. Free proline accumulation and drought resistance. **Crop Sci**, v.16, p. 428-431, 1976.
- BOHNERT, H. J.; JENSEN, R. G. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. **Trends Biotechnol.**, v.14, p.87-89, 1996.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.246-254, 1976.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**: Fortaleza: ESAM. 1976. 540p. (Coleção Morssoroense, 420).
- BRESTIC, M. et al. Does photorespiration protect the photosynthetic apparatus in French bean leaves from photoinhibition during drought stress? **Planta**, v.196, p.450-457, 1995.
- CACHORRO, P. et al. Abscisic acid and osmotic relations in *Phaseolous vulgaris* L. shoots under salt stress. **J. Plant Growth Reg.**, v.14, p. 99-104, 1995.
- CAMPBELL, W.H. Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiology. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.**, v.50, p. 277-303, 1999.
- CANO, E. A. et al. M. Effect of NaCl priming on increased salt tolerance in tomato. **J. Hortic. Sci.**, v. 66, p.621-628, 1991.

CARDOSO, B.B. Efeitos comparativos da salinidade sobre o metabolismo do nitrogênio em folhas e nódulos de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] inoculado com *Bradyrhizobium* sp. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. UFC. 2000

CARTER, D. L. Problems of salinity in agriculture. In: POLJAKOFF-MAYBER, A.; GALE, J. (Eds). **Plants in saline environments**. New York. Heidelberg, 1975. p.25-35.

CATALDO, D.A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic. **Commum Soil Science and Plant Analysis**, v.6, n.1, p. 71-80, 1975.

CELLA et al. The growth and peroxidase synthesis by two carrot cell lines. **J. Exp. Bot.**, v.35, p.1846-1852, 1984.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926.v.1.pp.399-402.

COSTA, R. C. L. **Assimilação de nitrogênio e ajustamento osmótico em plantas noduladas de feijão de corda submetidas ao estresse hídrico**. 1999. 255f. Tese (Doutorado em Bioquímica Vegetal) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CRAMER G.R. et al. Influx of Na, K and Ca into roots of salt stressed cotton seedlings: effects of supplemental Ca. **Plant Physiol.**, v. 83, p.510-51, 1987.

CRAMER, G. R., EPSTEIN, E.; LAÜCHLI, A. Na-Ca interactions in barley seedlings: relationship to ion transport and growth. **Plant Cell Environ.**, v.12, p. 551-558, 1989.

CRAMER, G.R., NOWAK, R.S. Supplemental manganese improves the relative growth, net assimilation and photo-synthetic rates of salt-stressed barley. **Physiol. Plant**, v. 84, p.600-605, 1992.

CRAMER, G.R.; EPSTEIN, E.; LAUCHLI, A. Kinetics of root elongation of maize in response to short-term exposure to NaCl and elevated calcium concentration. **J. Exp. Bot.**, v. 39, p. 1513-1522. 1988 .

CUNHA, R.S.M. **Análises filogenéticas em cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) : utilização do gene da subunidade pequena do RNA ribossômico (SSU Rrna) 2002.**

96f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Ceará.. Fortaleza, CE.

DELAUNEY, A. J. et al. Cloning of delta-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, v. 268, p.18673-18678, 1993.

DELAUNEY, A.J.; VERMA D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, v.4, p.215-23, 1993.

DELFINO et al. Restriction to carbon dioxide conductance and photosynthesis in spinach leaves recovering from salt stress. *Plant physiol.* V. 119, p. 293-302, 1999.

DELFINO, S. et al. Consequences of salt stress on conductance to CO₂ diffusion, Rubisco characteristics and anatomy of spinach leaves. *Aust J. Plant Physiol.*, v.25, p.395-402, 1998.

DUBOIS, F. et al. Localization of tobacco cytosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts shows organ- and cell-specific patterns of protein synthesis and gene expression. *Plant. Mol. Biol.*, v. 31, p. 803-817, 1996.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n.3, p.350-356, 1956.

DUCKE, A. **Estudos botânicos no Ceará**. Mossoró: Escola Superior de Agricultura, 1979. 104p.

DURAND, M.; LACAN, D. Sodium partitioning within the shoot of soybean. *Physiologia Plantarum*, v.91, p.65-71, 1994.

ENGEL, V.L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.3, n.1, p. 39-45, 1991.

EPSTEIN et al. **Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1980. v. 49, p.684-92.

- FAGERIA, N. K.; GHEYI, H.R. Melhoramento genético das culturas e seleção de cultivares. P. 363-383. In manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada. XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola. 1997.
- FERREIRA, O. S. et al. Efeito do estresse salino sobre alguns índices fisiológicos de diferentes genótipos de cajueiro anão-precoce e cajueiro comum. VIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. Ilhéus – Bahia. Setembro 2001.
- FERREIRA, O.S. Avaliação inicial da tolerância ao estresse salino em materiais de cajueiro através de índices de crescimento. in: XVI Congresso Brasileiro de Fruticultura, Fortaleza-CE, Brasil, p158. 2000.
- FIEC – Federação das Indústrias do Estado do Ceará – Exportações Cearense no período 2001/2002. Ceará em COMEX janeiro/2002. Disponível em <<http://www.sfiec.org.br/> - 22k> . Acesso em 10/03/02.
- FLOWERS, T.J. et al. Breeding for salt tolerance in crop plants-the role of molecular biology. *Acta Physiologiae Plantarum*, v.19, p.427-433, 1988.
- FLOWERS, T.J.; TROKE, P.E.; YEO, A.R. The mechanism of salt tolerance in halophytes. – *Annual Rev. Plant Physiol.*, v.28, p. 89-121, 1991.
- FOYER, C. H et al. Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA on coordination of nitrogen and carbon in maize leaves. *Plant Physiology*, v.117, p. 283-292, 1998.
- FRANÇOIS, L.E.; DONOVAN, T.J.; MASS, E.V. Calcium deficiency of artichoke buds in relation to salinity. *Hortic. Sci.*, v.26, p. 549-553. 1991.
- FRICKEW, LEIGH R A ; TOMOS A. D. The intercellular distribution of vacuolar solutes in the epidermis and mesophyll of barley leaves changes in response to NaCl. *J. Exp. Bot.*, v.47, p.1413–1426, 1996.
- FROTA, P.C.E.; PARENTE, J.I.G. Clima e fenologia. In: ARAÚJO, J.P.P. de; SILVA, V.V. (Orgs.) *Cajucultura. Modernas Técnicas de Produção*. Fortaleza: Embrapa/CNPAT, 1995. p.43-54.

GARCIA-LEGAZ et al.. Effect of salinity on growth, ion content and CO₂ assimilation rate in lemon varieties on different rootstocks. *Physiology Plantarum*. V. 89. p. 427-432.1993.

GIBSON, T.S., SPEIRS, J.; BRADKY, C.J. Salt tolerance in plants. II. In vitro translation of m-RNA from salt-tolerant and salt-sensitive plants on wheat germ ribosomes. Responses to ions and compatible organic solutes. *Plant Cell Environ*, v.7, p.579-587, 1984.

GOMES, M.M.A.G. et al. Trocas gasosas e quantificação do ácido abscísico em duas cultivares de arroz de sequeiro submetido à deficiência hídrica. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.9, n.3, p.177-183,1997.

GORHAM, J., WYN JONES, R.G. Mc Donnell, E. Some mechanisms of salt tolerance in crop plants, *Plant Soil*, v. 89, p. 15-40, 1985.

GORHAM, J., et al. Salt tolerance in the Triticeae: solute accumulation and distribution in an amphidiploid derived from *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring and *Thinopyrum bessarabicum*. *J. Exp. Bot.*, v.37, p. 1435-1449.

GOUIA, H.; GHORBAL, M. H.; THOURANIE, B. Effects of NaCl on flows of N and mineral ions and on NO₃⁻ reduction rate within whole plants of salt-sensitive bean and salt-tolerant cotton. *Plant physiol*, v.105:, p.1409-1418, 1994.

GREENWAY, H.; GUNN, A.; THOMAS, D.A. Plant response to saline substrates. VIII. Regulation of ion concentrations in salt-sensitive and halophytic species. *Aust. J. Biol. Sci.* v.19, p.741-56, 1965.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 30, p.149-155, 1980.

HAGEMAN, R. H.; HUCKLESBY, D. P. Nitrate reductase from higher plants. In: *Methods in Enzymology*, 17 A, p. 491-503, 1971.

HECKATHORN, S.A.; DE LUCIA, E.H.; ZIELINSKI, R.E. The contribution of drought-related decreases in foliar nitrogen concentration to decreases in photosynthetic capacity during and after drought in prairie grasses, *Physil. Plantarum*, v.101, p.173-182, 1997.

HELAL M; MENGEL, K. Nitrogen metabolism of Young barley plants as affected by NaCl-salinity and potassium. **Plant and Soil**, v51, p. 457-62. 1979.

HELLEBUST, J.A. Osmoregulations. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v.27, p. 485-505. 1976.

HERVIEU, F. et al. Contribution of ornithine aminotransferase to proline accumulation in NaCl treated radish cotyledons. **Plant Cell Environ.**, v.18, p. 205-210, 1995.

HIREL, B. et al. Multiple subunit composition of chloroplastic glutamine synthetase of *Nicotiana tabacum* L. **Plant Physiol**, v. 74, p.448-450, 1984.

HOAGLAND, D. R.; ARNON. D. I The water culture method for growing plants without soil. **Calif. Agric. Exp. Stn. Univ. Calif. Berkeley Circ**, v.347, p.139, 1950.

Hu AC-A, Delauney AJ, Verma DPS. A bifunctional enzyme (D 1 -pyrroline-5 carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 89, p. 9354-9358,1992.

HUANG, L.; MURRAY, F.; YANG, X. Interaction between mild NaCl salinity and sublethal SO₂ pollution on wheat *Triticum aestivum* cultivar "Wilgonyne" (Ciano/Gallo) I. Responses of stomatal conductance, photosynthesis, growth and assimilation partitioning. **Agric. Ecosyst. Environ**, v.48, p.163-178, 1994.

JAMES, P. A. et al. **Characterization of leaf boron injury in salt-stressed eucalyptus by image analysis**. United States Department of Agriculture.1998. (Agricultural Research Service).

JOHNSON, D.V. The botany, origin and spread of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of plantation crops**, Kasaragod, v.1, n.1, p.1-7, 1973.

JONES, M.M.; TURNER, N.C. Osmotic adjustment in expanding and fully expanded leaves of sunflower in response to water deficits. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 7, p.181-192, 1980.

KANG, G.M., TITUS, J.G. Increased proteolysis of senescing rice leave inthe presence of KCl and NaCl. **Plant Physiology**, p.81, v. 1232-7,1989.

KAO, C.H.; YANG, S.F. Role of ethylene in the senescence of detached rice leaves. **Plant Physiol.**, v. 73, p. 881-885, 1983.

KAVI, K. P.B. et al. Overexpression of D 1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase in-creases proline production and confers osmotolerance in trans-genic plants. **Plant Physiol**, v.108, p. 1387-1394, 1995.

KRISNAMURTHY, R. Amellioratin of salinity effect in salt tolerant rice by foliar application of putrescine. **Plant Cell Physiology**, v.32, p.699-703, 1991.

KUEH J.S.H. et al.. Proline biosynthesis in a proline-accumulating barley mutant. **Phytochemistry**, v. 23, p. 2207-2210, 1984.

LA HAYE, P.A.; EPSTEIN, E. Calcium and salt tolerance by beans plants. **Physiol. Plant.**, v.25, p. 213-218.1971.

LAUCHLI, A ; EPSTEIN, E. Plant response to saline and sodic conditions. In:TANJI, K.K., ed. **Agricultural Salinity Assesmente and Management**. New York: :ASCE, p. 113-137, 1990.

LAUTERI, M. et al. Genetic variation in photosynthetic capacity, carbon isotope discrimination and mesophyll conductance in provenances of *Castanea sativa* adapted to different environments. **Funct. Ecol.**, v.11, p. 675-683, 1997.

LAZOF, D.; LAUCHLI, A. The nutritional status of the apical meristem of *Lactuca sativa* as affected by NaCl salinization: An electron-probe microanalytic study. **Planta**, v.184, p.334-342.1991.

LEA, P.J. et al. The use of mutants lacking glutamine synthetase and glutamate synthase to study their role in plant nitrogen metabolism. In Poulton J.E., Romeo J.T., Conn E.E., eds. **Recent Advances in Phytochemistry**, Vol. 23. New York, Plenum Press. 157-189. pp. 1989.

LEA, P.J. Primary Nitrogen Metabolism. In: **PLANT BIOCHEMISTRY (DEY, P.M. & HARBORNE, J.B. eds.)**, pp. 273-306. Academic Press, San Diego, California-USA. 1997.

LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants.

Nature, v.251, p.614-616, 1974.

LEE, S.P. et al. Induction of Freezing Tolerance in Potato *Solanum commersonii* Suspension Cultured Cells. **Physiol. Plant.**, v.84, p.41.1992.

LORETO F, Harley PC, Di Marco G, Sharkey TD. Estimation of mesophyll conductance to CO₂ flux by three different methods. **Plant Physiol**, v.98. p.1437–1443, 1992.

LOUSTAU, D. et al. Growth and water relations of three geographically separate origins of maritime pine (*Pinus pinaster*) under saline conditions. **Tree Physiol**, v.15, p. 569-576, 1995.

LYNCH J.; LÄUCHLI, A. Salt stress disturbs the calcium nutrition of barley (*Hordeum vulgare* L.). **New Phytologist** 99, 345–354. 1985.

MAGALHÃES, J.R. et al. Nitrogen assimilation efficiency in maize genotypes under ammonia stress. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.5, n.2, p. 163-166, 1993.

MAGGIO, A. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? **The Plant Journal** (in press). 2002.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do Estado Nutricional das Plantas : Princípios e Aplicações. Piracicaba : POTAFOS. 201 p. 1989.

MANETAS, Y. A re-examination of NaCl effects on phosphoenol pyruvate carboxylase at high physiological enzyme concentrations. **Physiol. Plant.**, v. 78, p. 225-229, 1990.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1995. 680p.

MAAS, E.V.; HOFFMAN, G.J. crop salt tolerance – current assessment. **J. Irrig. Drain. Div. Am. Soc. Civ. Eng.**, v. 103, p. 115-134.1977.

MASS, E.V. Salinity and citriculture. **Tree Physiology**,v.12. p. 195-216, 1993..

MATOS, N.N. Relações hídricas e atividade da redutase de nitrato em mudas de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.) submetidas aos estresses hídrico e salino. Tese de doutorado. UFC. Fortaleza, 2001. 62p.

MATSUMOTO, H.; CHUNG, G.C. Increase in proton-transport activity of tonoplast vesicles as an adaptive response of barley roots to NaCl stress. **Plant Cell Physiol.**, v. 29, p. 1133-1140. 1988.

McCREE, K.J.; RICHARDSON, S.G. Stomatal closure vs. Osmotic adjustment: A comparison of stress responses. **Crop Science**, v. 27, p. 539-543, 1987.

MELO, A. R. B. **Utilização de nitrato e ajustamento osmótico em plantas de feijão-de corda [(*Vigna unguiculata* L (walp))] submetidas a diferentes níveis de estresse salino.** 1999. 255F. Tese (Doutorado em Bioquímica Vegetal) - Departamento de Bioquímica Vegetal. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.

MENESES JUNIOR, J. et al, Efeitos comparativos da salinidade sobre o crescimento e acumulação de solutos osmoticamente compatíveis em mudas de cajueiro comum e anão precoce. Resumos XVI Congresso Brasileiro de Fruticultura, Fortaleza, CE, 25 a 29 de Setembro de 2000, p. 255.

MITCHELL, J.D.; MORI, S.A. The cashew and its relatives (*Anacardium: Anacardiaceae*). **Memories on the New York botanical garden**, v.42, p.1-76, 1987.

MIZRAHI, Y.; PASTENAK, D. Effect of salinity on quality of various agricultural crops. **Plant Soil**, v.89, p. 301-307. 1985.

MOLINIER, M. et al. **Dinâmica da Água e das Matérias num Ecossistema Representativo do Nordeste Brasileiro: Condições de Extrapolação Espacial à Escala Regional**, ORSTOM, Recife, 1989.

MUNNS R., SCHACHTMAN D.P.; CONDON A.G. The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 22, p. 561-569, 1995.

MUNNS, R. Effect of high external NaCl concentrations on ion transport within the shoot of *Lupinus albus*. I. Ions in xylem sap. **Plant Cell Environ.**, v.11, p.283-289, 1988.

MUNNS, R. Physiological process limiting plant growth in saline soils: some dogms and hypotheses. **Plant Cell Environ.**, v.16, p.757-766, 1980.

- MUNNS, R.; SCHACHTMAN, D.P. Plant responses to salinity: significance in relation to time. In: BUXTON, D.R. et al. **International Crop Science I**. Madison/USA: Crop Science Society of America, 1993.
- MUNNS, R.; TERMAAT, A. Whole plant responses to salinity. **Aust. J. Plant Physiol.**, 13: 143-160. 1986.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v.25. p. 239-250. 2002.
- NEUMANN, P. M.; VOLKENBURGH, E.V.; CLELAND, R. E. Salinity stress inhibits bean leaf expansion by reducing turgor, not wall extensibility. **Plant Physiology**, v. 88, p.233-237.1988.
- Nielsen, T.H. et al. The sugar-mediated regulation of genes encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP glucose pyrophosphorylase is modified by phosphate and nitrogen. **Plant Cell Environ**, v.21, p. 443-454, 1998.
- NIU, X. et al.. Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. **Plant Physiology**, v.109, p.735-742, 1995.
- OERTLI, J.L.J. Effects of external salt concentrations on water relations in plants:5. Significance of external water-potential and sat-transport kinetics on rate of cell expansion. **Soil Sci.**, v.105, p.219-6-22, 1968.
- PENG, Z.; LU, Q.; VERMA, D. P. S. Reciprocal regulation of delta1- pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes control proline levels during and after osmotic stress in plants. **Mol. Gen. Genet.**, v.253, p.334-341, 1996.
- PEOPLES, M.B. et al. **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field**. Australian Centre for International Agricultural Research.Canberra. 19879. 76 p.
- PERERA, S. et al. Immunocytolocalization of glutamine synthetase in mesophyll and phloem of leaves of *Solanum tuberosum* L. **Protoplasma**, v.167, p.66-73, 1992.

Pérez-Alfocea F., et al. Osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* under NaCl and polyethylene glycol 6000 iso-osmotic stresses. **Physiologia Plantarum**, v. 87, p. 493–498, 1993.

POLJAKOFF-MAYBER, A. Morphological and anatomical changes in plants as a response to salinity stress. In: Poljakoff-Mayber, A.; Gale J. (Eds). **Plants in saline environments**. New York: Springer-Verlag. 1975 p. 97–117.

POLLARD, A.; WYN, J.R.G. Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. **Planta**, v.144, p.291-98.1979.

PRISCO J. T.; PAHLICH, E. Recent Advances on the physiology of water and salt stresses. IN: REUNIÃO BRASILEIRA DE FISILOGIA VEGETAL, 2, 1989, Piracicaba. **Anais...Piracicaba. SBFV;ESALQ**, 1989.p.24.

RABER, E. Altered nitrogen metabolism under environmental stress conditions. In: PASSARAKLI, M. (ed) **Handbook of Plant and Crop Stress**. New York, Marcel Dekker, 1993, p. 230-265.

RENTSCH D. et al. Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specific amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid targeting mutant. **Plant Cell**, v.8, p. 1437–1446, 1996.

RHODES, D.; HANDA, S.; BRESSAN, R.A. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. **Plant Physiol.**, v.82, p. 890–903.,1986.

ROBERTS, J.K. et al. Salt stimulation of phosphate uptake in maize root tips studied by ³¹P nuclear magnetic resonance. **Plant Pphysiol.**, v. 75. p. 947-950. 1984.

Rodríguez H.G. et al. Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. **Plant Physiology**, v. 113, p. 881–893, 1997.

ROMERO-ARANDA, R.;SYVERTSEN,J.P. The influence of foliar-applied urea nitrogen and saline solutions on net gas exchange of citrus leaves, **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v.121, p.501–506, 1996.

ROOSENS, N.H.C.J. et al. Isolation of ornithine- d-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in Arabidopsis. **Plant Physiol**, v.117, p. 263–271. 1998.

RUSH, D.W.; EPSTEIN, E.. Breeding and selections for salt tolerance by the incorporation of wild germplasm into a domesticated tomato. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.106, n.2, p.1669-704, 1981.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. 4 ed. California. Wadsworth Publishing Company. 1992. 682p.

SAMPAIO, T. **O tupi na geografia nacional**. 2 ed. s.l., O pensamento, 1914. 285 p.

SANTOS, R.V.; MURAOKA, T. Interações salinidade e fertilidade do solo. In: XXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 26, 1997. Campina Grande. Anais ... Campina Grande: UFPB, 1997. P. 289-317.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. Análise química de plantas. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 56p. 1974.

SATLER, S.O.; THIMANN, K.V. Relation between respiration and senescence in oat leaves. **Plant Physiol.**, v. 72, p.540-546, 1983.

SCHACHTMAN, D., LIU, W. Molecular pieces to the puzzle of interaction between potassium and sodium uptake in plants. **Trends in Plant Sci.**, v.4, n.7, p.281-287, 1999.

SHOMER-LLAN A.; WAISEL, Y. Effects of stabilizing solute on salt activation of phosphoenolpyruvate carboxylase from various plant sources. **Physiol. Plant.**, v.67, p. 408-414, 1986.

SILVA, S.L.F.. Características fisiológicas de dois porta-enxertos de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.), submetidos ao estresse salino . 2002. 34 p. (Monografia, 24).

SILVEIR, J.A.G.; MELO, A.R.B; VIÉGAS, R.A. Oliveira J.T.A. Salinity-induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. **Environmental and Experimental Botany**, Memphis, v. 46. p. 171-179. 2001.

SILVEIRA, J.A.G.; CARDOSO, B. B.; MELO, A. R. B. ; VIÉGAS, R. A. Salt-induced decrease in uptake and assimilation in cowpea plants. **Braz. J. Microbiol.**, v.31, p. 423-434, 2000.

SILVEIRA, J. A. G. Carbono e nitrogênio: partição e produtividade. In: ANAIS DO V SEMINÁRIO DE BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA (CROCOMO, O.J. & SILVEIRA, J.A.G. eds.) p.p.305-354. CEBTEC/FEALQ/USP, São Paulo. 1987.

SILVEIRA, J. A. G. et al. Phosfoenolpyruvate Carboxylase and Glutamine Synthetase Activities in Relation to Nitrogen Fixation in Cowpea Nodules. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10 n.1, p.19-23, 1998.

SILVEIRA, J.A.G. Interações entre assimilação de nitrogênio e o crescimento de cana-de-açúcar. Tese de Doutorado. USP/ESALQ. Piracicaba-SP. 154 p. 1985.

SIMS, D.A.; PEARCY, R. W. Am. Acclimation of shade-developed leaves on saplings exposed to late-season canopy gaps. **J. Bot.**, v.79, p.449. 1992.

SMIRNOFF N, CUMBES QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 28, p.1057-1060, 1989.

SOARES, J. B. **O Caju**: aspectos tecnológicos. Fortaleza: Banco Nordeste Brasil, 1986. 256p. (Monografia, 24).

SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. Glossary of salt science terms. Madison: American Society of Soil Science, 1987. 44p.

STEWART CR, BOGGESS SF. Metabolism of (5-3 H) proline barley leaves and its use in measuring the effect of water stress on proline oxidation. **Plant Physiol**, v. 61, p.654-657, 1978.

STEWART, G.R.; LEE, J.A. The role of proline accumulation in halophytes. **Planta**, v.120, p.279-89, 1974.

SULTANA, N., IKEDA, T., ITOH, R. Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. **Environ. Exp. Bot.**, v.42, p. 211-220. 1999.

SYVERTSEN, J.; LLOYD, J.J. Citrus. In: SCHAFFER, B. ANDERSON, P.C. eds. **Handbook of environmental physiology of fruits crops. V.II: Sub-tropical and tropical crops**. Florida: CRC Press, 1994. v.2. p. 65-99.

SZOKE A. et al. Subcellular localisation of D 1 -pyrroline-5-carboxylatereductase in root, nod-ule and leaf of soybean. **Plant Physiol**, v. 99, p.1642-1649, 1992.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 1st ed. California, The Benjamin/Cumming Publishing Company, California. 1991. 559p.

TALEISNIK, E.; GRUNBERG, K. Ion balance in tomato cultivars differing in salt tolerance. I. Sodium and potassium accumulation and fluxes under moderate salinity. **Physiologia plantarum**, v.92, p.528-534, 1994

TANAKA, Y. et al. Electron flow from NAD(P)H dehydrogenase to Photosystem I is required for adaptation to salt shock in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Plant Cell Physiol.**,v. 38, p.1311-1318.1997.

TERMAT, A.; MUNS, R. Use of concentrated macronutrient solutions to separate osmotic from NaCl-specific effects on plant growth. **Aust.J.Plant Physiol.**, v.13, p.509-522. 1986

TURNER, N.C. Adaptation to water deficits: a changing perspective. **Australian Journal Plant Physiology**, v.13, p.175-190, 1986.

TURNER, N.C. Drought resistance and adaptation to water deficits in crop plants. In: MUSSEL, H.; STAPLES, R. C. (Eds). **Stress Physiology in Crop Plants**. New York: Wiley- Interscience, 1979. p. 343-372.

VÉZINA, L.P.; LANGLOIS, J.R. Tissue and cellular distribution of glutamine synthetase in roots of pea (*Pisum sativum*) seedlings. **Plant Physiol**, v. 90, p. 1129-1133, 1989.

VIÉGAS, R. A. **Dinâmica de fontes de fósforo aplicadas a solos com diferentes valores de pH**. 1990. 85f. Dissertação (Mestrado em solos) Departamento de solos. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.

VIÉGAS, R.A. **Assimilação de nitrogênio e acumulação de solutos em plantas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em resposta ao estresse salino**. 1999. 85f. Tese (Doutorado em Bioquímica Vegetal). Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

VIÉGAS, R.A.; MELO, A.R.B.; SILVEIRA, J.A.G. Nitrate reductase activity and proline accumulation in cashew (*Anacardium occidentale* L.) in response to salt (NaCl) shock. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.1, p. 21-28, 1999.

VU, J.C.V.; YELENOSKY, G. Water deficit and associated changes in some photosynthetic parameters in leaves of 'Valencia' orange (*Citrus sinensis* Osbeck). **Plant Physiology**, v.88, p. 375-378, 1988.

WALKER, R.R., E. Törökfalvy ; W.J.S. Downton. Photosynthetic responses of the citrus varieties Rangpur lime and Etrog citron to salt treatment. **Aust. J. Plant Physiol**, v.9, p.783-790, 1982.

WATAD, A.A.; LERNER, H. R.; REINHOLD, L. Comparison between a stable NaCl selected Nicotiana cell line and the wild type. **Physiol. Veg.**, v.23, p. 887, 1985.

WAISEL, Y. Salt balance of leaves of the mangrove *Avicennia marina*. **Physiol. Plant.**, v. 67. p. 67-72, 1986.

WHITHAN, F. H.; BLAYDES, D. F.; DEVLIN, R. N. **Experiments in Plant Physiology**. New York: D. Van Nostrame Company, 1971. p. 55-58.

WOODS, S.A. **Salinity Tolerance of Turf Grasses** .s.l. Albert Food and Rural Department, 2002. Disponível em: <<http://www.agric.gov.ab.ca/soil/slatturf.html> - 12 k >. Acesso em: 05/03/02.

YEO, A. R. et al.. Short and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). **J. Exp. Bot.**, v.42, n.240, p.881-889, 1991.

YEO, A.R. et al. Ions distribution in salt stressed mature *Zea mays* roots in relation to ultrastructure and retention of sodium. **J.Exp. Bot.**, v. 28, p.17-29, 1993.

YEO, A.R.; FLOWERS, T.J. Varietal differences in the toxicity of sodium ions in rice leaves. **Physiologia Plantarum**, v.59. p.189-96, 1983.

YOSHIBA, Y. et al. Correlation between the induction of a gene for D 1 -pyrroline- 5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. **Plant J.**, v.7, p.751-760. Zhang CZ, Lu Q, Verma DPS (1995) Removal of feedback inhibition. 1995.

ZHANG, C.Z.; LU, Q.; VERMA, D.P.S. Removal of feedback inhibition of D 1 - pyrroline-5-carboxylate synthase a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. **J Biol Chem**, v.270, p. 20491-20496, 1995.

ZHU, B. et al. Overexpression of a pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. **Plant Sci.**, v. 139, p. 41-48, 1998.