

Vania Machado Passos

**Alterações fisiológicas e anatômicas em plântulas de *Annona muricata* L. (graviola) e *Annona squamosa* L. (pinha) submetidas a estresse salino**

**Feira de Santana – Bahia  
2001**



**Universidade Estadual de Feira de Santana  
Departamento de Ciências Biológicas  
Programa de Pós - Graduação em Botânica**

**Alterações fisiológicas e anatômicas em plântulas de  
*Annona muricata* L. (graviola) e *Annona squamosa* L. (pinha)  
submetidas a estresse salino**

**Vania Machado Passos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientadora: PROFA. DRA. ANGELA PIERRE VITÓRIA (UEFS)

FEIRA DE SANTANA – BA  
2001

Passos, Vania Machado

P324 Alterações fisiológicas e anatômicas em plântulas de *Annona muricata* (graviola) L. e *Annona squamosa* L. (pinha) submetidas a estresse salino./

Vania Machado Passos. – Feira de Santana: [s.n.], 2001.

53 p.: il

Orientador: Angela Pierre Vitória

Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, 2001.

1. Graviola- fisiologia e anatomia. 2. Pinha – fisiologia e anatomia. 3. Graviola – estresse salino. 4. Pinha – estresse salino. I: Universidade Estadual de Feira de Santana. II: Título.

CDU: 634.41

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo

---

Profa. Dra. Solange Maria Costa Amorim

---

Profa. Dra. Angela Pierre Vitória  
Orientadora e Presidente da Banca

Feira de Santana - BA  
2001

Dedico a Deus, a meus pais e a todos as pessoas que não mediram esforços em ajudar na realização de mais esta etapa da minha vida.

“ De tudo ficaram três coisas:  
a certeza de que estamos começando,  
a certeza de que é preciso continuar,  
e a certeza de que podemos ser  
interrompidos antes de terminar.  
Fazer da interrupção um caminho novo,  
Da queda um passo de dança,  
Do medo uma escada,  
Do sonho uma ponte,  
Da procura um encontro.  
E assim, terá valido à pena”

(Fernando Sabino)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, a Ele cabe o Louvor e a Glória, te agradeço Senhor, por seres o alicerce da minha vida;

A meu PAI (meu sol) que iluminou e continua a iluminar a minha vida durante toda a minha trajetória acreditando sempre nas minhas conquistas;

A minha MÃE (minha lua) que brilha me vigiando e zelando por mim com carinho e amor sem limites até mesmo nas horas se sono e cansaço;

A minha VÓ, Dagmar, que tanto torceu para que este momento se concretizasse, tenho certeza que você me guiará sempre com a sua força que demonstrou aqui na Terra;

A Chrystian (meu amor), meu espelho que está sempre a me mostrar qualidades e defeitos sem nunca duvidar do meu potencial;

A Angela Pierre que se mostrou muito mais que uma orientadora nos momentos de “diser-tensão”, eu não poderia chegar até aqui sem você;

A Farah e Noeli, pessoas que se fizeram presentes e me ajudaram em todos os momentos do trabalho, minha gratidão e o desejo de que sejam muito felizes nesta nova trajetória profissional;

A Bárbara Rosemar, que com muita disponibilidade com seus finos tratos anatômicos, me revelou maravilhas em seus cortes;

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes pela ajuda científica no desenvolvimento do trabalho com a sua grande competência profissional;

A Ciro Righi pelo auxílio no Excel, minhas desculpas por não oferecer-lhe o tão “sonhado churrasco” ;

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis dos Santos pelo empréstimo do laboratório de Anatomia Vegetal;

A Adriana Estrêla, secretária do curso de pós-graduação pela eficiente ajuda nos momentos de “pressa”;

A Ana Maria Giulietti por me mostrar, na Botânica, um caminho muito mais coberto de flores que espinhos;

Ao “amigo-carecão” Paulino, pela disponibilidade em ajudar com as gravações em CDs nas horas mais ocupadas do seu dia;

A toda a galera do Herbário e do LATAX (Lea, Dani, Pat, Indi, Elaine, Kelly, Téo, Zezé, Cosme, Flávio...) pelo incentivo e amizade ... estarei sempre com vocês ;

A todos os colegas do curso de pós-graduação, em especial Ana Cláudia, Alone, Tatiana e kátia, “ não se percam de mim não se esqueçam de mim não desapareçam ”;

A toda a equipe do Horto Florestal, em especial aos funcionários, pelo apoio e disponibilidade para os trabalhos técnicos;

A todos os professores que passaram deixando um pouco das experiências e incentivos para que todos nós continuássemos a prosseguir;

Enfim a todos a aqueles que direta ou indiretamente torceram para que este desejo se tornasse realidade, esta conquista é NOSSA !



## SUMÁRIO

### AGRADECIMENTOS

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	8
MATERIAL E MÉTODOS	9
1- Material Vegetal	9
2- Locais de experimentação	9
3- Teste de germinação	9
4- Condições de cultivo	10
4-1- Tratamentos de estresse salino	12
5- Determinação das medidas de crescimento	12
5.1- Parte aérea	12
5.2- Comprimento da raiz	12
5.3- Peso fresco	12
5.4- Peso seco	12
5.5- Área foliar	13
6- Determinação da abertura estomática	13
7- Determinação das concentrações de Na <sup>+</sup> e Cl <sup>-</sup> nos tecidos	13
8- Análises qualitativas de aminoácidos	14
9- Análises anatômicas	15
9.1- Microscopia óptica	14
9.2- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
1- Análises em plântulas	17
CONCLUSÕES	40

RESUMO	41
ABSTRACTS	42
REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS	45

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- (A) Sistema hidropônico montado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana; (B) Vaso da hidroponia mostrando a aeração fornecida pela bomba de aquário.....10

Figura 2- Determinação do peso fresco (g) em plântulas de *Annona squamosa* (A) e *Annona muricata* (B) com 2 semanas de idade submetidas a diferentes tratamentos salinos (0, 3, 100, 300 e 500 mM) por 1, 2 e 3 dias e *Annona squamosa* e *Annona muricata* (D) com 2 meses de idade submetidas à diferentes tratamentos salinos (0, 100 e 300 mM) por 1, 2, 3 e 7 dias.....18

Figura 3- Determinação do comprimento da parte aérea (cm) em plântulas de *Annona squamosa* (A) e *Annona muricata* (B) com 2 semanas de idade submetidas a diferentes tratamentos salinos (0, 3, 100, 300 e 500 mM) por 1, 2 e 3 dias e *Annona squamosa* e *Annona muricata* (D) com 2 meses de idade submetidas à diferentes tratamentos salinos (0, 100 e 300 mM) por 1, 2, 3 e 7 dias.....20

Figura 4- Determinação do comprimento da raiz (cm) em plântulas de *Annona squamosa* (A) e *Annona muricata* (B) com 2 semanas de idade submetidas a diferentes tratamentos salinos (0, 3, 100, 300 e 500 mM) por 1, 2 e 3 dias e *Annona squamosa* e *Annona muricata* (D) com 2 meses de idade submetidas à diferentes tratamentos salinos (0, 100 e 300 mM) por 1, 2, 3 e 7 dias.....22

Figura 5- Determinação do peso seco (g) de *Annona squamosa* (A) e *Annona muricata* (B) com 2 meses de idade submetidas à diferentes tratamentos salinos (0, 100 e 300 mM) por 7 dias.....23

Figura 6- Determinação da área foliar (cm<sup>2</sup>) de *Annona squamosa* (A) e *Annona muricata* (B) com 2 meses de idade submetidas à diferentes tratamentos salinos (0, 100 e 300 mM) por 7 dias.....23

Figura 7- Porcentagem de estômatos abertos entre 9:00 e 17:00 horas em plântulas com 2 meses de idade de *Annona muricata* (A) e *Annona squamosa* (B) em controle, estufa, controle hidroponia e 100 mM de NaCl por 7 dias.....25

Figura 8- Cultivo hidropônico de *Annona* (A) *Annona squamosa* – esquerda (controle) e direita (tratamento de 100 mM por 7 dias) (B) *Annona muricata* esquerda (controle) direita (tratamento de 100 mM por 7 dias) .....27

Figura 9- Microscopia Eletrônica de Varredura em *Annona squamosa* (A) Controle sem tricomas (aumento 50 X); (B) Epiderme do controle com células túrgidas e

estômatos abertos (aumento 200X); (C) Epiderme do tratamento com 100 mM de NaCl mostrando células murchas e estômatos fechados (aumento 200X).....30

Figura 10- Microscopia Eletrônica de Varredura em *Annona muricata* (A) Epiderme do controle evidenciando tricomas (aumento 50X); (B) Epiderme do controle com células túrgidas e estômatos fechados (aumento 500X); (C) detalhe do estômato fechado (aumento 2000X); (D) Epiderme do tratamento 100 mM de NaCl mostrando células murchas (aumento 200X); (E) Epiderme do tratamento de 100 mM de NaCl mostrando estômatos fechados (aumento 1000X).....31

Figura 11- Corte transversal. de folhas de *Annona squamosa* coradas com azul de toluidina a 0,5%. Controle (A e B) aumento 40X; tratamento de 100 mM de NaCl (C) aumento de 40X. (Setas indicam cloroplastos).....32

Figura 12- Corte transversal. de folhas de *Annona muricata* coradas com azul de toluidina a 0,5%. Controle (A) aumento 40X; tratamento de 100 mM de NaCl (B e C) aumento de 40X. (Setas indicam cloroplastos).....34

Figura 13- Determinação da quantidade de cloro (mg/kg) em raízes, folhas novas e adultas de *Annona squamosa* (A) e *Annona muricata* (B) e de sódio em raízes, folhas novas e adultas de *Annona squamosa* (C) e *Annona muricata* (D). .....35

Figura 14A - Cromatografia em sílica gel em folhas de *Annona squamosa* submetidas a 7 dias tratamento salino (1-controle; 2- 3 mM; 3- 100 mM; 4- 300 mM; 5 -500 mM de NaCl) .....38

Figura 14B- Cromatografia em sílica gel em raízes de *Annona squamosa* submetidas a 7 dias a tratamento salino (1-controle; 2- 3 mM; 3- 100 mM; 4- 300 mM; 5 -500 mM de NaCl) .....38

Figura 15A- Cromatografia em sílica gel em folhas de *Annona muricata* submetidas a 7 dias a tratamento salino (1-controle; 2- 3 mM; 3- 100 mM; 4- 300 mM; 5 -500 mM de NaCl) .....39

Figura 15B- Cromatografia em sílica gel em raízes de *Annona muricata* submetidas a 7 dias a tratamento salino (1-controle; 2- 3 mM; 3- 100 mM; 4- 300 mM; 5 -500 mM de NaCl) .....39

## LISTA DE TABELA

Tabela 1- Descrição dos componentes e das proporções (micro, macronutrientes e solução de Ferro) utilizados para o preparo da solução de Hoagland e Arnon (1952).....	11
---	----

## Introdução

A família Annonaceae compreende aproximadamente 128 gêneros e 2300 espécies (Judd, 1999). Esta família apresenta centros de distribuição na região Amazônica e Guianas e a sua origem se deu principalmente na América Central, Brasil e Índia.

As Annonaceae tem flores de tamanhos diversos e as cores variam de esbranquiçadas, creme amareladas, esverdeadas até a cor vinho. Vegetativamente a família pode ser reconhecida pelo odor forte do tronco ou dos ramos (Rizzini, 1994). São plantas caracterizadas pelo hábito arbóreo, ou muitas vezes pela presença de arvoretas, raramente na forma de lianas.

Os principais gêneros representantes são Guatteria, Uvaria, Annona, Polyalthia, Artabotrhyus e Rollinia. (Judd, 1999). O gênero *Annona* compreende mais de 120 espécies. Algumas delas são originárias do trópico, de regiões equatoriais, do continente americano e ilhas Caribenhas. (Bridg et al., 1994). Se caracterizam por produzirem frutos compostos ou sincarpas fecundados conjuntamente sendo a *Annona muricata* L. e a *Annona squamosa* L. as espécies mais importantes entre as árvores frutíferas (Pinto e Silva, 1995).

A pinha (*Annona squamosa* L.) é uma das principais espécies de *Annona* cultivada nas regiões tropicais (Morton, 1987). É uma planta cuja distribuição ocorre nos trópicos, originária provavelmente das Antilhas e regiões vizinhas (Simão, 1972; Silva e Lopes, 1985; Leon, 1987). Se caracteriza como uma árvore média de até 8 m de altura, com flores opostas às folhas, fruto carnoso composto, globoso até 12 cm de diâmetro, polpa branco-amarelada saborosa, o que desperta interesse comercial da fruta.

A adaptação desta espécie às regiões semi-áridas tornou-se uma importante alternativa agroeconômica e alimentar, especialmente para a região Nordeste do Brasil. Em razão destas vantagens o cultivo da pinha vem se expandindo particularmente nos estados da Bahia e Alagoas.

A graviola (*Annona muricata* L.) tem hábito de crescimento ereto e alto o que resulta em plantas de alto porte. Tem uma altura média de cerca de 4 a 8 metros, flores hermafroditas, de cor verde escuro quando em crescimento e verde-claro quando próximas a ântese, o fruto é uma baga composta ou sincarpo ovóide ou elipisóide, polpa branca muito apreciada comercialmente. A crescente demanda e interesse pela graviola justificam a sua inclusão entre as frutas tropicais brasileiras de excelente valor comercial para consumidores e indústrias de sucos. (Pinto e Silva, 1995).

A graviola é uma fruteira utilizada tanto para consumo in natura de seu fruto como para a industrialização de sua polpa sob forma de sucos. Seus maiores produtores no Brasil se encontram nas regiões Nordeste e Norte. Problemas de manejo adequado tem diminuído sua expansão (Calzavara e Müller, 1987). Ambas espécies são tropicais e se desenvolvem em climas variando de 21°C a 30°C.

Plantas crescidas em regiões costeiras e semi-áridas podem estar expostas a condições salinas (Maas, 1994). Nos habitats salinos, o vigor das plantas depende da concentração e da composição da solução química do solo. Nas regiões úmidas os solos salinos contêm predominantemente NaCl (Larcher, 1986). Em arroz, geralmente os efeitos salinos são mais severos nas plantas cultivadas nas regiões áridas do que nas úmidas (Asch et al., 1999).

Nas regiões secas (árido e semi-árido), como o sertão da Bahia, os poços artesianos propiciam a retirada de água salobra das camadas mais profundas do solo, submetendo as plantas que lá se desenvolvem a condições de estresse salino.

Estresse é uma condição adversa ou influência que tende a inibir o sistema de funcionamento normal do organismo vivo. As plantas podem responder ao estresse de várias maneiras: escapando dos efeitos de estresse para completar seu crescimento durante períodos mais favoráveis, sofrendo injúrias que podem ser letais ou não ou desenvolvendo mecanismos que possibilitem sua sobrevivência em condição estressante como ajustamento osmótico, alterações anatômicas, de crescimento e em sistemas antioxidantes. (Azevedo et al., 1998; Del Cura et al., 1996)

A salinidade afeta vários processos ao longo do ciclo da planta, como a germinação (um dos estádios mais críticos do ciclo), crescimento (intensamente influenciado pela presença de sal), florescimento e produção de sementes (Sibole et al. , 1998). O efeito da salinidade no crescimento da planta depende em parte de fatores que afetam a aquisição do carbono (Yeo, 1983).

No caso de estresse salino ocorre um excesso de íons, particularmente o  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  podendo haver efeitos específicos de toxicidade de cada elemento. Outra forma de estresse que pode prejudicar o desenvolvimento da planta em consequência da alta concentração de sal é a diminuição do potencial hídrico gerado em função da presença do NaCl (o que se constitui em uma seca fisiológica) dificultando a absorção de água e sais minerais.

O excesso de  $\text{Na}^+$  pode causar danos na integridade da membrana, nos processos de fosforilação, inibir enzimas ou causar uma disfunção metabólica. A redução de assimilação do carbono ocorre em função da combinação na redução de fotossíntese e do aumento da respiração.  $\text{Na}^+$  entra na célula da raiz movendo-se contra um gradiente de concentração. A concentração interna é mantida baixa com o auxílio de uma bomba de sódio que expulsa o sódio ativamente. (Hopkins, 1995).

Vários estudos vêm sendo realizados com o intuito de compreender os mecanismos através dos quais a salinidade afeta o metabolismo vegetal, reduzindo o crescimento e o desenvolvimento. Barbosa e colaboradores (Barbosa et al., 2001) estudando plântulas de feijão de corda cv. Pitiúba, realizaram as determinações de comprimento, matéria fresca e seca nas raízes das plântulas nos diferentes estádios fisiológicos em condições controle e em tratamento salino (NaCl 0,1M). Observou-se que as plântulas submetidas ao estresse salino levaram 5 dias a mais para atingir o estágio de desenvolvimento fisiológico que as plântulas controle, sugerindo que a salinidade retarda o crescimento e o desenvolvimento desta leguminosa.

Nas plantas, a salinidade pode induzir alterações no metabolismo de proteínas e ácidos nucléicos principalmente por interferir na absorção de N, fotossíntese, respiração, etc (Cheeseman, 1988; Corpas et al., 1993). A fotossíntese é geralmente



diminuída em plantas expostas a salinidade e pode declinar conforme aumenta o tempo de exposição ao sal (Munns e Termaat, 1986).

A absorção de nitrogênio também fica comprometida nas plantas intoxicadas (Botella et al., 1994). Estes autores verificaram um efeito inibitório do  $\text{Cl}^-$  na absorção de  $\text{NO}_3^-$  e citam que, em solos salinos, a adição de ambas as formas de N ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ) pode ser benéfica para a planta.

Larcher (1986) também cita que no caso do estresse salino, a produção de matéria seca e a taxa de crescimento declinam, prejudicando, especialmente, o crescimento das raízes. Bernstein et al. (1993) verificaram que em sorgo, elevadas concentrações de NaCl no meio de cultivo afetavam também a zona de crescimento da folha, reduzindo assim a expansão foliar.

Plântulas de *Annona muricata* e *Annona cherimola* submetidas a estresse salino de 30mM e 60 mM não apresentaram diferença significativa na produção de matéria seca da parte aérea em *A. muricata*. Porém, *A. cherimola*, apresentou queda em torno de 40%. (Ebert, 1998)

Em milho, a alta salinidade do solo reduz o número de folhas (Shannon et al., 1994) e em plântulas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) a salinidade reduz o número de folhas, o diâmetro do caule, peso e a área foliar (Patil et al., 1984).

Também em goiabeira submetida a diferentes concentrações e tipos de sais, Desai e Sing (1980) e Ferreira (1998) obtiveram resultados de redução de matéria seca. O efeito do cloreto de sódio na redução das variáveis estudadas foi mais expressivo aos 50 dias após o início do estresse. Durante todo o tempo de exposição todas as variáveis estudadas sofreram uma redução progressiva em função do aumento da salinidade, sendo a variável menos afetada o número de folhas na planta que decresceu a partir de 120 mM de NaCl. Em todas as épocas de avaliação a área foliar/planta foi o componente mais severamente atingido.

Além da diminuição do valor real dos parâmetros de crescimento, a abertura estomática geralmente também é diminuída em plantas estressadas. O controle da abertura estomática é um fator importantíssimo para possibilitar às plantas sobreviver em condições de estresse hídrico.

Em trabalho recente (Erdei et al., 1998) sugerem uma conexão entre o agente estressor (sal) e o ritmo biológico da planta. As observações feitas por estes autores quanto a atividade de enzimas antioxidantes e resistência estomática, indicam que o estresse salino poderia modificar e dessincronizar as oscilações bioquímicas e fisiológicas. Um exemplo é a regulação da abertura estomática que se dá, entre outros fatores, devido a existência de ritmos circadianos. Esse ritmo é imposto à planta pela alternância regular do dia e da noite e desaparece gradualmente se as plantas forem mantidas continuamente à luz ou no escuro. Na maioria das plantas os estômatos se abrem rapidamente depois do nascer do sol, se fecham temporariamente por volta do meio dia e se abrem novamente à tarde (Sutcliffe, 1980).

Algumas espécies minimizam a perda de água mediante maior sensibilidade estomática enquanto outras são capazes de permanecer fotossintetizando, mesmo quando ocorre uma redução no seu conteúdo hídrico (Levitt, 1972).

Távora (Távora et al., 2001) realizaram um experimento com plântulas de graviola cultivadas em hidroponia que após 30 dias receberam os tratamentos de 0, 30, 60, 90, 120 e 150 mM de NaCl, e observaram que a faixa de tolerância da graviola ao estresse salino situou-se entre 120 mM e 150 mM de NaCl. Os autores observaram que o aumento da salinidade determinou uma diminuição na produção da matéria seca total. A raiz e a parte aérea se comportaram de forma semelhante fazendo com que a relação entre si não se alterasse muito aos 30 dias após o início do estresse. A altura da planta, número de folhas, área foliar/planta e área foliar unitária foram reduzidas em função do estresse, sendo as duas últimas as variáveis mais afetadas. Eles verificaram também que a condutância estomática e a transpiração decresceram com o aumento da salinidade.

Muitas plantas respondem ao estresse hídrico e salino diminuindo o seu potencial osmótico em função do acúmulo de solutos. Este processo é conhecido como ajustamento osmótico. Os solutos incluem íons inorgânicos, açúcares e aminoácidos livres. Um aminoácido que parece ter sua produção alterada com o estresse é a prolina (Lutts et al., 1999), um aminoácido com grupo R não-polar (Lehninger, 1995).

O aumento deste aminoácido em organismos submetidos à estresse hídrico e salino é amplamente divulgado. As alterações metabólicas promovidas pela presença do sal ou ausência de água podem causar alteração na atividade fisiológica e metabólica tanto em calos quanto em plantas (Beer et al., 1975; Kalir et al., 1984; Piqueras et al., 1996).

Em cultura de calos de limão tolerantes a sal (*Citrus limon*) a quantidade de prolina e açúcares totais, principalmente sacarose, aumentaram significativamente quando em comparação com o controle (Piqueras et al., 1996).

Viégas e colaboradores (Viégas et al., 1999) verificaram que plantas de cajueiro crescidas em solução nutritiva com 100 mM de NaCl exibiram um aumento significativo e crescente nas concentrações de prolina e aminoácidos livres nas folhas após 8 dias de tratamento.

Um outro experimento com o gênero *Melaleuca* na Austrália, levaram Naidu e colaboradores (Naidu et al., 2000) a conclusão de que as espécies que acumularam prolina são plantas adaptadas a solos salinos sugerindo-se que isto ocorra devido ao efeito osmoprotetor da prolina. A acumulação de osmoprotetores é um fenômeno crucial na adaptação de plantas a salinidade (Aspinall e Paleg, 1981; Wyn Jones e Storey 1981; Hanson et al., 1994).

Além de alterações na composição de aminoácidos, a salinidade afeta também a anatomia das plântulas submetidas a este tipo de estresse. Segundo Morretes (1969) o efeito dos fatores água, luz e temperatura sobre a estrutura morfológica e anatômica dos órgãos vegetais, (especialmente das folhas) vem sendo estudados isoladamente por vários pesquisadores. Provavelmente a folha seja o órgão das angiospermas que mais facilmente apresenta alterações anatômicas ocasionadas pelo estresse, sem excluir porém, a possibilidade de raízes e caules também sofrerem os efeitos do ambiente em que se desenvolvem.

Bocher e Lyshede (1968) Apud Metcalf e Chalk (1979) evidenciaram que a anatomia ecológica fornece um retrato parcial de vários caminhos pelos quais as plantas podem se adaptar em seu respectivo ambiente ou a um novo fator.

Degano, 1999 observando plantas em cultura hidropônica de *Tessaria absinthioides* (Hook. Et Arn.) DC. Por 60 dias de tratamento, obteve como respostas

anatômicas desta espécie a salinidade (NaCl) um parenquima paliçádico com células delgadas nos tratamentos com relação ao controle, ou seja, ela se mostra menos desenvolvido em condições de salinidade.

Um outro estudo para avaliar os efeitos da salinidade na estrutura anatômica do trigo (*Triticum aestivum* L. cv. Kanchan) revelou a salinidade tornou os elementos do metaxilema e do protoxilema desorganizados e deformados enquanto em plântulas não tratadas, os mesmos eram esféricos e organizados. Devido a salinidade houve também uma redução no tamanho das células do córtex e nos elementos vasculares. (Rashid, et al., 2001)

Mudanças anatômicas de epidermes da folha de plantas de tomate submetidos ao estresse hídrico no estágio de pré-floração foi estudado por Sam e colaboradores (Sam, et al., 2000). Após 20 dias de germinada as plântulas foram submetidas aos tratamentos e foi observado que o déficit da água teve pouco efeito no número dos tricomas, no comprimento e na largura das células epidérmicas e no comprimento dos estômatos, mas diminuiu a densidade estomatal na superfície adaxial.

Além da diversidade de respostas em função do estágio de desenvolvimento da planta ou do tipo de cultivo, o grau de inibição por condições salinas varia grandemente entre as espécies, assim como os mecanismos envolvidos na inibição do crescimento (Gale, 1975).

No caso das Annonaceae, o estudo destes mecanismos já foram realizados sobre alguns aspectos para *A. squamosa* e *A. senegalensis*. O estresse salino em *A. squamosa* promoveu alterações nas trocas gasosas, fluorescência de clorofilas, relações hídricas e absorção de nutrientes e em *Annona senegalensis* houveram respostas negativas de crescimento em função da salinidade (Marler e Zozor, 1996).

De forma geral, muitos estudos ainda são necessários para identificar os vários mecanismos fisiológicos afetados pela salinidade e tentar determinar em qual momento estes mecanismos são susceptíveis (Sibole et al., 1998).

## OBJETIVOS

- Objetivos gerais:

Determinação das alterações anatômicas, metabólicas, de crescimento e desenvolvimento de plântulas de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. submetidas a estresse salino.

- Objetivos específicos:

1-Definir qual das duas espécies se desenvolve melhor nas condições salinas;

2-Determinar quais as concentrações de NaCl são toleradas pelas espécies estudadas ;

3- Analisar as alterações que a salinidade promove na abertura estomática de plântulas de *Annona muricata* e *Annona squamosa* submetidas a diferentes concentrações salinas;

4- Analisar por microscopia óptica e eletrônica de varredura quais as alterações anatômicas (folha), de plântulas submetidas ao NaCl;

5- Analisar as alterações no crescimento (radicular, parte aérea, área foliar, peso fresco e peso seco) das espécies estudadas;

6- Verificar quais são as alterações metabólicas (aminoácidos) das plântulas submetidas ao estresse salino e relacioná-la as diferentes concentrações de NaCl;

7- Determinar as concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  absorvidas e translocadas pela planta.

## **Materiais e métodos**

### 1-Material vegetal

O material vegetal foi constituído por sementes e plântulas das espécies *Annona squamosa* L. (pinha) e *Annona muricata* L. (graviola) da família *Annonaceae* e sementes de alface (*Lactuca sativa*).

### 2-Locais de experimentação

Os testes de germinação, cultivo das plântulas em hidroponia, processamento do material vegetal, análises de crescimento e análises cromatográficas foram desenvolvidos na Unidade Experimental Horto Florestal – UEFS. Todas as análises de microscopia óptica foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Estadual de Feira de Santana. As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizados no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) na ESALQ-USP. As dosagens de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> foram feitas no Laboratório de Solos do Departamento de Nutrição Mineral da ESALQ/USP.

### 3- Teste de germinação

Foi realizado um teste para determinar a possível presença de inibidores de germinação nas sementes de pinha e graviola. As sementes foram homogeneizadas em água destilada e peneiradas. O extrato foi utilizado para verificar a presença de inibidores de germinação. Lotes de 50 sementes de alface (*Lactuca sativa*) foram colocados para germinar em placas de Petri com papel de germinação na presença do extrato de pinha e de graviola separadamente (tratamentos) e de água destilada (controle).

### 4- Condições de cultivo

Plântulas de pinha e graviola foram cultivadas em sacos com terra em dois lotes com idades diferentes (duas semanas e dois meses). Após estes períodos as plântulas foram colocadas em sistema hidropônico com solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1952) aerada com bombas de aquário (Figura 1). As condições de cultivo foram controladas: umidade relativa (38%), temperatura (20/26°C) e fotoperíodo de 12 horas.

Para o preparo da solução de macronutrientes (solução estoque dez vezes concentrada), cada sal foi dissolvido separadamente em água destilada e posteriormente misturados nesta ordem:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  para que se evitasse a precipitação do Ca formando  $\text{CaSO}_4$ . A solução foi colocada em garrafão plástico e acondicionado em lugar escuro para evitar a formação de fungos.



Figura 1- (A) Sistema hidropônico montado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana; (B) Vaso da hidroponia mostrando a aerção fornecida pela bomba de aquário.

Os micronutrientes foram dissolvidos na sequência descrita na Tabela 1 e estocados em garrafa escura na geladeira.



A solução de Fe-EDTA foi preparada dissolvendo-se inicialmente o EDTA e o NaOH em aproximadamente 800ml de água destilada e acrescentando-se lentamente o  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . O volume final foi completado até 1000 ml e a solução acondicionada em garrafa escura fora da geladeira (para evitar a precipitação do ferro).

Para cada litro de solução estoque (dez vezes concentrada) de macronutriente foi adicionado 1 ml de solução de micronutriente (solução estoque). A solução utilizada para a hidroponia foi a solução estoque de macronutrientes e micronutrientes dez vezes diluída e acrescida de Ferro na proporção de 1 ml por litro de solução diluída (somente na hora do uso). O pH da solução final foi ajustado para 5,5. Foram utilizados 1,5 litros de solução nutritiva por vaso. Cada tratamento foi conduzido em 3 vasos com 1.5 litros de solução nutritiva acrescido de diferentes concentrações de NaCl.

**Tabela 1. Descrição dos componentes e das proporções (micro, macronutrientes e solução de Ferro) utilizados para o preparo da solução de Hoagland e Arnon (1952).**

<b>Macronutrientes</b>	<b>Peso Molecular</b>	<b>Peso utilizado</b>
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236	354 g/30L
$\text{KNO}_3$	101	151,5 g/30L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136	40,8 g/30L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,48	147,6 g/30L
<b>Micronutrientes</b>		
$\text{H}_3\text{BO}_3$	61,83	7,15 g/200ml
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	197,91	4,52 g/200ml
$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	287,34	0,55 g/200ml
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249,68	0,20 g/200ml
$\text{H}_2\text{MnO}_4$ ou $\text{NaMoO}_4$	241,95	0,225 g/200ml
<b>Fé+EDTA</b>		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278,03	25 g/1000ml
NaOH	40	3,65 g/1000ml
EDTA	372,24	33,2 g/1000ml

#### 4.1- Tratamentos de estresse salino

Lotes de plântulas das espécies de Annonaceae ainda não expostas a NaCl foram pesadas e o crescimento radicular aferido. As plântulas que apresentaram uniformidade no comprimento radicular e no peso foram selecionadas para este experimento. Como parâmetro para determinação das concentrações tóxicas de NaCl foi utilizada a diminuição do peso fresco. As plântulas do lote com 2 semanas de idade foram submetidas às diferentes concentrações de NaCl (500 mM, 300 mM, 100 mM, 3 mM e controle) por 1, 2 e 3 dias. O lote com 2 meses de idade foram submetidas às diferentes concentrações de NaCl (300 mM, 100 mM e controle) por 1, 2, 3 e 7 dias. Nestes períodos foram feitas aferições das medidas de crescimento como segue abaixo.

#### 5- Determinação das medidas de crescimento

##### 5.1 Parte aérea

A altura da parte aérea foi determinada com auxílio de régua milimetrada. Para a determinação da altura foi feita a medição desde a base até o ponto mais extremo do caule. Os resultados são expressos em centímetros/dias.

##### 5.2 Comprimento da raiz

O comprimento da raiz foi medido utilizando-se uma régua milimetrada. A medida foi feita da ponta mais extrema da raiz até a base do caule (início do sistema radicular). Os resultados são expressos em centímetros/dias.

##### 5.3 Peso fresco

O peso fresco total das plântulas controle e dos diferentes tratamentos foram determinados em balança MARTE modelo AS 2000. Os resultados são expressos em gramas/dias.

##### 5.4 Peso Seco

O peso seco total das plântulas controle e dos diferentes tratamentos foram determinados em balança analítica BOSCH modelo S 2000 após a secagem por 3 dias do material vegetal em estufa a 60°C com ventilação forçada. Os resultados são expressos em gramas/dias.

#### 5.5 Área foliar

A área foliar foi determinada pela separação de dez discos (com diâmetro conhecido) de folhas completamente estendidas. Os dez discos e todas as folhas da planta foram secos nas mesmas condições do item 5.4. A partir dos valores de peso seco dos discos (cuja somatória da área foliar era conhecida) foi determinada a área foliar total da plântula. Os resultados são expressos em centímetros quadrados/dias.

#### 6- Determinação da abertura estomática

Para determinação da abertura estomática, plântulas com dois meses de idade de ambas as espécies foram cultivadas em terra e transferidas para o sistema hidropônico com solução nutritiva como já descrito na item 4. O tratamento utilizado foi de 100 mM de NaCl por 3 dias e controle. Na face abaxial de cada tratamento foram passadas duas camadas de esmalte incolor e as folhas retiradas. Depois de seca foi retirada a película de esmalte e esta foi levada ao microscópio óptico para determinação da abertura dos estômatos. O procedimento foi repetido das 9:00 às 17:00 horas com intervalos de 1 hora.

A determinação da abertura estomática foi feita para os tratamentos contando-se 50 estômatos por horário de tratamento. Os resultados são expressos em percentagem de estômatos abertos/ hora.

#### 7- Determinação da concentração de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> nos tecidos

Para estas análises foram utilizadas plântulas com 2 meses de idade. Foram coletadas separadamente raízes e folhas (folhas novas e folhas velhas) de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. de tratamentos controle e 100 mM de NaCl. O tempo de exposição ao NaCl em hidroponia foi de 7 dias.

Após a coleta, folhas e raízes foram lavadas várias vezes em água destilada (seis recipientes distintos), para que não permanecesse  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  aderido à parede externa do tecido. Em seguida, o material foi seco e acondicionado em sacos de papel pardo e submetidos a secagem ( $60^\circ\text{C}$ ) por 4 dias.

O material seco foi macerado e acondicionado em “eppendorfs”. Posteriormente o material foi transportado para o laboratório de solos da ESALQ-USP, onde foram dosados os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . O  $\text{Na}^+$  foi medido pelo método de digestão nítrica perclórica e a determinação da dosagem de  $\text{Cl}^-$  foi feita pelo método de titulometria de nitrato de prata.

Os resultados foram expressos em quantidade de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (mg/Kg matéria seca).

#### 8- Análises qualitativas de aminoácidos

As análises qualitativas de aminoácidos foram feitas em plântulas de *Annona squamosa* L. e *Annona muricata* L. submetidas ou não (controle) às concentrações de 3, 100, 300 e 500 mM de NaCl após 3 dias. As plântulas tiveram suas raízes e parte aérea separadas e ambos os tecidos congelados em nitrogênio líquido e mantido em Freezer à  $-20^\circ\text{C}$  até o momento da análise.

A extração de aminoácidos foi feita com o material vegetal (anteriormente congelado) colocado em almofariz de porcelana. O material vegetal foi macerado com água destilada e o sobrenadante das extrações (amostras) foram colocados em “eppendorfs” e mantidos congelados até o momento da cromatografia.

Para a cromatografia foram utilizadas placas de sílica gel sobre poliéster de 20 x 20 cm (Sigma Aldrich).

Antes da aplicação das amostras as placas foram ativadas a  $60^\circ\text{C}$  por 120 minutos em estufa. As amostras foram aplicadas em alíquotas de  $60\mu\text{l}$  nas placas de cromatografia com o auxílio de uma pipeta automática.

Foi feita uma placa padrão com os seguintes aminoácidos (Sigma): alanina, serina, prolina, arginina, glicina, leucina, asparagina, treonina, cisteína, glutamina, histidina, lisina e glutamina.

As placas foram colocadas em cuba cromatográfica contendo como solvente álcool butílico, acetona, hidróxido de amônio e água destilada (50:50:25:10). A cromatografia foi finalizada quando faltavam 3 cm para o solvente chegar ao final da parte superior da placa e permaneceram secando em capela de exaustão por 12 horas. Os cromatogramas foram revelados com uma solução de 0,2% de ninidrina em acetona(P.A.).

A partir de comparação entre as placas das amostras e dos padrões de aminoácidos pode-se determinar quais os aminoácidos presentes nos extratos.

## 9- Análises anatômicas

### 9.1- Microscopia óptica

Plântulas de *Annona squamosa* L. e *Annona muricata* L. com duas semanas de idade foram submetidas à concentração de 100 mM de NaCl e controle por um período de 7 dias. Folhas novas e raízes foram coletadas e destinadas às análises anatômicas. O material vegetal foi fixado em álcool a 70% e cortado transversalmente à mão livre com lâmina de barbear Para a folha foi utilizada a região do limbo incluindo a nervura principal e pecíolo.

O material foi descolorido em hipoclorito de sódio a 50% e o corante usado foi o metacromático azul de toluidina (0,5%) onde submeteu-se o corte a três banhos rápidos e sucessivos de :

- 1- água destilada;
- 2- azul de toluidina;
- 3- água destilada.

Em seguida o material foi fixado com glicerina a 50% e lutado com esmalte.

Os testes para detecção de amido foram feitos com coloração utilizando lugol e para identificação de gotas lipídicas foi utilizado o Sudan IV (Kraus e Arduin, 1997).

### 9.2- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a observação em MEV foram utilizadas plântulas com duas semanas de idade de *Annona squamosa* L. e *Annona muricata* L. submetidas aos tratamentos salinos de 100 mM e controle por 7 dias.

Folhas novas foram coletadas às 10:00 h da manhã e fixadas em álcool 70%. O material foi levado ao NAP/NEPA (ESALQ/USP). Para o preparo das amostras, o material foi submetido a reidratação em banhos sucessivos de 10 minutos em concentrações decrescentes de álcool (60, 50, 40, 30, 20, 10 e 0 %).

Após a reidratação foi feita a fixação de folhas em fixador Karnovsky modificado-Glutaraldeído 2,5%, Formaldeído 2,5 % em Tampão Cacodilato de Sódio 0,05 M, pH 7,2. Este fixador combina a rapidez com que o formol penetra matando rapidamente a célula com a capacidade do glutaraldeído em preservar a estrutura da célula. Deste modo, são formadas pontes entre as moléculas graças aos dois grupamentos aldeídicos nas extremidades do glutaraldeído, criando assim uma trama tridimensional. O material permaneceu neste fixador por 1 dia em geladeira.

A pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) lavando-se a amostra pré-fixada em aldeído com 3 passagens de cerca de 10 minutos em tampão Cacodilato 0,05 M pH 7,2 e imersão em uma solução de ( $\text{OsO}_4$ ) 1% em Tampão Cacodilato 0,05 M pH 7,2 por uma hora à temperatura ambiente em uma capela. O  $\text{OsO}_4$  ou ácido ósmico, funciona como fixador graças aos oito grupamentos ativos que possui, os quais ao reagir com proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídios resultam em uma trama tridimensional estabilizando a estrutura da célula. Além disso, na MEV, o  $\text{OsO}_4$  funciona com emissor de elétrons secundários, melhorando a qualidade da imagem gerada.

Após a pós-fixação com  $\text{OsO}_4$ , a mostra fixada foi lavada com água destilada rapidamente por 3 vezes e a seguir passada em soluções de concentração crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) permanecendo cerca de 10 minutos em cada uma. Na solução a 100% foi feita passagem do material por 3 vezes de 10 minutos. Feito o processo de desidratação, as amostras foram secas em ponto crítico com  $\text{CO}_2$ .

O material biológico foi acondicionado em “stubs” (suporte próprio para observação em MEV) e em seguida recebeu uma cobertura de ouro de cerca de 100-200 Å por um processo conhecido com “sputtering”.

Após este preparo as amostras foram visualizadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura modelo DSM 940 A da Zeiss. As imagens foram digitalizadas em disquete e impressas em papel Glossy.

## Resultados e discussão

Os testes germinativos das sementes de *Annona muricata* e *Annona squamosa* não evidenciaram a presença de inibidor de germinação uma vez que não houve diferença entre a porcentagem de germinação de sementes de alface tratadas com água e com extrato de sementes.

O peso fresco (g) foi um dos parâmetros de crescimento mais afetado nas duas espécies quando submetidas as concentrações de NaCl (Fig.2). Verificou-se uma diminuição do peso fresco das plântulas principalmente nos tratamentos em períodos mais prolongados de exposição ao NaCl.

Uma diferença observada entre os dois lotes de plântulas (com 2 meses e 2 semanas de idade) foi que as plântulas mais jovens apresentaram maior perda de peso fresco que as plântulas de 2 meses. No experimento utilizando-se plântulas com 2 semanas de idade (Fig. 2A e 2B) houve uma diminuição do peso fresco em plântulas de pinha muito mais acentuada que em plântulas de graviola. Em concentrações maiores que 300 mM de NaCl as plântulas de pinha foram afetadas com a salinidade reduzindo o seu peso fresco em relação ao controle já no primeiro dia de tratamento. O peso fresco diminuiu consideravelmente no segundo e terceiro dia, principalmente em concentrações maiores de NaCl.

O peso fresco em graviola só diminuiu no terceiro dia de tratamento na concentração de sal de 500 mM, não tendo sido observado a mesma sensibilidade ao sal que em plântulas de pinha.

As plântulas com 2 meses de ambas as espécies não diminuíram o peso fresco mesmo nas maiores concentrações de sal (Fig. 2C e 2D).

De acordo com Ebert (Ebert, 1998) que trabalhou com plântulas de graviola com 2 anos de idade submetidas às concentrações de 30 e 60 mM de NaCl por 8 semanas em sistema hidropônico, esta espécie não tem o seu crescimento vegetativo afetado pelo tratamento salino, como ocorre em outras espécies de *Annona*.



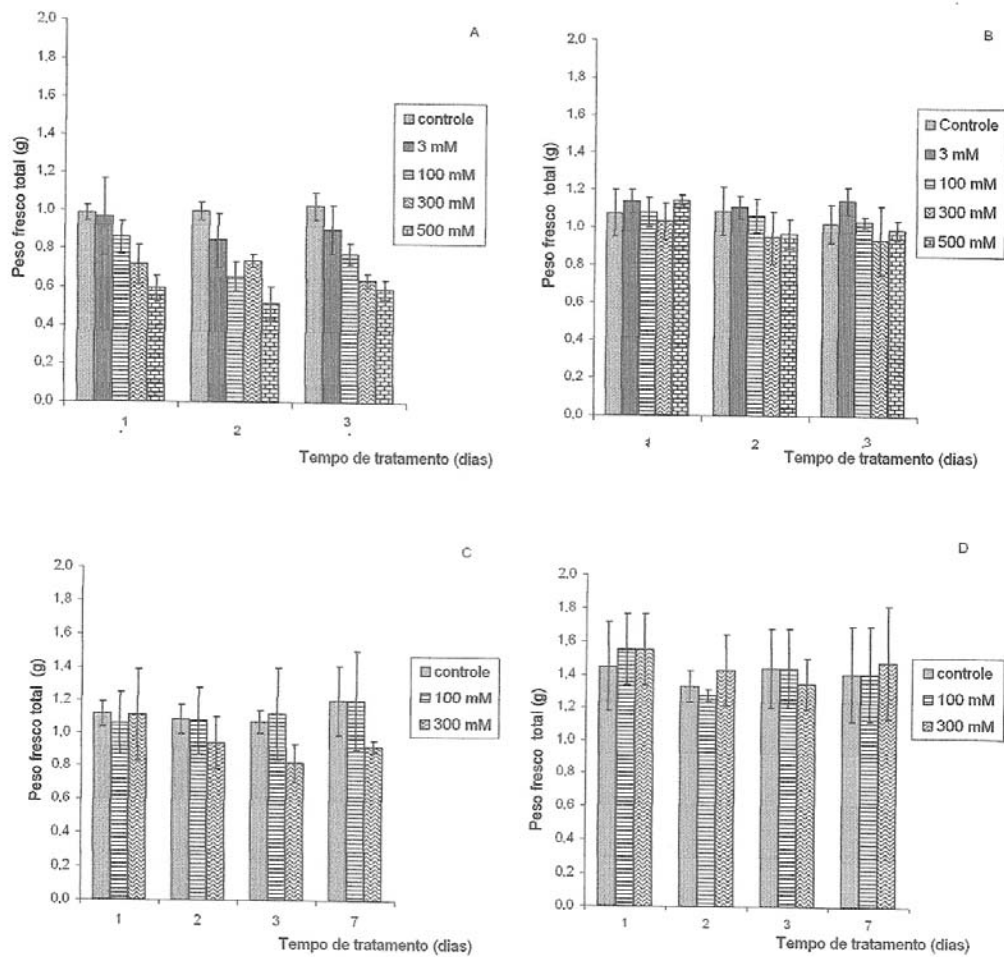


Figura 2- Determinação do peso fresco (g) em plântulas de *Annona squamosa* (A) e *Annona muricata* (B) com 2 semanas de idade submetidas a diferentes tratamentos salinos (0, 3, 100, 300 e 500 mM) por 1, 2 e 3 dias e *Annona squamosa* (C) e *Annona muricata* (D) com 2 meses de idade submetidas a diferentes tratamentos salinos (0, 100 e 300 mM) por 1, 2, 3 e 7 dias.

A sensibilidade das plantas a altas concentrações de NaCl pode resultar na ocorrência de sintomas nas folhas como necrose, redução do crescimento e perda de peso fresco. Estes efeitos são devido ao excessivo aumento e translocação dos íons de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> no tecido foliar (Munns e Termaat, 1986) que proporcionam alterações no potencial osmótico (Ho e Adams, 1989).

Nas concentrações de sal e nos períodos de tratamentos testados para as plântulas com 2 semanas de idade houve uma diminuição do peso fresco em pinha muito mais brusca que em graviola. Desta forma, sugerimos que a pinha seja mais susceptível a presença do NaCl que a graviola. Essa susceptibilidade em pinha pôde ser observada em função da diminuição no seu peso fresco já no primeiro dia de tratamento.

Um outro parâmetro de crescimento analisado em função da salinidade foi o crescimento da parte aérea. Novamente as alterações encontradas foram nas plântulas mais jovens. Em plântulas com 2 meses de idade os resultados não demonstraram diferenças nas medidas do comprimento da parte aérea para nenhuma das espécies submetidas à diferentes concentrações e períodos de tratamento (Fig. 3C e 3D). Como mostra a Fig. 3A e 3B, o comprimento da parte aérea (cm) das plântulas com 2 semanas de idade de pinha apresentou maior alteração do que de graviola. A diminuição no comprimento da parte aérea em plântulas de pinha foi diretamente proporcional ao tempo de tratamento. Nas plântulas de graviola com 2 semanas de idade não foram observadas nenhuma alteração da parte aérea, evidenciando que este parâmetro de avaliação de estresse salino também aponta a graviola como espécie mais tolerante a presença do NaCl.

Estudando o crescimento e desenvolvimento de sorgo em plântulas com 1 semana de idade sob condições de estresse salino, Lauchli e colaboradores (Lauchli et al., 1993) observaram que a salinidade reduz especialmente o crescimento e expansão das folhas, atrasando o desenvolvimento de muitas plantas. Durante 20 dias de exposição, o sal inibiu a expansão das folhas podendo este efeito estar associado com a redução do turgor foliar causado pelo baixo potencial hídrico nas raízes.

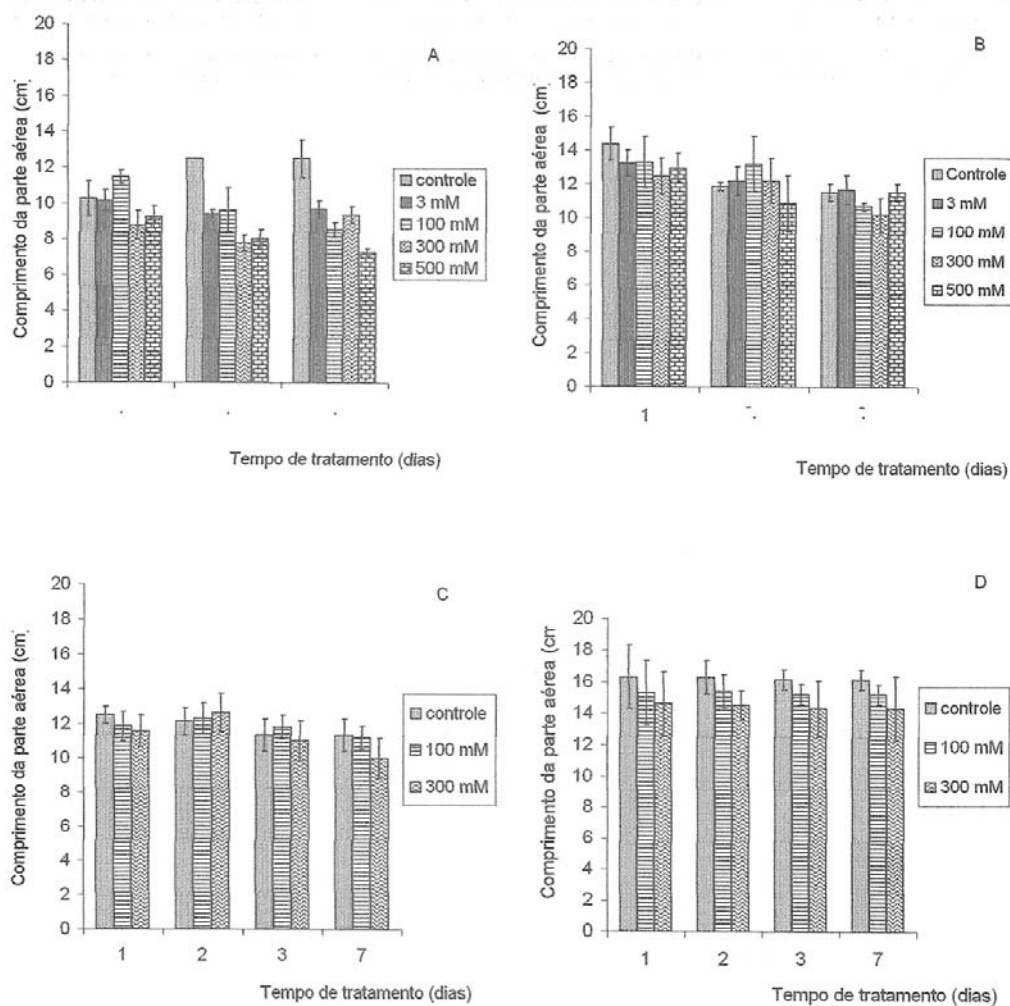


Figura 3- Determinação do comprimento da parte aérea (cm) em plântulas de *Annona squamosa* (A) e *Annona muricata* (B) com 2 semanas de idade submetidas a diferentes tratamentos salinos (0, 3, 100, 300 e 500 mM) por 1, 2 e 3 dias e *Annona squamosa* (C) e *Annona muricata* (D) com 2 meses de idade submetidas a diferentes tratamentos salinos (0, 100 e 300 mM) por 1, 2, 3 e 7 dias.

O comprimento da raiz também foi um parâmetro de crescimento analisado em plântulas submetidas a salinidade. Diferentemente dos outros parâmetros, o comprimento radicular parece ser afetado inclusive nas plântulas mais velhas.

Para as plântulas (de ambos os lotes 2 semanas e 2 meses de idade) o comprimento das raízes foi afetado em plântulas de ambas as espécies. Nas plântulas com 2 semanas, a presença do NaCl em graviola não interferiu o desenvolvimento do comprimento da raiz no primeiro dia. Porém, nos demais períodos de tratamento observou-se inibição do crescimento em função da presença do NaCl.

Plântulas de pinha com 2 meses de idade apresentaram o comprimento radicular (cm) mais afetado com o tempo de tratamento (principalmente na maior concentração de sal) que as plântulas de graviola (Fig.4C e 4D).

O crescimento das raízes também é afetado negativamente por condições de estresse (Kaufman, 1981; Parker, 1968; Slatyer, 1967).

Larcher (Larcher, 1986) cita que no caso do estresse salino, a produção de matéria seca e a taxa de crescimento declinam, prejudicando especialmente o crescimento das raízes e comprometendo a absorção de água e de nutrientes. Nossos dados sugerem que este parâmetro possa ser uma evidência rápida em plântulas jovens e adultas dos sintomas de estresse.

O peso seco (g) foi analisado em plântulas com 2 semanas com 7 dias de exposição ao NaCl e demonstrou que a diminuição do crescimento é devido a redução da absorção de água e não a queda na taxa fotossintética (Fig 5A e 5B).

Para ambas as espécies o peso seco não diferiu significativamente mesmo nos tratamentos de 300 mM em relação ao controle, demonstrando que a redução do crescimento constatado nas plântulas ocorreu em função da redução na absorção de água. A salinidade acarreta uma redução no gradiente de potencial hídrico no sistema solo-planta, dificultando a absorção de água e favorecendo o aparecimento do déficit hídrico responsável pela redução no crescimento (Soares et al ., 2001).

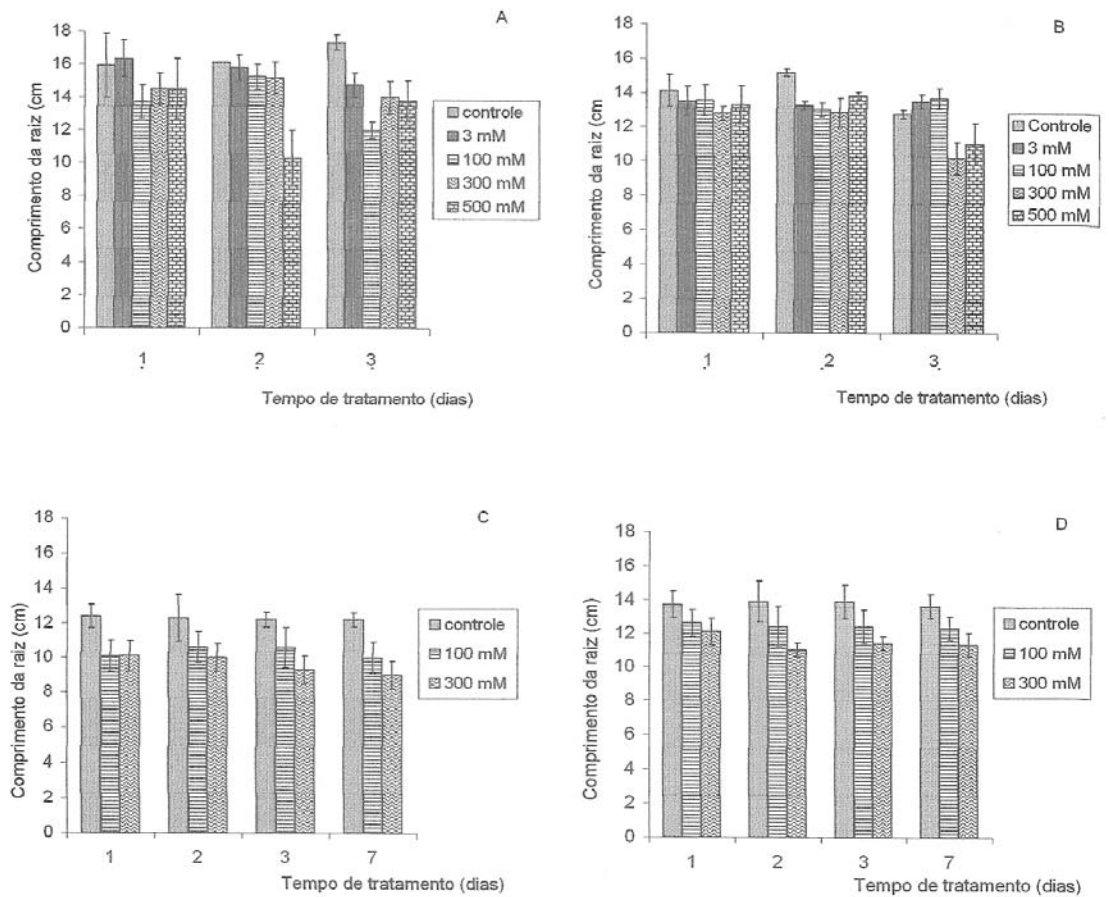


Figura 4- Determinação do comprimento da raiz (cm) em plântulas de *Annona squamosa* (A) e *Annona muricata* (B) com 2 semanas de idade submetidas a diferentes tratamentos salinos (0,3, 100, 300 e 500 mM) por 1,2 e 3 dias e *Annona squamosa* (C) e *Annona muricata* (D) com 2 meses de idade submetidas a diferentes tratamentos salinos (0, 100 e 300 mM) por 1, 2,3 e 7 dias.



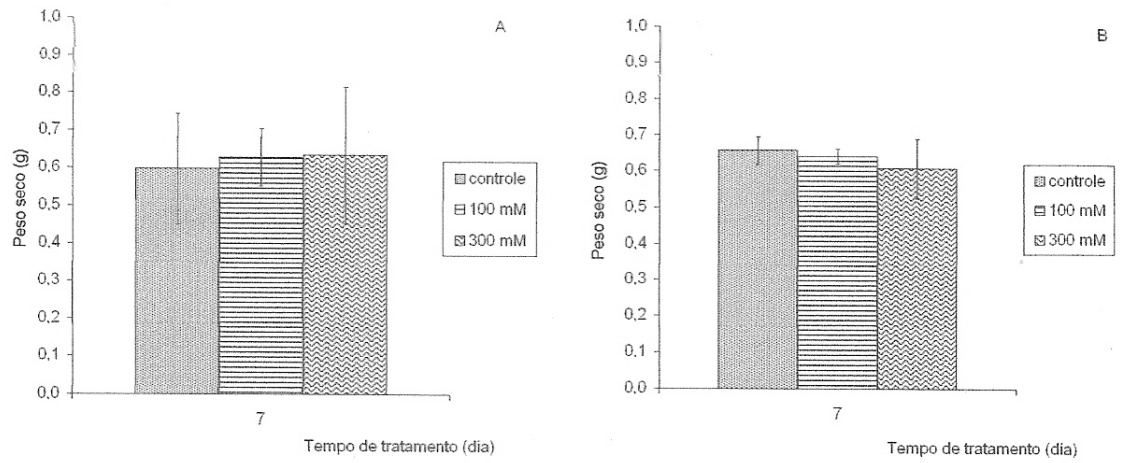


Figura 5- Determinação do peso seco (g) de *Annona squamosa* (A) e *Annona muricata* (B) com 2 meses de idade submetidas a diferentes tratamentos salinos (0, 100 e 300 mM) por 7 dias.

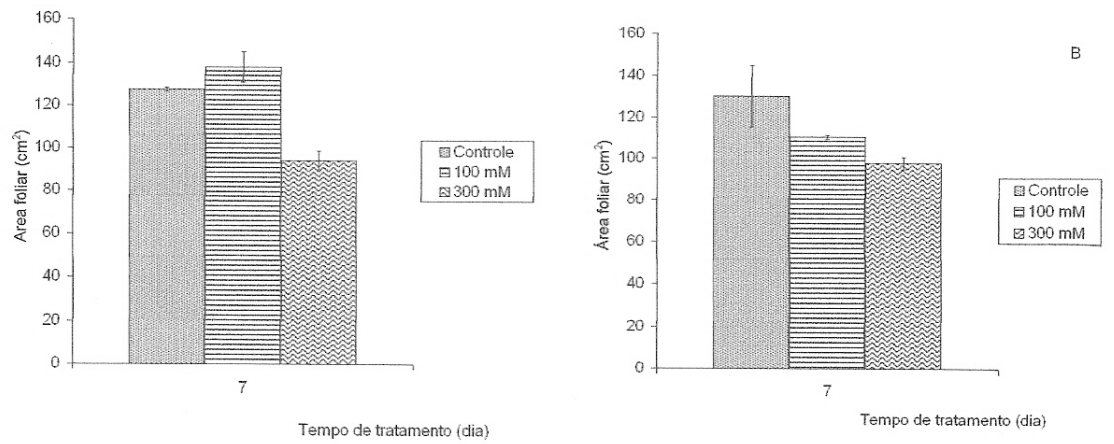


Figura 6 - Determinação da área foliar (cm<sup>2</sup>) em plântulas de *Annona squamosa* (A) e *Annona muricata* (B) com 2 meses de idade submetidas a diferentes tratamentos salinos (0, 100 e 300 mM) por 7 dias.

A área foliar foi outro parâmetro analisado. Para a obtenção destes dados foram utilizadas plântulas com 2 meses de idade submetidas a 7 dias de exposição ao NaCl. Para pinha a área foliar diminuiu em plântulas submetidas a maior concentração de NaCl (300 mM) e em graviola a área foliar diminuiu em relação ao controle para todos os tratamentos. (Fig 6A e 6B).

Observou-se que no período de 7 dias de tratamento as folhas de graviola não sofreram abscisão como as folhas de pinha. Porém as folhas de ambas as espécies começaram a apresentar sintomas de toxicidade e secaram.

Bernstein e colaboradores (Bernstein et al., 1993) verificaram que em sorgo, elevadas concentrações de NaCl no meio de cultivo afetavam também a zona de crescimento da folha, reduzindo assim a expansão foliar.

Os dados obtidos para a determinação da abertura estomática mostraram que o período de maior abertura dos estômatos é no início da manhã (Fig. 7A e7B).

Observou-se que as plântulas de pinha apresentaram em geral um maior percentual de estômatos abertos que as plântulas de graviola. Nos cultivos hidropônicos (controle e tratamento) a porcentagem máxima de abertura estomática para graviola foi de 50% (controle às 9 horas). Para pinha foi observado abertura de 100% dos estômatos (controle às 9 horas).

Apesar desta diferença em valores absolutos ambas as espécies apresentam similaridade no comportamento de abertura estomática permanecendo mais abertos no início da manhã e promovendo o fechamento nos horários mais quentes do dia.

Este fato se dá devido à existência de ciclos regulares de aproximadamente 24 horas (ritmos circadianos). Os organismos são geralmente submetidos a ciclos diários de luz e escuro, e animais e plantas às vezes exibem comportamentos rítmicos em associação com estas mudanças (Homblé, 1996; Taiz e Zeiger, 1998)).



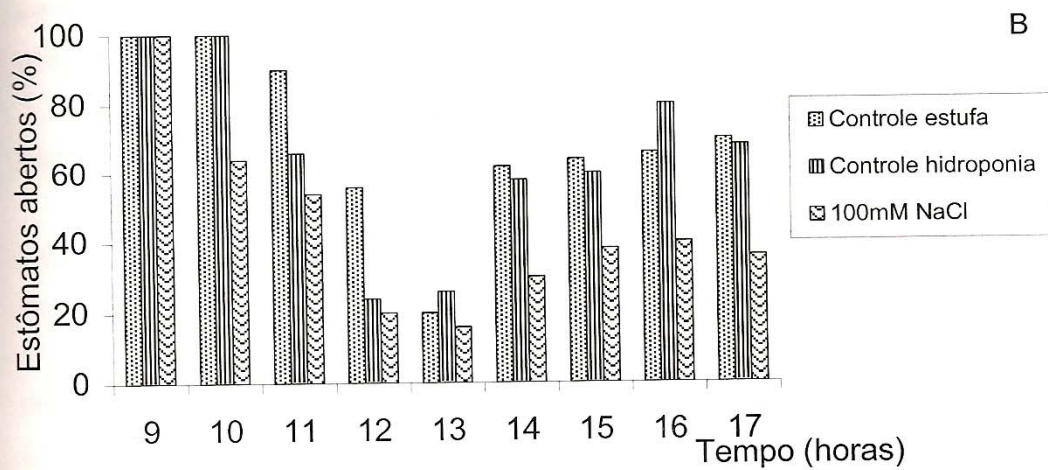
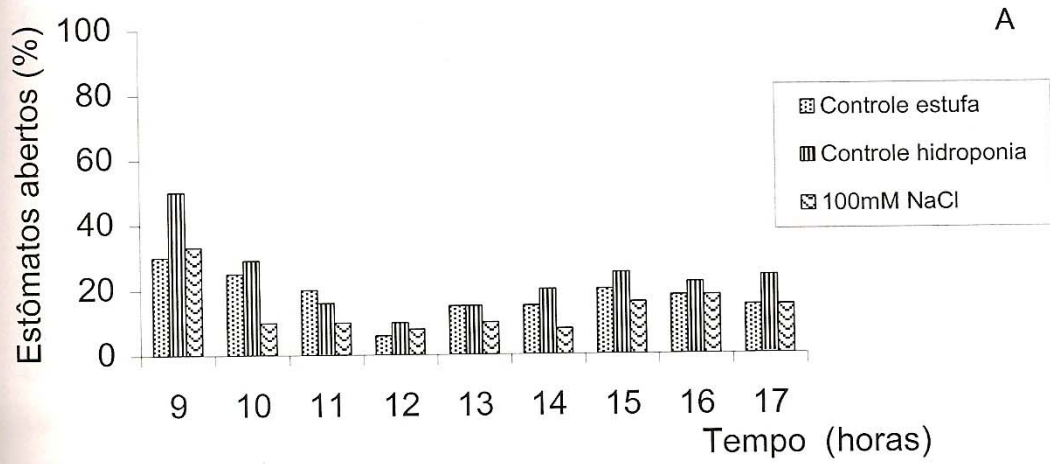


Figura 7- Porcentagem de estômatos abertos entre 9:00 e 17:00 horas em plântulas com 2 meses de idade de *Annona muricata* (A) e *Annona squamosa* (B) em controle, estufa, controle hidroponia e 100 mM por 7 dias.

Exemplos destes ritmos incluem movimentos das folhas e pétalas (posição dia e noite), abertura e fechamento dos estômatos e processos metabólicos como a fotossíntese. Quando plantas são transferidas de ciclos diários de luz e escuro para um ambiente com condições controladas de luz, muitos desses ritmos continuam a ser expressos, ao menos por alguns dias (Taiz & Zeiger, 1998).

No intervalo entre as 14 e 17 horas houve uma tendência ao aumento no percentual de estômatos abertos nos controles e no tratamento, mais evidente nas plântulas de pinha. Os resultados mostraram que durante todo o período de observação (9:00 às 17:00 horas) houve um menor percentual de estômatos abertos nas plantas submetidas ao sal (100mM) quando comparado com os controles, sugerindo assim uma interferência do sal na abertura estomática para ambas as espécies.

Em graviola observou-se que os estômatos permaneceram mais tempo fechado que os estômatos de pinha. Provavelmente esta observação justifique o fato de que a graviola tem mostrado ser mais tolerante ao NaCl que a pinha.

A maior tolerância da graviola pode ser verificada pela figura 8, na qual podemos observar mais facilmente o efeito da salinidade em pinha.

Segundo alguns autores, o fechamento dos estômatos e a inibição dos processos bioquímicos acontece em função de vários tipos de estresse, como por exemplo o hídrico e o salino (Hasegawa et al, 1986; Ieperen, 1996; Gosset et al, 1994; George e Nissen, 1992). Uma vez que a planta consegue minimizar os efeitos desses estresses com o fechamento dos estômatos ela consegue manter-se hidratada e absorve menor quantidade de sal como aconteceu com a graviola, já pinha apresentou sintomas de toxicidade mais rapidamente.



Fig 8- Cultivo hidropônico de *Annona* (A) *Annona squamosa* – esquerda (controle) e direita (tratamento de 100 mM por 7 dias) (B) *Annona muricata* esquerda (controle) direita (tratamento de 100 mM por 7 dias)

O potencial hídrico dentro da folha tem um efeito potente na abertura e fechamento dos estômatos. Como o potencial hídrico decresce (aumento de estresse hídrico) os estômatos se fecham. Experimentos realizados por De Villiers e colaboradores (De Villiers *et al.*, 1996) demonstraram que o estresse salino induz mudanças no fechamento dos estômatos.

São diversos os fatores que podem interferir no fenômeno de abertura e fechamento dos estômatos como: a presença da luz, o teor de gás carbônico, a temperatura e a disponibilidade de água. O fechamento estomático é uma resposta fisiológica potente à falta de água. Em condições de estresse hídrico o nível de ABA nas folhas pode aumentar 50 vezes de 4 a 8 horas, isto leva a uma redução na perda de água por transpiração devido ao fechamento dos estômatos (Turner, 1991). A concentração de ABA no mesófilo das folhas aumenta consideravelmente quando as plantas estão submetidas a algum tipo de estresse. A presença do ABA nos estômatos promove, entre outras alterações, a saída de potássio das células guardas e conseqüentemente os estômatos se fecham.

Os dados obtidos com a Microscopia Eletrônica de Varredura demonstraram que as plântulas controle de ambas as espécies apresentaram seus estômatos abertos e células túrgidas (Fig 8A e Fig 9A). As plântulas submetidas ao NaCl (100 mM) possuíam estômatos fechados e células murchas (Fig 8C e 9D). A presença do NaCl interferiu na turgescência celular e conseqüentemente os estômatos se fecharam. Esta observação foi corroborada com a realização da determinação da abertura estomática através de molde da epiderme. Em ambas as técnicas, MEV e molde da epiderme, os estômatos de graviola permaneceram fechados por mais tempo. Acreditamos que esta possa ser uma estratégia da planta para tolerar o estresse promovendo menor perda de água em plântulas de graviola do que em pinha.

Os dados revelaram também maior quantidade de tricomas (Fig. 8A e Fig 9A) nas plântulas de *Annona muricata* L. em relação a *Annona squamosa* L.. Este poderia ser outro mecanismo de adaptação à falta de água que possibilitaria à graviola maior resistência quando em comparação a pinha.

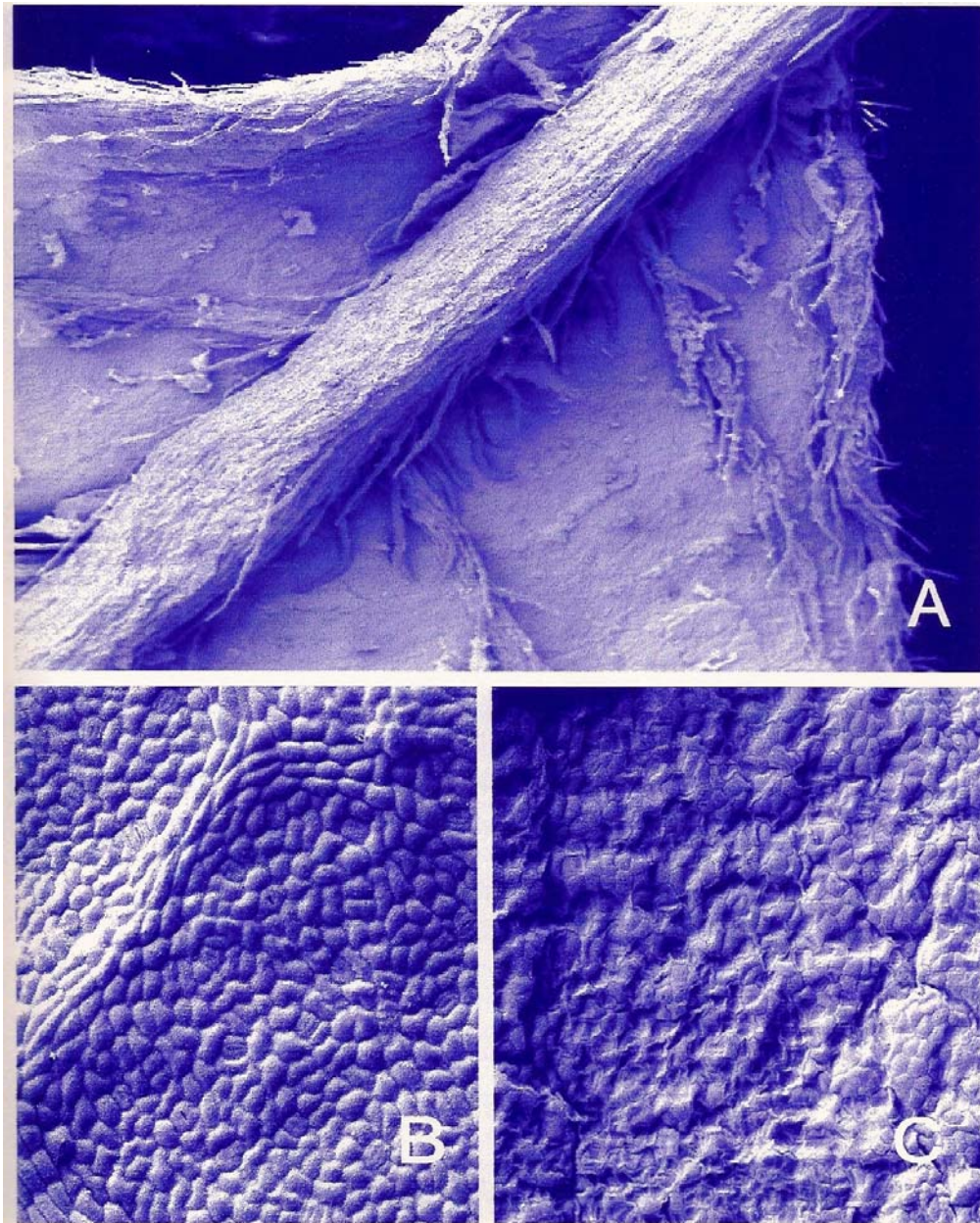


Figura 9- Microscopia Eletrônica de Varredura em *Annona squamosa* (A) Controle sem tricomas (aumento 50 X); (B) Epiderme do controle com células túrgidas e estômatos abertos (aumento 200X); (C) Epiderme do tratamento com 100 mM de NaCl mostrando células murchas e estômatos fechados (aumento 200X).

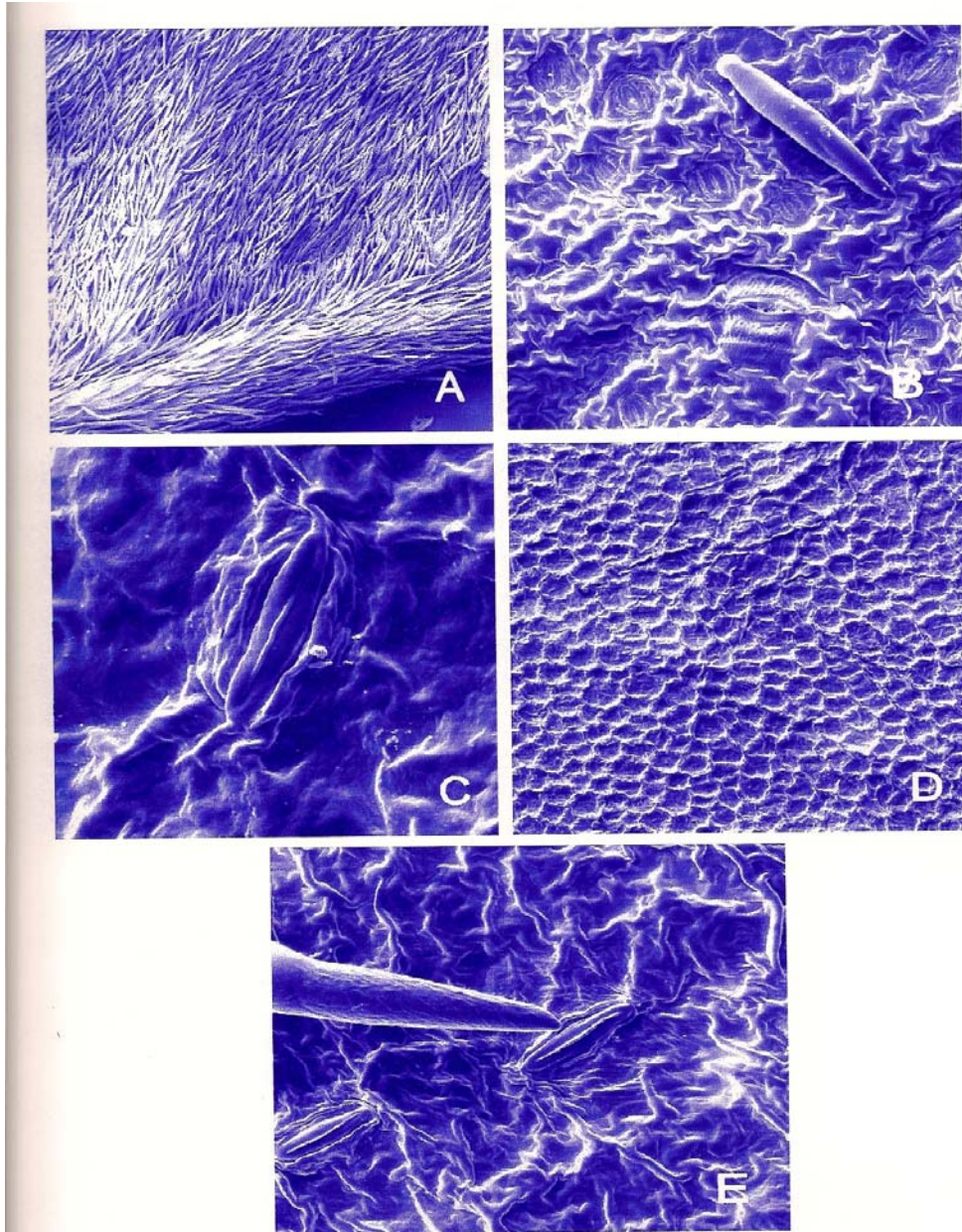


Figura 10- Microscopia Eletrônica de Varredura em *Annona muricata* (A) Epiderme do controle evidenciando tricomas (aumento 50 X); (B) Epiderme do controle com células túrgidas e estômatos fechados (aumento 500X); (C) Detalhe do estômato fechado (aumento 2000X); (D) Epiderme do tratamento com 100 mM de NaCl mostrando células murchas (aumento 200X); (E) Epiderme do tratamento com 100 mM de NaCl mostrando estômatos fechados (aumento 1000X).

Através da Microscopia Óptica constatamos que as plântulas de *Annona squamosa* L. submetidas a coloração com SUDAM II (fotos não mostradas) revelaram presença muito maior de gotas lipídicas do que a *Annona muricata* L.. A quantidade de gotas lipídicas foi menor em plântulas submetidas a concentrações de 100mM de NaCl em relação ao controle, sugerindo-se que a planta tenha utilizado este composto de reserva energética quando submetida a condição de estresse.

Anatomicamente a folha da *Annona squamosa* L. (Fig. 10) apresenta lâmina dorsiventral típica com 1 camada de paliçádico e várias de lacunoso composto de grandes espaços intercelulares.

De acordo com a Microscopia Óptica, as plântulas de pinha do controle (Fig 10A) apresentaram um parênquima paliçádico com células túrgidas e cloroplastos pequenos ( seta) . Já as plântulas que foram submetidas ao NaCl (Fig 10B e 10C) apresentaram o parênquima paliçádico com células murchas e cloroplastos grandes. Pode-se atribuir estas alterações a presença do sal. Diferenças anatômicas em lâminas foliares foram observadas por De Villiers e colaboradores (De Vielliers *et al.* , 1996) que verificaram mudanças anatômicas nas folhas e raízes de *Atriplex semibaccata* R. Br. submetidas ao estresse salino. Estes autores constataram que a salinidade influenciou o número e tamanho dos cloroplastos e o tamanho das folhas.

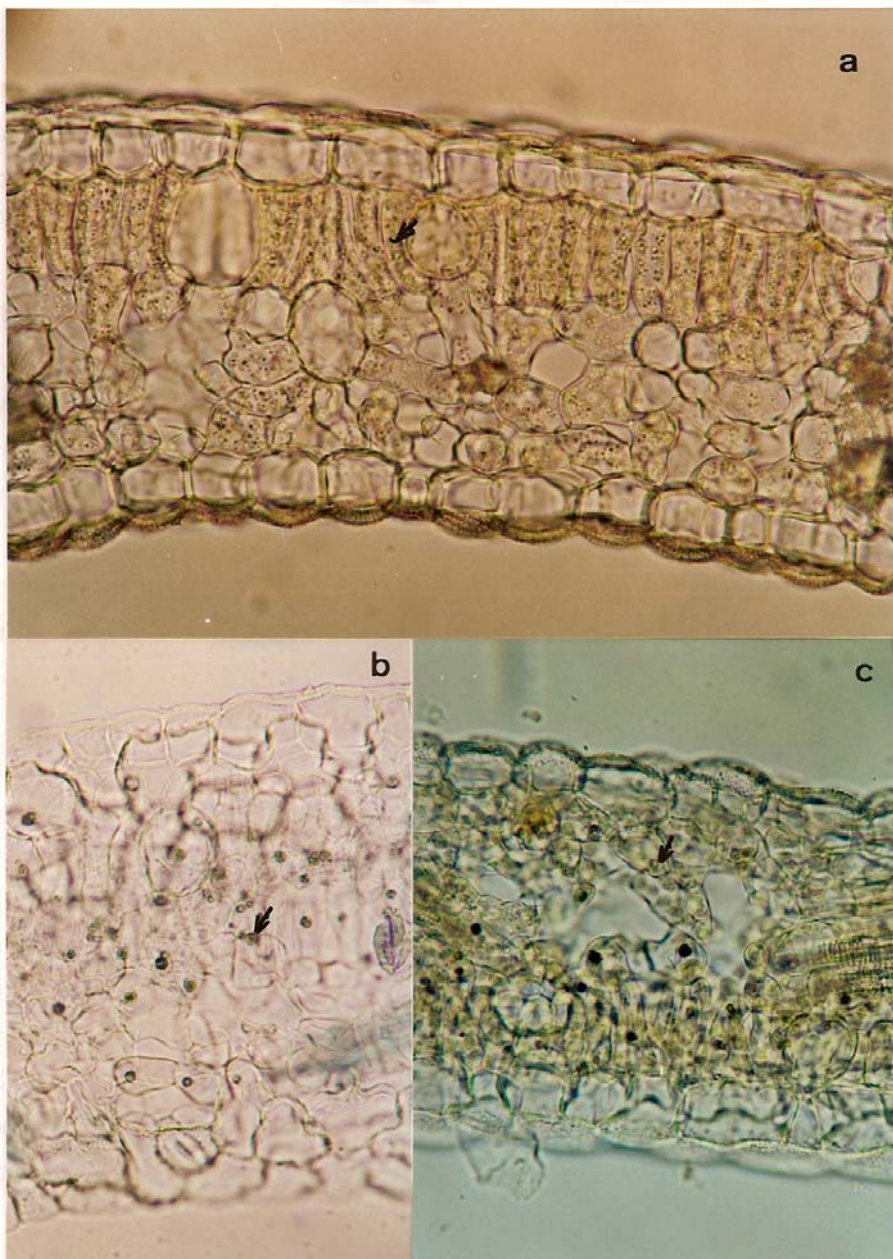


Figura 11- Corte transversal de folhas de *Annona squamosa* coradas com azul de toluidina a 0,5% (A) Controle – aumento de 40 X ; (B e C) tratamento de 100 mM de NaCl – aumento de 40 X (setas indicam cloroplastos).



A Microscopia Óptica realizada com plântulas de graviola também demonstrou parênquima paliçádico com células túrgidas e cloroplastos pequenos no controle (Fig 11A e Fig 11B - seta) e parênquima paliçádico com células murchas e cloroplastos grandes em plântulas tratadas com NaCl (Fig 11C- seta).

Krupta et al. (1993), trabalhando com metal pesado, verificaram que a ultraestrutura dos cloroplastos em plantas tratadas com cádmio estava alterada. Sugere-se que esta modificação provocada por um metal pesado esteja presente também neste experimento realizado com estresse salino. Vários distúrbios anatômicos podem ser evidenciados com a presença da salinidade (Romero-Aranda et al ., 1998).

As alterações anatômicas verificadas na folha sugerem que tenha havido uma mobilização dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  da raiz para a parte aérea. Com o objetivo de verificar se a translocação ocorreu, foram determinadas as concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  em raízes e parte aérea de ambas as espécies (Fig.12) .

Foi observado que ambos os íons estavam presentes nas folhas jovens e adultas de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. indicando que ocorre translocação de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nas espécies vegetais em questão.

Em *Annona muricata* L. houve um maior acúmulo de  $\text{Na}^+$  nas raízes quando em comparação com *Annona squamosa* L.. A quantidade de  $\text{Na}^+$  nas folhas jovens e adultas de ambas as espécies foi muito próxima. Isto sugere que deve haver dois mecanismos distintos de se evitar que o  $\text{Na}^+$  seja translocado para a parte aérea, onde pode promover maiores danos a planta (Jeschke et al., 1991). A *Annona muricata* L. parece dispor de um mecanismo de sequestro dos íons nas células radiculares e em *Annona squamosa* L. talvez haja um evitamento na absorção do mesmo.

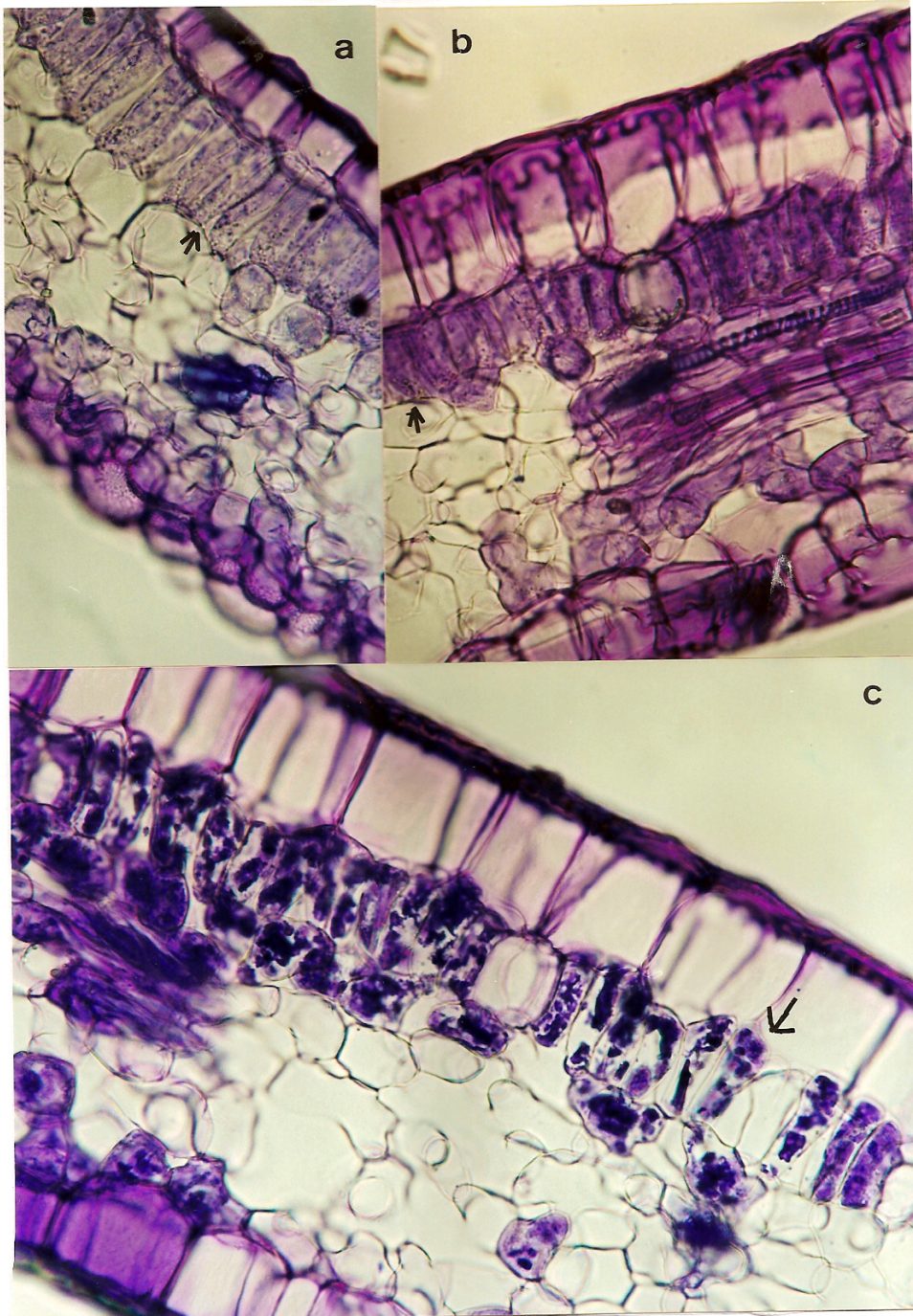


Figura 12- Corte transversal de folhas de *Annona muricata* coradas com azul de toluidina a 0,5% (A e B) Controle – aumento de 40 X ; (C) tratamento de 100 mM de NaCl – aumento de 40 X (setas indicam cloroplastos).

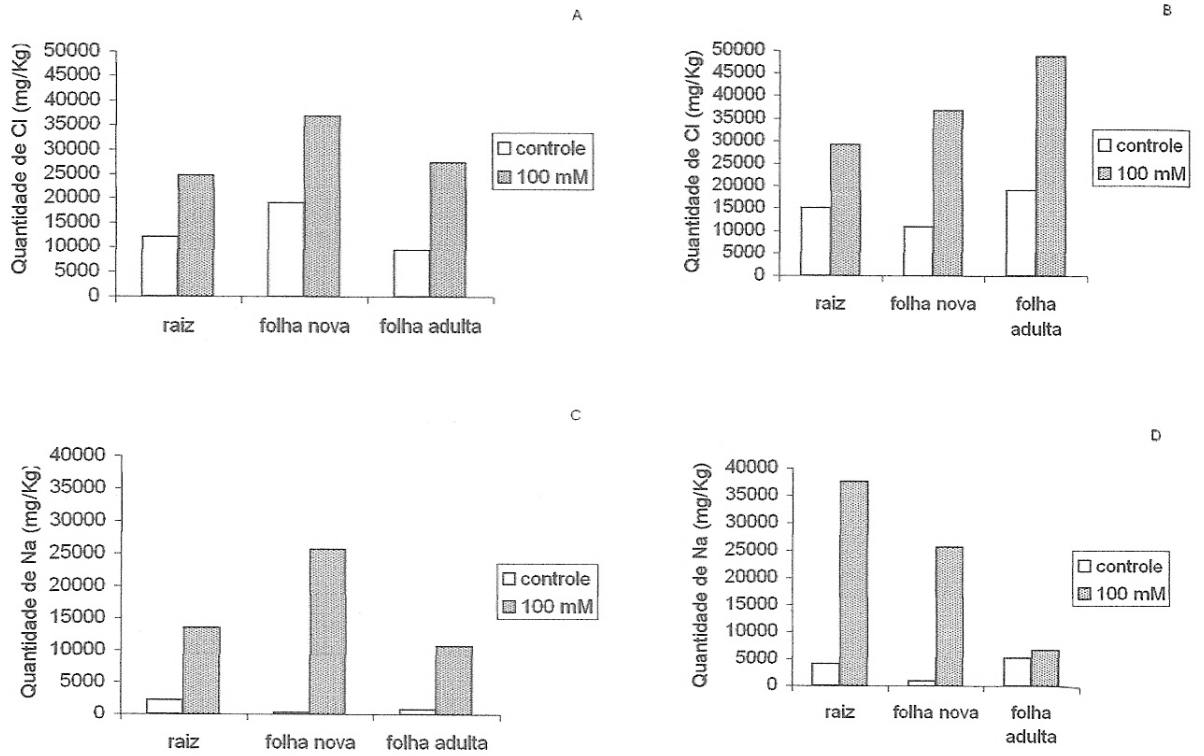


Figura 13 - Determinação da quantidade de cloro (mg/kg) em raízes, folhas novas e adultas de *Annona squamosa* (A) e *Annona muricata* (B) e de sódio (mg/kg) em raízes, folhas novas e adultas em *Annona squamosa* (C) e *Annona muricata* (D).

A translocação dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  em *Annona muricata* L. e *Annona cherimola* foi observada por Ebert e colaboradores (Ebert, et al., 1998). Neste experimento, a concentração de  $\text{Na}^+$  em *Annona muricata* L. foi maior nas raízes, o que foi compatível com os nossos resultados e em *Annona cherimola* a taxa de  $\text{Na}^+$  foi maior em caules e raízes que em *Annona muricata* L..

Em algumas plântulas o  $\text{Na}^+$  pode promover uma série de sintomas. Lorenzo e colaboradores (Lorenzo et al., 2000) verificaram os efeitos da presença do íon sódio na nutrição mineral de uma rosa híbrida e os resultados demonstraram que a alongação do caule da planta foi negativamente correlacionada com a presença do sódio. Também foram verificados distúrbios no teor de nitrato na planta, embora nenhum sintoma externo de toxicidade tenha sido observado.

O excesso de um elemento pode injuriar as plantas de várias formas. A toxidez pode resultar de um potencial hídrico baixo, como ocorre em solos salinos e, além disso podem haver efeitos específicos de cada elemento. O crescimento da planta ocorre somente dentro de um certo limite de concentração de sal no meio, e fora desse limite a planta não pode sobreviver (Sutcliffe, 1989).

A presença de  $\text{Cl}^-$  nos diferentes tecidos vegetais de ambas as espécies mostrou que este íon se distribui quase que igualmente pela planta, não tendo sido observado seu acúmulo nas raízes.

Uma distinção a ser feita quanto a translocação de  $\text{Cl}^-$  em *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. foi o maior acúmulo do íon nas folhas adultas da primeira espécie.

Ebert e colaboradores (Ebert et al., 1998) encontraram uma maior quantidade de  $\text{Cl}^-$  em todas as partes de *Annona muricata* L. com exceção das raízes e em *Annona cherimola* foi encontrada menor quantidade de  $\text{Cl}^-$  nas folhas jovens da plântula.

Romero-Aranda et al., (Romero-Aranda et al., 1998) observaram os efeitos fisiológicos e anatômicos o cloreto de sódio (15 M) em espécies tolerantes de sensíveis de *Citrus* verificaram que o acúmulo de cloro na folha causa distúrbios na fotossíntese e no crescimento da planta.

Um outro trabalho realizado por Sorey e Walker (1999) também com Citrus demonstram que os danos causados pelo sal manifesta-se geralmente com a queimadura e queda das folhas o que está diretamente relacionado com o acúmulo de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> nas folhas.

As análises cromatográficas de aminoácidos livres indicaram alteração na composição destes compostos em função da presença de NaCl. Nas folhas de ambas as espécies (Fig. 13A e 14A) observa-se uma relação direta entre o aumento na concentração de prolina e o aumento na concentração de NaCl. Nas raízes de *Annona muricata* L. (Fig. 14B) a prolina e uma banda na posição inferior à prolina, provavelmente, arginina, parecem diminuir de concentração conforme se dá o aumento da concentração de sal. Em *Annona squamosa* L. (Fig. 14 A) nenhuma alteração na composição de aminoácidos nas raízes foi observada.

O aumento da concentração de prolina é um indicativo de estresse hídrico e salino. Em plantas de algodão submetidas ao estresse hídrico verificou-se que houve um acúmulo de alguns aminoácidos (principalmente arginina, prolina e asparagina) muito maior nas células das plantas submetidas ao estresse quando em relação ao controle (Kuznetsov, et al., 1999). Outro experimento realizado com feijão demonstrou que a concentração de prolina nas folhas de plantas submetidas ao escassez de água foi um indicativo de estresse nesta espécie. (Lazcano-Ferrat et al., 1999).

Prolina parece se acumular em função de estresse salino e hídrico não só em plântulas intactas. Em cultura de calos de limão tolerantes a sal (*Citrus limon*) a quantidade de prolina e açúcares totais, principalmente sacarose, aumentaram significativamente quando em comparação com o controle (Piqueras et al., 1996).

Munns e colaboradores (Munns et al., 1983) citam que a manutenção do turgor da célula pelo ajustamento osmótico é uma importante adaptação fisiológica para minimizar os efeitos do estresse salino. Este alto potencial de ajustamento osmótico é possível devido ao acúmulo de solutos orgânicos (como alguns açúcares e aminoácidos) e inorgânicos nestas células.

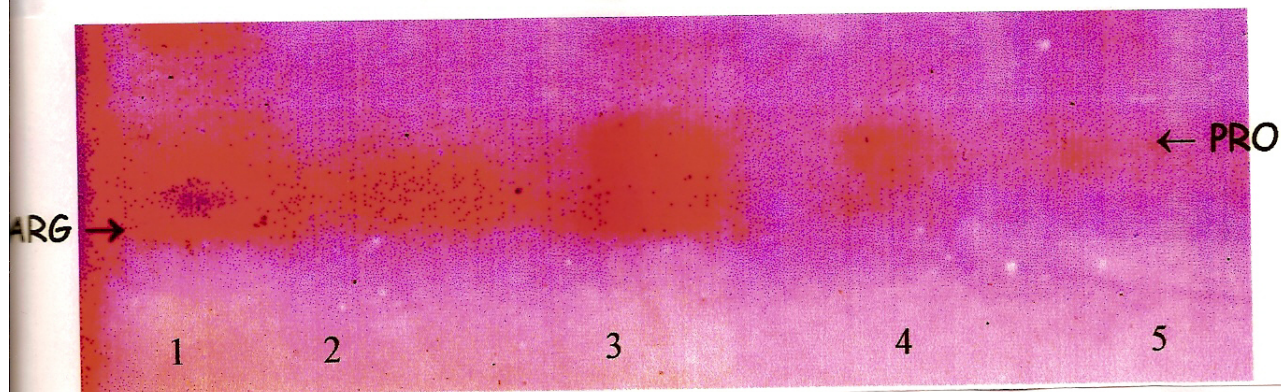


Figura 14A – Cromatografia em sílica gel de folhas de *Annona squamosa* submetidas a 3 dias de tratamento salino (1- Controle; 2- 3 mM; 3- 100 mM; 4- 300 mM; 5- 500 mM de NaCl (Setas indicam arginina e prolina).

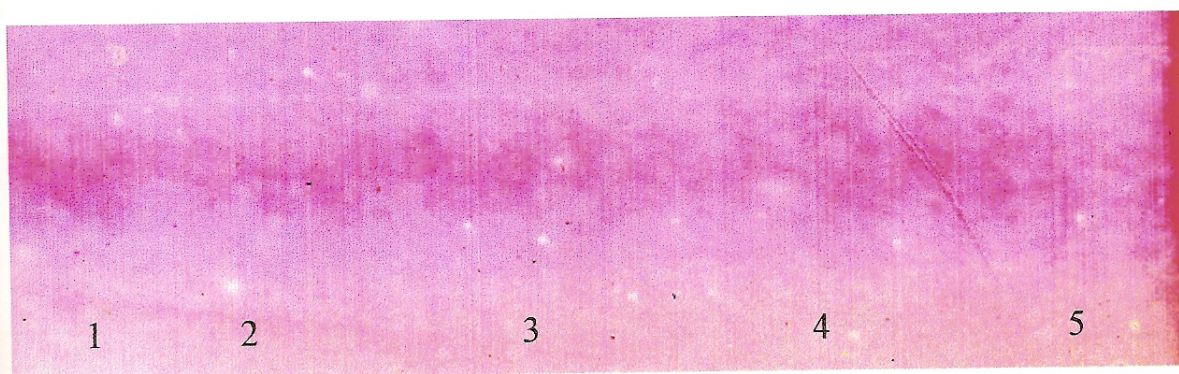


Figura 14B – Cromatografia em sílica gel de raízes de *Annona squamosa* submetidas a 3 dias de tratamento salino (1- Controle; 2- 3 mM; 3- 100 mM; 4- 300 mM; 5- 500 mM de NaCl).

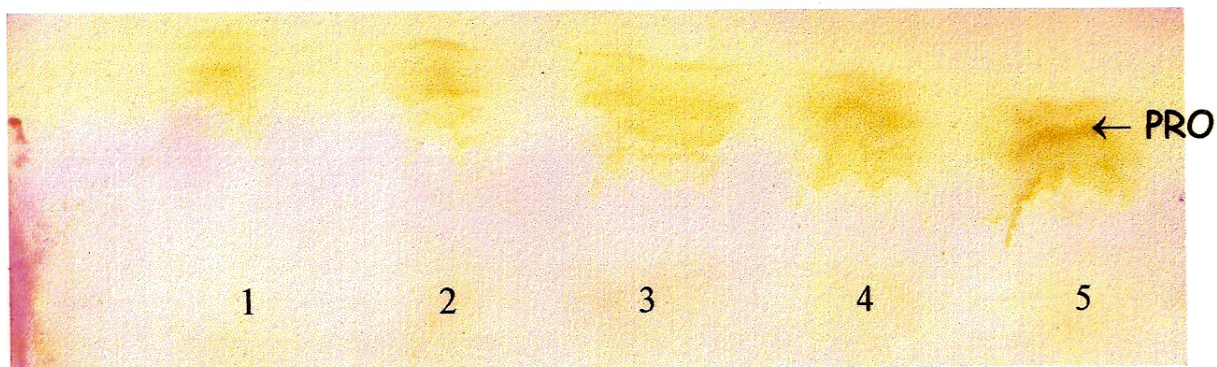


Figura 15A – Cromatografia em sílica gel de folhas de *Annona muricata* submetidas a 3 dias de tratamento salino (1- Controle; 2- 3 mM; 3- 100 mM; 4- 300 mM; 5- 500 mM de NaCl) - (Seta indica prolina).

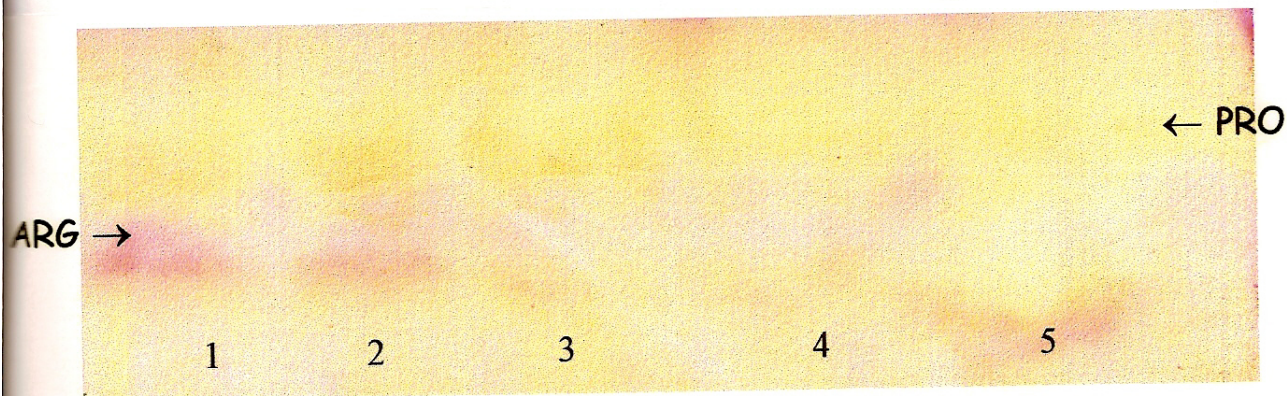


Figura 15B – Cromatografia em sílica gel de raízes de *Annona muricata* submetidas a 3 dias de tratamento salino (1- Controle; 2- 3 mM; 3- 100 mM; 4- 300 mM; 5- 500 mM de NaCl). (Setas indicam arginina e prolina) .



## Conclusões

- Plântulas de pinha são mais sensíveis à salinidade que plântulas de graviola em relação aos parâmetros de crescimento analisados;
- A *Annona muricata* L. apresenta um melhor controle da abertura estomática em condições de estresse salino;
- A maior presença de tricomas em *Annona muricata* L. poderia ser uma das características responsáveis pela melhor adaptação desta espécie à salinidade;
- Na presença de NaCl ocorre um aumento no volume dos cloroplastos de ambas as espécies;

A prolina aumenta em folhas de ambas as espécies submetidas à salinidade.

## RESUMO

A família Annonaceae compreende aproximadamente 128 gêneros e 2300 espécies. (Judd, 1999), sendo a *Annona muricata* L. e a *Annona squamosa* L. as espécies mais importantes entre as árvores frutíferas. (Pinto e Silva, 1995). A salinidade afeta vários processos ao longo do ciclo de vida da planta. A resposta da planta ao excesso de sal é complexa e envolve alterações na sua morfologia, fisiologia, anatomia e metabolismos primário e secundário. Portanto, os efeitos do estresse salino podem ser verificados nas alterações anatômicas, metabólicas e no crescimento. O objetivo deste trabalho foi analisar as alterações anatômicas (através da microscopia Óptica e Eletrônica de Varredura), metabólicas (composição de aminoácidos), de crescimento (radicular, parte aérea, peso fresco, peso seco e área foliar) e desenvolvimento de plântulas de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. submetidas a estresse salino. Os tratamentos salinos foram conduzidos em hidroponia na the Unidade Experimental Horto Florestal, Universidade Estadual de Feira de Santana sob temperatura controlada de 20° C (escuro )/26°C (luz) e fotoperíodo de 12 horas nas concentrações de 0, 3, 100 300 e 500 mM de NaCl por 1 períodos de 1, 2 e 3 dias para as plântulas com 2 semanas de idade e de forma similar para plântulas com 2 meses de idade por períodos de 1, 2, 3 e 7 dias em 0, 100, 300 mM de NaCl. Os resultados mostraram que as plântulas de pinha tem seu desenvolvimento mais afetado pelo NaCl do que as plântulas de graviola. Em ambas as espécies as maiores concentrações de NaCl inibiram o crescimento da raiz e da área foliar. Porém, graviola manteve o peso fresco e o comprimento da parte aérea em relação ao controle. As análises de peso fresco e seco demonstraram que a diminuição do crescimento é devido a redução da absorção de água e não a queda na taxa fotossintética. A *Annona muricata* L. apresenta um melhor controle da abertura estomática em condições de estresse salino. Dentre as alterações anatômicas, foi constatado que na presença de NaCl ocorre um aumento no volume dos cloroplastos de ambas as espécies e a maior presença de tricomas em *Annona*

*muricata* L. inclusive no controle, poderia ser uma das características responsáveis pela melhor adaptação desta espécie à salinidade. A presença de  $\text{Cl}^-$  nos diferentes tecidos vegetais de ambas as espécies mostrou que este íon se distribuiu quase que igualmente pela planta, não tendo sido observado seu acúmulo nas raízes. O  $\text{Na}^+$  foi acumulado nas raízes de graviola apesar de ter sido encontrado também nas folhas desta espécie. A análise de aminoácidos demonstrou a presença de prolina somente nas folhas de ambas as espécies nas concentrações mais elevadas de  $\text{NaCl}$ , indicativo do estabelecimento do estresse nestas plântulas.

## Abstract

(Physiological and anatomical alterations in *Annona muricata* L. and *Annona squamosa* L. seedlings submit by salt stress).

Annonaceae family approximately 128 genus and 2300 species. (Judd, 1999), being the *Annona muricata* L. and *Annona squamosa* L. the most important species of this genus (Pinto e Silva, 1995). Salinity can affect some processes in the plant life cycle. Plant responses to salt exposure are complex and involve alterations in morphology, physiology, anatomy and primary and secondary metabolism. Therefore, salt stress effects can be studied by analyzing aspects related to anatomical, metabolic and growth alterations. The main objective of this work was to analyze the anatomical (through the light microscopy and scanning electron microscopy), metabolic (amino acid composition), growth and development alterations (roots length, shoots length, fresh weight, dry weight and leaf surface) in *A. muricata* L. and *A. squamosa* L. seedling esposed to salinity (NaCl) in the Unidade Experimental Horto Florestal, Universidade Estadual de Feira de Santana. The experiments were performed in a 12:12 h light/dark cycle at 26° C/ 20° C in a hydroponic system and the salt trataments were carrid out five different concentrations of NaCl (0, 3, 100, 300 and 500 mM ) for periods of 1, 2 and 3 days for 2 weeks old seedlings. Similar experiment was carrid ourt two months old seedlings which were exposed to 0, 100 and 300 mM NaCl for periods 1, 2, 3 and 7 days. The growth of *A. squamosa* seedlings was more affected by NaCl than *A. muricata* seedlings. Root length and leaf area for both species were inhibited by the highest NaCl concentrations test. However, for *A. muricata* the fresh weight and shoots length remained at the levels of the control plants. Te analyses of fresh and dry wight suggested that the reduction in growth observed was due to water uptake reduction,

but not a decrease in the rate of photosynthesis. The *Annona muricata* L. exhibited a better control of stomata opening under salt stress. Anatomic alterations such as chloroplast size (increased volume) were clearly observed under NaCl treatment in both species whereas the leaves of *A. muricata* exhibited an increased number of trichomes, including in control plants which suggest to salinity. The presence of  $\text{Cl}^-$  in the different tissues of both the species showed that this ion was almost equally distributed within the plant system since it was not observed any accumulation in the roots. It was also present in the leaves. The amino acid analysis allowed to demonstrated the presence of proline in leaves of both the species when exposed to the highest concentrations of NaCl indicating the salt stress has been established in the seedlings.

## BIBLIOGRAFIA

ASCH, F. DINGKUHN, M.; WITTSTOCK, C.; DOREFFLING, K. 1999. Sodium and potassium uptake of rice panicles as affected by salinity and season in relation to yield and yield components. *Plant and Soil* 207: 133-145.

ASPINALL, D. e PALEG, L. G. 1981. Proline accumulation: physiological aspects In: PALEG, L.G. e ASPINALL, D. (eds.). *Physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. Academic Press, Sydney, pp 205-241.

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. 1998. Responses of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase - deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum*, 104: 280-292.

BARBOSA, G.K. da C.; FILHO, E.G.; PRISCO, J. T.; FILHO, J. E. 2001. Efeito do NaCl no crescimento e nas atividades galactosídicas de raízes de feijão-de-corda cv. Pitiúba in: *Resumos do VIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal*. Ilhéus. Bahia.

BEER, S.; SHOMER-ILN, A.; WAISEL, Y. 1975. Salt stimulated phosphoenolpyruvate carboxylase in *Cakile maritima*. *Physiologia Plantarum*, 34:293-295.

BERNSTEIN, N.; SILK, W. K. ; LÄUCHLI, A. 1993. Growth and development of sorghum leaves under conditions of NaCl stress. *Planta* 191: 433-439.

BOTELLA, M. A.; CERDÁ, A. LIPS, S. H. 1994. Kinetics of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  uptake by wheat seedlings. Effect of salinity and nitrogen source. *J. Plant Physiol.* 144: 53-57.

BRIDG, H.; EBERT, G.; LÜDDERS, P. 1994. Tropical fruits of the *Annona* genus. *Erwerbsobstbau* 36:17-20.

CALZAVARA, B.B. e MÜLLER, C.H. 1987. *Fruticultura tropical: a gravioleira (Annona muricata L. )* Belém, Embrapa/ CPATU, p.36.

CHEESEMAN, J. M. 1988. Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol.* 87: 547-550.

CORPAS, F. J.; GÓMEZ, M.; HERNÁNDEZ, J. A. Del RIO, L. A. 1993. Metabolism of activated oxygen in peroxisomes from two *Pisum sativum* L. cultivars with different sensitivity to sodium chloride. *J. Plant Physiol.* 141:160-165.

DEGANO, A. M. C. 1999. Respuestas morfológicas y anatómicas de *Tessaria absinthioidis* (Hook. et Arn.) DC. a la salinidad. *Revta brasil. Bot.* 22(3):357-363.

DESAI, U.T. e SINGH, R.M. 1980 Growth of guava plants (*Psidium guajava* L.) as affected by salinity. *Indian Journal Horticulture* 5:3-6.

DEL CURA, B.; ESCRIBANO, M. I.; ZAMORANO, J. P.; MERODIO, C. 1996. High carbon dioxide delays postharvest changes in RuBPCase and polygalacturonase-related protein in Cherimoya peel. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 121(4):735-739.

DE VIELLIERS, A. J.; VON TEICHMAN I.; VANROOYEN M. W.; THERON, G. K. 1996. Salinity induced changes in anatomy, stomatal counts and photosynthetic rate of *Atriplex semibaccata* R. Br. *South African Journal Of Botany* 62: (5) 270-276.

EBERT, G. 1998. Growth, Ion uptake and gas exchange of two *Annona* species under salt stress. *Angew. Bot.* 72:61-65.

EPSTEIN, E. 1985. Salt-tolerance crops: origins, development, and prospects of the concept. *Plant Soil* 89: 187-198.

ERDEI, L.; SZEGLETES, Z.; BARABÁS, K. N.; PESTENÁ CZ, A. FÜLÖP, K. KALMÁR, L.; TÓTH, B.; DÉR, A. 1998. Environmental stress and the biological clock in plants: changes of rhythmic behavior of carbohydrates, antioxidant enzymes and stomatal resistance by salinity. *Journal of Plant Physiology* 152: 265-271.

FERREIRA, R.G. 1998. Efeitos do estresse salino sobre o crescimento, composição química e respostas fisiológicas da goiabeira. Dissertação de mestrado Agronomia/ Fitotecnia. Universidade Federal do Ceará Fortaleza. p. 60 .

GALE, J. 1975. Water balance and gas exchange of plants under saline conditions. In: POLJAKOFF-MAYBER, A. & Gale, J. (eds). Plants in saline environments. Springer-Verlag, New York. p.168-185.

GEORGE, A. P.; NISSEN, R. J. 1992. Effects of environmental variables and cropping on plant water status of custard apple. *Journal of Horticultural Science* 67 (4) 445-455.

GOSSETT, D. R.; MILLHOLLON, E. P.; LUCAS, M. C. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Science* 34:706-714.

HANSON, A. D.; RATHINASABAPATHI, B.; RIVIAL, J.; BURNET M.; DILION M. O.; GAGE, D. A. 1994. Osmoprotective compounds in Plumbaginaceae: a natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* 91:306-310.

HASEGAWA, P. M. BRESSAN, R. A.; HANDA, A.. 1986. Cellular mechanisms of salinity tolerance. *Hort Science* 21: 1317-1324.

HO, L. C. and ADAMS. P. 1989. Effect of diurnal changes in salinity of the nutrient solution on the accumulation of calcium in the tomato fruit. *Annals of Botany.* 64:373-82.

HOAGLAND, D.R.; ARNON. D.I. 1952. The water culture method for growing plants without soil. *California Agriculture Experimental. Stat. Univ. Calif. Berkeley Circ.* 347:1-32.



HOMBLÉ, F. 1996. Membrane transport and oscillations in plants. In: VANDEN DRIESSCHE, T. J-L. GUISSSET e. G. M. PETIAU-DE VRIES (eds.) Membranes and Circadian Rhythms, pp. 125-138. Springer Verlag, Berlin.

IEPEREN, W. VAN. 1996. Effects os different day and night salinity levels on vegetative growth, yield and quality of tomato. Journal of Horticultural Science. 71 (1) 99-111.

JESCHKE, W. D.; PATE, J. S. 1991. Cation and chloride partitioning through xylem and phloem within the whole plant or *Ricinus communis* L. under conditions of salt stress. Journal of Experimental Botany. 42: (242) 1105-1116.

JUDD W. S.; CAMPBELL, C. S. KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. 1999. Plants sistematics a phylogenetic approach. Sinauer Associates Inc. Publ. Massachusetts E.U.A.. 464 p.

KALIR, A.; OMRI, G. ; POLJAKOFF-MAYBER, A. 1984. Peroxidase and catalase activity in leaves of *Halimione portulaciodes* exposed to salinity. Physiol. Plant.. 62:238-244.

KAUFMAN, M. R. Water relations during growth. 1981. In: PALEG e SPINAL, D. (eds) The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Academic Press . Sydney. p.55-70.

KELEG, F.M.; EL-AZAB, E.M.; SOUROUR, M. 1980.Effect of soil and salinity on growth and mineral content of leaves and roots of loquat, *Annona*, and *papaya* seedlings. J. Agr. Res. 28:213-224.

KRAUS,J. E.; ARDUIN M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica EDUR Rio de Janeiro.

KRUPTA 1999. Cadimium against higher plant photosynthesis- a variety of effects and where do they possibly come from? Zeitschrift fuer Naturforschung C54,723-729.

KUZNETSOV, V.V.; RAKITIN, V. Y.; ZHOLKEVICH V.N. 1999. Effects of preliminary heat-shock treatment on accumulation of osmolytes and droughth resistance in cotton plants during water defidency. Physiologia Plantarum 107(4):399-406.

LARCHER, W. 1986 Ecofisiologia Vegetal (tradução) 4<sup>a</sup> ed. São Paulo, EPU.

LAZCANO-FERRAT I.; LOVATT C. J. 1999. Relationship between relative water cotent, nitrogen pools, and growth of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A . Gray during water deficit. Crop Science. 39(2):467-475.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. COX, M.M. 1995. Princípios de Bioquímica. Sarvier Editora de Livros Médicos. Ltda. 839 p.

LEON, J. 1987. Botanica de los cultivos tropicales. San José, IICA. P. 425-431.

LEVITT, J. 1980 Responses of plant to environmental stress. II. Water, radiation, salt, and other stresses. Academic Press. New York.

LORENZO, H.; CID, M. C.; SILVERIO J. M.; RUANO M. C. 2000 Effects of sodium on mineral nutrition in rose plants Annals of Applied Biology. 137:(1) 65-72.

MAAS, E.V. 1994. Tolerance and responses of tropical corps to salinity stress, p.47-56. In: DAVENPORT, T. L. and HARRINGTON, H. M. (eds.) Proceedings of plant stress in the tropical environment. Kailua-Kona, HI, 20-25.

MARLER, T.E.; ZOZOR, Y. 1996. Salinity influences photosynthetic characteristics, water relations, and foliar mineral composition of *Annona squamosa* L. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121(2):243-248.

METCALF, C. R. e CHALK, L. 1979. Anatomy of the dicotyledons. 2<sup>o</sup> ed. Oxford, Clarendon Press v.I

MORRETES, B. L. de. 1969 Contribuição ao estudo da anatomia da folha de plantas do cerrado III. Sup. Botânica Universidade de São Paulo. (24):7-32.

MORTON, J. F. 1987. Fruits of warm climates. Creative Resouces Systems. Winterville, N.C.

MUNNS, R., GREENWAY, H.; KIRST, G. O. 1983 Halotolerant eukaryotes. Pp. 59-135. In: O. L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, and H. Ziegler (eds). Encyclopedia of Plant Physiology. 12C. News Series. Springer-Verlag, New York, N.Y.

MUNNS, R.; TERMAAT, A. 1986. Whole-plant responses to salinity. Austral. J. Plant Physiol. 13:143-160.

NAIDU, B. P.; PALEG, L. G.; JONES, G. P. 2000. Accumulation of proline analogues and adaptation of *Melaleuca* species to diverse environments in Australia. Australian Journal Botany 48:611-620.

PATIL, P. K.; PATIL, Y. K.; GHONSSIKAR, C. P. 1984. Effect of soil salinity on growth and nutritional status of guava (*Psidium guajava* L.) Intern. J. Trap. Agri. 2(4):337-344.

PINTO, A. C. de Q.; SILVA, E. M. da. 1995. A cultura da graviola Coleção Plantar. Serviço de Produção de Informação SPI . Brasília DF.

PIQUERAS, A.; HERNÁNDEZ, J. A.; OLMOS, E.; HELLÍN, E. ; SEVILLA, F. 1996. Changes in antioxidant enzymes and organic solutes associated with adaptation of citrus cells to salt stress. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 45: 53-60.

RASHID, P.; YASMIN F, KARMOKER JL. 2001 Effects of salinity on ion transport and anatomical structure in wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Kanchan) Bangladesh Journal of Botany 30: (1) 65-69

RIZZINI, C. M.; AGAREZ, F. V. PEREIRA, C. 1994. Botânica: Angiospermas. 2ª ed. Âmbito Cultural edições LTDA.

ROMERO-ARANDA, R.; MOYA J. L.; LEGAZ F.; PRIMO-MILLO E.; TALON M. 1998. Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus: beneficial and detrimental effects of cations. Plant Cell and Environment 21: (12) 1243-1253.

SAM, O. ; JEREZ E.; DELL'AMICO, J.; RUIZ-SANCHEZ 2000. Water stress induced changes in anatomy of tomato leaf epidermes. MC. BIOLOGIA PLANTARUM. 43: (2) 275-277.

SHANNON, M.C.; GRIEVE, C.M.; FRANÇOIS, L.E. 1994 Whole plant response to salinity. In: WILKINSON, R.E. (ED.) Plant environment interactions. New York: Basel:Hong Kong: Marcel-Dekker.p. 199-244.

SIBOLE, J. V.; MONTERO, E. ; CABOT, C.; POSCHENRIEDER, C. ; BARCELÓ, J. 1998.Role of sodium in the ABA-mediated long-term growth responses of bean to salt stress. Physiologia Plantarum 104: 299-305.

SILVA, M. G. C. ; LOPES, J. G. V. 1985. A ateira . Informativo SBF, Jaboticabal, v.4, n. 1, p. 13-14.

SIMÃO, S. 1971. Anoneira: Manual de Fruticultura. São Paulo. Editora Agronômica CERES. 570 p.

SLATYER, R. O.1967 Plant Water Relationships. Academic Press London.

SOARES, A. C. D.; COSTA, J. T. A. ; CRISOSTOMO, L. A. ; MELO, F. I. O. 2000. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de cajueiro anão precoce submetidas a estresse salino. Ver. Bras. Frutic. Jaboticabal -SP. 22:458-462.

STOREY, R.; WALKER, R.R. 1999 Citrus and salinity. Scientia Horticulturae. 78(1-4):39-81.

SUTCLIFFE, J. 1980. As plantas e a água. Volume 23. Editora Pedagógica e Universitária EPU Ltda. São Paulo. 126 p.

TAIZ, L. ZEIGER, E. 1998. Plant Physiology. The Benjamin Cummings Publishing Company. Inc. California p. 565.

TÁVORA, J. A. F.; LIMA, E. C.; HERNANDEZ, F.F.F.F 2001. Crescimento e relações hídricas de plantas jovens de gravioleira (*Annona muricata* L.) submetidas a estresse salino in: VIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. Ilhéus-Bahia

TURNER, N. C. 1991. Measurement and influence of environmental and plant factors on stomatal conductance in the field. Agricultural and Forest Meteorology. 54:137-154.

VIEGAS, R. A. ; MELO, A. R. B. de; SILVEIRA, J. A. G. da. 1999. Nitrate reductase activity and proline accumulation in cashew in response to NaCl salt shock. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 11(1): 21-28.

YEO, A. R. 1983. Salinity resistance: physiologies and prices. Physiologia Plantarum. 58:214-222.

WYN JONES, R.G.; STOREY, R. 198. Betaines. In: The physiology and biochemistry of drought resistance in plants (Eds L.G. PALEG, D. ASPINALL) pp. 172-204. Academic Press: Sidney.