



JÚNIA RAFAEL MENDONÇA FIGUEIREDO

**ESTRESSE SALINO NO DESENVOLVIMENTO
DE COPO-DE-LEITE**

**LAVRAS-MG
2015**

JÚNIA RAFAEL MENDONÇA FIGUEIREDO

**ESTRESSE SALINO NO DESENVOLVIMENTO DE
COPO-DE-LEITE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva

Coorientadores

Renato Paiva, Ph. D.

Dra. Fernanda Carlota Nery

Dra. Michele Valquíria dos Reis

**LAVRAS-MG
2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Figueiredo, Júnia Rafael Mendonça.

Estresse salino no desenvolvimento de copo-de-leite / Júnia
Rafael Mendonça Figueiredo. – Lavras : UFLA, 2015.
60 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador(a): Patrícia Duarte de Oliveira Paiva.
Bibliografia.

1. Salinidade. 2. Crescimento. 3. Ecofisiologia. 4. Bioquímica.
5. Anatomia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

JÚNIA RAFAEL MENDONÇA FIGUEIREDO

**ESTRESSE SALINO NO DESENVOLVIMENTO DE
COPO-DE-LEITE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de setembro de 2015

Prof. Dra. Fernanda Carlota Nery UFSJ

Dra. Simone Novaes Reis EPAMIG

Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva
Orientadora

Renato Paiva, Ph. D.
Dra. Fernanda Carlota Nery
Dra. Michele Valquíria dos Reis
Coorientadores

**LAVRAS-MG
2015**

Aos meus pais e aos meus irmãos,

OFEREÇO

*Ao Duzinho, pelo incentivo e
presença nas alegrias das minhas
conquistas,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar meu caminho.

Aos meus pais, Antônio Eugênio e Mariélen, por acreditarem junto comigo nos meus sonhos. Aos meus irmãos, Thales, pelo amor e por ser meu exemplo de determinação e Cássio, pelo carinho. Ao Duzinho por estar ao meu lado em todos os momentos, me apoiando em todas as decisões.

À Universidade Federal de Lavras e ao Setor de Fisiologia Vegetal pela possibilidade de realização do mestrado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora Patrícia Duarte de Oliveira Paiva e minhas coorientadoras Fernanda Carlota Nery e Michele Valquíria dos Reis, pela atenção, incentivo e ensinamentos.

Ao professor Renato Paiva por disponibilizar o laboratório para a realização dos trabalhos.

Ao Diogo, por toda ajuda durante a realização dos experimentos.

A todos os colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos e do Núcleo de Estudos de Paisagismo e Floricultura, por toda troca de experiência e por todos os trabalhos realizados juntos.

A todos os funcionários da Universidade Federal de Lavras, principalmente do Setor de Fisiologia Vegetal, que viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição.

E a todos que, de alguma maneira contribuíram para a conclusão dessa etapa, deixo meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

JÚNIA RAFAEL MENDONÇA FIGUEIREDO, filha de Antônio Eugênio Botrel Corrêa Figueiredo e de Mariélen Rafael de Mendonça Figueiredo, nasceu no dia 07 de junho de 1991, na cidade de Três Pontas, estado de Minas Gerais, Brasil. Ingressou nos cursos de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ) em 2010, concluindo os mesmos em 2014, quando apresentou as monografias de conclusão de curso “A inclusão social e a estrutura escolar para atender alunos com necessidades educacionais especiais em uma escola de São João del Rei-MG” e “Desenvolvimento do copo-de-leite em função da adubação com biofertilizante” com auxílio financeiro de bolsa de iniciação à docência da CAPES e de bolsa de iniciação científica da Fapemig, respectivamente. Em março de 2014, ingressou no programa de pós-graduação mestrado, *stricto sensu*, em Agronomia/Fisiologia Vegetal e em maio de 2015 foi aprovada no processo de mudança de nível para o doutorado. Atualmente, é membro do Núcleo de Estudos em Paisagismo e Floricultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

“Nada te perturbe, nada te amedronte. Tudo passa, a paciência tudo alcança. A quem tem Deus nada falta. Só Deus basta.”

Santa Tereza D’Ávila

RESUMO

A salinidade do solo é um problema nas produções agrícolas, com destaque para a floricultura, sendo ocasionada principalmente pelo uso em excesso de fertilizantes e utilização de água de qualidade inadequada, sobretudo nos cultivos em ambientes protegidos. O estresse salino inibe o crescimento vegetal por restringir a disponibilidade de água, levando a alterações morfológicas, estruturais, metabólicas e fisiológicas. Nesse contexto, objetivou-se avaliar as respostas de crescimento, ecofisiológicas, bioquímicas e anatômicas no desenvolvimento inicial de plantas de copo-de-leite (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng) quando submetidas ao estresse salino. Rizomas foram cultivados em bandejas de polietileno com substrato fibra de coco e os tratamentos utilizados foram 0; 25; 50; 75 e 100 mM de NaCl aplicados manualmente via irrigação para induzir ao estresse salino, sendo as avaliações realizadas após 60 e 90 dias. Foram avaliados parâmetros de crescimento, taxa fotossintética, condutância estomática, taxa de transpiração, teor relativo de clorofila, aminoácidos, proteínas totais, açúcares solúveis totais, açúcares redutores, açúcares não redutores e amido, além dos aspectos anatômicos de folhas e raízes. Após 60 e 90 dias, foi observado decréscimo na altura das plantas. O número de perfilhos e folhas, comprimento da raiz principal, massa seca e fresca da parte aérea e do sistema radicular, teor de água do sistema radicular, a relação entre a parte aérea/sistema radicular também reduziram após 90 dias de imposição do estresse salino, ocorrendo uma maior alocação de massa seca nas raízes. A taxa fotossintética, condutância estomática, taxa de transpiração e teor relativo de clorofila, após 60 dias, reduziram com o aumento da concentração de NaCl. No entanto, após 90 dias, a taxa fotossintética foi inalterada, ocorrendo aumento da condutância estomática, da taxa de transpiração, além do teor de clorofila em plantas submetidas a 75 mM de NaCl quando comparado com o tratamento controle. O estresse salino ocasionou maior acúmulo de aminoácidos totais nas folhas em 50 mM de NaCl, todavia, nesta concentração os teores de aminoácidos totais diminuíram nas raízes. Na parte aérea, ocorreu aumento no teor de proteínas totais e carboidratos e nas raízes aumento dos teores de carboidratos. Analisando-se as características anatômicas verificou-se redução do diâmetro polar, equatorial e da relação entre DP/DE dos estômatos, no entanto, houve aumento na densidade estomática em função do aumento da salinidade. De modo geral, concentrações mais elevadas de NaCl afetaram o desenvolvimento de copo-de-leite em todos os parâmetros analisados, indicando ser essa espécie sensível ao estresse salino.

Palavras-chave: *Zantedeschia aethiopica*. Salinidade. Ecofisiologia. Anatomia. Floricultura.

ABSTRACT

Soil salinity is a problem in agricultural production, especially floriculture, being caused mainly by excessive use of fertilizers and use of inadequate water quality, mainly in crops grown in greenhouses. Salt stress inhibits plant growth by restricting the availability of water, causing morphological, structural, metabolic and physiological changes. This experiment aimed to evaluate the growth responses, ecophysiological, biochemical and anatomical in the early development of calla lily plants (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng) subjected to salt stress by NaCl. Rhizomes were cultivated in plastic trays with coconut fiber substrate and the treatments were 0; 25; 50; 75 and 100 mM NaCl manually applied through irrigation to induce salt stress, and evaluations carried out after 60 and 90 days. Were evaluated the growth parameters, photosynthesis, stomatal conductance, transpiration rate, relative chlorophyll content, amino acids, total protein, total soluble sugars, reducing sugars, non-reducing sugars and starch in addition to the anatomical features of leaves and roots. After 60 and 90 days was observed decrease in plant height. The number of tillers and leaves, main root length, fresh and dry weight of shoot and root system, water content of the root system, the relationship between the shoot/root system also reduced after 90 days of imposition of salt stress, causing a greater allocation of dry matter in the roots. The photosynthetic rate, stomatal conductance, transpiration rate and relative chlorophyll content after 60 days reduced with increasing concentration of NaCl. However, after 90 days, the photosynthetic rate was unchanged, with increased stomatal conductance, the transpiration rate, besides the chlorophyll content of plants exposed to 75 mM NaCl as compared to the control treatment. The salt stress caused higher accumulation of total amino acids in the leaves in 50 mM NaCl, however, this concentration the total amino acids levels decreased in the roots. In the shoot, there was an increase in the levels of total protein and carbohydrates and roots increased carbohydrate content. Analyzing the anatomical characteristics it was reducing the polar diameter, equatorial and the relationship between DP/DE of the stomata, however, there was an increase in stomatal density due to increased salinity. In general, higher concentrations of NaCl affected the development of calla lily in all parameters, indicating that this species is susceptible to salt stress.

Keywords: *Zantedeschia aethiopica*. Salinity. Ecophysiology. Anatomy. Floriculture.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Floricultura.....	13
2.2 Copo-de-leite.....	13
2.3 Estresse salino sobre as plantas.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Condução do experimento.....	18
3.1.1 Avaliações de crescimento.....	18
3.1.2 Avaliações ecofisiológicas.....	19
3.1.3 Avaliações bioquímicas.....	20
3.1.4 Avaliações anatômicas.....	20
3.1.5 Análises estatísticas.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Avaliações de crescimento.....	23
4.2 Avaliações ecofisiológicas.....	31
4.3 Avaliações bioquímicas.....	36
4.4 Avaliações anatômicas.....	41
5 CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

A floricultura é um setor altamente competitivo que abrange o cultivo de plantas ornamentais, desde flores de corte e plantas envasadas, até a produção de sementes, bulbos e mudas de árvores de grande porte (DUVAL, 2014; LANDGRAF; PAIVA, 2009). Nos últimos anos tem apresentado expressivo crescimento econômico mundial e nacional, sendo produzidas mais de 350 espécies ornamentais no Brasil, incluindo a cultura do copo-de-leite (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng), a qual é realizada principalmente na região Sul de Minas Gerais (IBRAFLOR, 2015; LANDGRAF; PAIVA, 2009).

O habitat de cultivo de copo-de-leite são áreas de brejos e beiradas de rios, porém para produções de fins comerciais não é recomendado o plantio nessas áreas, devido à umidade constante que leva ao aparecimento de doenças, principalmente de bactérias, como *Pectobacterium carotovorum*. Dessa forma é realizado em áreas bem drenadas, com irrigação constante, mantendo a umidade alta (PAIVA; ALMEIDA, 2012). Assim, águas com baixa qualidade podem causar sérios danos nas plantas de copo-de-leite.

O bom desenvolvimento da cultura também é comprometido pelo desbalanceamento nutricional, uma vez que, informações sobre adubação ainda são escassas e o uso empírico com doses elevadas de fertilizantes prejudica a produção e a qualidade das inflorescências, principalmente pela salinidade causada pelo excesso dos fertilizantes (ALMEIDA et al., 2012; SOUZA et al., 2010).

As principais causas do estresse salino nas plantas ornamentais são a utilização água de irrigação salobra de má qualidade, fertilização acima do essencial e cultivo em ambientes protegidos. Em plantas ornamentais, o excesso dos sais causa nanismo, redução da taxa de clorofila, taxa fotossintética, qualidade das plantas e das flores devido à seca fisiológica imposta e, ainda,

deficiência nutricional, principalmente de íon Cálcio (Ca^{2+}) e íon Potássio (K^+) (VEATCH-BLOHM; MALINOWSKI; KEEFER, 2012). Com o estresse, a produção de flores perde em qualidade e quantidade causando grandes perdas para os produtores.

O estresse salino é um problema frequente na floricultura, no entanto, estudos fisiológicos que mostrem os efeitos desse estresse nas plantas ornamentais são escassos e em copo-de-leite ainda são inexistentes. Dessa forma, objetivou-se avaliar as respostas de crescimento, ecofisiológicas, bioquímicas e anatômicas no desenvolvimento inicial de plantas de copo-de-leite submetidas ao estresse salino.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Floricultura

Em todo o mundo o consumo de flores e plantas ornamentais vem aumentando ao longo dos anos. No Brasil, em 2014, o setor movimentou R\$ 5,7 bilhões, tendo aumento de 9,06% quando comparado com o ano de 2008. Neste período, o número de produtores elevou 31,19%, chegando a 8.248 produtores no país, enquanto que a área cultivada aumentou em 14,47% totalizando 14.992 hectares (IBRAFLOR, 2015; JUNQUEIRA; PEETZ, 2014). Esse incremento no número de produtores contribui para o aumento da agricultura familiar no país e para a inserção da mão de obra feminina no mercado de trabalho, sendo estas duas características bem marcantes na floricultura (IBRAFLOR, 2015; JUNQUEIRA; PEETZ, 2014; LANDGRAF; PAIVA, 2009).

As rosas, crisântemos, helicônias, gérberas, estrelícias, tangos e gladiolos são as espécies mais produzidas entre as mais de 350 espécies produzidas no Brasil (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008). O sudeste do país apresenta aproximadamente 50% dos produtores do Brasil, com uma área plantada de 8.561 hectares de várias espécies de flores e plantas ornamentais. Neste contexto se destaca o copo-de-leite que é largamente produzido no estado de Minas Gerais (IBRAFLOR, 2015; LANDGRAF; PAIVA, 2009; JUNQUEIRA; PEETZ, 2014).

2.2 Copo-de-leite

O copo-de-leite (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng) pertence à família das Aráceas é nativo de regiões tropicais da África do Sul (PAIVA; ALMEIDA, 2012). Apesar de não ser nativa do Brasil é uma planta comum e bem adaptada no país, com alta rentabilidade por área plantada e alto valor

econômico, sendo uma excelente alternativa para a agricultura familiar, em razão do baixo investimento para implantação e manutenção do cultivo (PAIVA; ALMEIDA, 2012). É uma espécie perene utilizada em decorações, arranjos e jardins, devido as suas características ornamentais e período de duração pós-colheita (LAZZERESCHI et al., 2013; PAIVA; ALMEIDA, 2012).

As plantas geralmente atingem 90 cm de altura e apresentam hábito de crescimento em forma de touceira, com fase de desenvolvimento inicial lenta, sendo necessário realizar o cultivo sempre em áreas protegidas ou com meia-sombra, evitando excesso de radiação solar. A espécie floresce nos meses mais frios, entre maio e setembro, sendo que a região Centro-Sul de Minas Gerais apresenta características climáticas favoráveis para o cultivo e possui a maior área plantada com esta espécie no Estado (PAIVA; ALMEIDA, 2012). A maior produtividade ocorre quando há irradiância entre 250 a 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperaturas entre 16°C e 22°C e disponibilidade de água, visto que floresce em condições mais úmidas (RODRIGUES et al., 2014; ZURITA, 2008).

Para a cultura do copo-de-leite, ainda são escassas informações sobre nutrição, o que ocasiona muitas vezes uso excessivo de fertilizantes e adubação orgânica, levando ao estresse salino nesta cultura, comprometendo o desenvolvimento das plantas (SOUZA et al., 2010). O efeito das concentrações de biofertilizante no desenvolvimento do copo-de-leite foi analisado, e em doses mais elevadas a produção de hastes foi afetada negativamente, o que pode ter ocorrido, entre outros motivos, pelo excesso salino (FIGUEIREDO et al., 2014). Além disso, a salinidade pode ser causada pela baixa qualidade da água e pelo cultivo em ambiente protegido (RASOOL et al., 2013).

2.3 Estresse salino sobre as plantas

As plantas são frequentemente expostas a condições de estresses bióticos e abióticos, que podem ser limitantes para produção vegetal. Os estresses bióticos são causados por insetos, fungos, bactérias e vírus e os abióticos por excesso ou falta de água, temperaturas extremas, desbalanceamento nutricional, luminosidade, disponibilidade de oxigênio, concentração de íons metais e salinidade (ASHRAF; AKRAM, 2009; TAIZ; ZEIGER, 2013).

O estresse salino ocorre principalmente em regiões áridas e semi-áridas, mas a atividade antrópica tem contribuído para o aumento da salinidade (NAWAZ et al., 2010). Assim, a salinidade pode ser primária ou secundária com base nas suas fontes e causas. A salinidade primária é causada por intemperismos das rochas, ascensão capilar de água subterrânea salobra, entrada de água do mar pela costa e limitada drenagem do solo. Já a salinidade secundária é causada pela ação antrópica, como introdução de irrigação sem adequada drenagem, efluentes industriais, uso abusivo de fertilizantes, plantio em ambiente protegido, remoção da cobertura vegetal natural, inundação com águas ricas em sal e uso de água de baixa qualidade para a irrigação (DIAS et al., 2007; RASOOL et al., 2013).

O estresse salino apresenta um componente osmótico e um iônico, que são responsáveis pela inibição do crescimento das plantas. O estresse osmótico restringe a captação de água, fazendo com que as células percam a turgidez, levando a maior concentração de íons nas células e o componente iônico causa toxicidade nas plantas, podendo levar à morte celular. Em um período curto de estresse, geralmente ocorre predominância do efeito osmótico dos sais, mas em períodos mais longos os íons se acumulam e levam a distúrbios nutricionais e metabólicos. Em nível celular as respostas iniciais estão relacionadas com redução da expansão da superfície foliar, perda da turgescência, desidratação, redução do crescimento e do alongamento das raízes, além disso, ocorre

aumento da taxa respiratória e diminuição da taxa fotossintética (DIAS; BLANCO, 2010; MUNNS, TESTER, 2008; NAWAZ et al., 2010).

As alterações nas trocas gasosas ocorrem, pois o estresse osmótico causado na zona radicular diminui a disponibilidade de água para a planta. Dessa forma, ocorre síntese de ácido abscísico, o qual é transportado para as células guardas, ocorrendo então o fechamento estomático, que causa queda na fotossíntese (FRAIRE-VELÁZQUEZ; BALDERAS HERNÁNDEZ, 2013). A redução fotossintética também é causada por alterações nas estruturas dos cloroplastos, devido aos efeitos tóxicos causados pelos íons Na^+ e Cl^- , assim, ocorre decréscimo no teor de clorofilas (ASSIS JÚNIOR et al., 2007; VEATCH-BLOHM; MALINOWSKI; KEEFER, 2012).

Essas alterações devido à salinidade são variáveis dependendo da espécie, isso porque, existem plantas que são capazes de tolerar o estresse salino. Dessa forma, as plantas são classificadas em dois grandes grupos quanto à capacidade de sobrevivência nestas condições, sendo chamadas de halófitas e glicófitas. As halófitas são nativas de ambientes salinos e assim completam o ciclo de vida nestes locais. As glicófitas não toleram a salinidade da mesma maneira que as halófitas, e têm um limiar de sal acima do qual apresentam os primeiros sinais de estresse salino. Mas, este limiar é variável entre todas as espécies de glicófitas, permitindo ser classificadas em tolerantes que são aquelas que suportam de 80 a 120 mM de NaCl, moderadamente tolerantes que resistem às concentrações de 60 a 80 mM de NaCl, moderadamente sensíveis que toleram de 40 a 60 mM de NaCl e as sensíveis que sobrevivem em concentrações de 0 a 40 mM de NaCl (GIANELLO; BISSANI; TEDESCO, 1995).

A tolerância ao estresse salino acontece por meio de estratégias bioquímicas como, mudanças no metabolismo fotossintético, alterações na estrutura das membranas, indução do sistema antioxidante, síntese de

hormônios, síntese de solutos orgânicos, acumulação seletiva, eliminação, compartimentalização e controle da captação de íons (SILVEIRA et al., 2010).

Os solutos orgânicos mais importantes para o ajustamento osmótico são os aminoácidos livres totais e os açúcares solúveis totais, os quais são armazenados no citoplasma e nas organelas (SILVEIRA et al., 2010).

Além disso, a síntese de proteínas relacionadas com a biossíntese de solutos compatíveis, enzimas do sistema antioxidante, proteases, transportadores e chaperonas são a primeira linha de defesa contra o estresse (FRAIRE-VELÁZQUEZ; BALDERAS-HERNÁNDEZ, 2013), visto que, a tolerância em grande parte é conferida pela indução das enzimas do sistema antioxidante, pela homeostase iônica e pela síntese de solutos compatíveis, como prolina, malato, citrato, inositol, glicose, frutose, ascorbato e succinato (RAI et al., 2011; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Anatomicamente, o estresse salino faz com que ocorra lignificação das paredes celulares, aparecimento de Estrias de Caspary, armazenamento de cristais de oxalato de cálcio, redução de células dos feixes vasculares e desorganização na deposição das células (MELO et al., 2011; OLA et al., 2012; VEATCH-BLOHM; MALINOWSKI; KEEFER, 2012).

A espessura dos tecidos, o transporte de íons Na^+ pela via apoplástica, o número de estômatos e células da epiderme, a distância dos feixes vasculares e a diferenciação e número dos vasos de xilema também são alterados em condições de elevadas concentrações de NaCl (MELO et al., 2011; OLA et al., 2012; VEATCH-BLOHM; MALINOWSKI; KEEFER, 2012).

Em cana-de-açúcar, o estresse salino causa redução na distância entre as nervuras, área do feixe vascular, área das células do mesofilo e nas células da epiderme (AKHTAR et al., 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condução do experimento

Rizomas de copo-de-leite com aproximadamente cinco centímetros de comprimento foram cultivados em bandejas de polietileno com capacidade de 16 litros, sendo 10 rizomas por bandeja. O substrato utilizado foi fibra de coco granulada e a adubação foi realizada a cada 15 dias com adaptação da Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais-CSFEMG (1999), sendo 100 mM de NPK 13-40-13, 90 mM de nitrato de potássio, 70 mM de nitrato de cálcio, 50 mM de ureia, 80 mM de sulfato de magnésio e 1,42 mM de micronutrientes (enxofre, magnésio, boro, ferro, cobre, manganês, molibdênio e zinco).

O experimento foi conduzido em sala de crescimento com temperatura de 25°C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância média de 56 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. A aplicação dos tratamentos de salinidade foi realizada manualmente via irrigação, utilizando água destilada e iniciou 10 dias após o plantio dos rizomas, sendo aplicados em todos os dias de irrigação. As irrigações foram realizadas duas vezes por semana de forma a manter a umidade do solo próximo capacidade de campo, utilizando 0,5 l por bandeja em cada dia de irrigação.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), sendo os tratamentos constituídos de diferentes concentrações de NaCl (0, 25, 50, 75 e 100 mM) diluídas em água destilada, com as respectivas condutividades elétricas das soluções, 0,0052 dSm^{-1} , 2,3 dSm^{-1} , 4,58 dSm^{-1} , 6,86 dSm^{-1} e 9,14 dSm^{-1} , obtidas pela equação de Richards (1954) e por condutímetro digital. As avaliações foram realizadas aos 60 e 90 dias, sendo esses tempos estudados separadamente.

3.1.1 Avaliações de crescimento

Para estas avaliações foram utilizadas cinco repetições sendo duas plantas por repetição. As avaliações de crescimento não destrutivas foram realizadas aos 60 e 90 dias de tratamento salino. As análises realizadas foram altura das plantas, número de folhas e número de brotações. Para medir a altura das plantas foi utilizada régua, sendo medidas desde o ápice foliar até a extremidade superior do rizoma. Já o número de folhas e o número de brotações foram feitos por contagem direta.

Aos 90 dias foram realizadas avaliações de crescimento destrutivas: massa fresca e seca da parte aérea e das raízes, teor de água da parte aérea e do sistema radicular e o comprimento da raiz. O comprimento da raiz foi obtido com régua, medido a partir da extremidade inferior do rizoma até o ápice da raiz primária. Para obtenção da massa fresca da parte aérea e da raiz, foi utilizada balança de precisão. Posteriormente, o material foi armazenado em sacos de papel do tipo kraft e colocados em estufa de circulação forçada de ar à 70°C até atingirem o peso constante, afim de obter a massa seca, sendo calculado ao final o teor de água em porcentagem.

3.1.2 Avaliações ecofisiológicas

As avaliações ecofisiológicas foram realizadas aos 60 e 90 dias no período da manhã entre 9 e 11 horas. E foram utilizadas sete repetições por tratamento, sendo feita uma amostra por planta. A taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs) e taxa de transpiração (E) foram avaliadas utilizando o Analisador Portátil de CO₂ a infravermelho (IRGA[®] LCA-4 ADC Hoddesdon, UK). Também foi avaliado o teor relativo de clorofila através do medidor portátil de clorofila AtLeaf+[®] (FT Green LLC, Wilmington, DE).

3.1.3 Avaliações bioquímicas

As avaliações bioquímicas foram realizadas ao final do experimento, sendo coletada uma amostra por planta e três repetições por tratamento, e as análises realizadas em duplicatas.

As extrações de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, aminoácidos livres totais e proteínas totais foram realizadas em folhas e raízes pela homogeneização de 200 mg de massa seca em 5 mL de tampão fosfato de potássio, 0,1 M, pH 7,0, seguido de banho-maria à 40°C durante 30 minutos. Após a homogeneização o material foi centrifugado durante 20 minutos a 10.000 g e o sobrenadante coletado. O processo foi repetido e os sobrenadantes foram combinados. O pellet foi ressuscitado com 8 mL do tampão acetato de potássio 200 mM, pH 4,8, para a extração do amido. Foi acrescentada 2 mL da solução enzima amiloglicosidase, onde cada 1 mg da enzima foi dissolvida em 1 mL de tampão acetato de potássio 200 mM pH 4,8. O homogeneizado foi incubado em banho-maria 40°C durante duas horas e depois centrifugado a 10.000 g por 20 minutos, o sobrenadante foi coletado e o volume completado para 15 mL.

Para a quantificação de açúcares solúveis totais e amido foi realizado o método da Antrona (YEMM; WILLIS, 1954), para os açúcares redutores foi utilizado o método de DNS (MILLER, 1959) e a quantificação de açúcares não redutores foi obtida por diferença entre a quantidade de açúcares solúveis totais e açúcares redutores. Os aminoácidos livres totais foram quantificados pelo método da Ninhidrina (YEMM; COCKING, 1955) e as proteínas totais pelo método de Bradford (1976).

3.1.4 Avaliações anatômicas

As amostras para as análises anatômicas foram coletados aos 90 dias após a imposição do estresse. Foram coletadas folhas completamente expandidas e as raízes e estas foram armazenadas em álcool 70% (v. v⁻¹) até a realização dos cortes anatômicos.

Foram realizados cortes transversais nas folhas e nas raízes, sendo que nas folhas foram realizados cortes nas faces epidérmicas abaxiais e adaxiais. Os cortes foram feitos à mão livre utilizando lâminas de aço. E então, submetidos à clarificação com hipoclorito de sódio 2%, tríplice lavagem em água destilada e foram corados com solução de azul de Astra a 0,1% e safranina a 1% na proporção de 7:3 (KRAUS; ARDUIN, 1997). Posteriormente, foram montadas lâminas semipermanentes utilizando água glicerinada 50%, e estas foram seladas com esmalte incolor. As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio Zeiss Scope AX10[®] acoplado à câmera digital e fotomicrografadas em software Axio Vision R.L. 4.8[®].

Os parâmetros anatômicos observados nas folhas foram: diâmetro polar, equatorial dos estômatos e densidade estomática. A densidade estomática foi obtida pelo número de estômatos por mm² (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Foram realizadas 15 repetições por tratamento para avaliar o DP e DE e cinco para a densidade (nº estômatos/mm²). Nas raízes foram analisadas a presença de Estrias de Caspary e a formação de raízes laterais.

3.1.5 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância; quando significativos (P<0,05) pelo teste F, foram submetidos à análise de regressão e a escolha da equação foi baseada no maior coeficiente de determinação (R²). Quando polinomial, após a derivação da equação determinou-se os pontos de inflexão

das curvas. Foi utilizado o software Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados (SISVAR[®]) (FERREIRA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estresse salino imposto por NaCl na água de irrigação inibiu o desenvolvimento das plantas de copo-de-leite quando aplicadas as concentrações de 25, 50, 75 e 100 mM de NaCl (Figura 1). Aos 60 dias, foram realizadas as análises de crescimento em todas as concentrações de NaCl, no entanto, com o aumento do tempo de imposição ao estresse salino foram observadas as primeiras consequências da presença de íons tóxicos Na^+ e Cl^- , os quais causaram necroses dos tecidos foliares e a aceleração da senescência das folhas maduras na concentração de 100 mM de NaCl, impedindo que fossem analisadas algumas variáveis estudadas.

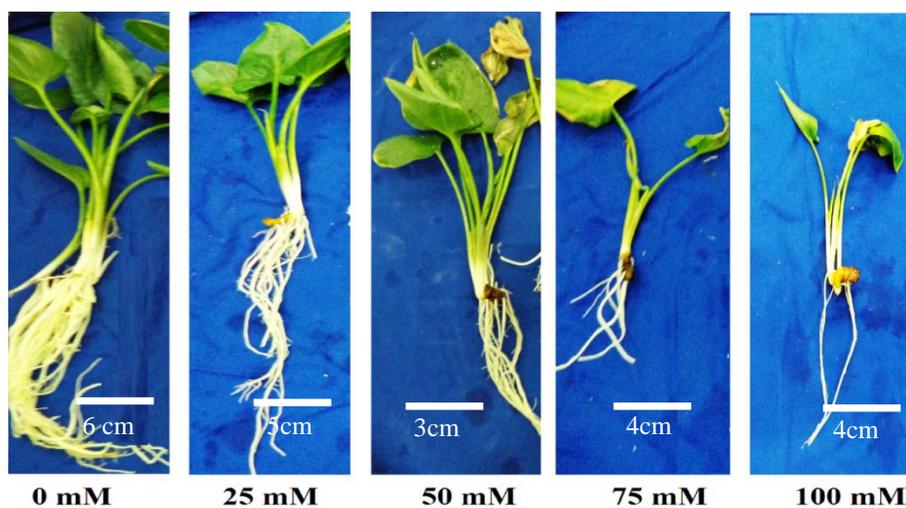


Figura 1 Aspecto visual das plantas de copo-de-leite submetidas ao estresse salino com 0, 25, 50, 75 e 100 mM de NaCl, após 90 dias

4.1 Avaliações de crescimento

A altura das plantas aos 60 e 90 dias apresentaram redução com o aumento da concentração de NaCl (Figuras 2A e 2B). Aos 60 dias, na concentração de 75 mM de NaCl, ocorreu redução de 52,15% e, em 100 mM, de 69,73% em comparação com o tratamento controle (Figura 2A). Aos 90 dias de avaliação, a aplicação de 100 mM de NaCl limitou fortemente o desenvolvimento das plantas, dessa forma, as avaliações foram realizadas até o tratamento de 75 mM. Neste tratamento, a altura das plantas reduziu até 63,64% em relação às plantas que não receberam estresse (Figura 2B), reduzindo 15% quando comparada com as plantas do mesmo tratamento após 60 dias (Figuras 2A e 2B).

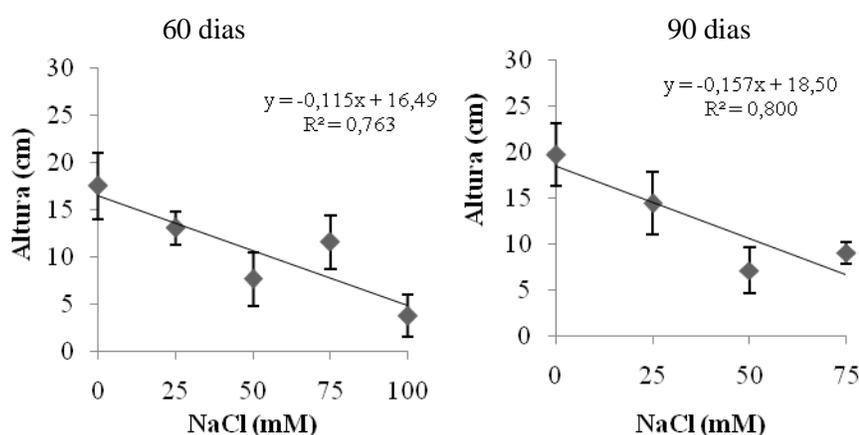


Figura 2 Altura das plantas de copo-de-leite submetidas às concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100 mM de NaCl

Quanto ao número de perfilhos e folhas, não foram verificados alterações com o aumento da concentração de NaCl após 60 dias. Entretanto, aos 90 dias, para o número de perfilhos houve aumento até a concentração máxima estimada de 32,5 mM de NaCl (Figura 3A). Esse aumento pode ser justificado

pela essencialidade do cloro como micronutriente, sendo necessário para o melhor desenvolvimento das plantas, quando em níveis adequados (EMMANUEL et al., 2004).

Para o número de folhas, observou-se redução com o incremento das concentrações de NaCl (Figura 3B). Esse resultado pode estar associado ao acúmulo de Na^+ e Cl^- nas paredes das células e citoplasma das folhas mais velhas (NAWAZ et al., 2010). Visto que, a maior absorção destes íons em níveis tóxicos pode ter acarretado maior translocação para a parte aérea, mostrando que as raízes não apresentaram mecanismo de retenção dos íons com o aumento do estresse salino (SOUZA et al., 2011). No entanto, a redução também pode ser um mecanismo adaptativo das plantas para minimizar a perda de água por transpiração (CUNHA et al., 2013).

O comprimento da raiz principal reduziu com o aumento das concentrações de NaCl, devido a restrições na divisão e alongação celular, ocorrendo, principalmente, pela toxicidade iônica que ocorre na rizosfera (Figura 3C) (GALVAN-AMPUDIA; TESTERINK, 2011).

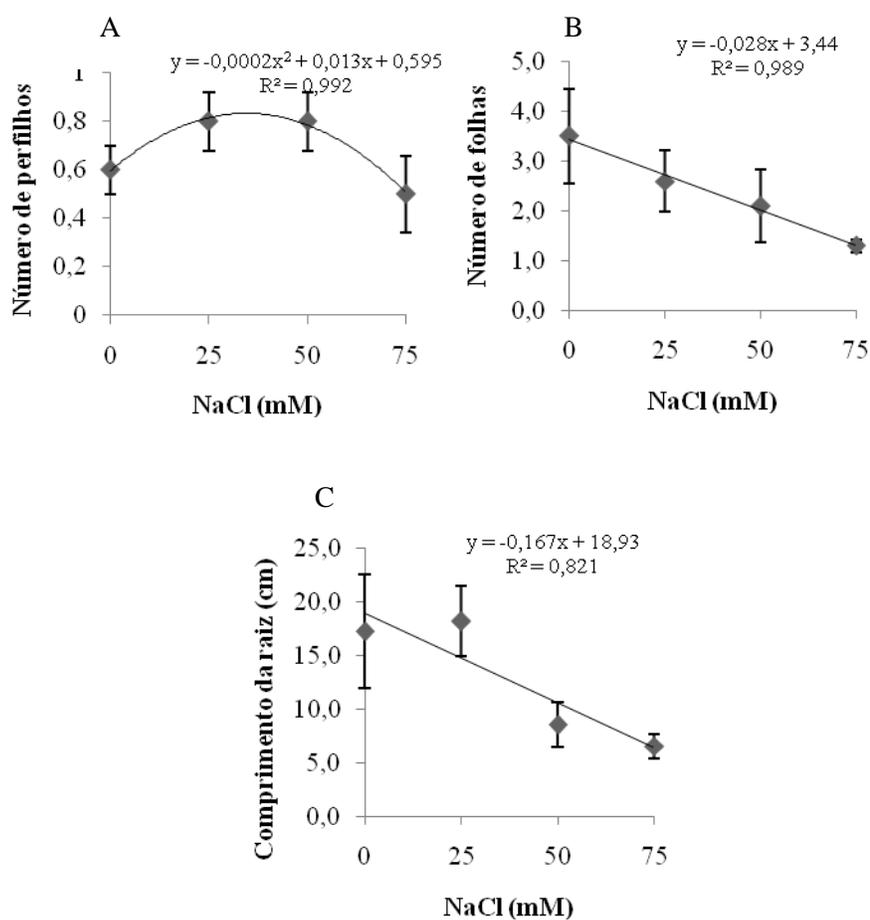


Figura 3 Número de perfilhos (A), número de folhas (B) e comprimento da raiz (C) das plantas de copo-de-leite, após 90 dias, submetidas às concentrações de 0, 25, 50 e 75 mM de NaCl

A redução da altura já no primeiro tempo de avaliação pode ter ocorrido, dado que, um dos efeitos da salinidade em curto prazo é a redução da altura da planta devido ao efeito osmótico dos sais que limita a expansão celular (MUNNS, 2002). No entanto, neste mesmo período, não ocorreram diferenças

para o número de perfilhos e de folhas, o que indica que a sensibilidade para estes dois fatores ocorre em um prazo maior, visto que, após 90 dias ocorreu decréscimo com o aumento da concentração salina.

Dessa forma, após 90 dias, as análises de altura da planta, número de perfilhos, número de folhas e comprimento das raízes seguiram o mesmo comportamento, reduzindo com o aumento da salinidade (Figuras 2B, 3A, 3B e 3C). O que pode estar relacionado com a ocorrência de alterações morfológicas, como inibição da divisão e alongação celular (SHABALA; MUNNS, 2012).

O aumento da imposição do estresse salino sobre as plantas de copo-de-leite causou decréscimo da massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular (Figuras 4A, 4B, 4C e 4D).

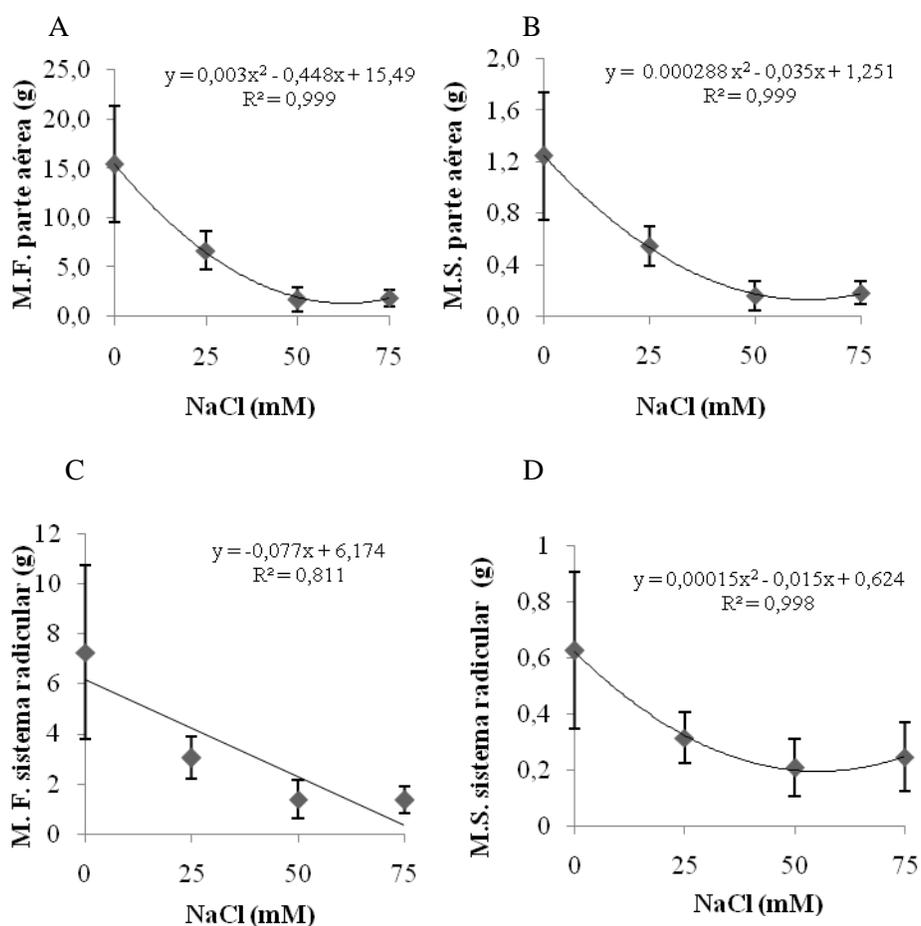


Figura 4 Massa fresca da parte aérea (A), massa seca da parte aérea (B), massa fresca do sistema radicular (C) e massa seca do sistema radicular (D) de plantas de copo-de-leite após 90 dias, submetidas às concentrações de 0, 25, 50 e 75 mM de NaCl

A relação massa seca da parte aérea/sistema radicular apresentou decréscimo com o aumento da concentração salina (Figura 5A). Os resultados demonstraram que nas concentrações de 0 mM e 25 mM de NaCl a alocação da massa seca foi maior na parte aérea, no entanto, com o aumento da concentração salina para 50 mM e 75 mM de NaCl ocorreu o inverso, evidenciando ter

ocorrido maior particionamento da massa seca para o sistema radicular, o que pode ter ocorrido pela maior translocação dos íons (Figura 5B). A maior redução na massa seca da parte aérea pode ocorrer pela translocação dos íons a partir do sistema radicular, os quais em concentrações mais altas se tornam citotóxicos e causam danos no desenvolvimento da planta (NAWAZ et al., 2010).

Esses dados corroboram com o fato da massa seca da parte aérea ter reduzido em 80,33%, enquanto que o sistema radicular reduziu em apenas 44,43% na concentração de 75 mM de NaCl em relação ao tratamento controle (Figura 4B e 4D) e também podem estar relacionados com a redução do crescimento da parte aérea como um todo, com redução da altura, número de perfilhos e número de folhas, que provavelmente também ocorreram devido à maior translocação dos íons para a parte aérea (Figuras 2, 3A e 3B).

Estes resultados, da mesma forma que os dados para a altura da parte aérea, número de perfilhos e folhas, permitem classificar a sensibilidade da espécie ao estresse salino, uma vez que, plantas com maior tolerância restringem o acúmulo de íons Na^+ e Cl^- na parte aérea por meio de compartimentalização no sistema radicular, apresentando maior alocação de massa seca na parte aérea e não nas raízes (CAVALCANTI et al., 2004).

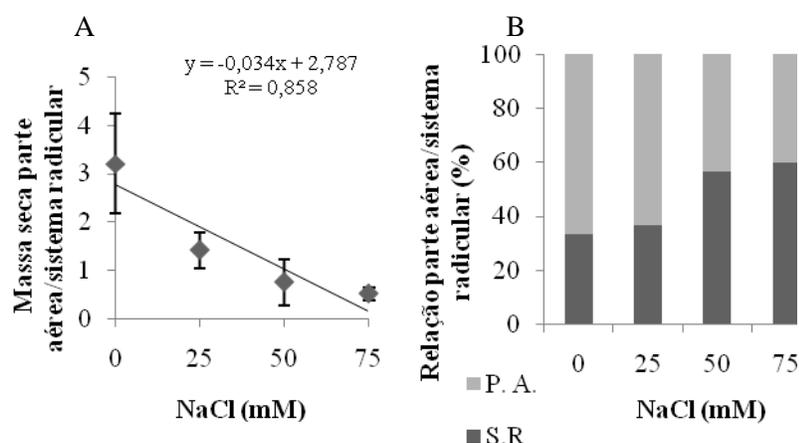


Figura 5 Relação entre massa seca da parte aérea/sistema radicular (A) e alocação de massa seca na parte aérea e no sistema radicular (B) de plantas de copo-de-leite após 90 dias submetidas às concentrações de 0, 25, 50 e 75 mM de NaCl. P.A.: parte aérea, S.R.: sistema radicular

Os dados de teor de água da parte aérea não apresentaram diferenças significativas. Isso pode ter ocorrido pelo aumento do tamanho dos vacúolos para armazenarem maiores quantidades de Na^+ e Cl^- , sendo possível aumentar a quantidade de água translocada a partir das raízes (MUNNS et al., 2002). Todavia, nas raízes o teor de água diminuiu com o aumento da concentração salina (Figura 6). Essa diferença no teor de água nas raízes reflete a absorção de água limitada em condições de elevada salinidade devido ao efeito osmótico, acarretando um fenômeno conhecido como seca fisiológica ou ainda o maior transporte de água para a parte aérea, devido à translocação dos íons (PRISCO; GOMES FILHO, 2010).

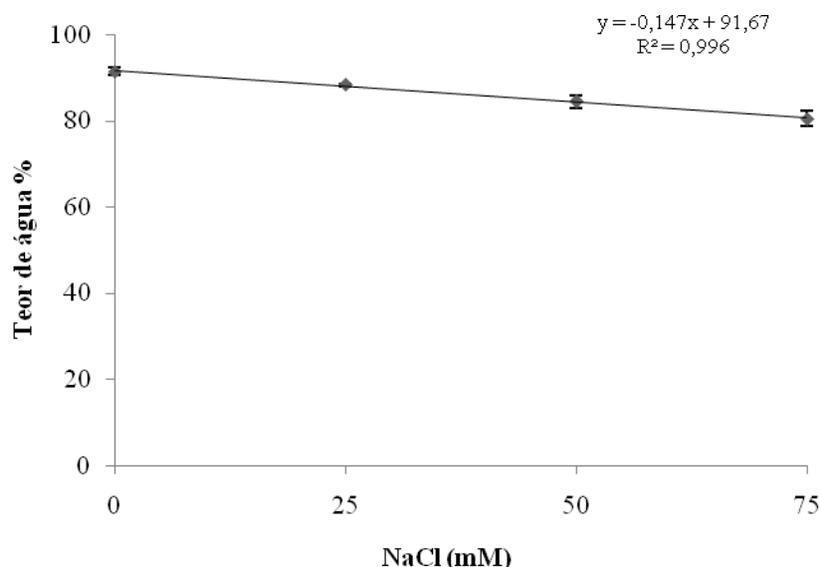


Figura 6 Teor de água das raízes de copo-de-leite submetidos às concentrações de 0, 25, 50 e 75 mM de NaCl por 90 dias

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a alta concentração salina afeta o desenvolvimento do copo-de-leite (*Zantedeschia aethiopica*). No entanto, resultados contrários foram encontrados para *Zantedeschia K. Koch*, que apresentou tolerância ao estresse salino. Para esta espécie, a concentração de 50 mM de NaCl não alterou o número de perfilhos, peso seco, teor de água e conteúdo de pigmentos. E esses resultados podem ter ocorrido devido à menor translocação dos íons Na^+ e Cl^- , pois estes provavelmente ficaram retidos nos rizomas (VEATCH-BLOHM; MORNINGSTAR, 2011).

4.2 Avaliações ecofisiológicas

A taxa fotossintética (A) após 60 dias de estresse salino diminuiu à medida que houve aumento nas concentrações de NaCl (Figura 7), uma vez que,

o estresse salino acarreta o aumento da taxa de respiração e consequente diminuição da fotossíntese (TAKEMURA et al., 2000).

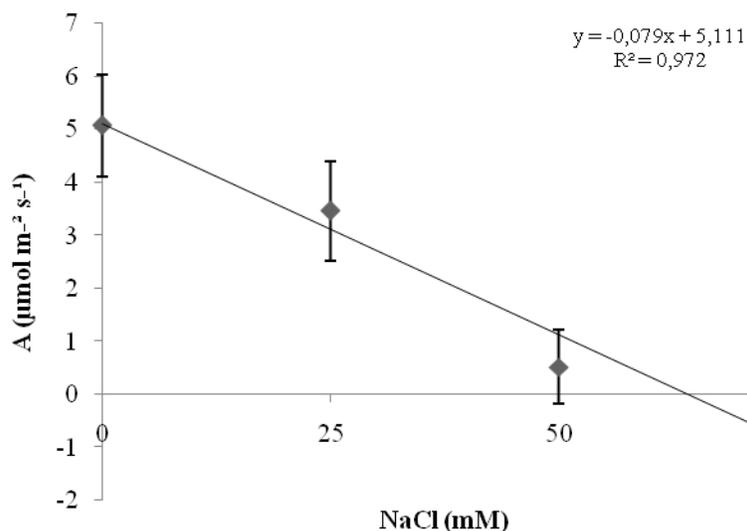
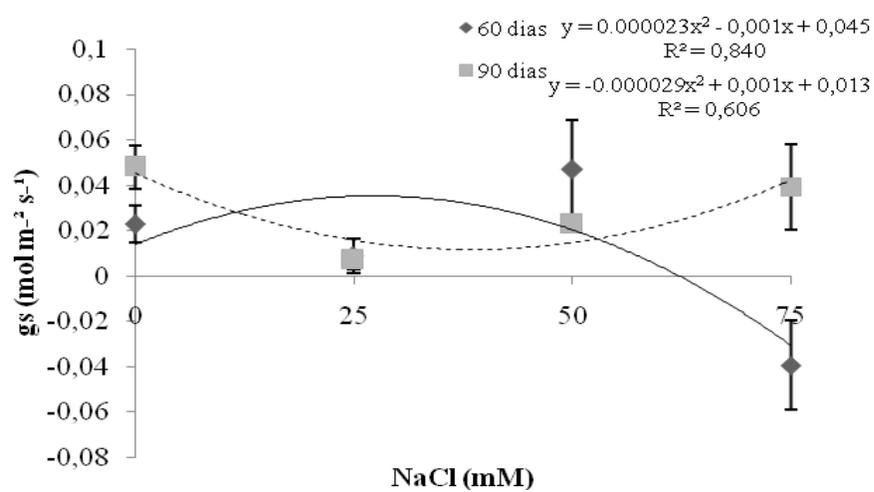


Figura 7 Taxa fotossintética- A de plantas de copo-de-leite após 60 dias submetidas às concentrações de 0, 25, 50 e 75 mM de NaCl

A redução na taxa fotossintética justifica a inibição do crescimento encontrada para o copo-de-leite após 60 dias de imposição de NaCl (Figura 2A). Visto que, a menor taxa de crescimento durante o estresse salino é frequentemente acompanhada pela baixa assimilação fotossintética de CO_2 (SILVA et al., 2008). Foi verificado ainda, diminuição na condutância estomática, taxa de transpiração e índice de clorofilas (Figuras 8A, 8B e 9), que estão relacionados com a menor taxa fotossintética (ALAM et al., 2015; RIVERO et al., 2014; VEATCH-BLOHM; MALINOWSKI; KEEFER, 2012).

A



B

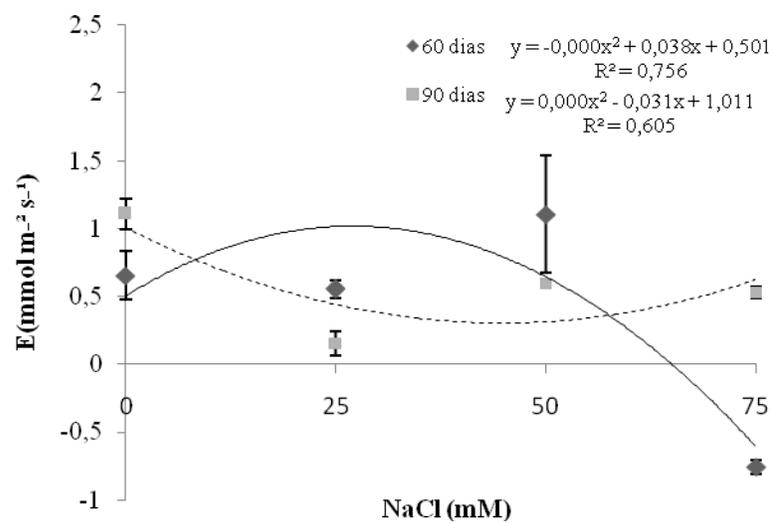


Figura 8 Condutância estomática- g_s (A) e taxa de transpiração- E (B) de plantas de copo-de-leite após 60 e 90 dias submetidas às concentrações de 0, 25, 50 e 75 mM de NaCl

Aos 90 dias a taxa de fotossíntese não apresentou diferenças entre as concentrações de NaCl, e isso pode ocorrer durante o estresse salino mesmo quando outros fatores sinalizam a ocorrência do estresse, uma vez que, alterações anatômicas nas folhas, como maior densidade de cloroplastos e densidade estomática podem resultar em maior condutância estomática e taxa de transpiração (SHABALA; MUNNS, 2012), o que pode ser confirmado pelos resultados observados (Figuras 15A e 15B).

A condutância estomática (gs) medida aos 60 dias foi superior na concentração máxima estimada de 23,25 mM de NaCl (Figura 8A), conseqüentemente reduziu a taxa de transpiração (Figura 8B). A redução da condutância estomática permite as plantas manterem baixos os níveis de íons tóxicos, funcionando como um mecanismo de proteção, que permite a economia e o uso eficiente de água (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009; FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2014). Dessa forma, a condutância estomática é reduzida imediatamente e transitoriamente (PARIDA; DAS, 2005), o que evita a perda de água pela transpiração, sendo considerado com um mecanismo adaptativo da planta (DEBEZ et al., 2013). Contudo, a redução da condutância estomática diminui a assimilação fotossintética de CO₂ e, paralelamente, a produção de fotoassimilados, o que limita o crescimento da planta (FEIJÃO et al., 2011), como foi observado para o copo-de-leite (Figuras 2, 3A e 3B).

Aos 90 dias após a imposição do estresse salino, a condutância estomática reduziu até concentração mínima estimada de 39,13 mM, concomitantemente foi observado aumento na taxa de transpiração (Figura 8A e 8B).

O teor relativo de clorofila foi maior em plantas tratadas com 25 mM de NaCl e diminuiu com o aumento das concentrações salinas aos 60 dias. Aos 90 dias, em 75 mM de NaCl, o teor relativo de clorofila não diferiu dos dados encontrados no tratamento controle (Figura 9), o que justifica a inalteração da

taxa fotossintética encontrada aos 90 dias, pois maior concentração de clorofila pode indicar a maior densidade de cloroplastos e dessa forma não ocorre queda na taxa fotossintética (SHABALA; MUNNS, 2012).

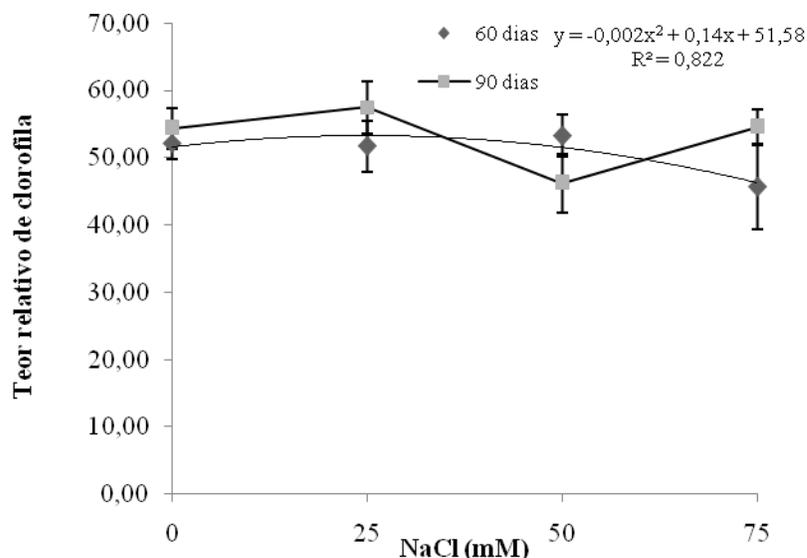


Figura 9 Teor relativo de clorofila nas folhas de copo-de-leite submetidas às concentrações de 0, 25, 50 e 75 mM de NaCl por 60 e 90 dias

A redução do teor relativo de clorofila também ocorreu em girassol (SANTOS, 2004) e *Portulaca oleracea* L. (ALAM et al., 2015) tratado com NaCl. Isso ocorre devido à degradação das clorofilas, principalmente pelas clorofilases, no início do estresse salino e também por alterações na síntese de clorofila, devido à redução da síntese de ácido 5-aminolevulínico (ALA), (SANTOS, 2004; VEATCH-BLOHM; MALINOWSKI; KEEFER, 2012).

As características encontradas na taxa fotossintética, condutância estomática, taxa de transpiração e teor relativo de clorofila permitem inferir que a espécie é sensível às concentrações de salinidade, uma vez que, a tolerância é

conferida quando a planta mantém taxa de fotossíntese líquida e condutância estomática altas, com o mínimo de transpiração e não ocorra degradação das clorofilas (IVANOVA et al., 2014). Plantas de *Ocimum pilosum* Willd também apresentaram decréscimo na taxa fotossintética, condutância estomática e taxa de transpiração com o aumento da concentração salina na água de irrigação (TARCHOUNE et al., 2012).

4.3 Avaliações bioquímicas

Os dados para a concentração de aminoácidos totais na parte aérea e no sistema radicular não se ajustaram a nenhum modelo de regressão, ainda assim, foi verificado que em 50 mM de NaCl, os níveis de aminoácidos totais foram superiores na parte aérea e inferiores no sistema radicular (Figuras 10A e 10B).

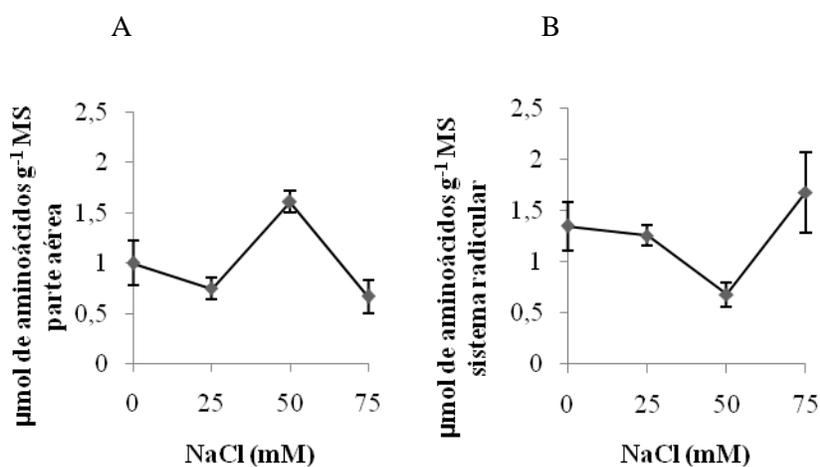


Figura 10 Teor de aminoácidos (µmol) por g⁻¹ MS na parte aérea (A) e no sistema radicular (B) de plantas de copo-de-leite submetidas às concentrações de 0, 25, 50 e 75 mM de NaCl por 90 dias

O aumento na concentração de aminoácidos na parte aérea pode estar relacionado à quebra de proteínas, disponibilidade de nitrogênio orgânico, energia, manutenção do pH celular e eliminação dos radicais livres (KRASENSKY; JONAK, 2012; PARIDA; DAS, 2005). O incremento também pode ser devido à manutenção do equilíbrio osmótico durante o estresse salino, possibilitando maior acúmulo de solutos compatíveis, como a prolina, que contribui para o equilíbrio hídrico e integridade de proteínas, enzimas e membranas celulares (ASHRAF; ASHRAF; MUHAMMAD, 2012).

Nas raízes, o decréscimo no teor de aminoácidos pode estar relacionado com a alocação para a parte aérea, auxiliando no ajustamento osmótico, uma vez que, durante o estresse salino os aminoácidos livres mais abundantes (cisteína, arginina, metionina) são reduzidos, já prolina, valina, isoleucina e aspartato aumentam na presença dos íons Na^+ e Cl^- (EL-SHINTINAWY; EL-SHOURBAGY, 2001). Dessa forma, a provável translocação dos íons tóxicos para a parte aérea acarretou maior síntese destes aminoácidos relacionados com o ajustamento osmótico.

Os teores de proteínas nas raízes não apresentaram diferenças entre as concentrações de NaCl. No entanto, na parte aérea, com 75 mM de NaCl, o teor de proteínas foi superior em quase cinco vezes ao tratamento controle (Figura 11).

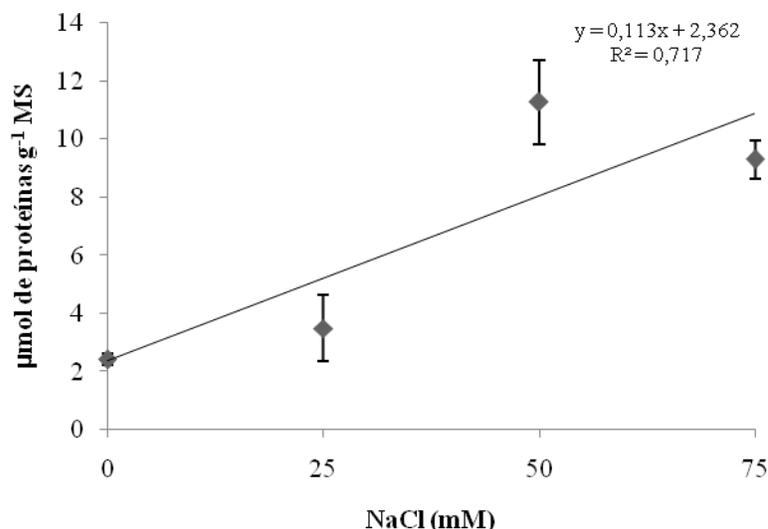


Figura 11 Teor de proteínas (μmol) por g^{-1} MS na parte aérea de plantas de copo-de-leite submetidas às concentrações de 0, 25, 50 e 75 mM de NaCl por 90 dias

A diferença obtida no teor de proteínas apenas na parte aérea pode ter ocorrido devido à possível translocação dos íons a partir das raízes concordando com os resultados referentes à relação entre a massa seca da parte aérea/sistema radicular e consequente redução dos parâmetros de crescimento. O aumento de proteínas nas folhas pode ter ocorrido, pois o estresse salino mesmo causando a quebra de algumas proteínas estimula à síntese de muitas outras nas folhas, como deidrinhas, que são importantes para manter a estrutura de outras proteínas, fazer a estabilização das membranas celulares e a sinalização de respostas à salinidade (TESTER; DAVENPORT, 2003).

Na parte aérea, os dados para os teores de açúcares solúveis totais e não redutores em 50 mM de NaCl foram superiores, aumentando em 76,79% (Figura 12A) e 73,94% (Figura 12B), respectivamente quando comparado ao controle. Todavia, os teores de açúcares redutores não apresentaram diferenças entre as

concentrações e o pico dos teores de amido ocorreram na concentração de 70,45 mM de NaCl (Figura 12C).

Nas raízes, a concentração de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e não redutores aumentaram com o incremento das doses de cloreto de sódio (Figuras 12A, 12B, 12D). Os dados para amido apresentaram os menores teores na concentração mínima estimada de 35,08 mM de NaCl (Figura 12C).

O aumento nos teores de carboidratos (AST, AR, ANR e amido) nas concentrações mais elevadas de NaCl (50 mM e 75 mM de NaCl) pode ser uma tentativa de sobrevivência durante o estresse, pois aumentos nos teores de açúcares solúveis totais, açúcares não redutores e amido estão relacionados à manutenção do equilíbrio osmótico da célula, visando manter o nível de água necessário para o ajustamento osmótico (LACERDA et al., 2001). Além disso, o aumento do conteúdo de carboidratos corrobora com a redução dos parâmetros de crescimento avaliados, uma vez que, a produção de fotoassimilados é maior do que é prontamente utilizado pelas plantas durante o estresse salino, já que nestas condições a taxa de crescimento das plantas é mais sensível ao estresse salino do que a fotossíntese, dessa forma, ocorre acúmulos destes solutos quando o crescimento é inibido (BEZERRA et al., 2003; SAIRAM; TYAGI, 2004). Resultados semelhantes foram encontrados em *Jatropha curcas* L. e em *Piptadenia moniliformis* Benth, para os teores de açúcares solúveis totais (CUNHA et al., 2013; GOMES et al., 2012).

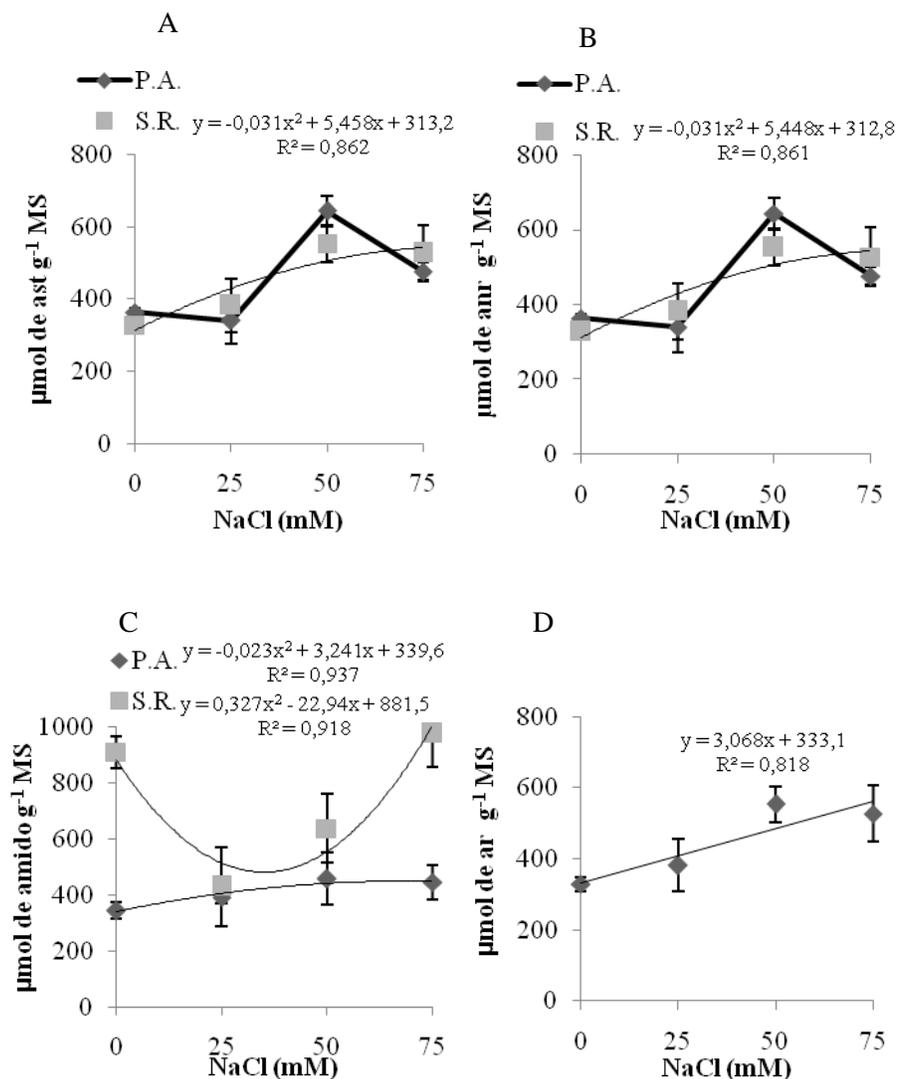


Figura 12 Teor de açúcares solúveis totais (A), açúcares não redutores (B), amido (C) e açúcares redutores (D) (μmol) por g^{-1} MS na parte aérea e no sistema radicular de plantas de copo-de-leite submetidas às concentrações de 0, 25, 50 e 75 mM de NaCl por 90 dias. AST: açúcares solúveis totais, ANR: açúcares não redutores, AR: açúcares redutores, P.A.: parte aérea, S.R.: sistema radicular

Neste trabalho a alteração na síntese proteica, o aumento no teor de carboidratos e a redução da taxa fotossintética estão fortemente relacionados

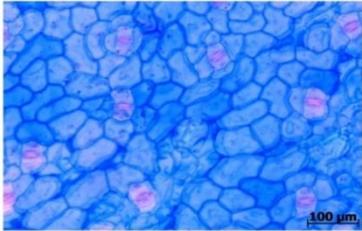
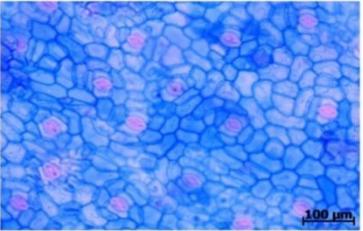
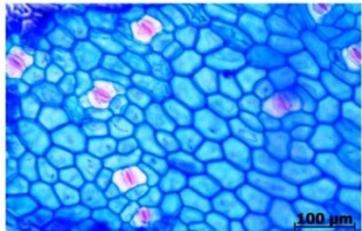
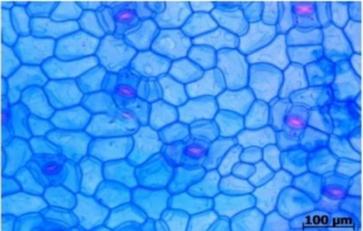
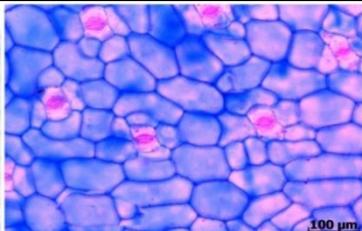
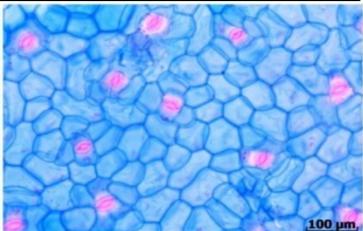
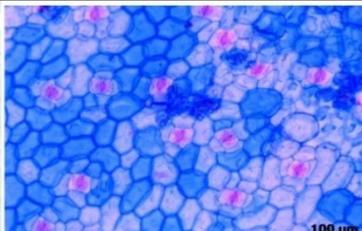
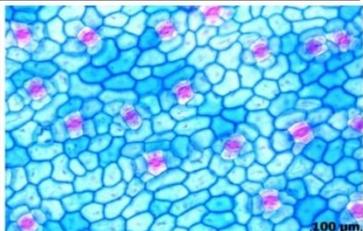
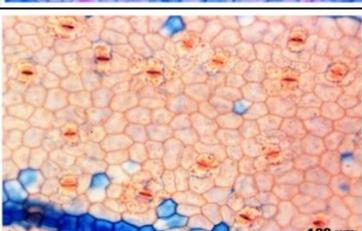
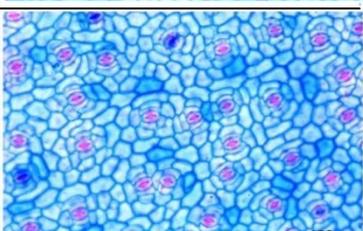
com a inibição do crescimento das plantas de copo-de-leite durante o estresse salino. Deste modo, a provável translocação de aminoácidos das raízes para a parte aérea não foi suficiente para a espécie realizar o ajustamento osmótico e manter uma tolerância ao estresse.

No sistema radicular, o incremento dos teores de carboidratos pode representar tentativa de proteção ao rizoma durante o estresse salino (PRISCO; GOMES FILHO, 2010), visto que, este serve como reserva nutricional possibilitando futura regeneração de uma nova planta.

4.4 Avaliações anatômicas

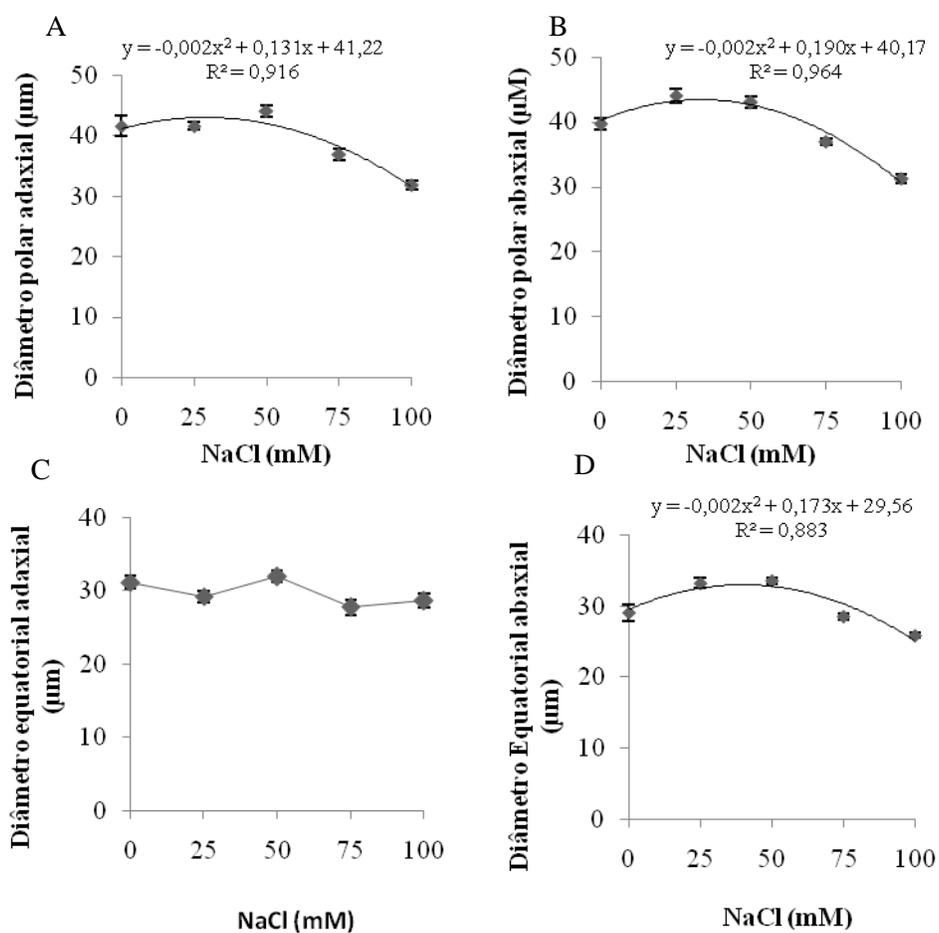
As folhas apresentaram estômatos diacíticos em ambas às faces epidérmicas, no entanto, a epiderme abaxial apresentou maior densidade estomática comparado à epiderme adaxial, sendo classificada como anfihipoestomática (Tabela 1).

Tabela 1 Cortes transversais das folhas de plantas de copo-de-leite submetidas às concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100 mM de NaCl após 90 dias de imposição do estresse salino

NaCl (mM)	Epiderme Adaxial	Epiderme Abaxial
0		
25		
50		
75		
100		

As análises das seções transversais das folhas e das raízes de copo-de-leite mostraram que a anatomia destas estruturas foram afetadas pelo aumento na concentração de NaCl. Nas folhas ocorreram reduções do diâmetro polar (DP) (Figuras 14A e 14B) e equatorial (DE) (Figuras 14C e 14D) dos estômatos da epiderme abaxial e adaxial com o aumento da salinidade.

Com o incremento de NaCl para 100 mM ocorreu redução na relação DP/DE na epiderme adaxial e abaxial(Figura 14E e 14F).



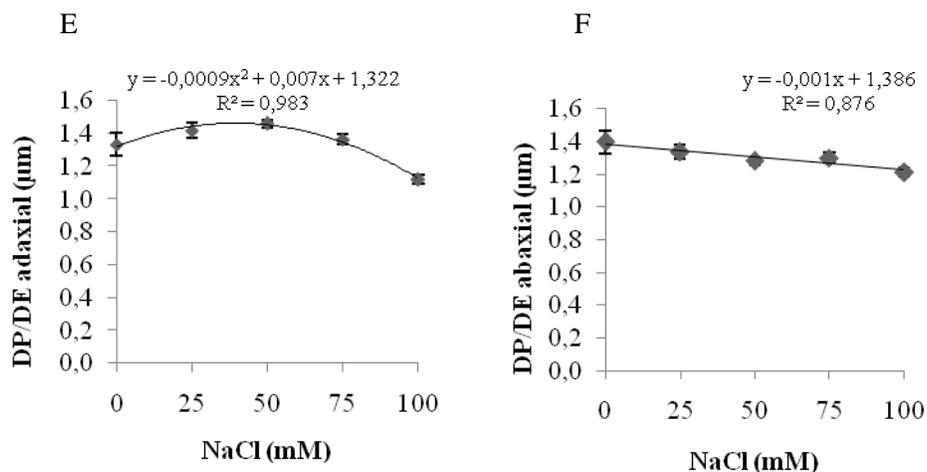


Figura 14 Diâmetro polar adaxial (A) e abaxial (B), Diâmetro equatorial adaxial (C) e abaxial (D) e relação DP/DE dos estômatos da epiderme adaxial (E) e abaxial (F) da epiderme de folhas de plantas de copo-de-leite submetidas às concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100 mM de NaCl por 90 dias

Quanto à densidade estomática (número de estômatos/mm²) os valores observados em ambas as faces epidérmicas corroboram com os obtidos por Yiotis e Psara (2011), para a mesma espécie estudada neste trabalho. No entanto, verificou-se com a aplicação da salinidade um aumento da densidade estomática (Figuras 15A e 15B).

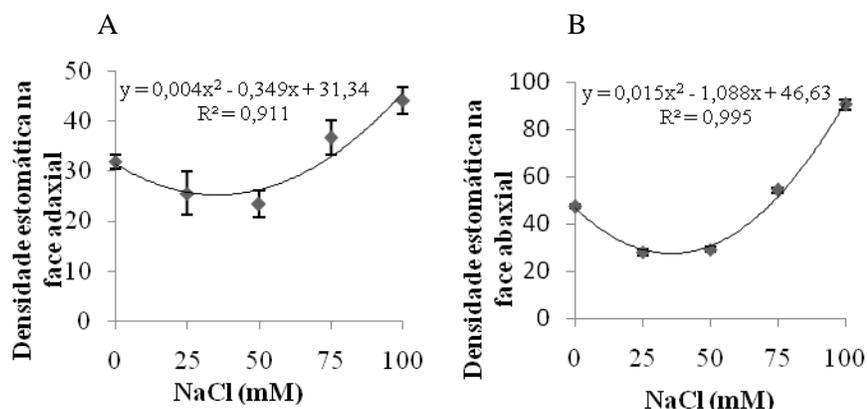


Figura 15 Densidade estomática (número de estômatos/mm²) na epiderme adaxial (A) e abaxial (B) em plantas de copo-de-leite submetidas às concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100 mM de NaCl por 90 dias

Em condições normais o número de estômatos da superfície abaxial da epiderme é aproximadamente 32,5% maior do que na superfície adaxial para o copo-de-leite, no entanto, com o aumento da salinidade essa diferença aumenta para 51%, sendo um mecanismo de adaptação durante o estresse salino, uma vez que, as plantas tendem a manter o microclima na epiderme abaxial com maior número de estômatos (VENKATARAMANA; RAO; NAIDU, 1986) (Figuras 15A e 15B). Esses resultados podem estar relacionados com o aumento da condutância estomática e da taxa de transpiração que foram encontrados durante o estresse salino (Figuras 8A e 8B). Tal resultado indica que a espécie não manteve os mecanismos adaptativos para o uso eficiente de água, uma vez que, ocorreu aumento da taxa de transpiração enquanto ocorria o processo de seca fisiológica, como pode ser observado pela redução dos parâmetros de crescimento analisados. O aumento da densidade estomática na epiderme abaxial faz com que a taxa fotossintética não seja alterada durante o estresse (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

Resultados contrários foram encontrados em *Lotus tenuis* Wald, que com o aumento da salinidade não apresentou alterações na densidade estomática, no entanto, ocorreu redução da abertura estomática quando comparada com o tratamento controle, indicando menor relação DP/DE dos estômatos (PAZ et al., 2014).

Não se observou menor relação DP/DE dos estômatos nas concentrações salinas mais altas, no entanto, a taxa fotossintética permaneceu inalterada e conseqüentemente ocorreu aumento na condutância estomática e taxa de transpiração após 90 dias (Figura 7, 8A e 8B), o que pode estar relacionado com o aumento da densidade estomática na epiderme adaxial e abaxial. As alterações ocorridas não foram suficientes para a adaptação da planta ao estresse salino, uma vez que, todos os parâmetros de crescimento foram negativamente afetados pela concentração de NaCl, pois o aumento de sais no solo impediu a maior absorção de água, dessa forma, a taxa de transpiração pode ter sido maior do que a absorção, indicando a sensibilidade ao estresse sofrido, devido ao uso não eficiente da água.

Além disso, para que se tenha maior adaptabilidade durante condições estressantes em algumas espécies ocorre o aumento do diâmetro polar, porém em plantas de copo-de-leite este aumento ocorreu, em média, apenas até a concentração de 50 mM de NaCl, o que também indica a baixa adaptabilidade da espécie ao aumento da concentração salina (RIBEIRO et al., 2012).

Nas raízes verificou-se a presença de Estrias de Caspary, independente do estresse aplicado (Figura 16). Contudo, o aumento nas Estrias de Caspary constitui uma adaptação das plantas ao estresse salino, uma vez que, sua presença na endoderme restringe o movimento de íons para o xilema via apoplasto (BASTÍAS; GONZÁLEZ-MORO; GONZÁLEZ-MURUA, 2015).

Verificou-se ainda, a formação de raízes laterais nas plantas submetidas à concentração de 100 mM de NaCl (Figura 16E). A formação destas raízes

corroborar com a redução do comprimento da raiz principal encontrado nas concentrações mais elevadas de NaCl, visto que, uma das estratégias das plantas para amenizar o estresse imposto pela salinidade é a alteração na arquitetura da raiz e também alterações no direcionamento do crescimento (GALVAN-AMPUDIA; TESTERINK, 2011).

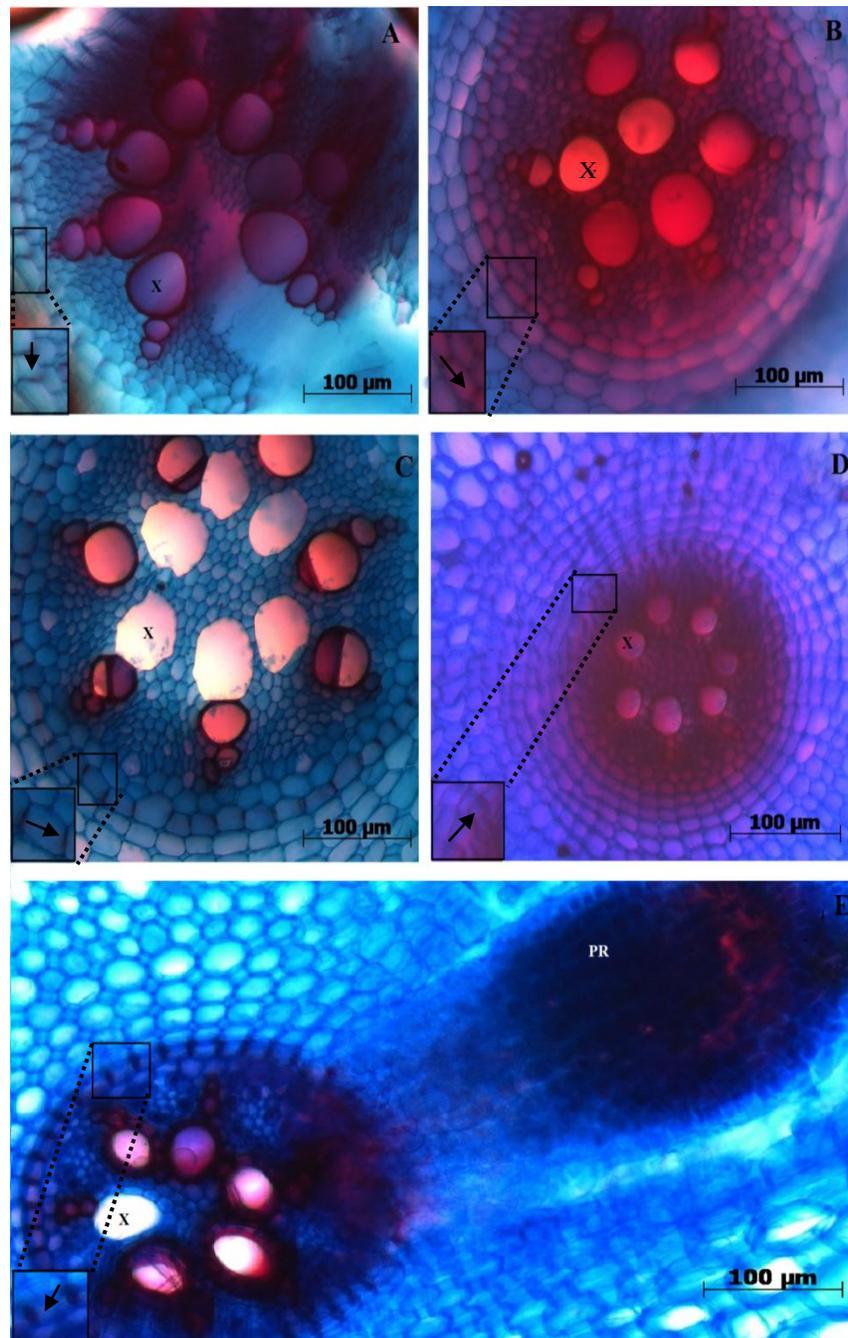


Figura 16 Seções transversais de raízes de plantas de copo-de-leite submetidas às concentrações de 0, 25, 50, 75 mM e 100 mM de NaCl após 90 dias. (A)

0mM (B) 25 mM (C) 50 mM (D) 75 mM (E) 100 mM com detalhe da formação de raiz lateral (PR= primórdio radicular). Detalhe das Estrias de Caspary (seta preta). (X= xilema)

A formação de raízes laterais durante o estresse salino pode ser visto como um mecanismo adaptativo, uma vez que, dessa forma é possível abranger maior volume de solo, na tentativa de encontrar porções com menor salinidade e maior disponibilidade de nutrientes, que possibilitem o desenvolvimento normal da planta (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). No entanto, para o copo-de-leite, essa tentativa de adaptação ao estresse salino não foi suficiente, visto que, ocorreram alterações nos parâmetros de crescimento, ecofisiológicos, bioquímicos e também aumento no número de estômatos que não contribuíram para o uso eficiente da água, levando à senescência das plantas.

De acordo com os principais resultados para as análises de crescimento, ecofisiológicas, bioquímicas e anatômicas é possível classificar a espécie em sensível ao estresse salino, uma vez que, ocorreram alterações negativas nestes parâmetros acima da concentração de 40 mM de NaCl e espécies sensíveis sobrevivem em concentrações de 0 a 40 mM de Cl, sendo que acima desta concentração já são classificadas como moderadamente sensíveis (GIANELLO; BISSANI; TEDESCO, 1995).

5 CONCLUSÕES

Com o aumento do estresse salino ocorre redução da altura, número de folhas, número de perfilhos, massa fresca e seca das plantas de copo-de-leite. Acontecem alterações negativas na taxa fotossintética, condutância estomática, taxa de transpiração, teor de clorofila, carboidratos e proteínas, bem como, alterações anatômicas que impedem o desenvolvimento normal das plantas, indicando a sensibilidade da espécie ao estresse salino. Acarretando perdas em qualidade e quantidade na produção de flores.

REFERÊNCIAS

- AKHTAR, S. et al. Some growth, photosynthetic and anatomical attributes of sugarcane genotypes under NaCl salinity. **International Journal Of Agriculture & Biology**, Faisalabad, v. 3, n. 4, p. 439-443, 2001.
- ALAM, M. A. et al. Effect of salinity on biomass yield and physiological and stem-root anatomical characteristics of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) Accessions. **BioMedResearch International**, Cairo, v.2015, p. 1-15, 2015.
- ALMEIDA, E. F. A. et al. Produção de copo-de-leite em resposta à adubação com NPK e esterco bovino. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 129-134, 2012.
- ASHRAF, M.; AKRAM, N. A. Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: an analytical comparison. **Biotechnology advances**, Elmsford, v. 27, n. 6, p. 744-752, Nov./Dec. 2009.
- ASHRAF, M. A.; ASHRAF, M.; MUHAMMAD, S. Growth stage-based modulation in antioxidant defense system and proline accumulation in two hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars differing in salinity tolerance. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, London, v. 207, n. 5, p. 388-397, May 2012.
- ASSIS JÚNIOR, J. et al. Produtividade do feijão-de-corda e acúmulo de sais no solo em função da fração de lixiviação e da salinidade da água de irrigação. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 702-713, Dez. 2007.
- BASTÍAS, E.; GONZÁLEZ-MORO, M. B.; GONZÁLEZ-MURUA, C. Combined effects of excess boron and salinity on root histology of *Zea mays* L. amylacea from the Lluta Valley (Arica, Chile). **IDESIA**, Arica, v. 33, n. 2, p. 9-20, Feb. 2015.

BEZERRA, M. A. et al. Fotossíntese de plantas de cajueiro-anão precoce submetidas ao estresse salino. **Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**, Fortaleza, v.47, p. 149-152, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the determination of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p. 248-254, 1976.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função dos órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

CAVALCANTI, F. R. et al. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, Lancaster, v. 163, n. 3, p. 563-571, Sept. 2004.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, n. 4, p. 551-560, 2009.

COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 359 p.

CUNHA, P. C. et al. Crescimento, síntese de solutos orgânicos e equilíbrio iônico de plântulas de pinhão-mansô sob estresse salino. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 26, n. 3, p. 46-52, Set. 2013.

DEBEZ, A. et al. Ecophysiological and genomic analysis of salt tolerance of *Cakile maritima*. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 92, p. 64-72, Aug. 2013.

DIAS, N. S.; BLANCO, F. F. Efeito dos sais no solo e na planta. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCT-Sal, 2010. v. 1, cap. 9, p. 129-140.

DIAS, N. S. et al. Salinização do solo por aplicação de fertilizantes em ambiente protegido. **Irriga**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 135-147, Jan./Mar. 2007.

DUVAL, C. M. The flower production and family farming. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 241-241, June 2014.

EL-SHINTINAWY, F.; EL-SHOUBAGY, M. N. Alleviation of changes in protein metabolism in NaCl-stressed wheat seedlings by thiamine. **Biologia plantarum**, Praha, v. 44, n. 4, p. 541-545, Dec. 2001.

EMMANUEL, E. et al. Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital waste water. **Environment International**, Oxford, v. 30, p. 891-900, Sept. 2004.

FEIJÃO, A. R. et al. Efeito da nutrição de nitrato na tolerância de plantas de sorgo à salinidade. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n.3, p. 675-683, Jul./Set. 2011.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, N. et al. Intrinsic water use efficiency controls the adaptation to high salinity in a semi-arid adapted plant, henna (*Lawsonia inermis* L.). **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 171, n. 5, p. 64-75, Mar. 2014.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./Dec. 2011.

FIGUEIREDO, J. R. M. et al. Desenvolvimento de copo-de-leite em função da adubação com biofertilizante. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, Viçosa, v. 4, n. 2, Dez. 2014.

FRAIRE-VELÁZQUEZ, S.; BALDERAS-HERNÁNDEZ, V. E. Abiotic stress in plants and metabolic responses. In: VAHDATI, K.; LESLIE, C. **Abiotic stress-plant responses and applications in agriculture**. Rijeka: Intech, 2013. cap. 2, p. 25-48.

GALVAN-AMPUDIA, C. S.; TESTERINK, C. Salt stress signals shape the plant root. **Current opinion in plant biology**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 296-302, June 2011.

GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; TEDESCO, M. J. **Princípios de fertilidade do solo**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 277 p.

GOMES, A. D. V. et al.. Acúmulo de solutos orgânicos em plantas de munquêm (*Albizia inundala* (Mart)) submetido a estresse salino em diferentes níveis de cloreto de sódio. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 7, n. 3, p. 54-56, Jul./Set. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA. **O mercado de flores no Brasil**. Disponível em:
<<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=235>>. Acesso em: 18 ago. 2015.

IVANOVA, K. et al. Photosynthesis and growth responses of five paulownia lines to salt stress. **Comptes Rendus de l'academie bulgare des Sciences**, Sofiya, v. 67, n. 8, p. 1101-1106, Nov. 2014.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 38-52, 2008.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. O setor produtivo de flores e plantas ornamentais do Brasil, no período de 2008 a 2013: atualizações, balanços e

perspectivas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 115-120, 2014.

KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 4, p. 1593-1608, Jan. 2012.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198p.

LACERDA, C. F. et al. Plant growth and solute accumulation and distribution in two sorghum genotypes, under NaCl stress. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 13, p. 270-284, 2001.

LANDGRAF, P. R. C.; PAIVA, P. D. O. Produção de flores cortadas do estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 120-126, Jan./Fev. 2009.

LAZZERESCHI, S. et al. Serious damages by impatiens necrotic spot virus in *Zantedeschia aethiopica*. **Acta horticultrae**, The Hague, v. 1002, p. 319-326, 2013.

MELO, G. M. et al. Alterações anatômicas em folhas e raízes de *Jatropha curcas* L. cultivadas sob estresse salino. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 3, p. 670-674, Jul./Set. 2011.

MILLER, G. L. Determination of reducing sugar by DNS method. **Analytical Chemistry**, Whashington, v. 31, p. 426-428, Mar. 1959.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 25, p. 239-250, Feb. 2002.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 651-681, 2008.

NAWAZ, K. et al. Fatality of salt stress to plants: Morphological, physiological and biochemical aspects. **African Journal of Biotechnology**, Naiarobi, v. 9, n. 34, Aug. 2010.

OLA, H. A. E. et al. Morpho-anatomical changes in salt stressed kallar grass (*Leptochloa fusca* L. Kunth). **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, Ma'an, v. 8, n. 2, p. 158-166, Apr. 2012.

PAIVA, P. D. O.; ALMEIDA, E. F. A. **Produção de flores de corte**. Lavras: UFLA, 2012. 678 p.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 60, n. 3, p. 324-349, Mar. 2005.

PAZ, R. C. et al. Akaline, saline and mixed saline–alkaline stresses induce physiological and morpho-anatomical changes in *Lotus tenuis* shoots. **Plant Biology**, Malden, v. 16, n. 6, p. 1042-1049, Mar. 2014.

PRISCO, T.; GOMES FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura**: estudos básicos e aplicados. Fortaleza: INCT-Sal, 2010. v. 1, p. 147-163.

RAI, M. K. et al. Developing stress tolerant plants through in vitro selection- an overview of the recent progress. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 71, n. 1, p. 89-98, Apr. 2011.

RASOOL, S. et al. Salt stress: causes, types and responses of plants. In: AHMAD, P et al. **Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress**. New York; Springer, 2013. p. 1-24.

RIBEIRO, M. N. O. et al. Anatomia foliar de mandioca em função do potencial para tolerância à diferentes condições ambientais. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 354-361, June 2012.

RICHARDS, L. A. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. **Soil Science**, Madison, v. 78, n. 2, p. 154, 1954.

RIVERO, R. M. et al. The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 1059-1073, May 2014.

RODRIGUES, M. et al. Action of growing degree days on the morphogenesis and physiological responses of calla lily. **Acta Physiologia e Plantarum**, Kraków, v. 36, n. 7, p. 1893-1902, May 2014.

SAIRAM, R. K.; TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 86, n. 3, p. 407-421, Feb. 2004.

SANTOS, C. V. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. **Scientia Horticulturae**, Amesterdam, v. 103, n. 1, p. 93-99, Dec. 2004.

SHABALA, S.; MUNNS, R. Salinity stress: physiological constraints and adaptative mechanisms. In: SHABALA, S. **Plant stress physiology**. New York: Cabi, 2012. p. 59-93.

SILVA, E.C. et al. Physiological responses to salt stress in young umbu plants. **Enviromental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 63, n. 1, p. 147-157, May 2008.

SILVEIRA, J. A. G. et al. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura**: estudos básicos e aplicados. Fortaleza: INCT-Sal, 2010. v. 1, cap. 11, p. 161-179.

SOUZA, R. P. et al. Fotossíntese e acúmulo de solutos em feijoeiro caupi submetido à salinidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 6, p. 586-592, Jun. 2011.

SOUZA, R. R. et al. Doses de boro no desenvolvimento de copo-de-leite em solução nutritiva. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1396-1403, Dez. 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Artmed, 2013. 918 p.

TAKEMURA, T. et al. Physiological and biochemical responses to salt stress in the mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 68, p. 15-28, Sept. 2000.

TARCHOUNE, I. et al. Effects of NaCl or Na₂SO₄ salinity on plant growth, ion content and photosynthetic activity in *Ocimum basilicum* L. **Acta physiologia e plantarum**, Kraków, v. 34, n. 2, p. 607-615, Mar. 2012.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 91, n. 5, p. 503-527, Feb. 2003.

VEATCH-BLOHM, M. E.; MALINOWSKI, M.; KEEFER, D. Leaf water status, osmotic adjustment and carbon assimilation in colored calla lilies in response to saline irrigation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 144, p. 65-73, Sept. 2012.

VEATCH-BLOHM, M. E.; MORNINGSTAR, L. Calla lily growth and development under saline irrigation. **HortScience**, Alexandria, v. 46, n. 2, p. 222-227, Feb. 2011.

VENKATARAMANA, S.; RAO, P. N. G.; NAIDU, K. M. The effects of water stress during the formative phase on stomatal resistance and leaf water potential and relationship with yield in ten sugarcane varieties. **Field Crops Research, Indian**, v. 13, p. 345-353, 1986.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, London, v. 80, n. 948, p. 209-214, 1955.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, London, v.57, p. 508-514, 1954.

YIOTIS, C.; PSARAS, G. K. *Dianthus caryophyllus* stems and *Zantedeschia aethiopica* petioles/pedicels show anatomical features indicating efficient photosynthesis. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, London, v. 206, n. 4, p. 360-364, Apr. 2011.

ZURITA, F. et al. Stress detection by laser-induced fluorescence in *Zantedeschia aethiopica* planted in subsurface-flow treatment wetlands. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 110-118, 2008.