



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA FLORESTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS



Natália Vaz da Silva

**GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO DE MUDAS DE NIM
INDIANO (*Azadirachta indica* A. Juss.) SUBMETIDAS A
ESTRESSES ABIÓTICOS**

Recife – 2015

Natália Vaz da Silva

GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO DE MUDAS DE NIM
INDIANO (*Azadirachta indica* A. Juss.) SUBMETIDAS A ESTRESSES
ABIÓTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rejane Jurema Mansur Custódio Nogueira – UFRPE

Coorientadores: Prof^a Dr^a Maria de Mascena Diniz Maia - UFRPE

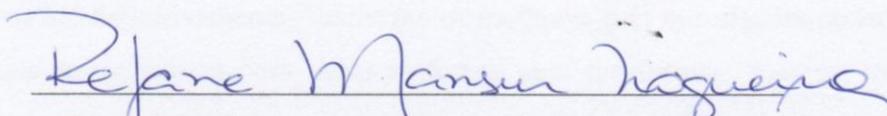
Dr^o Wolfgang Harand - INSA

Recife - 2015

**GERMINAÇÃO E ESTABELECIMENTO DE MUDAS DE NIM INDIANO
(*Azadirachta indica* A. Juss.) SUBMETIDAS A ESTRESSES ABIÓTICOS**

NATÁLIA VAZ DA SILVA

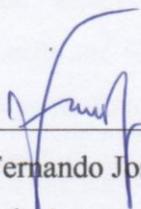
Aprovada em: 25 / 02 /2015



Prof.^a Dr.^a. Rejane Jurema Mansur Custódio Nogueira

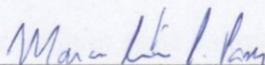
(ORIENTADORA),

Dissertação apresentada à banca examinadora:



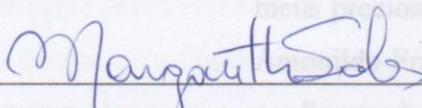
Prof. Dr. Fernando José Freire

(Departamento de Agronomia/ UFRPE)



Prof. Dr. Marco Antônio Amaral Passos

(Departamento de Ciência Florestal/ UFRPE)



Prof. Dra. Margareth Ferreira Sales - Suplente

(Departamento de Biologia/ UFRPE)

A Deus, a luz de minha existência, aos meus preciosos pais, Maria de Jesus Vaz e Antonildo Frazão, dignos de eterno amor e confiança, à minha estimada irmã, Natiele Vaz, grande companheira, e ao meu esposo, Rafael Spósito, o grande amor da minha vida!

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida e por todas as experiências vividas de corpo e alma. Sem Ele eu não seria nada mais que “qualquer um” no mundo, a Ele devo minha existência. O Senhor ouviu minhas preces e conduziu grandes mudanças em minha vida... Eu amo o Senhor!

À melhor família do mundo, a minha! À minhas avós, tias e tios, primas e primos, à minha irmã e por último, mas não menos importantes, aos meus pais, por todo o apoio e confiança que sempre me deram, mesmo para sair debaixo das suas asas por alguns dias ou até definitivamente. Vocês são os melhores pais que alguém poderia ter, reconheço que se dedicaram com todas as forças para me formar “menina, moça e mulher” da maneira mais amorosa que puderam e por isso os agradecerei para sempre!

A Rafael Spósito, meu grande amor que acompanhou toda a minha trajetória desde a graduação e durante o mestrado foi promovido a noivo e então esposo. Neste período me proporcionou momentos pessoais adoráveis, além de nunca medir esforços para me ajudar como pôde academicamente, seja pegando no pesado na casa de vegetação ou ficando em silêncio enquanto eu estudava. Você me completa em todos os aspectos e eu te agradeço por isso. Eu amo você... menino!

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo acolhimento desde a minha graduação e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais, pela oportunidade que me foi dada para desenvolver esta dissertação com esforço, dedicação e seriedade.

À minha orientadora pelos 7 anos de experiências, pela contribuição no meu amadurecimento profissional e por que não pessoal? Pelos ensinamentos, às vezes dados com puxões de orelha, mas que valeram à pena. Levarei vários de seus jargões para sempre... Obrigada por ter feito parte da minha história!

À família LFV, que acolhe, ensina, compartilha, “publica”, até agrega, mas principalmente AJUDA. Com certeza essa é a maior lição que todos, os que estão lá e os que já foram embora, carregam dessa vivência. O LFV é uma família, pois muitas vezes passamos mais tempo lá do que com nossas famílias de casa. Eu adoro cada integrante de um jeito especial e nenhum de vocês cairá no esquecimento, pois as amizades que se configuraram, tenham certeza, são inesquecíveis! Quero agradecer aos antigos seres LFVanos que contribuíram enormemente para a minha formação acadêmica e pessoal. E claro, àqueles que contribuíram diretamente no andamento da minha dissertação, Elaine Cristina, Rafaela Pereira, Clóvis Lapa Neto, Letícia Walter, Maria Francycellen, Olímpia

Lino, Luisa Braz, Maria Eduarda, Laura Oliveira, Thiago Barreto, Marcelo Maurício, Lilian Cândida, Caio Victor e Jean Gueiros. Um agradecimento especial eu faço a Cibele Alves e a Cinthya Pacheco, pois além de serem as companheiras mais antigas da família LFV, por quase todo o período que estive lá, são amigas muito especiais que já me ajudaram em momentos muito difíceis simplesmente pela sincera amizade que me têm. Obrigada por tudo pessoal!

Aos meus amigos da SF-3, Thiago Morais, Kisy Maria e Wilson Barbosa, a todos os grandes professores que passaram pela minha vida acadêmica e todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a minha formação, meus sinceros agradecimentos!

SILVA, NATÁLIA VAZ DA. **Germinação e Estabelecimento de Mudanças de Nim Indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.) Submetidas a Estresses Abióticos**. 2015. Orientadora: Rejane Jurema Mansur Custódio Nogueira. Coorientadores: Maria de Mascena Diniz Maia e Wolfgang Harand

RESUMO

A *Azadirachta indica* A. Juss. destaca-se por apresentar potencial ecológico e econômico por possuir múltiplas utilidades medicinais, veterinárias e agropecuárias, pode ocupar áreas quentes e secas, podendo ser indicado como alternativa ambiental, social e econômica para nossa região. Com o intuito de conhecer a germinação e a fisiologia de mudas de nim indiano sob condições adversas, foram conduzidos dois ensaios no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O primeiro ensaio foi realizado para estudar a influência do período e da temperatura de armazenamento na germinação do nim. Para tanto foram utilizadas sementes coletadas de uma área de produção da espécie na zona da mata norte de Pernambuco, testando-se os períodos de armazenamento: 3, 9 e 27 dias, e as temperaturas de armazenamento: 5 °C e 25 °C, em esquema fatorial 3 x 2, com quatro repetições de 18 sementes para cada tratamento. Foi avaliada a porcentagem de germinação ao longo de 21 dias. O segundo ensaio foi conduzido para avaliar o estabelecimento de mudas de nim sob salinidade em casa de vegetação, por meio do comportamento fisiológico das mesmas. Para tanto, foram utilizadas mudas com seis meses de idade, que foram transplantadas para vasos com capacidade para 11 L, onde foram testados os tratamentos salinos: 0 mM, 50 e 100 mM de NaCl e 50 e 100 mM de CaCl₂, em esquema fatorial 2 x 2 + 1, com 24 repetições para cada tratamento. O crescimento das plantas foi avaliado semanalmente e, após 15, 30, 45 e 60 dias de estresse, foram avaliados os seguintes parâmetros: as trocas gasosas (fotossíntese, transpiração, condutância estomática, concentração interna de CO₂, eficiência do uso da água e eficiência de carboxilação), as relações hídricas (potencial hídrico foliar, teor relativo de água e o percentual de danos nas membranas), os pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b*, total e carotenoides e o índice de clorofila), além da produção e alocação de matéria seca (folhas, caule e raízes). Os dados obtidos de cada experimento foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5%. Quanto à germinação de sementes de nim, foi encontrado que esta é inibida quando

armazenada sob baixa temperatura (5 °C), enquanto que o armazenamento sob temperatura de 25 °C reduzem a viabilidade das sementes. Quanto ao estabelecimento de mudas sob salinidade, estas podem ser classificadas como tolerantes a esta condição, suportando serem cultivadas por 60 dias em concentrações de até 100 mM de NaCl e 50 mM de CaCl₂ sem prejuízos em sua produtividade.

Palavras-chaves: Germinação, Período de armazenamento, Temperatura de armazenamento, Tolerância à salinidade, Salinidade por NaCl, Salinidade por CaCl₂.

SILVA, NATÁLIA VAZ DA. **Germination and Seedling Establishment of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Submitted to Abiotic Stresses.** 2015. Adviser: Rejane Jurema Mansur Custódio Nogueira. Comitê: Maria de Mascena Diniz Maia e Wolfgang Harand

ABSTRACT

The *Azadirachta indica* A. Juss. stands out for present ecological and economic potential by having multiple medicinal, veterinary and agricultural uses, can grow in hot and dry areas and should be indicated as environmental, social and economical alternative to our region. In order to know the germination and physiology of the neem seedlings under adverse conditions, were conducted two tests at the Laboratory of Plant Physiology of the Federal Rural University of Pernambuco. The first test was conducted to study the influence of period and temperature of storage on germination of neem. For this purpose were used seeds collected from one production area in the region of northern forest of Pernambuco testing the storage periods: 3, 9 and 27 days and storage temperatures 5 ° C and 25 ° C, in a factorial arrangement 3 x 2, with four replications of 18 seeds for each treatment. The germination percentage over 21 days was evaluated. The second test was conducted to evaluate the establishment of neem seedlings under salinity in the greenhouse, through the physiological behavior of the same. To this end, plants at six months of age were used, who were transplanted to pots with a capacity of 11 L, where the saline treatments were tested: 0 mM, 50 and 100 mM of NaCl and 50 and 100mM of CaCl₂, in a factorial arrangement 2 x 2 + 1, us with 24 repetitions for each treatment. Plant growth was measured weekly and after 15, 30, 45 and 60 days of stress, the following parameters were evaluated: the gas exchange (photosynthesis, transpiration, stomatal conductance, internal CO₂ concentration, efficiency of water use and efficiency of carboxylation), the water relations (leaf water potential, relative water content and the percentage of membrane damage), photosynthetic pigments (chlorophyll a, b, and total, carotenoid and chlorophyll index), besides the production and allocation dry matter (leaves, stem and roots). Data from each experiment were submitted to analysis of variance and means were compared with each other by 5% Tukey test. For germination of neem seeds was found that this is inhibited when stored at low temperature (5 ° C), while storage at 25 ° C reduce the viability of the seeds. Regarding the establishment of seedlings under salinity, these can be categorized as tolerant to this

condition, supporting be cultivated for 60 days in concentrations up to 100 mM NaCl and 50 mM CaCl₂ without losses in productivity.

Keywords: Germination, Storage period, Storage temperature, Salinity tolerance, NaCl salinity, CaCl₂ salinity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A - Frutos de nim indiano coletados no município de Itabaiana-PB em abril de 2014, B - Despolpa manual com peneira e C - Secagem das sementes em condições ambientes (Fonte: Silva, 2013) 37
- Figura 2.** A - Medição do diâmetro do caule e B – Medição da altura de mudas de nim indiano submetidas à salinidade em casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRPE (Fonte: Silva, 2013) 41
- Figura 3:** Curso diário da fotossíntese (A) de plantas de nim indiano cultivadas em casa de vegetação. Médias seguidas por mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade 42
- Figura 4.** A - Avaliação das trocas gasosas em mudas de nim indiano submetidas à salinidade em casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRPE, B – Detalhe para a pinça do IRGA (Fonte: Silva, 2013) 42
- Figura 5.** A e B - Coleta de material para avaliação do potencial hídrico foliar e C - Medição do potencial hídrico foliar de mudas de nim indiano submetidas à salinidade em casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRPE (Fonte: Silva, 2013) 43
- Figura 6.** A - Recorte dos folíolos basais e B - Retirada da nervura central dos folíolos para obtenção do peso da matéria fresca e C - Imersão em água destilada para obtenção do peso da matéria túrgida, na determinação do teor relativo de água de folhas de nim indiano submetidas à salinidade em casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRPE (Fonte: Silva, 2013) 44
- Figura 7.** A - Recorte de discos de folíolos de nim, B - Incubação em banho-maria dos discos em água destilada e C - Leitura da condutividade elétrica da solução para determinação do percentual de danos nas membranas em folhas de mudas de nim indiano submetidas à salinidade em casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRPE (Fonte: Silva, 2013) 45
- Figura 8.** A - Recorte do limbo foliar em pequenos fragmentos, B – Retirada do extrato dos pigmentos dos tubos de ensaio e C - Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos por espectrofotometria em folhas de mudas de nim indiano submetidas à salinidade em casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRPE (Fonte: Silva, 2013) 46
- Figura 9.** A - Coleta de folhas, B - Coleta de caule e C - Coleta de raízes para avaliação da produção de matéria seca de mudas de nim indiano submetidas à salinidade em casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRPE (Fonte: Silva, 2013) 46
- Figura 10:** Porcentagem de germinação de sementes de nim indiano sob diferentes períodos e temperaturas de armazenamento. Médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre as temperaturas e minúsculas entre os períodos de armazenamento, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Um único grupo de letra minúscula e maiúscula para mais de um tratamento, representa semelhança estatística entre eles 49
- Figura 11:** Crescimento de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ por 60 dias, cultivadas em casa de vegetação. A - Altura da

planta, B - Diâmetro do caule e C - Número de folhas. As setas indicam o momento da diferenciação dos tratamentos salinos. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais) em cada época de avaliação, médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade Um único grupo de letra minúscula e maiúscula para mais de um tratamento, representa semelhança estatística entre eles 54

Figura 12: Fotossíntese (A) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, C - 45 DAD e D - 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade 59

Figura 13: Transpiração (E) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, C - 45 DAD e D - 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade 61

Figura 14: Condutância estomática (gs) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, C - 45 DAD e D - 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade 63

Figura 15: Concentração interna de CO₂ (Ci) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, C - 45 DAD e D - 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade 65

Figura 16: Eficiência do uso da água (EUA) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, C - 45 DAD e D - 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade 66

Figura 17: Eficiência de carboxilação (EC) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, C - 45 DAD e D - 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade 68

Figura 18: Potencial hídrico foliar (Ψ) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (15, 30, 45 e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação, avaliados em dois horários, A, C, E e G - 4 horas e B, D, F e H - 12 horas. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), 72

médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Figura 19: Teor relativo de água (TRA) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (15, 30, 45 e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação, avaliados em dois horários, A, C, E e G - 4 horas e B, D, F e H - 12 horas. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade 75

Figura 20: Danos nas membranas (DM) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade 78

Figura 21: Teores de clorofila *a* de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade 81

Figura 22: Teores de clorofila *b* de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade 82

Figura 23: Teores de clorofila total de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade 84

Figura 24: Teores de carotenoides de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade 85

Figura 25: Índice de clorofila de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade 87

Figura 26: Produção de matéria seca das folhas de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de 89

vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Figura 27: Produção de matéria seca dos caule de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

90

Figura 28: Produção de matéria seca das raízes de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

92

Figura 29: Produção de matéria seca total de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

93

Figura 30: Alocação de biomassa seca para as folhas (ABF), para o caule (ABC) e para as raízes (ABR) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

95

Figura 31: Relação raiz/parte aérea de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos das classes de salinidade dos solos sobre o rendimento de espécies vegetais. Fonte: Adaptado de Abrol; Yadav; Massoud (1998)	27
Tabela 2. Comprimento, largura e peso médios de 100 sementes coletadas de três matrizes no município de Itabaiana-PB em abril de 2014	37
Tabela 3: Efeitos causados por diferentes níveis de NaCl e CaCl ₂ por 60 dias, em variáveis fisiológicas avaliadas em plantas de nim indiano cultivadas em casa de vegetação	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Fotossíntese
ABC	Alocação de biomassa do caule
ABF	Alocação de biomassa das folhas
ABR	Alocação de biomassa das raízes
Alt	Altura da planta
ANOVA	Análise da variância
B.O.D.	Biochemical Oxygen Demand
C _i	Concentração interna de CO ₂
Clor <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
Clor <i>b</i>	Clorofila <i>b</i>
Clor total	Clorofila total
DAD	Dias após a diferenciação
Diam	Diâmetro do caule
E	Transpiração
EC	Eficiência de carboxilação
EUA	Eficiência do Uso da Água
g _s	Condutância estomática
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco
IVG	Índice de Velocidade de Germinação
MF	Matéria fresca
MSC	Matéria seca do caule
MSF	Matéria seca das folhas
MSR	Matéria seca das raízes
MST	Matéria seca total
NF	Número de folhas
R/Pa	Relação raiz parte aérea
TMG	Tempo médio de germinação
TRA	Teor relativo de água

LISTA DE SÍMBOLOS

%G	Porcentagem de germinação
%DM	Percentual de danos nas membranas
Ψ	Potencial hídrico foliar
CaCl_2	Cloreto de Cálcio
Cl^-	Íon cloreto
CO_2	Dióxido de carbono
Na^+	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE E SEUS MÚLTIPLOS USOS	20
2.2 GERMINAÇÃO DO NIM INDIANO E SUAS POSSÍVEIS INTERFERÊNCIAS	23
2.3 SALINIDADE: CAUSAS E EFEITOS EM PLANTAS	26
2.3 O NIM INDIANO: UMA ALTERNATIVA SUSTENTÁVEL	32
2.4 HIPÓTESE	33
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 ENSAIO I – INFLUÊNCIA DO PERÍODO E TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES NA GERMINAÇÃO DE NIM INDIANO	36
4.1.1 Local de experimentação e aquisição das sementes	36
4.1.2 Tratamentos testados e delineamento experimental	37
4.1.3 Variável analisada	38
4.1.4 Análise estatística	38
4.2 ENSAIO II – ESTABELECIMENTO DE MUDAS DE <i>Azadirachta Indica</i> A. JUSS. SOB SALINIDADE	38
4.2.1 Local de experimentação e aquisição das mudas	38
4.2.2 Tratamentos testados e delineamento experimental	39
4.1.3 Variáveis analisadas	40
4.1.3.1 Crescimento	40
4.1.3.2 Trocas gasosas	41
4.1.3.3 Relações hídricas	43
4.2.3.4 Pigmentos fotossintéticos	45
4.2.3.5 Produção de matéria seca e alocação para os diversos órgãos	46
4.2.4 Análise estatística	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 ENSAIO I – INFLUÊNCIA DO PERÍODO E TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES NA GERMINAÇÃO DE NIM INDIANO	48
5.2 ENSAIO II – ESTABELECIMENTO DE MUDAS DE <i>AZADIRACHTA INDICA</i> A. JUSS. SOB SALINIDADE	53
5.2.1 Crescimento	53
5.2.2 Trocas gasosas	57
5.2.3 Relações hídricas	70
5.2.4 Pigmentos fotossintéticos	79
5.2.5 Produção de matéria seca e alocação para os diversos órgãos	88
5.2.6 Ficha de descritores fisiológicos dos mecanismos de resposta à salinidade	101
6 CONCLUSÃO	105
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

1 INTRODUÇÃO

O nim é uma espécie que apresenta múltiplas possibilidades de uso que vão desde a utilização de suas folhas, casca, madeira, frutos e principalmente as sementes, dentre as quais está a sua principal atuação como inseticida natural. A espécie pode ser utilizada para exploração de lenha e carvão, no reflorestamento de áreas abandonadas ou até mesmo degradadas, para a implantação de sistemas agroflorestais em consórcio com outras culturas, além do seu plantio em larga escala para o aproveitamento dos seus produtos, em especial para produção de inseticidas. Uma vez que o nim já tem potencialidade para ocupar áreas quentes e secas, ele pode ser considerado como uma alternativa para alguns problemas ambientais, sociais e econômicos enfrentados em regiões do nosso país.

A salinização dos solos é um desses grandes problemas, sendo facilmente encontrada em regiões de clima árido e semiárido e diante dessa questão de magnitude mundial é imprescindível que sejam tomadas algumas iniciativas para o manejo das áreas que estão sendo exploradas para a produção vegetal irrigada, para que se evite que novas áreas se tornem improdutivas pelo acúmulo de sais, além da recuperação e reutilização das áreas que já se encontram desertificadas. Uma alternativa seria a revegetação dessas áreas com espécies de interesse econômico, preferencialmente de múltiplos usos, que apresentem tolerância para viver em ambientes salinos. Essa estratégia além de auxiliar na redução do processo erosivo a que os solos descobertos estão expostos, auxilia ainda na remoção dos íons, no aumento da capacidade de drenagem, além da manutenção da umidade do solo pela redução da evapotranspiração.

Diante disso, torna-se extremamente relevante o direcionamento de pesquisas para o melhor entendimento do comportamento fisiológico de espécies como o nim sob condições adversas, para auxiliar a revegetação de áreas que apresentam essas condições, como a salinidade, no sentido de garantir o estabelecimento de um maior número de mudas nesses locais de interesse. É necessário ainda o conhecimento do comportamento da germinação da espécie, uma vez que é interessante saber a melhor forma de armazenamento das sementes, a fim de assegurar a viabilidade e vigor das mesmas pelo maior tempo possível, para que se possa manter a produção de mudas além dos períodos de frutificação da espécie. Com isso, esta pesquisa pretende compreender a germinação e o estabelecimento de mudas de nim sob condições

adversas, gerando melhorias científicas, tecnológicas, sociais e econômicas no sentido de possibilitar a implantação da mesma em regiões necessitadas de recuperação ou para o enriquecimento das atividades de exploração.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE E SEUS MÚLTIPLOS USOS

A *Azadirachta indica* A. Juss, pertencente à família Meliaceae, é originária da Índia e Birmânia e é popularmente conhecida como nim indiano ou neem. Plantações desta espécie apresentam incremento médio anual de biomassa de 3-10 m³.ha⁻¹, portanto são consideradas de crescimento médio a rápido (HEGDE, 1993). Sua altura varia de acordo com o local onde se desenvolve, havendo citações que vão desde 20 m até mais de 40 m de altura. Possui um tronco reto, com 25-30 cm de diâmetro aos oito anos de idade, com casca grossa e fissurada com boa capacidade de rebrota, aceitando facilmente podas no tronco e é munida de um grande sistema radicular com uma raiz pivotante que pode chegar até 15 metros de profundidade, o que lhe confere certo grau de tolerância à seca (CSURHES et al., 2008; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1992; NEVES, E. J. M., 2004).

O nim é uma árvore perene ou “sempre verde”, pois não perde suas folhas com facilidade, podendo perder parte delas em situações de extrema seca, o que a torna interessante para arborização por disponibilizar uma sombra fechada o ano inteiro. Suas folhas são compostas - pinadas e alternas, de cor verde escuro com a borda serrilhada medindo de 3-8 cm de comprimento. Suas flores bissexuais são de cor creme, com cheiro que atraem abelhas, elas são dispostas em cachos axilares e cada inflorescência com 150-250 flores de 1 cm, têm de 15-25 cm de comprimento (CSURCHES et al., 2008).

Seus frutos, semelhantes a azeitonas verdes, são do tipo drupa, têm superfície glabra, têm de 1-3 cm de diâmetro podendo ser alongados, ovais ou arredondados. São de cor amarela quando maduros e compostos por polpa doce que envolve geralmente uma única semente, raramente duas ou três, que pode chegar a ser metade do peso do fruto, (CSURCHES et al., 2008; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1992). Estas sementes possuem um teor de 35-45% de óleo, necessitando de cuidados especiais,

tanto para a manutenção da boa qualidade do óleo, quanto para prolongar o seu poder germinativo, já que perdem a viabilidade dentro de 3-4 semanas (HEGDE, 1993). Plantas de nim iniciam a frutificação entre 3-5 anos, alcançando a sua capacidade de produção máxima após 10 anos, com um montante de 50 Kg de frutos.planta⁻¹.ano⁻¹ e podem viver por mais de dois séculos (CSURCHES et al., 2008; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1992).

Sua madeira é avermelhada, dura e resistente ao ataque de cupins e apodrecimento, com densidade básica entre 0,56-0,85 g.cm⁻³, pode ser cortada por volta dos 5-7 anos de idade e é também utilizada na produção de móveis, construção, portas e caixotes, (MARTINEZ, 2008; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1992; NEVES, E. J. M., 2004) e segundo Hegde (1993) possui propriedades comparáveis a madeiras de teca em vários aspectos e é utilizada para construção de barcos, remos e lemes, sendo por isso representativa no mercado internacional.

Araújo, Rodrigues e Paes (2000), estudando um povoamento de nim no centro-oeste brasileiro, afirmam que ela apresenta ainda boas qualidades para fins energéticos por possuir um poder calorífico de 4.088,5 Kcal.Kg⁻¹, um rendimento para carvão de 38,2%, um teor de cinzas de 2,11% e porcentagem de carbono fixo de 81,82%. Essas características o colocam como uma possível alternativa ao uso de madeira de florestas nativas para lenha e carvão, já que a exploração ilegal de espécies arbóreas é uma das principais causas de devastação dos biomas do nosso país, principalmente da Caatinga e do Cerrado.

Quanto às condições para o seu desenvolvimento, o nim ocorre em locais quentes e secos, em altitudes de até 1000 m, não suportando frio demasiado e geadas. Ele se desenvolve com maior sucesso do que outras espécies em solos inférteis, pedregosos e rasos e em alguns casos, solos ácidos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1992).

Além da Índia e seus países vizinhos, onde o nim ocorre naturalmente, à medida que se comprovavam as suas aplicações, ele foi implantado em outros países e continentes, com intuítos tanto de introduzir plantios comerciais para o aproveitamento de seus produtos, quanto de formação de cultivos experimentais, para o conhecimento do seu comportamento em condições semelhantes as do seu local de origem. Read e French (1993) dedicaram uma seção de seu livro “Genetic Improvement of Neem Strategies for the Future” para detalhar as condições da implantação e das pesquisas

com o nim em diversos países da Ásia como, Tailândia, Nepal, Sri Lanka, Indonésia, Malásia, Paquistão e alguns da África como, Gana, Senegal e Nigéria.

Martinez (2008) citou que no Brasil, os primeiros plantios, que foram introduzidos com sementes das Filipinas, datam de 1986, e foram feitos pelo Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR, localizado em Londrina, para estudos do nim como inseticida. Com o tempo foram realizados mais plantios experimentais e, finalmente com o aumento das descobertas sobre as utilidades da espécie foram feitos os primeiros plantios comerciais em vários estados como, São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Pará e Tocantins.

Em um levantamento sobre as exigências edafoclimáticas do nim, com vistas ao seu uso em programas agroflorestais no Brasil, Neves, E. J. M. (2004) relatou que os primeiros plantios experimentais datam de 1993 e iniciaram na região central do país. Ainda no mesmo trabalho, o autor comprovou a versatilidade do nim quando compara os plantios existentes em regiões com pluviosidades que vão de 600 mm (Petrolina – PE) a 2200 mm (Castanhal – PA).

Pesquisadores da Embrapa tem desenvolvido pesquisas sobre as especificidades silviculturais em relação à escolha de matrizes, colheita de sementes, produção de mudas, preparo do solo (NEVES; CARPANEZZI, 2008; OLIVEIRA, I. P. et al., 2005), exigências nutricionais, com a determinação dos teores foliares de nutrientes em função do que é disponibilizado pelo solo (NEVES; CARPANEZZI, 2006; NEVES, E. J. M. et al., 2013; OLIVEIRA, I. P. et al., 2005), espaçamento do plantio, condições para o plantio de mudas em campo até a época de aproveitamento dos produtos de interesse, sejam frutos (NEVES; CARPANEZZI, 2008), sementes, madeira, etc., utilizando para isso plantios de todas as regiões do Brasil.

Carpanezi e Neves (2010) em uma análise crítica apontaram algumas lacunas e indicam diversas sugestões para a melhoria do cenário da produção nacional de nim indiano. Eles fizeram uma análise da carência de estudos nas áreas de silvicultura, considerando a particularidade de cada local, no melhoramento genético, na produção de madeira, além do aproveitamento dos produtos da copa. Este último tema é de extrema relevância uma vez que a partir daí pode-se aproveitar os compostos advindos das suas folhas e cascas, através da extração do óleo presente em seus frutos e sementes, além da torta residual desta prensagem que é útil para fins inseticidas e fertilizantes.

Dentre os estudos realizados com o extrato do nim, os que apresentaram fins farmacêuticos e pesticidas mostraram maior relevância, sobretudo no isolamento de vários compostos ativos como a azadiractina, nimbina, e salanina (TEWARI, 1993). Porém, é sobre a azadiractina que se tem concentrado maior parte das pesquisas por apresentar ação inseticida, sendo os frutos a sua principal fonte (ALVES, P. D. et al., 2009; COSTA et al., 2010; ESPARZA-DIAS et al., 2010; GONÇALVES; BLEICHER, 2006a; GONÇALVES; BLEICHER, 2006b). Este composto tem demonstrado efeitos similares aos inseticidas tradicionais, por apresentarem modos de ação que vão desde a modificação da ecdise - processo de troca de casca dos insetos -, retardo do consumo de alimentos e até do desenvolvimento (MARTINEZ, 2008).

A azadiractina, assim como a maioria dos compostos encontrados nas partes da planta do nim indiano, pertence à classe dos limonóides e foi isolado em 1972. Os limonóides são considerados os maiores representantes dos terpenos com ação inseticida, são também conhecidos como meliacinas por serem encontrados principalmente em plantas da família Meliaceae, como é o caso do nim (VIEGAS JR., 2003).

Além de fins agrícolas, o nim é utilizado para fins medicinais, como relatam Biswas et al. (2002) em uma revisão onde reuniram compostos isolados de vários órgãos de plantas de nim. Neste trabalho conseguiram enumerar distintas atividades biológicas da espécie, como: antiinflamatória, antiartrite, hipoglicêmica, antigástrica, espermicida, antifúngica, antibacteriana, diurética, antimalária, imunomoduladora e antitumoral.

2.2 GERMINAÇÃO DO NIM INDIANO E SUAS INTERFERÊNCIAS

O conhecimento das condições ideais para a germinação de espécies florestais é de extrema relevância, especialmente quando se trata de uma espécie com potencial para reflorestamento, seja na implantação de sistemas agroflorestais ou plantios comerciais, ou ainda para recuperação de áreas degradadas, uma vez que garantindo algumas condições, como a boa germinação, pode-se chegar mais perto da formação de mudas de boa qualidade, que poderão render mais tarde, indivíduos adultos mais produtivos e com sucesso na reprodução de alguma característica de interesse.

A germinação do ponto de vista fisiológico, é o ato de sair do repouso e entrar em atividade metabólica (NASSIF; VIEIRA; FERNANDES; 1998), e esse processo pode ser influenciado por diversos fatores, podendo estes ser intrínsecos, quando é inerente à semente ou à planta mãe, ou extrínsecos, quando esses fatores, bióticos ou abióticos, são advindos de circunstâncias do ambiente.

Relata as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), um número grande de sementes apresenta algum tipo de impedimento para que ocorra a germinação, fato que pode estar atrelado à dormência fisiológica ou dormência física, o que não é o caso das sementes de nim, já que estas não apresentam nenhum tipo de dormência (PHOGAT et al., 2009). No entanto, Carvalho e Nakagawa (2000) indicam a água, a temperatura e o oxigênio como fatores essenciais a germinação, existindo outros limitantes como, por exemplo, intensidade luminosa e substrato como muitos autores vêm abordando em estudos com espécies florestais (ANDRADE; PEREIRA, 1994; OLIVEIRA, M. T. R. et al., 2009; PACHECO et al., 2006)

Particularmente em relação ao fator umidade, inicialmente foi feita por Roberts (1973), uma classificação de sementes em relação a sua tolerância a dessecação, onde as ortodoxas são aquelas que suportam ser dessecadas até baixos teores de umidade, e as recalcitrantes, aquelas que não suportam tal nível de dessecação sem que haja danos e até a morte da semente. Posteriormente, Ellis et al. (1990) sugeriram uma terceira classificação, as intermediárias, para o grupo de sementes que podem se comportar como ortodoxas ou como recalcitrantes. Elas suportam certo grau de dessecação, porém não são tão sensíveis como as recalcitrantes, nem tão tolerantes quanto as ortodoxas, existindo sim, níveis de tolerância à dessecação. Essa variação de resposta neste grupo de sementes pode depender das espécies, dentro do mesmo gênero, e até da procedência das sementes, dentro de uma mesma espécie (MEDEIROS; EIRA, 2006).

Com relação a essa classificação, o nim se encontra em uma situação bem indefinida, pois são encontrados trabalhos que variam muito com a região do estudo e são reportadas classificações errôneas de várias espécies (MEDEIROS; EIRA, 2006). As sementes de nim foram incluídas nos três grupos citados anteriormente (MEDEIROS; EIRA, 2006; VARGHESE; NAITHANI, 2000a), portanto, é comum a todos os trabalhos nessa linha de pesquisa, com espécie que se encontram nesta situação, o interesse em classificá-la definitivamente quanto à tolerância de suas sementes a dessecação, para que desta forma, se possam descobrir as melhores formas

de manutenção e um possível prolongamento da viabilidade destas sementes, no intuito de utilizá-las para fins de melhoramento, de produção de mudas para reflorestamento ou recuperação de áreas degradadas, entre outros fins.

Embora existam trabalhos que classifiquem as sementes de nim como recalcitrantes e ortodoxas (MEDEIROS; EIRA, 2006; VARGHESE; NAITHANI, 2000a), a hipótese mais adotada é a de que as mesmas sejam intermediárias (SACANDÉ; BUITINK; HOEKSTRA, 2000), justificada exatamente por essa gama de respostas que vêm sendo publicadas há décadas. Estas variam principalmente em função da procedência do material vegetal utilizado em cada pesquisa, embora haja aqueles que justifiquem que outras condições também não estejam padronizadas entre os estudos, mas que merecem especial atenção. Entre esses fatores estão, a idade fisiológica dos frutos no momento da coleta (BHARATHI et al., 1996; EESWARA; ALLAN; POWELL, 1998; PAULA et al., 2009; PEDROSO; AZEVEDO; VANZOLINI, 2008), o conteúdo de água das sementes (EESWARA; ALLAN; POWELL, 1998; NEYA et al., 2004; VARGHESE; NAITHANI, 2000a), o pré-tratamento das sementes (AZAD; ZEDA-AL-MUSA; MATIN, 2010; CHANEY; KNUDSON, 1988), as embalagens utilizadas para o armazenamento (FLORIANO, 2004), bem como os períodos e as temperaturas de armazenamento aos quais as mesmas são submetidas (BERJAK et al., 1995; BONJONAVI; BARBEDO, 2008; VARGHESE; NAITHANI, 2008), inclusive as variáveis que são escolhidas para a classificação definitiva das sementes nesses estudos (VARGHESE; NAITHANI, 2000a).

Neste aspecto, várias pesquisas vêm sendo realizadas desde a década de 90, com espécies que apresentam um comportamento fisiológico de sementes de difícil manejo (ANDRÉO; NAKAGAWA; BARBEDO, 2006; BONJONAVI; BARBEDO, 2008; MENDONÇA; DIAS, 2000; NEVES, C. S. V. J., 1994; SACANDÉ; BUITINK; HOEKSTRA, 2000; VERTUCI, 1993), por sua alta sensibilidade a variações ambientais, sejam elas recalcitrantes ou intermediárias, como é o caso do nim. Estas vêm sendo cada vez mais aprimoradas, até o ponto de se estudar o que ocorre bioquimicamente nas sementes (SACANDÉ; BUITINK; HOEKSTRA, 2000; SACANDE et al., 2001; VARGHESE; NAITHANI, 2000b), como o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) e expressões diferenciais de enzimas que podem estar envolvidas nestas variações tão bruscas de comportamento (VARGHESE; NAITHANI, 2002). Além disso, estudos mais recentes testam o crioarmazenamento,

que seria o uso de congelamento em nitrogênio líquido a fim de se preservar a viabilidade destas sementes, associando ainda o estudo das injúrias desta técnica através do monitoramento de variáveis bioquímicas (VARGHESE; NAITHANI, 2008).

São necessários cada vez mais esforços para se conhecer o complexo funcionamento do processo germinativo destas sementes, para que então se consiga definir um padrão que possibilite a manutenção da viabilidade e do vigor desse material para diversos fins, sejam os que já foram citados anteriormente, ou até para a preservação da biodiversidade através de constituição de bancos de germoplasma por períodos tão grandes quanto possível.

2.3 SALINIDADE: CAUSAS E EFEITOS EM PLANTAS

Para que o solo seja caracterizado como salino, o mesmo deve apresentar uma concentração de sais solúveis que causem prejuízos ao desenvolvimento de um grande grupo de plantas cultivadas (ABROL; YADAV; MASSOUD, 1998), devendo apresentar ainda, a condutividade elétrica de sua pasta de saturação $\geq 4,0 \text{ dS.m}^{-1}$ (25°C). Os sais solúveis mais comumente encontrados nestes solos são o cloreto de sódio e os sulfatos de cálcio e de magnésio, havendo ainda consideráveis quantidades dos cátions divalentes Ca^{2+} e Mg^{2+} (ABROL; YADAV; MASSOUD, 1998).

A salinização dos solos é mais comumente encontrada em regiões de clima árido e semiárido, das quais se estima que quase 50% tenham algum grau de salinização (ABROL; YADAV; MASSOUD, 1998). Nestas áreas quentes e secas, a salinidade tem uma maior predominância, devido a pouca quantidade e má distribuição das chuvas e a alta demanda evaporativa, que aliados à má qualidade da água utilizada em manejos de irrigação inadequados, fazem com que haja um acúmulo de sais na superfície, o que causa um decréscimo do potencial osmótico da solução do solo, tornando a água indisponível para as plantas, o que por sua vez, gera prejuízos na germinação (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000) e no estabelecimento de plântulas.

A depender do nível de tolerância que as plantas apresentam à salinidade, elas são classificadas em glicófitas ou halófitas. As primeiras não suportam viver em ambientes salinos, já as últimas, em menor número, conseguem sobreviver em ambientes extremamente salinos, onde as concentrações de sal seriam prejudiciais as

espécies do grupo anterior, tendo como principal característica a capacidade de completar seu ciclo de vida sob essas condições (TAIZ; ZEIGER, 2010).

Na tabela 1 são apresentados os efeitos causados especificamente em plantas glicófitas cultivadas, em função dos níveis de salinidade classificados por meio da condutividade elétrica do extrato de saturação. Pode-se observar que a partir da faixa de 2-4 dS.m⁻¹ é possível identificar efeitos no rendimento de culturas sensíveis à salinidade, e que, culturas tolerantes podem apresentar rendimento satisfatório, mesmo quando cultivadas em substrato com condutividade elétrica entre 8-16 dS.m⁻¹, os quais são classificados como fortemente salinos.

Tabela 1: Efeitos das classes de salinidade dos solos sobre o rendimento de espécies vegetais.

Classe de salinidade do solo	Condutividade do extrato de saturação (dS.m⁻¹)	Efeitos em plantas cultivadas
Não Salino	0 - 2	Efeitos salinos desprezíveis
Levemente salino	2 - 4	Os rendimentos para culturas sensíveis podem ser afetados
Moderadamente salino	4 - 8	Os rendimentos são afetados
Fortemente salino	8 - 16	Somente culturas tolerantes apresentam rendimento satisfatório
Muito fortemente salino	>16	Somente algumas culturas muito tolerantes apresentam rendimento satisfatório

Fonte: Adaptado de Abrol; Yadav; Massoud (1998)

A salinidade é um fator estressante para as plantas predominantemente por sua ação osmótica, pois o excesso de íons torna o potencial hídrico da solução do solo extremamente reduzido, impedindo desta forma que a água seja absorvida pelos vegetais. Uma vez que a salinidade causa osmoticamente um estresse hídrico, pode ser constatado que as respostas das plantas à salinidade são bastante semelhantes àquelas que ocorrem quando as mesmas são expostas ao déficit hídrico (MUNNS, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2010).

Taiz e Zeiger (2010) chamam atenção para um diferencial, que está no fato de que, quando sob déficit hídrico, as plantas ao se ajustarem a essa situação, continuam absorvendo a água do solo, causando uma redução da sua quantidade e consequentemente o potencial osmótico no substrato tende a ficar cada vez mais negativo. Já sob salinidade, o potencial do substrato, na maioria das situações, é baixo, porém constante, pois a concentração de sais no solo não é alterada, restando às plantas

se ajustar e, mesmo que lentamente, manter o seu desenvolvimento. Porém, além desse efeito osmótico, pode haver ainda os efeitos da absorção excessiva dos íons solubilizados na solução, podendo a planta sofrer com os efeitos específicos (toxidez) desses íons sobre as enzimas e membranas (LARCHER, 2004).

Plantas submetidas ao estresse salino inicialmente podem absorver os íons ou não. Quando ainda não os tem absorvido, o efeito adverso causado é o déficit hídrico, como dito anteriormente, neste caso as plantas podem sintetizar solutos orgânicos, como glicina betaína, prolina, sorbitol, manitol, pinitol e sacarose (TAIZ; ZEIGER, 2010), a fim de tornar o seu potencial hídrico mais negativo e assim manter a absorção de água. No segundo caso, a água é absorvida juntamente com os íons, estes são acumulados no interior das células e podem causar toxidez, desta forma as plantas podem compartimentalizar esses íons ou extrusá-los por estruturas específicas, dependendo do nível de adaptação que a mesma apresente (GREENWAY; MUNNS, 1998). Além dessas respostas, Larcher (2004) reporta como mecanismos de regulação da concentração de sais no interior das plantas, a exclusão de sais, dada por meio de barreiras que limitam o transporte dos íons a longas distâncias, desta forma algumas partes da planta, como a parte aérea, por exemplo, permanecem com uma pequena concentração de sal; ele cita a suculência, que ocorre com o aumento do volume celular à medida que há entrada dos sais, mantendo desta forma praticamente a mesma concentração salina dentro das células, evitando os efeitos deletérios de seu excesso; e o autor menciona ainda a redistribuição de sais, que evita um aumento na concentração de íons em determinadas partes da planta, sendo esses íons translocados via floema.

A possibilidade de respostas das plantas a esse tipo de estresse é imensa e bastante variada em função do grupo que a planta está incluída, da própria espécie e até do genótipo. Mais tarde, Munns e Tester (2008) classificaram as respostas das plantas à salinidade em nível celular, em nível de órgão e em nível da planta inteira, podendo estas respostas ocorrer de duas formas, rápida ou lenta. Na forma rápida, chamada fase osmótica, há redução do potencial osmótico externo e uma inibição do crescimento da parte aérea, e na forma lenta, chamada fase iônica, se dá o excesso de íons (predominantemente o Na^+), e ocorre a senescência de folhas maduras, semelhante aos tipos de resposta demonstrados anteriormente. Para se distinguir os efeitos osmóticos ou iônicos que as plantas estão sofrendo, pode-se observar a taxa de emissão de novas folhas e os sinais de injúrias em folhas mais velhas, e isso pode ser feito através de

medições do crescimento (crescimento das folhas). Além disso, para observar esses efeitos podem ser avaliadas também as trocas gasosas (condutância estomática) das plantas cultivadas sob salinidade (MUNNS; TESTER, 2008)

Especificamente, os efeitos osmóticos da salinidade, similares aos do estresse hídrico, inicialmente são a inibição da expansão da área foliar, a abscisão foliar, o acentuado crescimento de raízes e o fechamento estomático (TAIZ; ZEIGER, 2010). Essas respostas afetam diretamente o crescimento, pela redução do conteúdo de água necessário para os processos metabólicos e pela redução da assimilação de CO_2 . Pelo fato desses processos de crescimento serem sensíveis aos efeitos dos sais, a taxa de crescimento e a produção de biomassa podem ser utilizados como critérios para avaliar o grau de estresse e a capacidade da planta de superar a salinidade (LARCHER, 2004).

Quanto aos efeitos iônicos da salinidade, eles podem ser primários, quando há um aumento significativo da concentração de íons no interior das células da planta causando toxidez, e secundários, quando esse excesso de íon é predominantemente prejudicial às estruturas celulares. No primeiro caso, há o acúmulo principalmente de Na^+ , Cl^- ou SO_4^{2-} nas células (TAIZ; ZEIGER, 2010), podendo o Na^+ ter a sua concentração aumentada antes mesmo do Cl^- (MUNNS; TESTER, 2008). No entanto, o Cl^- é citado como o íon mais tóxico, pois algumas plantas evitam a absorção do Na^+ nas raízes, enquanto que o Cl^- segue livremente em todas as partes tornando-se, portanto o componente mais tóxico (MUNNS; TESTER, 2008).

Em relação à entrada excessiva de íons para o interior das plantas sob salinidade, podem ser citados alguns efeitos primários, como o aumento da razão Na^+ e K^+ , que inativa as enzimas e inibem a síntese de proteínas; a alta concentração de Na^+ , que pode deslocar Ca^{2+} da membrana plasmática, além de inibir a absorção de K^+ causando um desbalanço nutricional; e juntamente com o acúmulo do Na^+ , o excesso de Cl^- nos cloroplastos provoca a inibição da fotossíntese. Secundariamente, esses distúrbios metabólicos podem causar a ruptura da integridade das membranas e do metabolismo celular, a produção de moléculas tóxicas (Espécies reativas de oxigênio – ERO) e então a morte celular (TAIZ; ZEIGER, 2010).

Para os estudos experimentais dos efeitos da salinidade em plantas, o NaCl é o sal mais utilizado, pois os íons Na^+ e Cl^- são encontrados em maior concentração nos solos salinos e/ou sódicos. Porém, em condições naturais, embora haja uma predominância desses íons, são encontrados também outros íons, que influenciam direta

ou indiretamente na ação destes primeiros e que também são absorvidos pelas plantas podendo causar injúrias significativas em sua produtividade. A fim de conhecer o comportamento de plantas quando expostas à salinidade, são encontrados na literatura pesquisas que utilizam além do NaCl, também outros tipos de sais no substrato como o CaCl_2 e KCl (ALVES, F. A. L. et al., 2008), KNO_3 e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (AKINCI; SIMSEK, 2004; EBERT et al., 2002) e até alguns agentes que promovem a redução do potencial osmótico das soluções, como PEG (polietilenoglicol) e manitol (MUNNS; TESTER, 2008).

Através desses testes com diferentes sais, já são reportados que a adição de alguns íons pode causar efeitos benéficos no desempenho de plantas sob estresse salino. A variação de potássio (KNO_3) e cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), por exemplo, causa incremento no crescimento de embriões maduros de pepino submetidos a estresse por NaCl (0 mM, 100 mM e 150 mM) *in vitro*; a presença do Ca^+ e do K^+ adicional é capaz de inibir os efeitos da salinidade (AKINCI; SIMSEK, 2004) e Ebert et al. (2002) também afirmam que um suplemento moderado de 10 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ reflete em bons efeitos no crescimento e metabolismo de plantas de goiabeira estressadas por NaCl.

Além desses resultados, a aplicação de 10 mM de CaCl_2 reduziu os impactos do NaCl (até 225 mM por 15 dias) em plantas jovens de trigo, resposta que foi atribuída pelos autores, à expressão de enzimas antioxidantes, sendo este o fator determinante para o enfrentamento desse estresse (ALLA et al., 2014). Também testando os efeitos desses sais, Arshi, Abdin e Iqbal (2006) encontraram danos bem maiores nos tratamentos de NaCl isolado, em relação aos tratamentos de CaCl_2 isolado e àqueles resultantes da combinação dos dois sais, comprovando mais uma vez o efeito mitigador da adição de pequenas concentrações de CaCl_2 em plantas sob salinidade.

Além destes, vários outros trabalhos encontraram efeitos positivos do CaCl_2 em várias espécies como em sorgo (LACERDA et al., 2004), em oliveiras (MELGAR; BENLLOCH; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, 2006), em lentilha d'água (CHENG et al., 2013), inclusive em halófitas como a *atriplex* (NEDJIMI; DAOUD, 2009) e a *Limonium bicolor* (DING et al., 2010). Essas respostas são justificadas por Carvajal, Cerdá e Martínez (2000), pois os íons de Ca^+ devem atuar na função dos canais de passagem de água das raízes, impedindo que os íons de Na^+ sejam absorvidos pelas plantas, talvez por uma competição entre estes íons nos sítios de ligação das membranas, causando, com isso, uma redução dos efeitos da salinidade pelo NaCl.

No entanto, essas respostas podem não ocorrer, como é o caso de uma pesquisa que analisou o rendimento de plantas de milho, melão e feijão sob salinidade imposta por diferentes níveis de NaCl, de CaCl₂ e de ambos os sais combinados. Os autores encontraram uma redução no rendimento proporcional ao aumento da concentração salina, independente do sal utilizado. O interessante de observar é que as curvas de crescimento afetadas ao longo dos níveis obtiveram rendimentos diferentes, seguindo a ordem CaCl₂ > NaCl⁺CaCl₂ > NaCl, denotando que o NaCl foi mais prejudicial para as três culturas estudadas e o CaCl₂ o sal que causou menores injúrias, retificando portanto, que não foi encontrado o efeito mitigador do CaCl₂ em conjunto com o NaCl que é reportado em outras pesquisas, pois todos os níveis utilizados a partir desta combinação apresentaram efeitos intermediários entre os dois sais aplicados isoladamente.

Alves F. A. L. et al., (2008), também não encontraram o efeito atenuador do CaCl₂ (3 mM) na absorção e transporte de íons Na⁺ em plantas de cajueiro sob estresse de 200 mM de NaCl por 72 horas. Porém, a adição de KCl (5 mM) melhorou o desempenho das plantas sob esse mesmo nível de NaCl, já que causou uma redução na absorção e transporte de Na⁺ para os caules e folhas. Em pesquisa com abordagem semelhante (LACERDA, 2005 apud ALVES F. A. L. et al., 2008) encontraram resultados diferentes quando cultivaram plantas de feijão sob alta e baixa umidade, justificando que o uso do CaCl₂ como amenizador da salinidade depende de fatores ambientais como a umidade relativa do ar.

Além destas pesquisas, os resultados obtidos por Silva, J. V. et al. (2003) também não sustentam a hipótese de que o cálcio suplementar tem efeitos inibitórios sobre o estresse por NaCl. Inclusive, foram encontradas reduções do rendimento e na produção de matéria seca para a parte aérea de plantas de pepino, proporcional ao aumento das concentrações salinas, sendo encontrados efeitos mais prejudiciais quando submetidas a 30 mM de CaCl₂ (COLLA et al., 2013). Mostrando que ainda são necessários mais estudos nessa linha, para averiguar a influência de diferentes sais isoladamente para conhecer até que ponto eles podem ser benéficos ou causar prejuízos na produtividade das plantas.

No caso específico do nim indiano, também são encontrados alguns estudos que vêm sendo realizados com o intuito de se conhecer o seu comportamento quando submetidas à salinidade (CHA-UM et al., 2004; DAGAR, 2006; DINIZ et al., 2013;

FREIRE et al., 2010; GURUMURTHY et al., 2007; HOLANDA et al., 2007; NUNES et al., 2012; PANDE; TARAFDAR, 2002; SHIVANNA; NAGASHREE; GURUMURTHY, 2013), porém ainda são insuficientes, pois os estudos são desenvolvidos em diversas partes do mundo, e cada um deles abrange um número limitado de variáveis fisiológicas, bioquímicas, moleculares e anatômicas. Para que se possam caracterizar os mecanismos de resposta utilizados pelo nim indiano, ainda é necessário o desenvolvimento de experimentos sob condições controladas que teste níveis considerados medianos e altos de concentração de diferentes sais e que essas plantas sejam avaliadas ao longo de períodos consideravelmente longos, pois conhecendo os limites de tolerância da espécie é que se pode indicar a introdução desta em áreas onde as suas utilidades são extremamente requisitadas.

2.4 O NIM INDIANO: UMA ALTERNATIVA SUSTENTÁVEL

O nim é utilizado há muitos séculos pela população indiana para fins diversos por apresentar potenciais na área medicinal considerados empiricamente como “milagrosos”. Com o passar dos anos e o aumento de interesse e investimentos, principalmente nas áreas dos produtos farmacêuticos e agrícolas, os cientistas começaram a comprovar a eficácia dos compostos presentes nesta planta e cada vez mais vem se difundindo o conhecimento acerca das suas aplicabilidades e por esses motivos, há quem a rotule de planta maravilha (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1992; TEWARI, 1993).

Uma dessas principais aplicabilidades está relacionada ao meio agrícola e agropecuário, uma vez que o nim produz compostos que ao longo das últimas décadas teve sua eficiência comprovada em relação a alguns inseticidas sintéticos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1992) e já são produzidos inseticidas a base desses compostos naturais que tem atuação conhecida em mais de 300 espécies (MARTINEZ, 2008). Essa característica tem posicionado o nim como uma alternativa sustentável que pode ser empregada por ser seguro, biodegradável, não tóxico e de baixo custo (HEGDE, 1993).

Os estudos com o nim têm produzido resultados promissores e o desenvolvimento de pesquisas na área de produção da espécie tem grande valia, uma vez que ela se adapta bem em ambientes de clima quente, condição que caracteriza várias regiões do nosso país. Além disso, por ser uma espécie de múltiplos usos, o nim

se torna interessante tanto na implantação de sistemas agroflorestais, quanto no reflorestamento de áreas abandonadas pela agricultura convencional, que muitas vezes são destinadas a famílias que se mantêm através da agricultura de subsistência, ou ainda na implantação de plantios comerciais (CARPANEZZI; NEVES, 2010; NEVES; CARPANEZZI, 2008; NEVES, E. J. M., 2004).

Independente da modalidade de cultivo deve-se ter conhecimento da maneira mais viável ambiental, econômica e socialmente de se realizar a produção em grande escala de mudas desta espécie para os mais variados fins. A partir daí é que surge a necessidade do desenvolvimento de pesquisas sobre a fisiologia das sementes, a germinação da espécie, além da caracterização do comportamento fisiológico destas plantas, ainda jovens, quando cultivadas sob condições adversas, como a salinidade, uma vez que é necessário conhecer para se manejar qualquer que seja a espécie de interesse.

2.4 HIPÓTESE

Há um padrão no comportamento da germinação em função do período e da temperatura de armazenamento em sementes de nim que serão úteis para a produção de mudas da espécie para diversos fins.

O nim indiano apresenta tolerância à salinidade servindo como alternativa para o reflorestamento, a implantação de sistemas agroflorestais e a recuperação de ambientes salinizados da nossa região.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de fatores abióticos na germinação e no estabelecimento de mudas de nim indiano.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a influência do tempo e da temperatura de armazenamento sobre a germinação de sementes de *Azadirachta indica* A. Juss;
- Acompanhar o crescimento em altura, número de folhas e diâmetro do caule, além da produção de biomassa seca e alocação desta para os diversos órgãos de plantas jovens de nim indiano em casa de vegetação sob diferentes condições salinas;
- Analisar o comportamento das trocas gasosas (fotossíntese, transpiração, condutância estomática, concentração interna de CO₂, eficiência do uso da água e eficiência de carboxilação) de mudas de nim indiano sob salinidade por NaCl e CaCl₂ em condições de casa de vegetação;
- Avaliar os efeitos da salinidade por NaCl e CaCl₂ nas relações hídricas (potencial hídrico foliar, teor relativo de água e percentual de danos nas membranas) em mudas de nim indiano;
- Estudar os pigmentos fotossintéticos (método não destrutivo – SPAD e destrutivo – extração bioquímica) do nim indiano sob níveis crescentes de NaCl e CaCl₂;

- Elaborar uma ficha de descritores fisiológicos capazes de identificar os mecanismos de resposta ao estresse salino por NaCl e CaCl₂ para mudas de nim indiano.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, constituída por dois ensaios.

O primeiro foi um ensaio de germinação, realizado no intuito de conhecer as limitações da germinação do nim em função do período e da temperatura de armazenamento. Uma vez que as sementes de nim tem como característica a perda considerável de viabilidade em poucos dias (HEGDE, 1993; MARTINEZ, 2008; PHOGAT et al., 2009), as sementes utilizadas para este ensaio foram coletadas na ocasião da montagem.

Foi realizado ainda um experimento em casa de vegetação para o estudo fisiológico do estabelecimento de mudas de nim sob condições de salinidade.

4.1 ENSAIO I – INFLUÊNCIA DO PERÍODO E TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES NA GERMINAÇÃO DE NIM INDIANO

4.1.1 Local de experimentação e aquisição das sementes

O experimento foi conduzido no período de abril a junho de 2014. Para tanto, foram coletados frutos de nim de três árvores matrizes em abril de 2014, em uma área de cultivo da espécie, localizada no município de Itabaiana-PB, pertencente à Cruanji Neem do Brasil, empresa de beneficiamento de óleo de sementes de nim, cuja sede é instalada no município de Timbaúba-PE, distante 106 Km da cidade do Recife.

Os frutos foram coletados diretamente dos galhos das árvores com uso de um podão e uma lona, em seguida os mesmos foram levados ao Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRPE onde ficaram amadurecendo por três dias. Após esse período foi feita a despolpa dos frutos, utilizando uma peneira e água corrente e então as sementes foram postas para secar sobre folhas de papel em temperatura ambiente por dois dias (Figura 1).



Figura 1. A - Frutos de nim indiano coletados no município de Itabaiana-PB em abril de 2014, B - Despolpa manual com peneira e C - Secagem das sementes em condições ambientes (Fonte: Silva, 2013)

O material coletado de cada matriz foi avaliado quanto ao comprimento e a largura da semente com o uso de um paquímetro digital, marca Digimess, além do peso da semente que foi aferido com o uso de uma balança analítica, marca Shimadzu, modelo AY220. Foram amostradas 100 sementes e os valores médios destas variáveis se encontram na tabela 2.

Tabela 2. Comprimento, largura e peso médios de 100 sementes coletadas de três matrizes no município de Itabaiana-PB em abril de 2014

	Comprimento (mm)		Largura (mm)		Peso (g)	
Matriz 1	14,29	±1,20	5,62	±0,65	0,15	±0,04
Matriz 2	12,17	±0,86	6,65	±0,48	0,22	±0,05
Matriz 3	13,73	±0,93	6,54	±0,49	0,19	±0,04

4.1.2 Tratamentos testados e delineamento experimental

Após o beneficiamento dos frutos, cada um dos lotes, agora constituído por sementes foi dividido em duas amostras, que foram armazenadas em sacos de papel a 5 °C (refrigerador) e a 25 °C (ar condicionado). Estas amostras permaneceram armazenadas sob estas condições por 3, 9 e 27 dias. Após cada período de armazenamento as mesmas foram higienizadas com solução de detergente a 5% por cinco minutos (BRASIL, 2013) e lavadas em água corrente, quando então se procedeu a montagem do experimento.

As sementes foram dispostas em placas de *Petri* previamente forradas com uma folha de papel de filtro e mantidas fechadas dentro de uma câmara do tipo B.O.D. (Marca Adamo) previamente limpa com solução de detergente e posteriormente com álcool 70%. Todos os materiais utilizados foram autoclavados em autoclave vertical (Phoenix Luterco), a 120 °C (1 Kgf.cm⁻²) por 20 minutos. O experimento foi conduzido

sob temperatura constante de 35 °C, onde foi verificada maior porcentagem de germinação de sementes de nim (VIDIGAL et al., 2007). Todos os tratamentos foram umedecidos com água destilada em quantidade suficiente para umedecer o substrato e no interior da câmara de germinação a umidade relativa média foi de 24% durante todo o período experimental.

Uma amostra de sementes que não passou por nenhum tipo de armazenamento foi posto para geminar sob as mesmas condições dos demais tratamentos para se identificar a porcentagem de germinação após os processos de beneficiamento. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2 (3 períodos - 3, 9 e 27 dias e 2 temperatura - 5 °C e 25 °C), totalizando 6 tratamentos compostos por cinco repetições de 18 sementes, totalizando 630 sementes.

4.1.3 Variável analisada

A contagem da germinação foi feita em intervalos de três dias até os 21 dias, considerando como critério, a emissão de 2 mm de radícula. De posse destes dados foi calculada a porcentagem de germinação (%G) para todas as ocasiões das contagens.

4.1.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software Assistat 7.7.

4.2. ENSAIO II – ESTABELECIMENTO DE MUDAS DE *Azadirachta Indica* A. JUSS. SOB SALINIDADE

4.2.1. Local de experimentação e aquisição das mudas

O experimento foi conduzido no período de setembro a dezembro de 2014. As variáveis ambientais no interior da casa de vegetação foram registradas com o uso de um termohigrômetro. Durante todo o período experimental a temperatura média foi de

32,9 °C, variando de 27,8 °C a 39,9 °C, e a umidade relativa do ar média foi de 55%, variando de 32% a 73%, respectivamente.

Para a montagem deste ensaio foram utilizadas mudas de nim indiano, cedidas pelo Centro de produção e comercialização de Recife do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA. Quando cedidas, as mudas tinham 6 meses de idade e estavam mantidas em sacos de polietileno com capacidade para 1 Kg de substrato composto por esterco de gado e solo na proporção de 1:3. As mudas foram produzidas sexualmente de sementes coletadas de matrizes localizadas no bairro de Torrões, em Recife – PE.

Primeiramente, 120 mudas foram selecionadas, quanto à sanidade, à altura e ao número de folhas, em seguida foram transplantadas para vasos de polietileno com capacidade para 11 L, previamente preenchidos com aproximadamente 17 Kg de areia, que foi lavada a fim de se retirar toda a matéria orgânica e os nutrientes. Cada um dos 40 vasos recebeu três plantas, e as mesmas foram mantidas por 40 dias em aclimação na casa de vegetação.

As plantas receberam rega diariamente, seguindo a sequência de um dia com solução nutritiva a ½ força (HOAGLAND; ARNON, 1950 adaptado por BEZERRA NETO; BARRETO, 2012) e dois dias com água. Para minimizar a evaporação, os vasos foram cobertos com recortes de plástico branco evitando também que se criasse uma camada de algas na superfície dos mesmos.

4.2.2 Tratamentos testados e delineamento experimental

Passado o período de aclimação, foram preparadas soluções salinas a partir da adição de sais na solução nutritiva até as concentrações de 50 mM (estresse moderado) e 100 mM (estresse severo) de cloreto de sódio (NaCl) e de cloreto de cálcio (CaCl₂), além de uma solução isenta destes sais, denominada 0mM (controle). As soluções apresentavam as condutividades elétricas: 1,45 dS.m⁻¹, 6,3 dS.m⁻¹, 9,9 dS.m⁻¹, 6,9 dS.m⁻¹ e 10,5 dS.m⁻¹ para 0 mM, 50 mM de NaCl, 100 mM de NaCl, 50 mM de CaCl₂ e 100 mM de CaCl₂, respectivamente.

A imposição do estresse foi realizada de forma particionada, adicionando-se primeiramente as soluções com metade de suas respectivas concentrações (25 mM e 50 mM de cada sal) e após um dia foram adicionadas as soluções com as concentrações definitivas, a fim de se evitar um choque osmótico às plantas. A manutenção dos

tratamentos salinos foi feita através da rega dos vasos até que a condutividade elétrica da solução drenada pelo orifício do vaso fosse semelhante à da solução estoque do tratamento correspondente. Essa avaliação foi feita semanalmente com o uso de um condutivímetro da marca Instrutherm, modelo CD-880.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial $2 \times 2 + 1$ (2 tipos de sal - NaCl e CaCl₂, 2 níveis de sal - 50 mM e 100 mM e uma testemunha 0 mM), totalizando 5 tratamentos com seis repetições cada. Foram realizadas avaliações em quatro ocasiões (após 15, 30, 45 e 60 dias de diferenciação), totalizando 120 plantas.

4.1.3 Variáveis analisadas

A partir do transplântio das mudas, foram realizadas as medições relacionadas ao crescimento e em cada época de coleta (15, 30, 45 e 60 dias após a diferenciação dos tratamentos salinos - DAD) foram avaliadas as trocas gasosas, as relações hídricas, os pigmentos fotossintéticos e a determinação da produção e alocação de matéria seca para os diversos órgãos. Os métodos adotados estão descritos a seguir:

4.1.3.1 Crescimento

No momento do transplântio das mudas para os vasos de polietileno, foram feitas marcações para determinar as plantas de número um, dois e três de cada vaso e as mesmas receberam uma marca indelével na altura de 1 cm da superfície do substrato, para que a partir daí fossem realizadas as medidas de crescimento semanalmente. O diâmetro do caule (DC) foi feito com o uso de um paquímetro digital, também foi avaliada a altura das plantas com uso de uma trena, a partir dessa marca até a inserção da primeira folha (Figura 5), além disso, foi contado o número de folhas das plantas.



Figura 2. A - Medição do diâmetro do caule e B – Medição da altura de mudas de nim indiano submetidas à salinidade em casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRPE (Fonte: Silva, 2013)

4.1.3.2 Trocas gasosas

Com o uso de um analisador portátil de CO_2 a infravermelho, o Infrared Gas Analyzer – IRGA, da marca ADC, modelo LCIpro⁺, foram avaliadas a fotossíntese (A), a transpiração (E), a condutância estomática (gs) e a concentração interna de CO_2 (Ci) (Figura 6). Com esses dados foi calculada a eficiência do uso da água (EUA) através da razão entre a fotossíntese e a transpiração e a eficiência de carboxilação (EC) através da razão entre a fotossíntese e a concentração interna de CO_2 . As avaliações foram realizadas na segunda folha completamente expandida.

A fim de se determinar o horário das avaliações, foi realizado previamente um curso diário das trocas gasosas, em intervalos de duas horas (8h, 10h, 12h, 14h e 16h), em dois dias consecutivos para avaliar o horário de maior abertura estomática da espécie (Figura 6). Na ocasião determinou-se que as avaliações seriam realizadas às 8 horas.

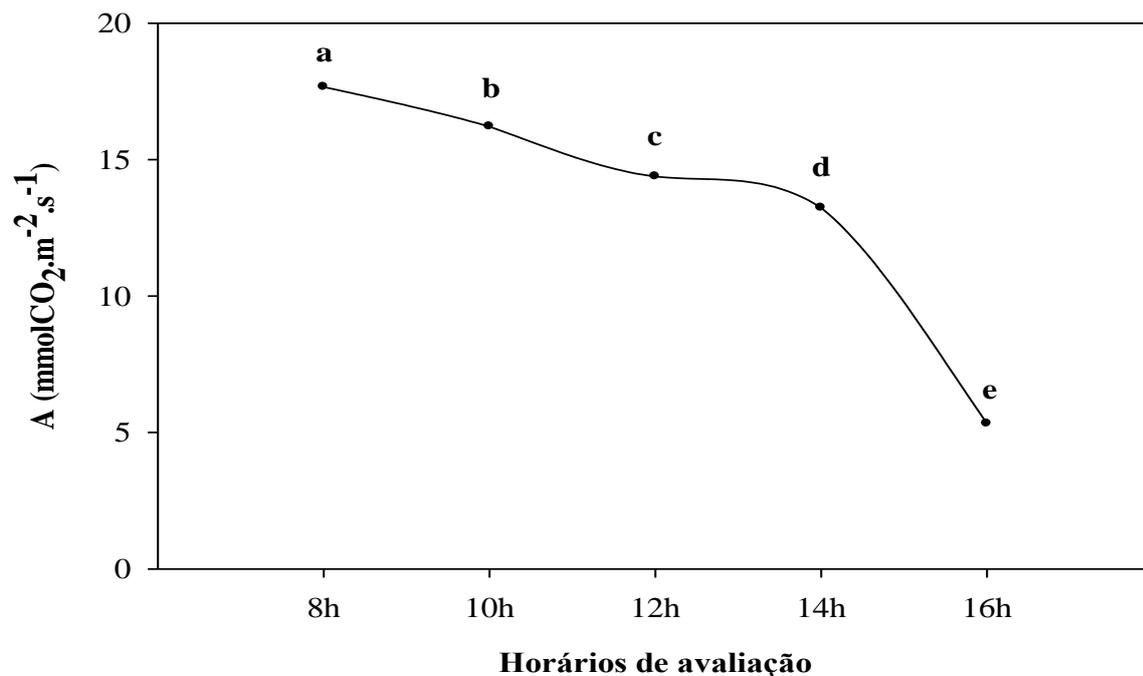


Figura 3: Curso diário da fotossíntese (A) de plantas de nim indiano cultivadas em casa de vegetação. Médias seguidas por mesma letra, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

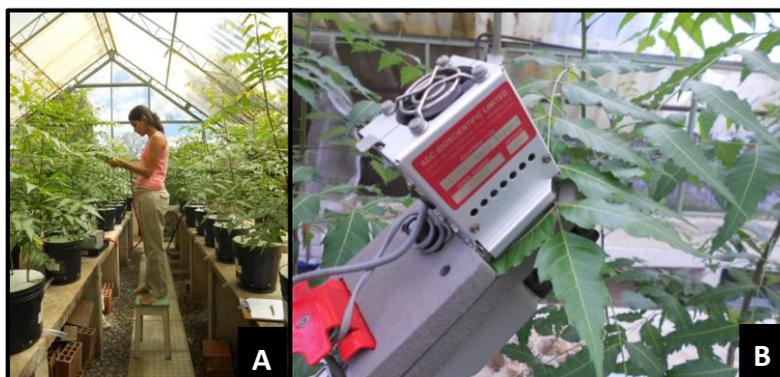


Figura 4. A - Avaliação das trocas gasosas em mudas de nim indiano submetidas à salinidade em casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRPE, B – Detalhe para a pinça do IRGA (Fonte: Silva, 2013)

4.1.3.3 Relações hídricas

O potencial hídrico foliar (Ψ_f) e o teor relativo de água (TRA) foram avaliados em dois horários: às quatro horas (antemanhã) e ao meio dia. Estes horários foram escolhidos devido ao fato de serem os extremos ambientais que podem ocorrer durante o dia. Ao meio dia se encontra a maior demanda evapotranspiratória e antes de amanhecer se encontram as condições mais amenas de temperatura e umidade relativa do ar, portanto as plantas apresentam baixa ou nenhuma taxa transpiratória, sendo, portanto, este o horário provável de maior status hídrico, onde pode ser constatado apenas o efeito do estresse.

Para as avaliações, foram coletadas folhas do terço superior das plantas, as quais foram imediatamente envoltas em filme plástico e acondicionadas em ambiente refrigerado até o momento das avaliações. O potencial hídrico foi feito utilizando-se a porção superior das folhas, contendo de cinco a sete folíolos, com o uso da câmara de pressão de Scholander modelo 3035 (Soil Moisture Equipment Corp, Santa Bárbara, CA, USA), conforme metodologia descrita por Scholander et al. (1965) (Figura 7).

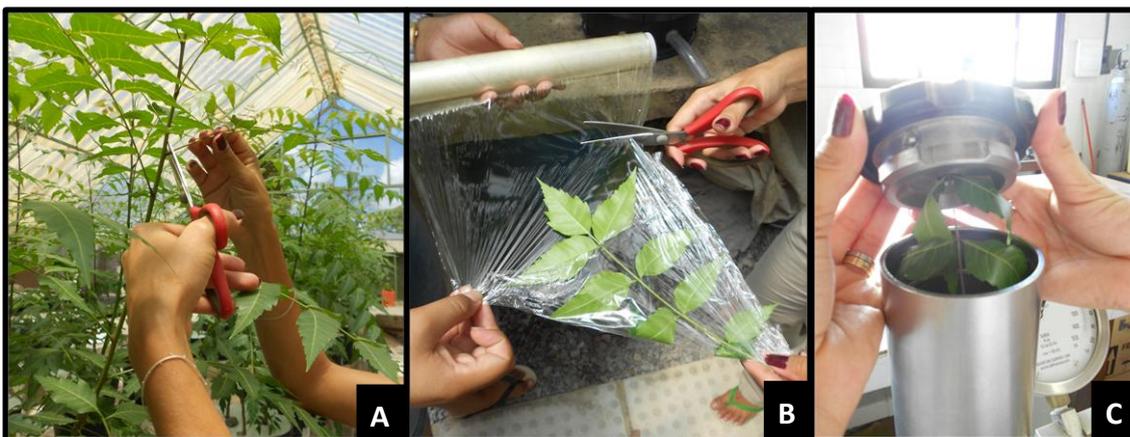


Figura 5. A e B - Coleta de material para avaliação do potencial hídrico foliar e C - Medição do potencial hídrico foliar de mudas de nim indiano submetidas à salinidade em casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRPE (Fonte: Silva, 2013)

O teor relativo de água foi determinado na mesma folha coletada para o potencial hídrico foliar, pesando-se os dois folíolos basais sem as suas nervuras centrais, obtendo-se o peso da matéria fresca, logo os mesmos foram postos em placas de *Petri* e submersos em 10 mL de água destilada, onde passaram 24 horas sob refrigeração (Figura 8). Após esse período, os folíolos foram pesados novamente, a fim de se obter o peso da matéria túrgida e logo após foram postos pra secar em estufa de circulação

forçada de ar a 65°C (±5°C). Após 72 horas os folíolos foram novamente pesados para se obter o peso da matéria seca. O TRA foi calculado de acordo com a seguinte fórmula (CAIRO, 1995):

$$\text{TRA} = \frac{(PMF - PMS)}{(PMT - PMS)} \times 100$$

Onde:

TRA - Teor relativo de água

PMF - Peso da matéria fresca

PMS - Peso da matéria seca

PMT - Peso da matéria túrgida



Figura 6. A - Recorte dos folíolos basais e B - Retirada da nervura central dos folíolos para obtenção do peso da matéria fresca e C - Imersão em água destilada para obtenção do peso da matéria túrgida, na determinação do teor relativo de água de folhas de nim indiano submetidas à salinidade em casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRPE (Fonte: Silva, 2013)

Foi avaliado ainda o percentual de danos nas membranas cortando-se 10 discos do limbo de folhas localizadas também no terço superior das plantas, os mesmos foram imersos em 10 mL de água destilada em tubos de ensaio. Após incubação por 24 h a 25 °C foi aferida a condutividade elétrica da solução (L1) e o vazamento de eletrólitos foi induzido por meio de incubação em banho-maria por 1h a 100 °C, quando foi então realizada outra leitura da condutividade elétrica da solução (L2) (Figura 9). Para determinar o percentual de integridade das membranas, os dados foram aplicados na seguinte fórmula (ALVES F. A. L., 2009).

$$\%DM = (L1/L2) \times 100$$

Onde:

DM – Danos nas membranas

L1 – Leitura inicial

L2 – Leitura final



Figura 7. A - Recorte de discos de folíolos de nim, B - Incubação em banho-maria dos discos em água destilada e C - Leitura da condutividade elétrica da solução para determinação do percentual de danos nas membranas em folhas de mudas de nim indiano submetidas à salinidade em casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRPE (Fonte: Silva, 2013)

4.2.3.5 Pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos foram avaliados pelos métodos destrutivo e não destrutivo. No primeiro, utilizou-se o clorofilômetro SPAD-506 (Minolta, Japão), com o qual foi realizada uma média de 10 leituras ao longo de toda a planta.

Foram analisados ainda os teores de clorofilas *a*, *b*, total e carotenoides pelo método destrutivo, onde foram coletados 0,1 g de limbo foliar que foram cortados em pequenos pedaços e imersos em 10 mL de álcool etílico, em tubos de ensaio previamente cobertos com papel alumínio, onde ficaram por 48 h sob refrigeração. Passado este período foram feitas as leituras da absorbância em espectrofotômetro da clorofila *a*, *b* e carotenoides, com os comprimentos de onda 664 nm, 649 nm e 470 nm, respectivamente (Figura 10). Para o cálculo da concentração dos pigmentos, as leituras correspondentes à absorbância de cada pigmento foram aplicadas nas fórmulas que seguem (LISCHTENTHALER; BUSCHMAN, 2001):

$$\text{Clor } a: 13,36 \times A_{664} - 5,19 \times A_{649}$$

$$\text{Clor } b: 27,43 \times A_{649} - 8,12 \times A_{664}$$

$$\text{Clor total: Clor } a + \text{Clor } b$$

$$\text{Carotenoides: } (1000 \times A_{470} - 2,13 \times \text{Clor } a - 97,64 \times \text{Clor } b) / 209$$



Figura 8. A - Recorte do limbo foliar em pequenos fragmentos, B – Retirada do extrato dos pigmentos dos tubos de ensaio e C - Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos por espectrofotometria em folhas de mudas de nim indiano submetidas à salinidade em casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRPE (Fonte: Silva, 2013)

4.2.3.5 Produção de matéria seca e alocação para os diversos órgãos

Após a realização de todas as análises já descritas em cada época de avaliação (15, 30, 45 e 60 DAD), as plantas foram separadas em folhas, caules e raízes para a determinação da produção de matéria seca. As partes da planta foram acondicionadas em sacos de papel e postas para secar até atingir peso constante em estufa de aeração forçada 65°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$). Após esse período o material foi pesado em balança analítica para obtenção do peso da matéria seca das folhas (MSF), do caule (MSC) e das raízes (MSR), além de calculada a matéria seca total (MST). De posse desses dados foram calculadas segundo Benincasa (1988), a alocação de matéria seca para as folhas (ABF), para o caule (ABC) e para as raízes (ABR), além da relação raiz e parte aérea (R/Pa).

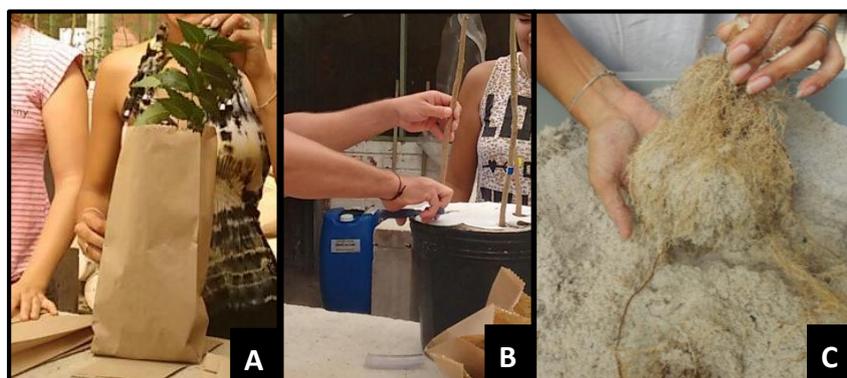


Figura 9. A - Coleta de folhas, B - Coleta de caule e C - Coleta de raízes para avaliação da produção de matéria seca de mudas de nim indiano submetidas à salinidade em casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRPE (Fonte: Silva, 2013)

4.2.4 Análise estatística

Todos os dados foram então submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o software Assistat 7.7.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ENSAIO I – INFLUÊNCIA DO PERÍODO E TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES NA GERMINAÇÃO DE NIM INDIANO

A germinação de sementes de nim indiano foi afetada significativamente quando submetidas aos diferentes períodos e temperaturas de armazenamento. O grupo de sementes que não foi armazenado apresentou uma porcentagem de germinação média de 88% sendo este valor maior do que aqueles alcançados quando as sementes foram submetidas às condições de armazenamento testadas nesta pesquisa.

Observando a porcentagem de germinação (Figura 10), percebeu-se que a baixa temperatura (5 °C) impediu que o processo germinativo ocorresse, para praticamente todos os tempos de armazenamento adotados. O que não ocorreu quando as sementes foram submetidas a uma temperatura mais amena (25 °C), onde pôde-se observar quase que isoladamente, o efeito do tempo de armazenamento sobre a redução da germinabilidade a medida que esse foi aumentado.

Foi verificado que o armazenamento a 5 °C não surtiu bons resultados, uma vez que as mesmas apresentaram uma redução de 98% na porcentagem de germinação final quando armazenadas por três dias, em relação aquelas armazenadas pelo mesmo período a 25 °C. A partir de nove dias de armazenamento a 5 °C as sementes já não germinaram mais, mostrando quão prejudicial é o armazenamento sob baixa temperatura para a germinação de sementes de nim (Figura 10).

Isso não ocorreu quando as mesmas foram armazenadas a 25 °C e um fato interessante que pode ser verificado é que após três dias de armazenamento a 25 °C, em média 74% das sementes germinaram. No entanto, passados nove dias de armazenamento sob a mesma temperatura, essa porcentagem de germinação reduziu para 25% (66% menor). Quando as sementes foram submetidas a 27 dias de armazenamento também a 25 °C, a porcentagem de germinação final foi de 27%, ou seja, 62% menor do que aquelas sementes que foram armazenadas sob esta temperatura pelo menor período (Figura 10). Independente do fato de a %G ter sido um pouco maior após 27 dias de armazenamento do que após nove dias, ainda pode-se considerar essa perda de viabilidade muito alta, o que denota que após um período de nove dias de

armazenamento, já não é mais viável fazer uso de sementes de nim, como por exemplo, para fins de produção de mudas sexuadamente.

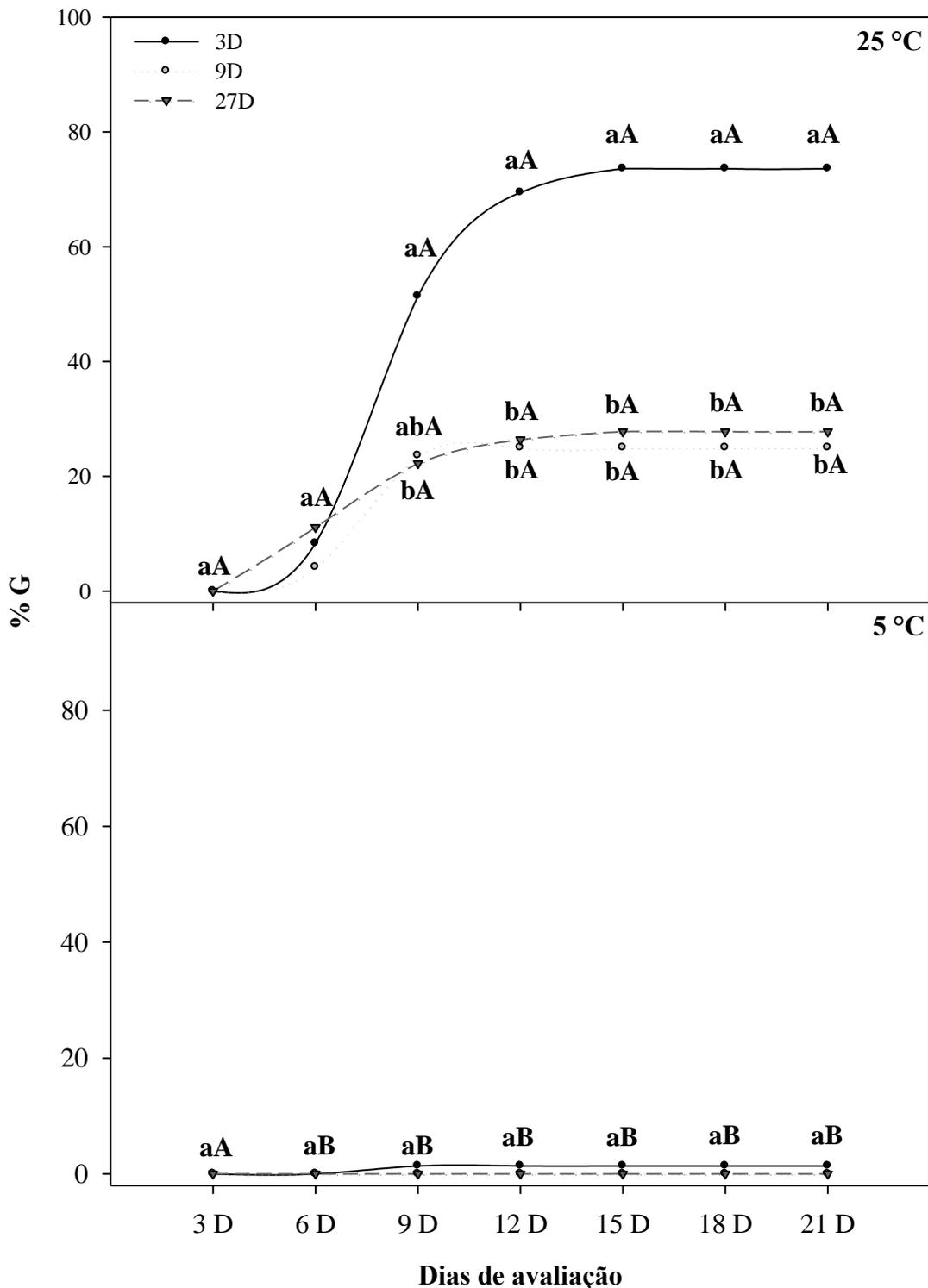


Figura 10: Porcentagem de germinação de sementes de nim indiano sob diferentes períodos e temperaturas de armazenamento. Médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre as temperaturas e minúsculas entre os períodos de armazenamento, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Um único grupo de letra minúscula e maiúscula para mais de um tratamento, representa semelhança estatística entre eles

Em estudo com sementes de nim, os tempos de armazenamento 0, 3, 7, 15, 30, 45 e 60 dias, em temperatura ambiente e a 10 °C, Phogat et al. (2009) também encontraram valores decrescentes de germinação ao longo do tempo devido à perda de umidade que ocorreu independentemente da temperatura de armazenamento, porém aquelas submetidas a 10 °C, somente reduziram a sua germinação a zero a partir dos 45 dias, enquanto que as demais chegaram aos 60 dias ainda com 30% de germinação, comprovando, assim como na presente pesquisa, que a baixa temperatura nem sempre é ideal para o armazenamento de sementes recalcitrantes como encontrado na literatura (MARTINEZ, 2008).

Sementes de nim armazenadas em temperatura ambiente (26 - 28 °C) mantiveram 100% de germinação em uma pesquisa desenvolvida por Varghese e Naithani (2000a) até 15 dias após a colheita, no entanto, a perda de umidade para 11,8%, causou também uma redução substancial da viabilidade. Porém, diferentemente da presente pesquisa, estas sementes só perderam a viabilidade completamente, após 180 dias, quando apresentavam umidade de 5,9%. Os autores justificaram ainda que a secagem acelerada pode ter aumentado os danos à viabilidade de sementes de nim, o que pode justificar os baixos valores encontrados na presente pesquisa, uma vez que esta variável não foi acompanhada periodicamente.

Enfatizando os resultados extremos que existem dentre os estudos realizados com esta espécie, estão os encontrados por Eeswara, Allan e Powell (1998), que testando estágios de maturação na coleta, conteúdos de água e temperaturas de armazenamento, após cinco semanas de armazenamento em refrigerador (3 °C), em sala com ar condicionado (22 °C) e em freezer (-20 °C), com sementes secas até 13,2% de umidade, houve germinação de 65%, 52% e 0%, respectivamente, chegando a atingir uma germinação de 50% mesmo após 24 semanas e os autores discutem ainda a classificação destas sementes, se recalcitrante, intermediárias ou ortodoxas.

Diante da variação de respostas encontradas na literatura, vale destacar que diversos são os fatores que podem estar afetando essa falta de padronização entre estes testes e vários autores vem tentando desvendar quais motivos e como eles influenciam nestas flutuações tão intensas. Por exemplo, Pedroso, Azevedo e Vanzolini (2008), em pesquisa realizada no Brasil, estudaram a influência da coloração dos frutos no momento da coleta nas variáveis de germinação, descobrindo que sementes coletadas

diretamente do chão, parcialmente com polpa apresentam uma melhor qualidade fisiológica.

Já Phogat et al. (2009), em pesquisa realizada na Índia, avaliaram os efeitos das condições de coleta e a temperatura de armazenamento sobre a germinação de sementes de nim indiano, as classificando como recalcitrantes e comprovando que as mesmas devem ser mantidas com alta umidade. O autor considera esse fator mais crítico do que a própria temperatura de armazenamento, que não deve deixar de ser considerada.

Inovações em técnicas de armazenamento podem ser encontradas na literatura, como é o caso do crioarmazenamento, ou seja, armazenamento em nitrogênio líquido. Adotando-se essa técnica Varghese e Naithani (2008) encontraram uma sobrevivência das sementes de 92 - 96% após um mês de armazenamento. Após 12 meses os autores relataram uma queda na germinação, muito embora, esta tenha sido de 50% em relação à controle, o que foi conseguido após uma prévia dessecação das sementes até $0,16 \text{ g H}_2\text{O. g}^{-1}$ matéria seca.

Embora as sementes de nim sejam consideradas por alguns autores como intermediárias, na presente pesquisa, observou-se um comportamento recalcitrante, pois elas perderam sua viabilidade após pouco tempo de armazenamento. O processo de dessecação é natural no armazenamento de sementes, porém este grupo em especial, já apresenta uma redução drástica de viabilidade nos primeiros dias após a coleta e uma alternativa para minimizar esse processo seria, de modo geral, armazenar as sementes em ambiente propício para a manutenção de umidade, pelo mínimo de tempo possível, embora essas sugestões normalmente devam ser dadas com base em condições bem específicas.

Diante destes resultados pode-se dizer que o comportamento do nim é bastante variado em relação a sua viabilidade, e que embora já existam muitos trabalhos tratando deste tema, não existe um padrão para o tempo de armazenamento, sabe-se apenas que baixas temperaturas são extremamente prejudiciais a manutenção da viabilidade e vigor das sementes. Como foi discutido, é necessário o desenvolvimento de trabalhos para estabelecer os padrões de coleta, de pré-tratamento e de armazenamento para que se possa ter algum entendimento do comportamento padrão da germinação das sementes de nim. Por enquanto recomenda-se que as sementes sejam semeadas o quanto antes após a coleta, pois assim aproveita-se o vigor das mesmas, e caso haja a necessidade de armazenar as sementes, sugere-se que sejam realizados testes especificamente para cada

região de coleta enquanto mais estudos são realizados para identificar o padrão de tolerância a dessecação desta espécie.

5.2 ENSAIO II – ESTABELECIMENTO DE MUDAS DE *Azadirachta indica* A. JUSS. SOB SALINIDADE

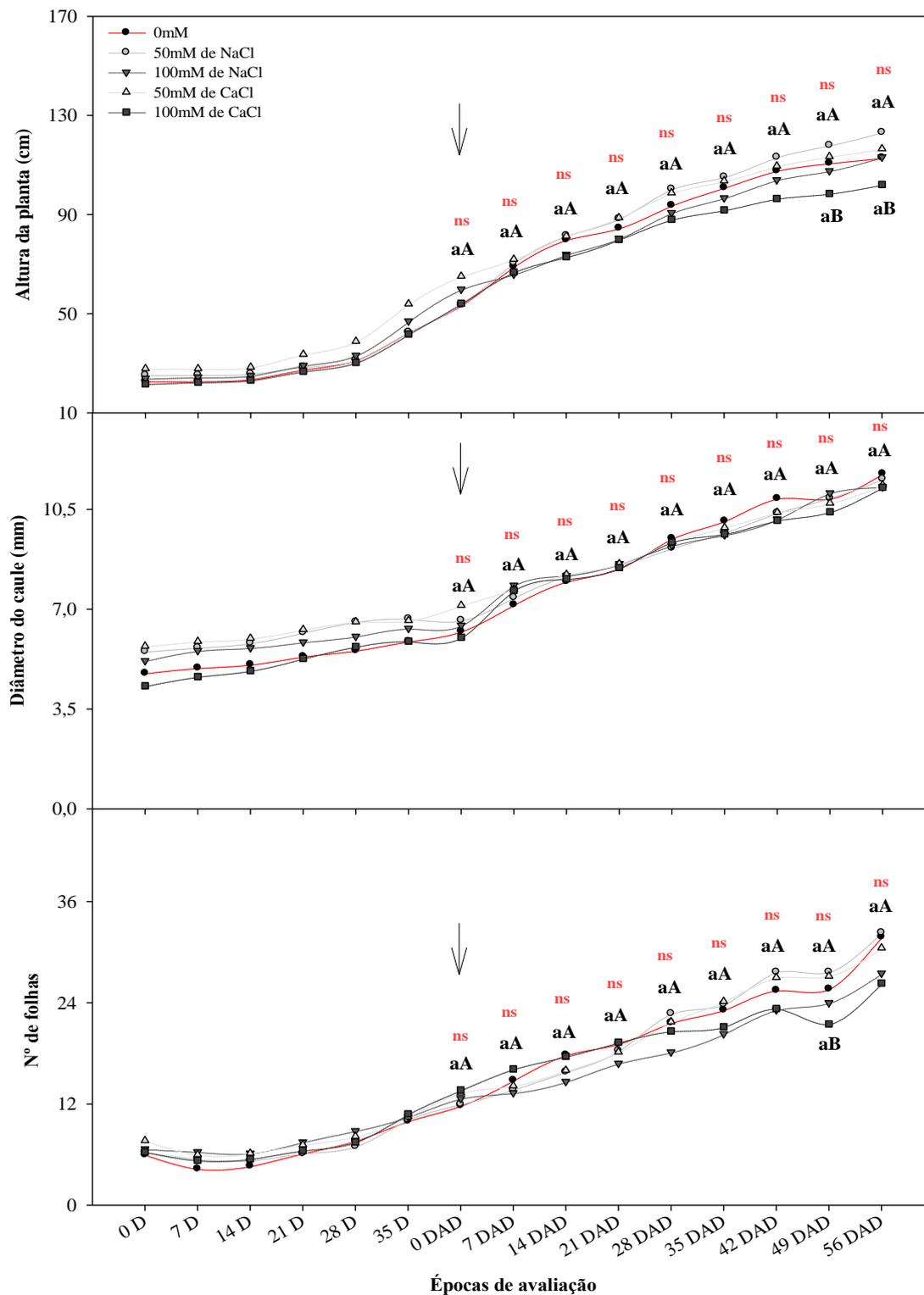
5.2.1 Crescimento

As variáveis de crescimento quase não foram afetadas pelos níveis de salinidade estudados, o que pode ser observado na figura 11. Todas as variáveis do crescimento foram uniformes entre as plantas de todos os tratamentos, até completaram 42 dias de imposição do estresse.

Para a variável altura, foi observado que nas primeiras semanas após o transplântio houve um crescimento lento para todas as plantas, sendo este mais pronunciado a partir do 28º dia após o transplântio. Quando as plantas completaram 42 dias, foi realizada a diferenciação dos tratamentos salinos, pois até então as plantas estavam em fase de aclimatação (Figura 11).

No momento do transplântio, as plantas apresentavam uma altura média de 24,3 cm e essa altura foi aumentada para 57,3 cm no momento da diferenciação. No entanto, passados 28 dias da diferenciação, os tratamentos salinos aplicados não causaram efeito significativo nesta variável. Desde o início da diferenciação até o 28º dia, houve um incremento absoluto na média de altura de 75%, 86%, 52%, 52% e 62% para as plantas dos tratamentos 0 mM, 50 mM de NaCl, 100 mM de NaCl, 50 mM de CaCl₂ e 100 mM de CaCl₂ (Figura 11).

A interação entre o tratamento controle e o fatorial entre os níveis e os tipos de sais estudados não foi significativa até o final do período experimental. Aos 49 DAD foi verificada uma diferença para as plantas cultivadas sob 100 mM de CaCl₂, essa diferença persistiu até a última semana de avaliação (56 DAD). Nestas duas épocas de avaliação o tratamento severo apresentou alturas 15% menores em relação ao tratamento de 50 mM do mesmo sal.



** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 11: Crescimento de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ por 60 dias, cultivadas em casa de vegetação. A - Altura da planta, B - Diâmetro do caule e C - Número de folhas. As setas indicam o momento da diferenciação dos tratamentos salinos. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais) em cada época de avaliação, médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Um único grupo de letra minúscula e maiúscula para mais de um tratamento, representa semelhança estatística entre eles.

Quanto ao diâmetro do caule, inicialmente as plantas foram transplantadas para os vasos com uma sensível diferença desta variável, porém esta diferença foi anulada à medida que as plantas se aclimataram nos vasos. Novamente pode ser verificado que a interação testemunha x fatorial não foi significativa em nenhuma das épocas de avaliação. Até o final do período experimental o diâmetro não sofreu nenhum efeito da salinidade. Pode ser observado que houve um incremento de 89%, 74%, 76%, 59% e 87%, para os tratamentos 0 mM, 50 mM e 100 mM de NaCl e 50 mM e 100 mM de CaCl₂, respectivamente, desde a diferenciação dos tratamentos até o final do período experimental (Figura 11).

O número de folhas foi inicialmente reduzido, provavelmente em resposta ao transplântio, havendo casos de plantas que perderam quase todas as folhas. A partir da 3ª semana, as plantas retornaram a produção de novas folhas, havendo um aumento em todos os indivíduos estudados, chegando ao momento da diferenciação dos tratamentos com uma média de 13 folhas por planta (Figura 11).

O número de folhas não foi afetado até os 42 DAD, quando as mesmas apresentavam 26, 28, 23, 27 e 23 folhas por planta, para os tratamentos 0 mM, 50 mM e 100 mM de NaCl e 50 mM e 100 mM de CaCl₂, respectivamente, (Figura 11). Porém, aos 49 DAD foi observado um número de folhas 26% menor nas plantas do tratamento severo de CaCl₂, se comparado ao moderado de CaCl₂, sendo denotada para este tratamento, uma redução nesta variável, provavelmente por queda das mesmas. Porém na última avaliação, pode ser observado um aumento na variável pelo surgimento de novas folhas, o que causou novamente a não diferenciação entre os níveis e tipos de sais utilizados.

De modo geral, percebe-se que as variáveis de crescimento das plantas de nim indiano foram pouco afetadas pelo estresse salino. No entanto, em todas as variáveis estudadas pôde-se perceber que as mesmas economizaram energia no período inicial de aclimação, denotando a importância deste período.

Fazendo um estudo comparativo entre duas espécies, nim indiano e cinamono, regadas com soluções de CE de 0,49; 4,15; 6,33 e 10,45 dS.m⁻¹, Freire et al. (2010), encontraram após 45 dias de estresse, reduções no crescimento em altura e na produção de matéria seca de ambas as espécies, porém os prejuízos foram consideravelmente maiores em plantas de nim. As reduções de altura foram significativas a partir da CE de 6,33 dS.m⁻¹, com os menores valores para o tratamento mais severo, concluindo que

plantas de nim sofrem com o estresse. Uma observação que se faz importante neste trabalho, é que os autores também avaliaram a absorção de macronutrientes e do Na^+ na parte aérea das plantas, encontrando que absorção dos macronutrientes foi reduzida em 50%, enquanto que o Na^+ foi acumulado até seis vezes mais nas plantas do tratamento mais estressado em comparação com as controle, indicando que o nim não foi eficiente em regular a absorção e translocação destes nutrientes na parte aérea.

Nunes et al. (2012), trabalhando com solo salino e não salino em conjunto com a adição de biofertilizante em mudas de nim, encontrou, 86 dias após a semeadura, inibição do crescimento em altura em plantas regadas com solução salina de $1,04 \text{ dS.m}^{-1}$, além da redução em 41,6% no diâmetro caulinar e em 49% no número de folhas emitidas, ambos, entre os tratamento controle e o maior nível de sal testado ($4,0 \text{ dS.m}^{-1}$), concluindo que mudas de nim não toleram ser irrigadas com soluções com CE acima $0,5 \text{ dS.m}^{-1}$ sem perdas na qualidade das mesmas, o que não ocorreu na presente pesquisa. Uma justificativa para essa diferença também pode ser a idade entre as plantas utilizadas nos dois trabalhos, já que as plantas utilizadas pelos autores supracitados eram mais jovens (86 dias) e passaram menos tempo sob irrigação salina (56 dias), enquanto que as do presente trabalho foram transplantadas com 180 dias de idade e após passar mais um período de aclimação de 40 dias é que foram submetidas à salinidade por 60 dias, o que pode ter conferido às plantas melhor condição de enfrentar o estresse.

Diniz et al. (2013), testaram outras concentrações salinas (CE: 0,5; 1,5; 3,0; 4,5 e $6,0 \text{ dS.m}^{-1}$), também em conjunto com biofertilizante e após 117 dias sob essas condições, encontraram reduções na altura, no diâmetro, no número de folhas, de 59%, 29% e de 58%, respectivamente, quando comparado o tratamento salino mais severo ($6,0 \text{ dS.m}^{-1}$) e o controle ($0,5 \text{ dS.m}^{-1}$), concluindo que o estresse salino inibe o crescimento de mudas de nim. As diferenças de resultados em relação a presente pesquisa podem ser justificadas pelo tempo que estas plantas passaram sob estresse, que foi de 56 e 117 dias, para o primeiro e o segundo, respectivamente. No entanto, vale salientar que a menor concentração de sais utilizada na presente pesquisa, já tinha uma CE superior ao maior nível que os autores supracitados testaram, deixando claro que as mudas trabalhadas neste experimento toleraram níveis de até 11 dS.m^{-1} de NaCl e CaCl_2 sem grandes prejuízos no crescimento, mais uma vez isso pode ter ocorrido devido a maturidade das mudas utilizadas nesta pesquisa.

Arshi, Abdin e Iqbal (2006), encontraram em plantas de *Cassia angustifolia* que o CaCl_2 promoveu o crescimento de folhas e minimizou os efeitos causados pelo NaCl , já que neste trabalho eles testaram níveis de destes sais isolados e combinados, porém as concentrações que causaram benefícios às plantas foram bem menores do que as testadas nesta pesquisa, o maior nível de CaCl_2 foi de 10 mM.

Na presente pesquisa, as variáveis de crescimento se mantiveram semelhantes entre os tratamentos testados até os 60 dias, exceto o número de folhas que foi afetado somente aos 49 DAD. Segundo Munns e Tester (2008) a tolerância à fase osmótica pode ser detectada através do aumento da capacidade de emitir folhas novas, enquanto se aumenta também a sobrevivência das folhas mais velhas, o que foi observado nas plantas deste estudo até os 49 DAD, pois até então a emissão de folhas estava semelhante entre os tratamentos, assim como a senescência das folhas mais velhas de plantas estressadas, que quase não foi verificada até o final do período experimental, denotando mais uma vez que essas plantas toleraram bem a salinidade.

5.2.2 Trocas gasosas

Todas as variáveis estudadas foram afetadas pelo estresse, de maneira diferenciada a depender do tipo de sal e das épocas de avaliação, com efeitos mais expressivos nas últimas épocas em função da duração do estresse. As reduções foram pronunciadas em plantas submetidas à maior concentração (100 mM) e entre os sais estudados, foram maiores em plantas submetidas ao estresse por CaCl_2 .

A interação testemunha x fatorial foi altamente significativa em quase todas as épocas, exceto aos 45 DAD onde não verificada interação significativa. Aos 15 dias sob salinidade a taxa de fotossíntese das plantas controle ficou em torno de $20,3 \mu\text{molCO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a maior de todas as coletas. Foram encontradas reduções desta variável para os tratamentos severos de NaCl e CaCl_2 de 19% e 55%, respectivamente. Havendo no tratamento de 100 mM uma diferença significativa entre os dois sais utilizados, onde os valores de fotossíntese foram 33% menores nas plantas cultivadas em CaCl_2 (Figura 12).

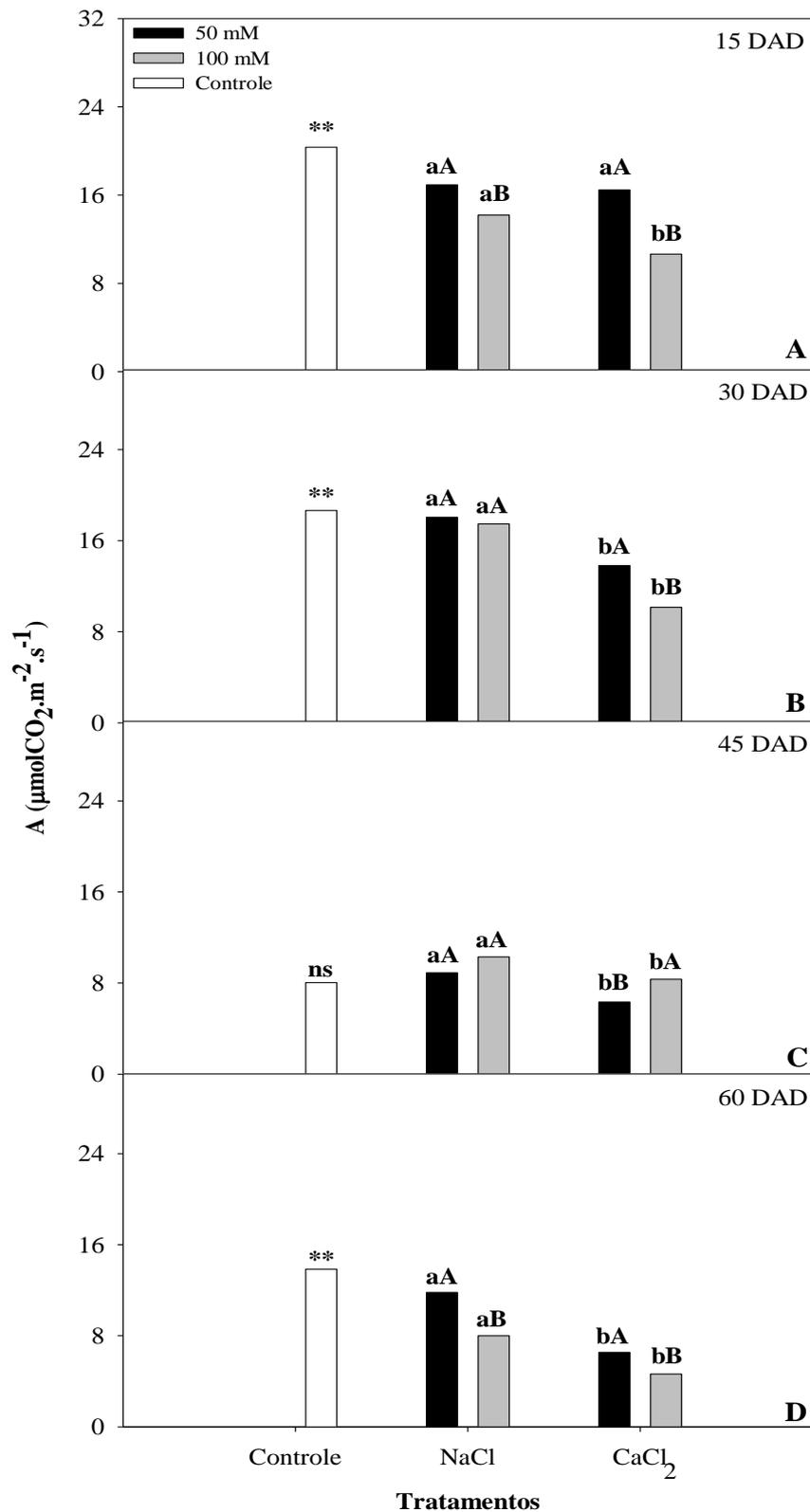
Aos 30 DAD, apenas o tratamento severo de CaCl_2 foi reduzido em relação ao moderado deste sal, em torno de 36%. Enquanto que na comparação entre os tipos de

sais dentro do mesmo tratamento o CaCl_2 novamente causou redução em relação ao NaCl de 31% e 72% para os níveis de 50 mM e 100 mM, respectivamente.

Aos 45 DAD as plantas do tratamento 50 mM de CaCl_2 apresentaram valores de fotossíntese 31% menores do que as do tratamento severo deste sal. Com relação aos efeitos dos sais para cada tratamento, ocorreu algo semelhante à segunda coleta, onde as plantas cultivadas sob CaCl_2 , apresentaram valores 40% (50 mM) e 23% (100 mM) menores em relação àquelas sob NaCl (Figura 12).

Já na última avaliação o efeito da salinidade foi maior, tanto entre os níveis quanto entre os sais. Os níveis severo de ambos os sais causaram redução de 48% e 41% em relação aos níveis moderados, para NaCl e CaCl_2 , respectivamente. Nos níveis de 50 mM e 100 mM, o sal de CaCl_2 novamente foi responsável pela diminuição da taxa fotossintética das plantas de nim, com valores 80% e 72% menores do que os encontrados para as plantas cultivadas sob NaCl , respectivamente (Figura 12).

Pode ser observado que ao longo das épocas de avaliação houve uma redução gradual dos valores de fotossíntese, sendo menores nas duas últimas coletas. É notório que aos 45 dias de imposição do estresse, todos os tratamentos apresentaram uma redução drástica da assimilação de CO_2 , se comparado com as coletas realizadas aos 15 e aos 30 DAD (Figura 12). Esse comportamento atípico pode ser justificado devido a alterações das condições externas que afetaram todos os tratamentos, como a diminuição da temperatura e aumento da umidade relativa do ar causada por precipitações ocorridas nos dias que antecederam esta coleta. Esse fato também foi verificado na última coleta, porém em menor intensidade, o que pode não ter sido suficiente para causar tanta variação desta variável, quanto na coleta anterior.



** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 12: Fotossíntese (A) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, C - 45 DAD e D - 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

O que pode ser ressaltado é que as plantas regadas com solução de NaCl, independente dos níveis, permaneceram com os maiores valores, por todas as coletas que se seguiram, o que pode indicar que essa variável, embora seja sensível as mudanças ambientais foi bem administrada pelas mudas não submetidas ao estresse por NaCl.

Para a variável transpiração, foi observado que nas duas primeiras coletas que não houve interação significativa entre o tratamento controle e o fatorial, no entanto esta foi significativa na terceira, e altamente significativa na quarta denotando o efeito crescente do estresse.

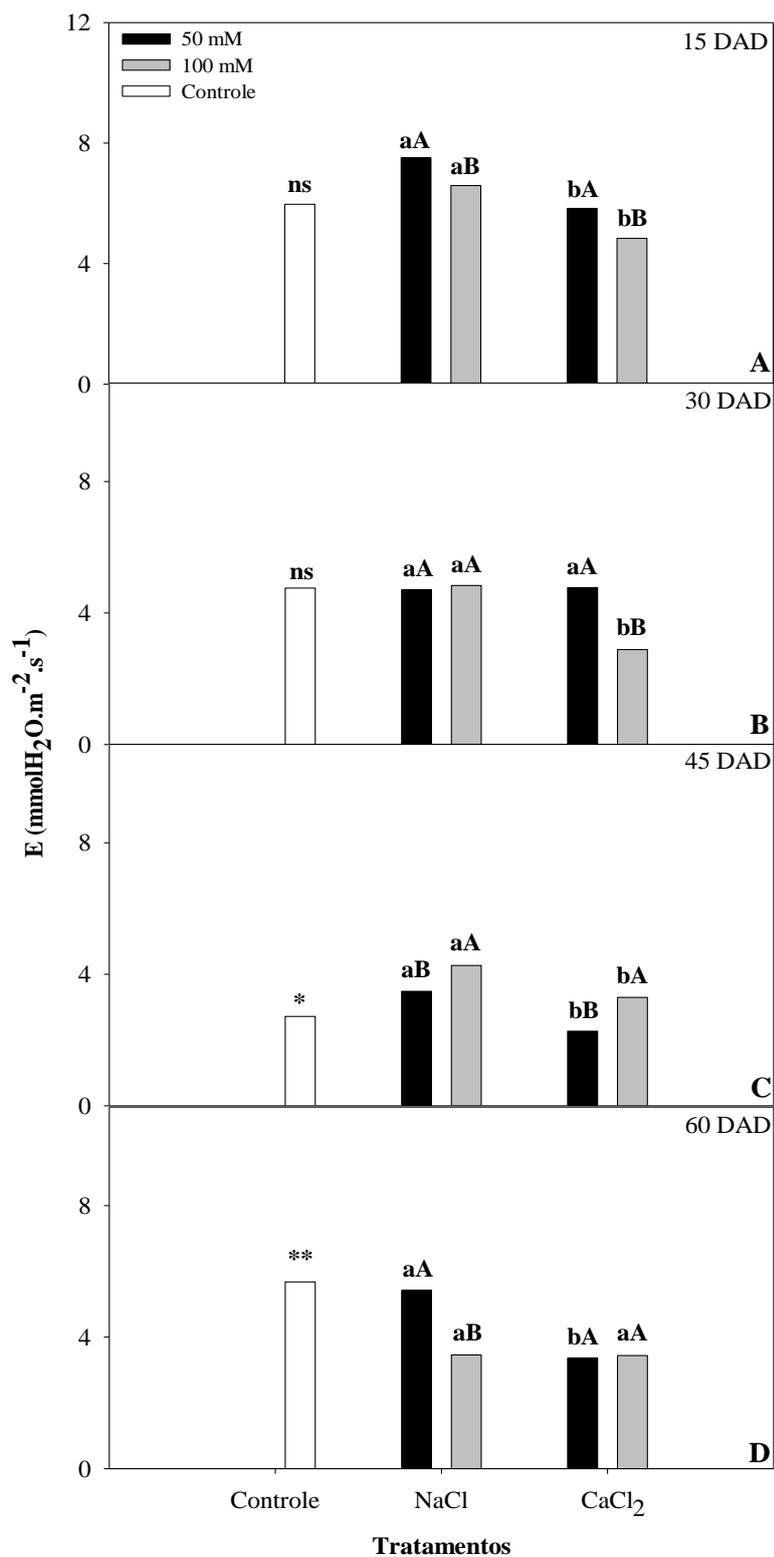
Aos 15 DAD foi verificada uma redução nos tratamentos severos dos dois sais, em relação ao moderado, de 14% e 20% respectivamente. Comparando-se os sais, foi observado um maior efeito do CaCl₂, com valores 29% e 36% menores do que o NaCl, para os níveis 50 mM e 100 mM, respectivamente (Figura 13).

Passados 30 DAD o efeito do estresse só foi verificado nas plantas sob 100 mM de CaCl₂, sendo estes valores 65% menores do que o outro nível de CaCl₂ e 67% menor do que o mesmo nível de NaCl (Figura 13).

Após 45 DAD, as plantas dos tratamentos 50 mM apresentaram os menores valores em relação ao severo de ambos os sais, sendo estes 23% e 45% menores, para o NaCl e CaCl₂, respectivamente. Em relação aos tipos de sais, mais uma vez o CaCl₂ causou as maiores reduções, independente do nível de sal (Figura 13).

Na última coleta (60 DAD) apenas o tratamento severo de NaCl foi reduzido em 57% em relação ao nível moderado deste sal. Enquanto que para o nível de 50 mM o CaCl₂ causou maior efeito, reduzindo a variável em questão em 61% (Figura 13).

Foi observado para a transpiração, comportamento semelhante ao verificado na fotossíntese, com os menores valores nas duas últimas coletas, provavelmente pelo mesmo motivo que foi abordado anteriormente. Porém, esse fato não ocorre de maneira significativa para todos os tratamentos, comparando-se as épocas de avaliação, foi encontrado que os tratamentos controle e os moderados (NaCl e CaCl₂) sofreram essa redução na terceira coleta (45 DAD) e um leve aumento na quarta (60 DAD) (Figura 13). Já os tratamentos severos de ambos os sais permaneceram similares ou continuaram reduzindo a sua transpiração, denotando que os efeitos do estresse talvez estivessem sendo mais pronunciados do que as variações ambientais como discutido na fotossíntese.



** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 13: Transpiração (E) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl_2 em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, C - 45 DAD e D - 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

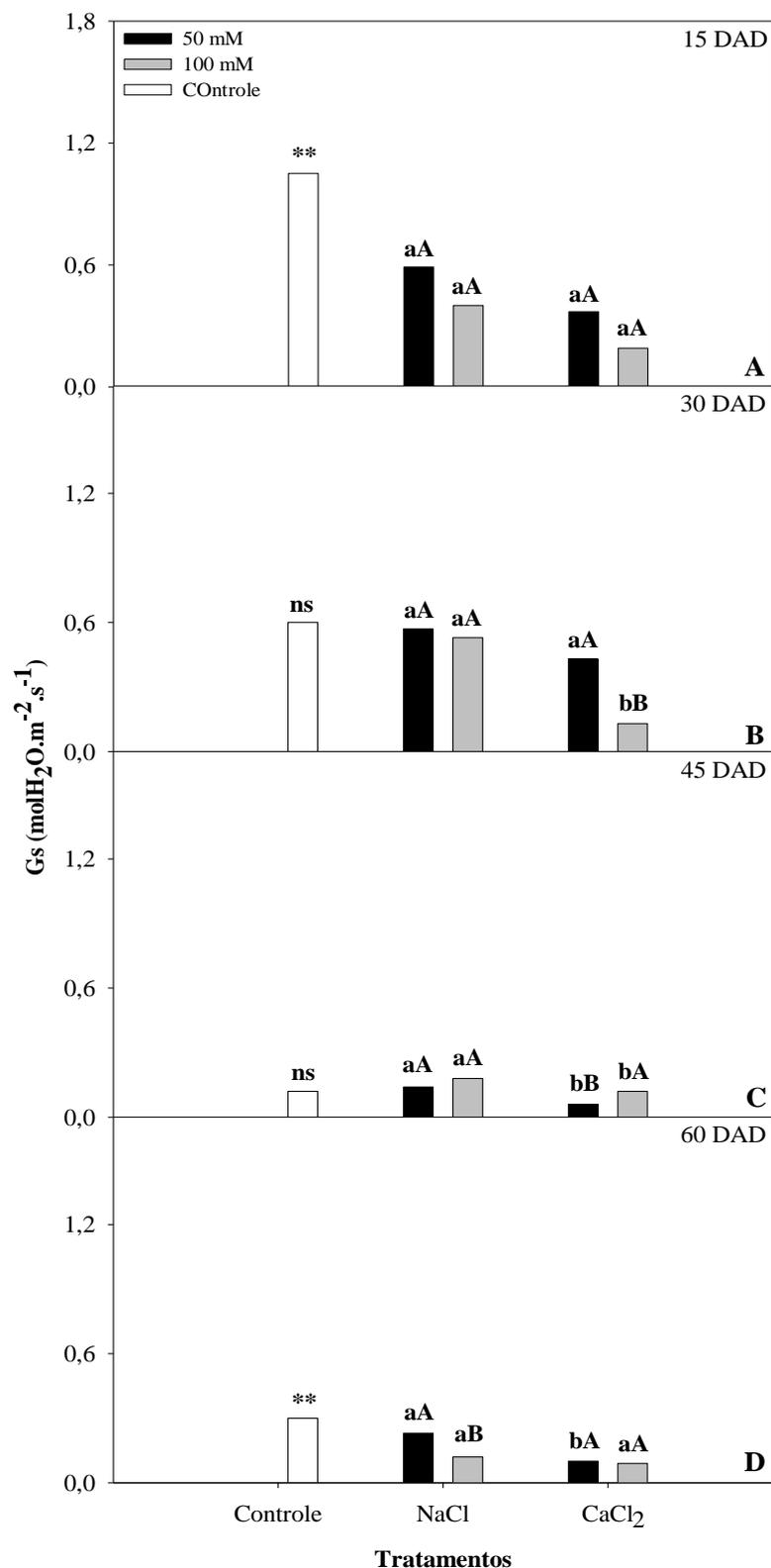
Por se tratar da abertura estomática no momento das avaliações, a condutância estomática acompanhou os valores de fotossíntese e transpiração. A interação entre o tratamento controle e o fatorial entre os níveis e tipos de sais foi significativa apenas para a primeira e a última coletas, não apresentando diferença nas demais.

Aos 15 DAD não foi verificada diferença estatística entre nenhum dos níveis e tipos de sal estudados, onde a condutância estomática variou de 0,19 a 0,59 $\text{mmol.H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Já aos 30 DAD o tratamento de 100 mM de CaCl_2 foi 31% menor do que o moderado deste sal e três vezes menor do que as plantas cultivadas sob o mesmo nível de NaCl (Figura 14).

Na terceira coleta, apenas o tratamento 50 mM de CaCl_2 foi menor do que o severo, com redução de 100%. Na comparação entre os e feitos dos sais, assim como na fotossíntese e transpiração, o CaCl_2 também reduziu esta variável em ambos os níveis. Essas reduções foram de 142% e 50% para 50 mM e 100 mM, respectivamente (Figura 14).

Na última coleta, ocorrida após 60 dias de estresse só foi verificada diferença entre os níveis de NaCl , com os menores valores para o tratamento severo e comparando os sais, para o nível de 50 mM o CaCl_2 apresentou o maior efeito, com valores xx% menores do que os encontrados no 50 mM de NaCl (Figura 14).

Nas duas últimas coletas, pelo mesmo motivo discutido anteriormente, as plantas de todos os tratamentos se encontravam com condutância estomática mais baixa que nas avaliações anteriores, com valores médios que variaram de 0,06 a 0,30 $\text{molH}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, enquanto que na primeira coleta estes valores chegaram a 1,05 $\text{molH}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Nestas ocasiões, as plantas não precisaram abrir tanto os seus estômatos para as trocas de vapor d'água com o ambiente, já que o mesmo estava com condições bem mais amenas do que anteriormente.



** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 14: Condutância estomática (gs) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, C - 45 DAD e D - 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Para a concentração interna de CO_2 a interação testemunha x fatorial foi altamente significativa apenas na primeira época de avaliação, não havendo significância nas demais. Justamente nesta coleta, avaliada aos 15 DAD não foi verificada diferença estatística entre os níveis e tipos de sais testados, com valores que variaram de 199 a 226 $\text{mol.H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 15).

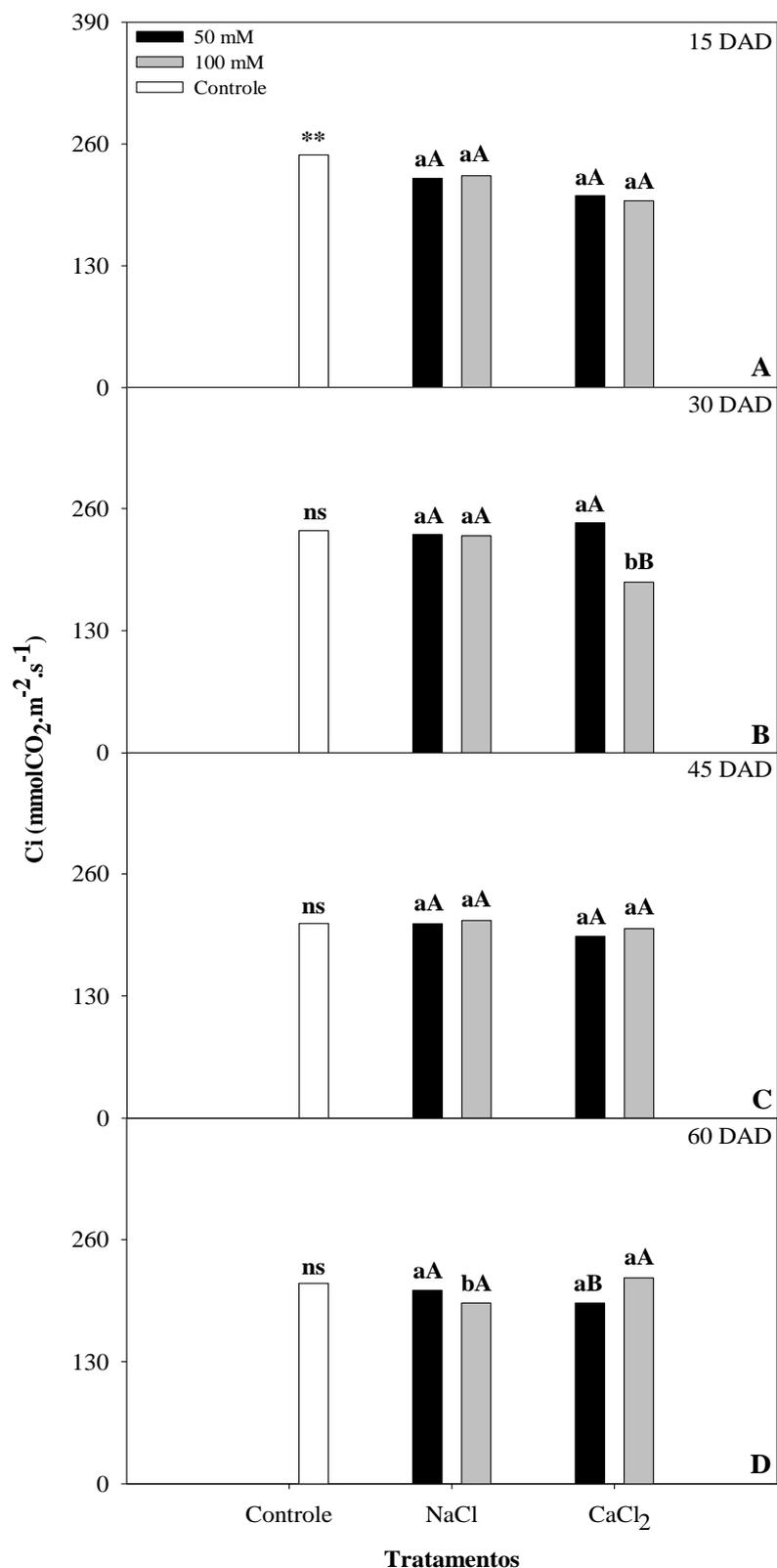
Após 30 dias de estresse, as plantas do tratamento 100 mM de CaCl_2 tiveram sua concentração interna de CO_2 reduzida em relação ao nível moderado deste sal (35%) e a este mesmo nível de NaCl (27%) (Figura 15).

Após 45 dias de estresse, também não foi constatada diferença entre os níveis e tipos de sais estudados, com valores que variaram de 0,06 a 0,17 $\mu\text{molCO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Aos 60 DAD o nível moderado de CaCl_2 apresentou valor 14% menor do que o nível severo deste sal e para o nível severo, desta vez o NaCl foi o que causou as maiores reduções, também em 14% em relação ao CaCl_2 (Figura 15).

A eficiência do uso da água foi a variável das trocas gasosas menos afetada pela salinidade ao longo das épocas de avaliação. Foi verificado que a interação testemunha x fatorial foi significativa em quase todas as épocas de avaliação, exceto na terceira coleta. Avaliando as coletas separadamente, pode-se observar que esta variável foi a menos afetada pelo estresse, pois a mesma não apresentou diferença estatística entre os níveis e tipos de sais na primeira (15 DAD) e terceira coleta (45 DAD), apresentando valores que variaram de 2,1 a 2,8 e de 2,4 a 3,0, respectivamente (Figura 16).

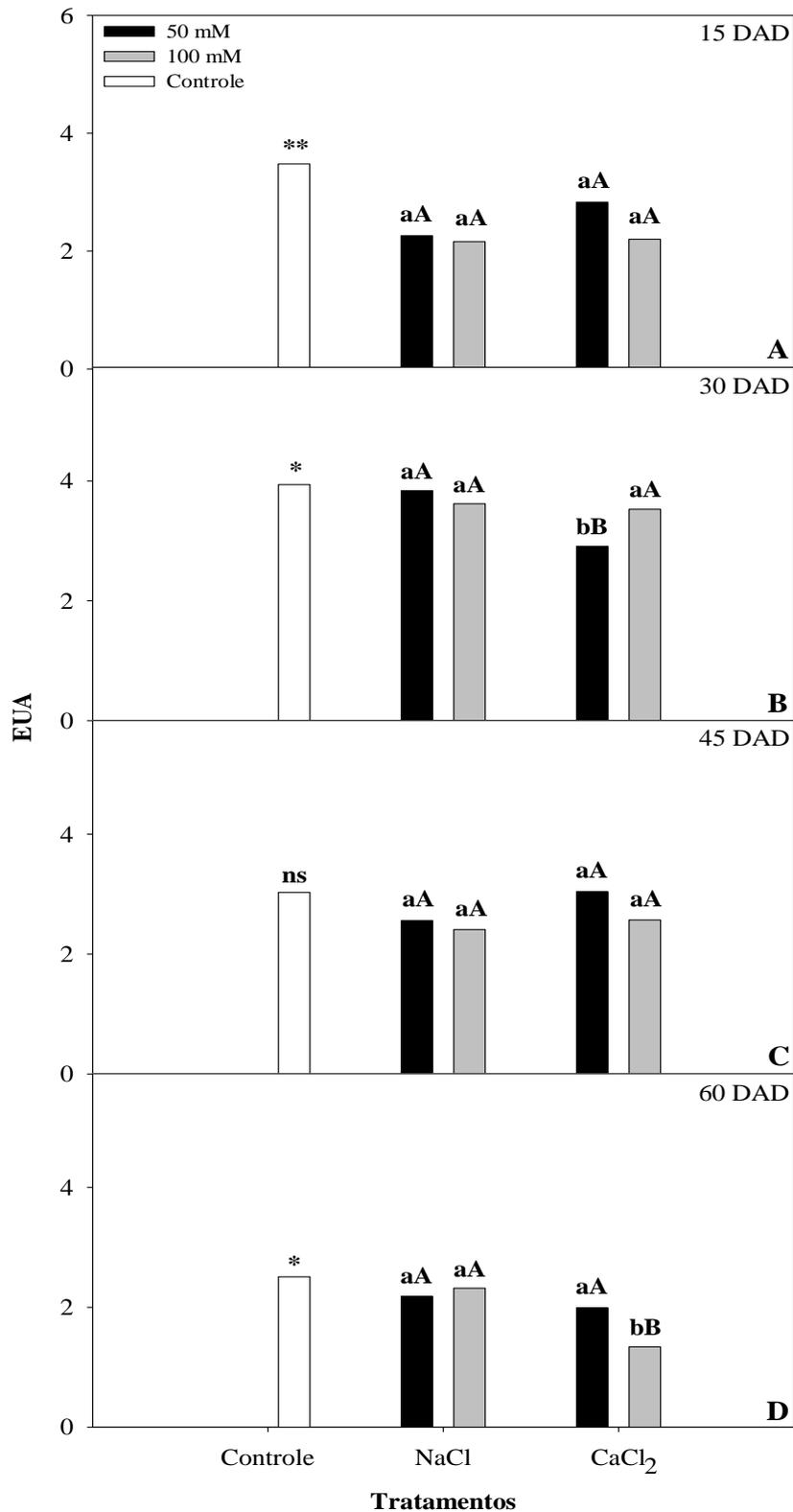
Para a segunda coleta, realizada após 30 DAD, foi verificada redução apenas no tratamento de 50 mM de CaCl_2 , que apresentou uma EUA de 2,9, que foi 22% menor do que o nível severo deste sal e 32% menor do que o encontrado neste mesmo nível de NaCl (Figura 16).

Na última coleta foi encontrada também redução em apenas um tratamento, porém desta vez foi o tratamento severo de CaCl_2 , que apresentou diferença significativa em relação ao tratamento moderado de CaCl_2 de 48% e em relação ao 100 mM de NaCl de 73%. O que pode ser observado é que os tratamentos de NaCl na primeira e na terceira coleta (15 e 45 DAD) apresentaram valores maiores de transpiração, o que fez com que a EUA fosse reduzida, justificando que não é bom para os indivíduos perder água para o meio, se este não capaz de manter uma alta assimilação de CO_2 (Figura 16).



** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 15: Concentração interna de CO₂ (Ci) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, C - 45 DAD e D - 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade



** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

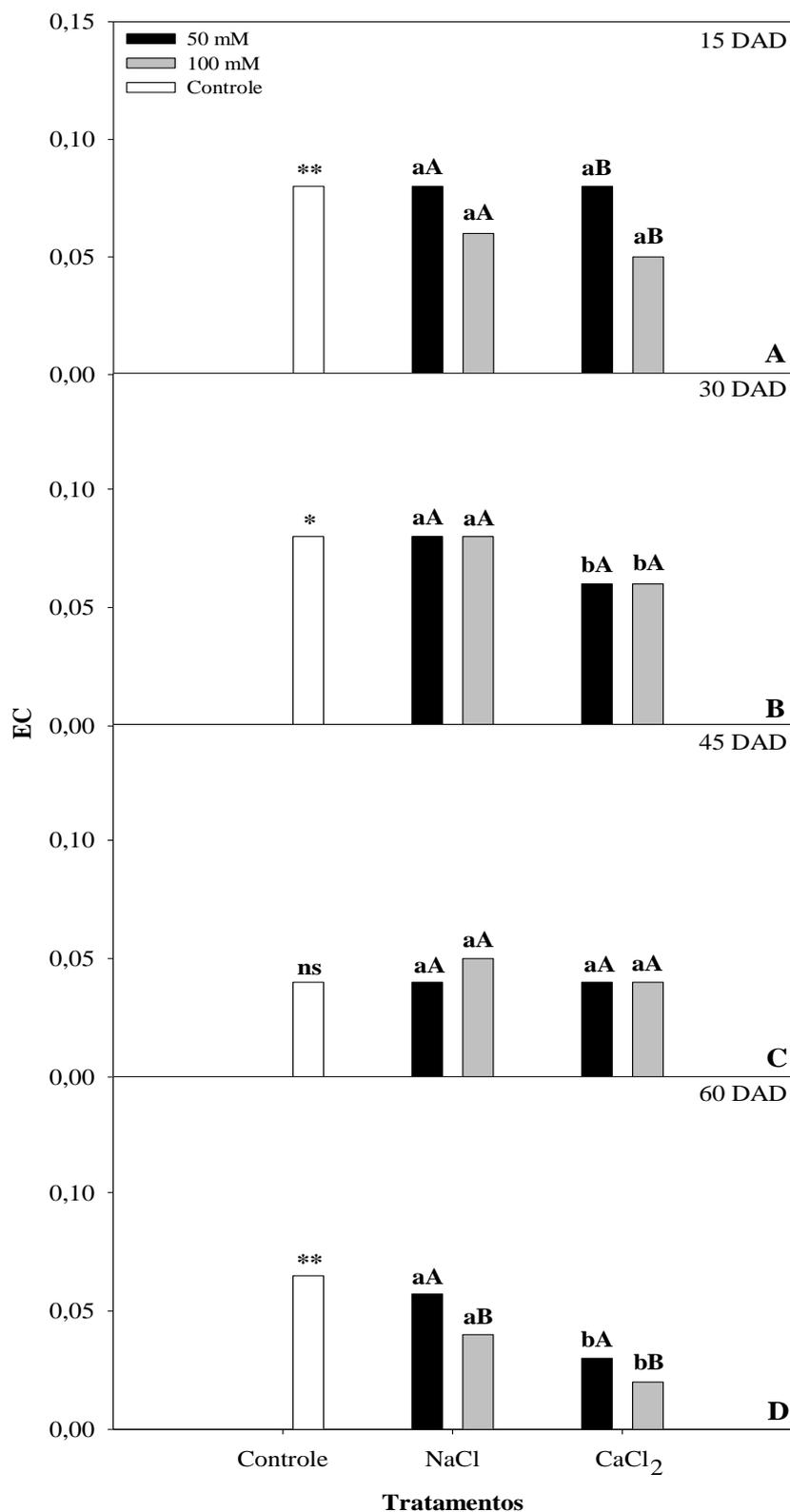
Figura 16: Eficiência do uso da água (EUA) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, C - 45 DAD e D - 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Para a eficiência de carboxilação, foi verificada interação significativa entre o tratamento controle e o fatorial em quase todas as épocas, exceto para a terceira coleta onde a interação não foi significativa. Avaliando o fatorial entre os níveis e tipos de sais testados, observa-se que aos 15 DAD os tratamentos severos de ambos os sais apresentaram uma redução desta variável, na ordem de 33% e 60% em relação ao nível de 50 mM, para o NaCl e CaCl₂, respectivamente (Figura 17).

Aos 30 DAD reduções foram encontradas apenas entre os sais estudados, com maior efeito do CaCl₂ sobre a variável, que a reduziu em 33% (50 mM) e 60% (100 mM) em relação aos valores encontrados para os mesmos níveis de NaCl.

Aos 45 DAD não foi verificada diferença estatística entre os níveis e tipos de sais estudados com valores de todos os tratamentos salinos ficaram em torno de 0,4. Porém, aos 60 DAD foram verificados os maiores efeitos, justificados pelo maior tempo de imposição do estresse. O nível severo de ambos os sais causou reduções em relação ao nível moderado, sendo estas reduções de 50% para o NaCl e o CaCl₂, respectivamente. Enquanto que na avaliação dos efeitos dos tipos de sais, foi verificado que o CaCl₂, causou reduções de 100% nos níveis moderado e severo em relação ao NaCl (Figura 17).

Como esta variável é dependente de outras duas, também era esperado comportamento semelhante em relação às épocas de avaliação. Para a maioria dos tratamentos, houve uma redução nas duas últimas coletas, o que não impediu de registrar o efeito do estresse após 60 dias, constatando novamente como as plantas submetidas a 50 mM de NaCl conseguiram manter os maiores valores, denotando certa tolerância a esse nível de salinidade.



** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 17: Eficiência de carboxilação (EC) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, C - 45 DAD e D - 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Em estudo com plantas de pinhão-manso, as trocas gasosas foram severamente afetadas pelo estresse de 100 mM de NaCl por 14 dias (SILVA et al., 2011), havendo reduções de 85%, 84%, 97% e 47% para fotossíntese, transpiração, condutância estomática e concentração interna de CO₂. Os autores encontraram ainda uma queda de 73% na eficiência de carboxilação instantânea. Esses resultados divergem dos encontrados no presente estudo, uma vez que as reduções não foram tão expressivas, para a mesma época de avaliação, exceto para a condutância estomática. Em relação as demais épocas de avaliação estudadas nesta pesquisa, não foram encontradas até o final do período experimental, reduções tão grandes para o mesmo tratamento de NaCl (100 mM), tampouco para o de CaCl₂, que foi o responsável pelas maiores quedas nas trocas gasosas. Isso pode ter relação com a tolerância da espécie a salinidade, pois as mudas de pinhão-manso foram submetidas novamente a condição controle (isenta de sais), e mesmo assim, não houve recuperação das trocas gasosas, o que é justificado pelos autores pelo fato de ter ocorrido algum dano irreversível ao aparato fotossintético após esse período, sendo a mesma classificada como sensível a esse nível de estresse.

Testando os efeitos do NaCl e do CaCl₂ Arshi, Abdin e Iqbal (2006) encontraram reduções significativas nas trocas gasosas de *Cassia angustifolia* sob os níveis de NaCl, enquanto que os níveis de CaCl₂ gerou danos bem menores do que o NaCl isolado. Os autores encontraram para a fotossíntese e para a condutância estomática das plantas sob CaCl₂, valores semelhantes ao tratamento controle, mesmo após 120 dias. Isso pode ser explicado, pois as concentrações utilizadas foram bem maiores para o NaCl (80 mM e 160 mM) do que para o CaCl₂ (5 mM e 10 mM), portanto, mesmo se passando vários dias, essa concentração não foi estressante para as plantas. A combinação dos dois sais não chegou a eliminar os efeitos do NaCl, porém causou reduções bem menores do que o NaCl isolado, comprovando o efeito mitigador da adição de pequenas concentrações de CaCl₂ em plantas sob salinidade.

Segundo Munns e Tester (2008) a resposta em nível de planta inteira mais observável é o fechamento estomático, pois assim como no déficit hídrico, eles atribuem essa resposta ao efeito osmótico, que faz com que haja uma redução imediata do conteúdo de água fora das plantas. Eles explicam ainda que mudanças na anatomia das folhas possam estar também relacionadas a essa redução da taxa fotossintética, pela produção de folhas menores e mais espessas. Além dos sais que são absorvidos pelas

plantas submetidas à salinidade, e que segundo os autores, podem ficar acumulados nos cloroplastos causando também uma redução no desempenho fotossintético.

5.2.3 Relações hídricas

O estresse salino causou reduções significativas nas relações hídricas das plantas de nim indiano, tanto no potencial hídrico foliar, que uma variável que expressa a disponibilidade da água que se encontra no xilema para realizar trabalho, quanto no teor relativo de água, que é uma variável que indica a quantidade de água presente no tecido no momento da coleta, em relação ao máximo de água que este tecido poderia reter. Foi encontrado na primeira variável, um efeito mais pronunciado e já que o potencial hídrico e o TRA foram avaliados às 12 horas e às 4 horas, como esperado, foram encontrados os menores valores na avaliação realizada no horário do meio dia, por ser este o horário de maior demanda evaporativa com temperaturas que alcançaram 35,9 °C. Além disso, às 4 horas ocorre a temperatura mais baixa e a umidade relativa mais alta do dia, o que propicia uma baixa ou nula taxa transpiratória, dando todo o aparato para que as plantas retomem o seu *status* hídrico. Exatamente neste momento, as alterações detectadas podem ser consideradas como o efeito puro dos tratamentos, o que pode não ocorrer ao meio dia, pois as condições ambientais por si só, já alteram o *status* hídrico das plantas.

Para todas as coletas e horários o tratamento controle apresentou diferença significativa do fatorial. Na primeira coleta, realizada após 15 dias de submissão ao estresse, as plantas do tratamento controle estavam com um potencial hídrico de -0,58 MPa. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os níveis de sal aplicados nas plantas submetidas ao CaCl₂. Já naquelas cultivadas sob NaCl, foi visto as 4 horas que o potencial das plantas do tratamento severo (100 mM) apresentaram um queda de 44%, em relação as do tratamento moderado (50 mM). Na comparação dos sais dentro de cada nível foi verificado que no tratamento severo, o NaCl foi o que causou as maiores reduções de potencial, sendo estes 17% e 10% menores nos dois horários de avaliação (4 e 12 horas), respectivamente (Figura 18-A e 18-B).

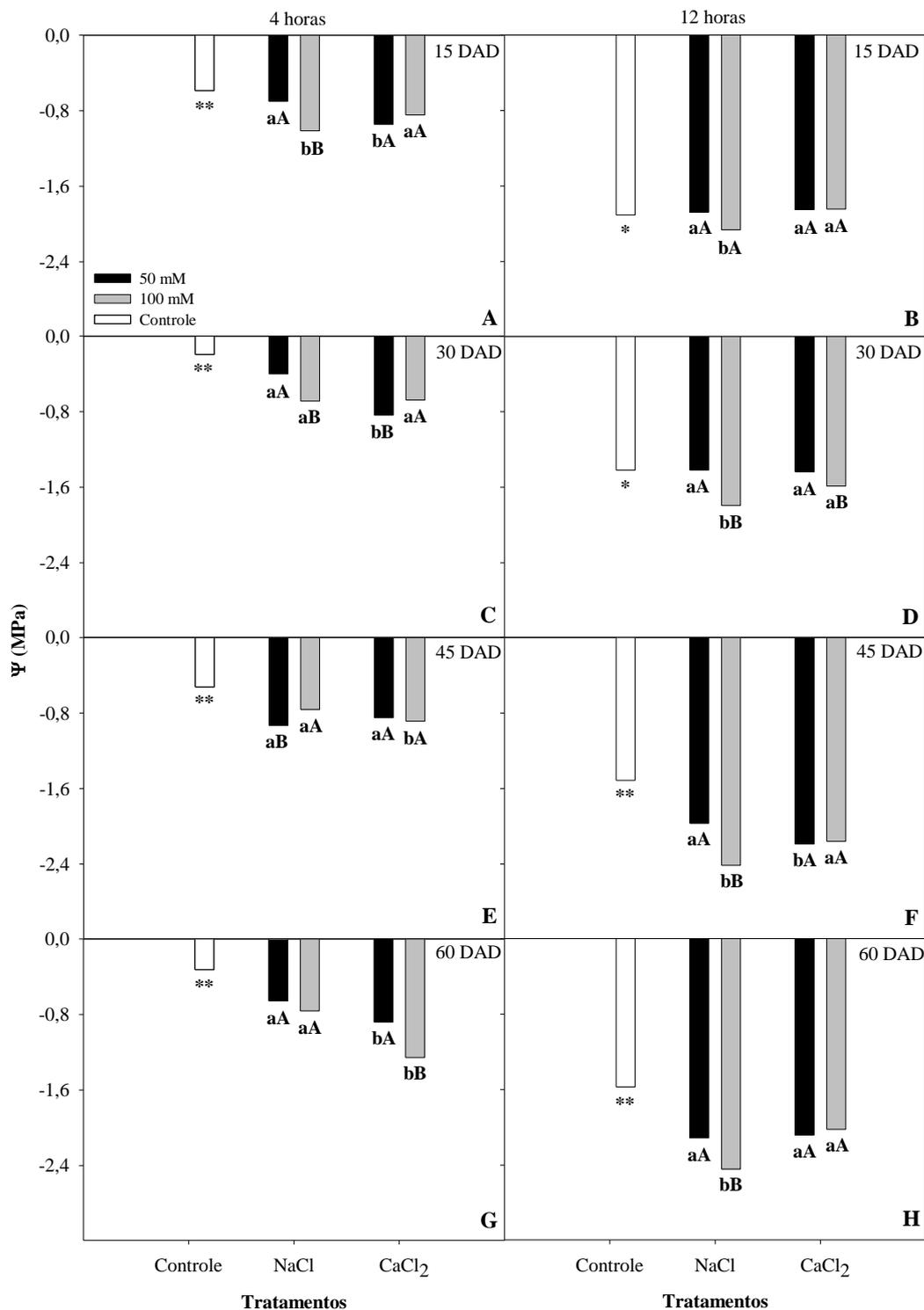
Foi constatado na segunda coleta (30 DAD) diferenças entre os níveis nos dois sais independente do horário de avaliação. Excetuando as plantas sob CaCl às 4 horas, todas as demais apresentaram os menores valores nos tratamento severos, com reduções

de 70%, 26% e 10% para as plantas do NaCl (4 e 12 horas) e para as plantas de CaCl₂ (12 horas), respectivamente. Comparando-se os efeitos dos sais para um mesmo nível, foi verificada uma redução nos potenciais das plantas sob 50 mM de CaCl₂ às 4 horas e para as plantas de 100mM de NaCl ao meio dia (Figura 18-E e 18-F).

Na terceira avaliação, só foram encontradas reduções nas plantas sob NaCl, de 22% para aquelas sob 50mM e 100mM de CaCl₂, se comparados ao outro nível do mesmo sal. Já entre os sais dentro do mesmo tipo de sal, só foram encontradas diferenças na avaliação do meio dia, onde nos tratamentos moderados os valores foram 11% menores nas plantas sob CaCl₂ e nos tratamentos severos foram 16% menores para o NaCl (Figura 18-E e 18-F).

Aos 60 DAD, no horário da antemanhã, os potenciais foram reduzindo à medida que os níveis eram maiores e ficaram significativamente mais negativos quando expostos ao CaCl₂, com potenciais médios de -0,65 MPa, -0,76 MPa, -0,88 MPa e -1,26 MPa, enquanto as plantas controle ficaram com -0,32 MPa. Já ao meio dia, esses valores caíram para -2,11 MPa, -2,44 MPa, -2,08 MPa e -2,02 MPa, para os tratamentos 50 mM e 100 mM de NaCl, e para os de 50 mM e 100 mM de CaCl₂, respectivamente (Figura 18-G e 18-H).

O que pode ser observado entre os horários de avaliação, é que o tratamento de 100 mM de NaCl, diminuiu esta variável mais do que os demais tratamentos ao meio dia, o que também foi verificado nas trocas gasosas, onde algumas vezes, os valores de transpiração destas plantas eram maiores até do que os das plantas controle. Levando em consideração que a avaliação das trocas gasosas foi realizada às 8 horas, pode-se considerar que estas plantas continuaram perdendo água, ao ponto de às 12 horas, não conseguir manter o seu potencial tão elevado quanto o das plantas dos demais tratamentos.



** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 18: Potencial hídrico foliar (Ψ) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (15, 30, 45 e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação, avaliados em dois horários, A, C, E e G - 4 horas e B, D, F e H - 12 horas. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Resultados semelhantes foram encontrados por Cha-um et al. (2004), ao avaliar plântulas de nim cultivadas *in vitro* em altas concentrações salinas (0M, 0,34 M, 0,68 M e 1,02 M de NaCl). Muito embora os autores relatem que a salinidade reduziu fortemente o potencial hídrico das folhas, eles não os apresentaram. Porém em uma análise do gráfico apresentado, os potenciais ficaram em torno de -2,90 MPa para as plantas controle e -3,30 para as plantas submetidas ao maior nível de sal. Houve inclusive um aumento desta variável nas plantas do tratamento salino de 0,34 M de NaCl, que já tem uma concentração três vezes maior do que o maior nível de NaCl utilizado no presente estudo, porém tal resposta inesperada não é explicada pelos autores.

Uma vez que a salinidade causa osmoticamente um estresse hídrico, é interessante citar que Martins (2008), estudando plantas de nim submetidas a diferentes condições hídricas (100%, 80%, 60%, 40%, 20% da capacidade de pote, suspensão de rega e reirrigação) em casa de vegetação por 30, 45 e 60 dias, encontraram nas plantas sem rega uma extrapolação da capacidade do equipamento para a medição do potencial hídrico (-4,0 MPa), o que significa que as plantas apresentaram pelo menos este valor, podendo ser ainda mais negativo em todas as épocas de avaliação e nos mesmos horários avaliados na presente pesquisa. Isso não foi verificado neste trabalho, uma vez que o valor mais negativo alcançado foi de -2,4 MPa. O que pode ser observado é que os valores das plantas que recebiam 100% da capacidade de pote apresentaram os mesmos valores de potencial hídrico que as plantas isentas de sal do presente estudo, além disso, as plantas só apresentaram redução significativa do potencial hídrico, quando submetidas a 20% da CP, com potenciais semelhantes aos encontrados no presente trabalho.

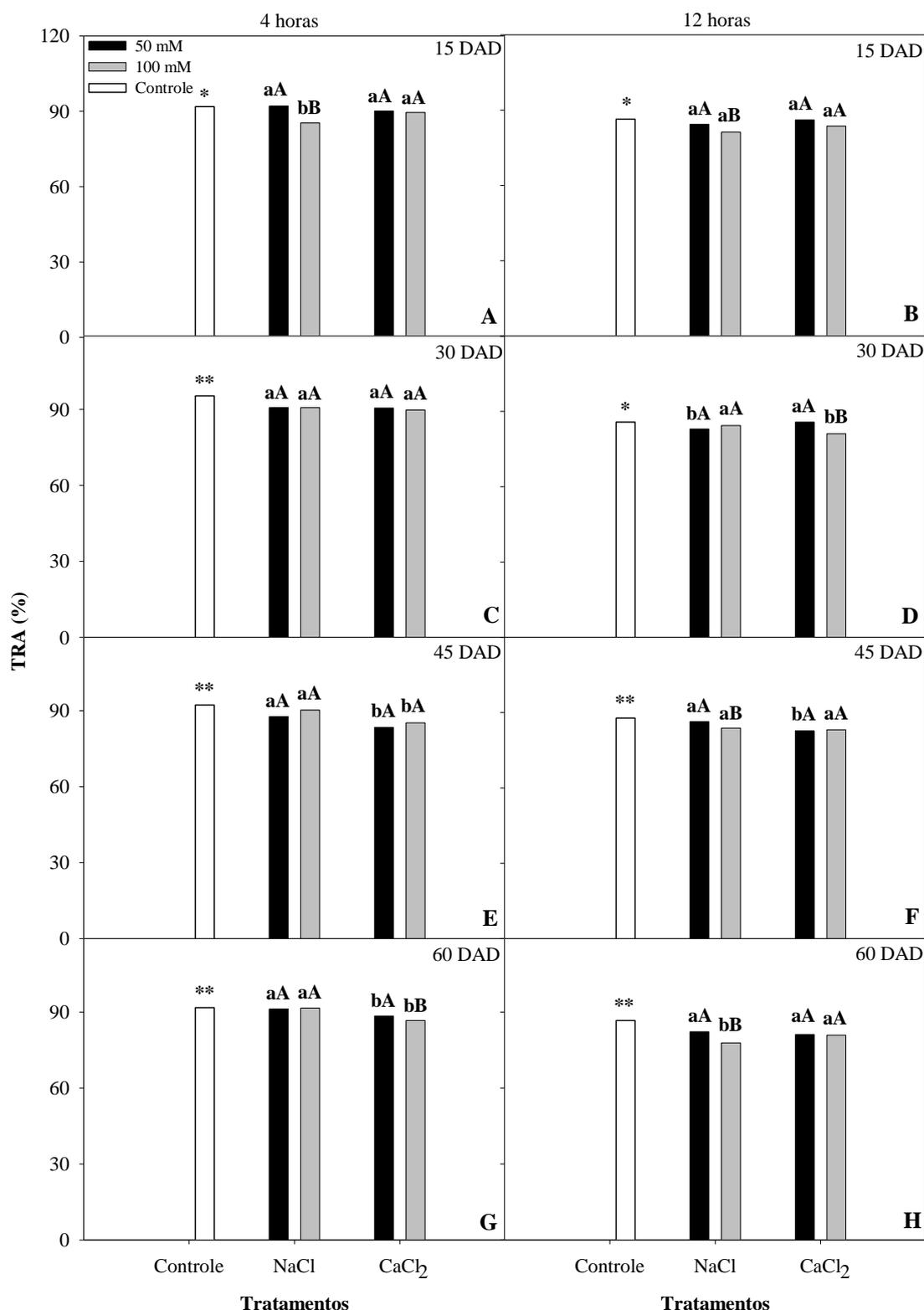
Com relação ao teor relativo de água, em todas as avaliações foi observada uma interação significativa entre o tratamento controle e o esquema fatorial utilizado. Na avaliação das 4 horas pôde-se observar na primeira coleta, assim como o potencial hídrico foliar, o menor TRA para o tratamento 100 mM de NaCl (85%), diferente estatisticamente do outro nível de NaCl e também do que o mesmo nível de CaCl_2 que apresentaram valores de TRA de 92% e 89%, respectivamente. Ao meio dia, verifica-se também uma diferença estatística no tratamento 100 mM de NaCl, porém isto ocorre apenas em relação ao tratamento moderado do mesmo sal (Figura 19-A e 19-B).

Na avaliação das 4 horas, realizada aos 30 DAD, não foram verificados efeitos entre os níveis nem entre os sais utilizados. No entanto, ao meio dia o tratamento severo de CaCl_2 foi reduzido tanto em relação ao tratamento moderado de CaCl_2 , quanto ao mesmo nível de NaCl , com reduções de apenas 6% e 4%, respectivamente (Figura 19-C e 19-D).

Já na terceira coleta, no primeiro horário de avaliação, não houve diferença entre os níveis para nenhum dos sais, porém, os níveis de CaCl_2 causaram maiores reduções do que os de NaCl , com TRAs de 83,4% e 85,2%, respectivamente. Ao meio dia, apenas o tratamento 100 mM de NaCl com um TRA apenas 3% menor do que as plantas sob 50mM do mesmo sal. Enquanto que na comparação dos sais dentro do mesmo nível, apenas o moderado de CaCl_2 permaneceu menor do que o mesmo nível do outro sal (Figura 19-E e 19-F).

Na última coleta, foram verificadas reduções às 4 horas, novamente nas plantas submetidas aos dois níveis de CaCl_2 foram menores, com TRA 3% e 6% para 50 mM e 100 mM, respectivamente em relação aos mesmos níveis de NaCl , ficando o tratamento severo com os potenciais mais negativos. Ao meio dia essas reduções foram encontradas apenas no tratamento 100 mM de NaCl , com um TRA 6% menor do que 50mM do mesmo sal e 4% menor do que o mesmo nível de CaCl_2 (Figura 19-G e 19-H).

Avaliando as épocas de coleta pode-se perceber uma sensível redução do TRA ao longo do tempo, porém até os 30 dias de estresse, a maioria dos tratamentos não foi afetada. Mesmo quando isto ocorreu, em comparação com a média do tratamento controle, esta variável foi reduzida em pequena proporção. Esse fato pode ser constatado a partir da ausência de sintomas de perda de turgescência até a última coleta, quando algumas plantas dos tratamentos mais severos de ambos os sais começaram a apresentar sintomas de injúrias causadas pela salinidade. O que confirma que as plantas de nim não responderam ao estresse salino por esses tipos de sais, como plantas sensíveis à salinidade.



** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 19: Teor relativo de água (TRA) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (15, 30, 45 e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação, avaliados em dois horários, A, C, E e G - 4 horas e B, D, F e H - 12 horas. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Estudos com plantas de jatobá submetidas aos mesmos níveis de salinidade encontrados nesta pesquisa, verificaram que após 45 dias de estresse, quando ocorreu o fechamento estomático das plantas mais estressadas, o teor relativo de água foi reduzido em 13% em relação ao tratamento controle e considerando o conjunto de variáveis que foram analisadas no trabalho, o autor indica a produção de mudas da espécie em níveis de até 50 mM de NaCl sem acarretar em prejuízos no desenvolvimento das plantas (NASCIMENTO, 2013).

Resultados semelhantes também foram encontrados por Silva, E. C. A. (2013), com plantas de moringa submetidas a um nível moderado (75 mM) e um severo (150 mM) de NaCl. Durante as três épocas de avaliação (2, 24 e 48 horas de imposição ao estresse) não houve redução do TRA para as plantas do estresse moderado, no entanto, aquelas cultivadas sob estresse severo reduziram significativamente esta variável, mantendo valores médios de 75% nas duas primeiras avaliações e 78% na terceira, enquanto as plantas controle apresentavam um TRA de aproximadamente 85%. Ao fim do trabalho a autora indicou o cultivo de mudas desta espécie em níveis de até 75 mM de NaCl.

As reduções encontradas nesta variável, em ambos os trabalhos, foram bem pequenas comparando o tratamento mais severo e o controle, assim como ocorreu nas plantas de nim da presente pesquisa, onde a maior redução encontrada para esta variável foi de 10%. Uma vez que os trabalhos citados foram realizados com espécies florestais que já apresentam adaptação à ambientes de clima quente e seco, e que, segundo sugestão dos autores, elas conseguem se desenvolver em ambientes consideravelmente salinizados, isso também pode ser considerado verdadeiro para plantas de nim já que apresentam a mesma característica de ocorrência.

Para os danos nas membranas pode ser observado que não houve diferença estatística nem entre os níveis salinos, tampouco entre os tipos de sais nas duas primeiras épocas de avaliação (15 e 30 DAD), apresentando valores que variaram de 21% a 23%, e de 27% a 34%, para a primeira e segunda coleta, respectivamente (Figura 20).

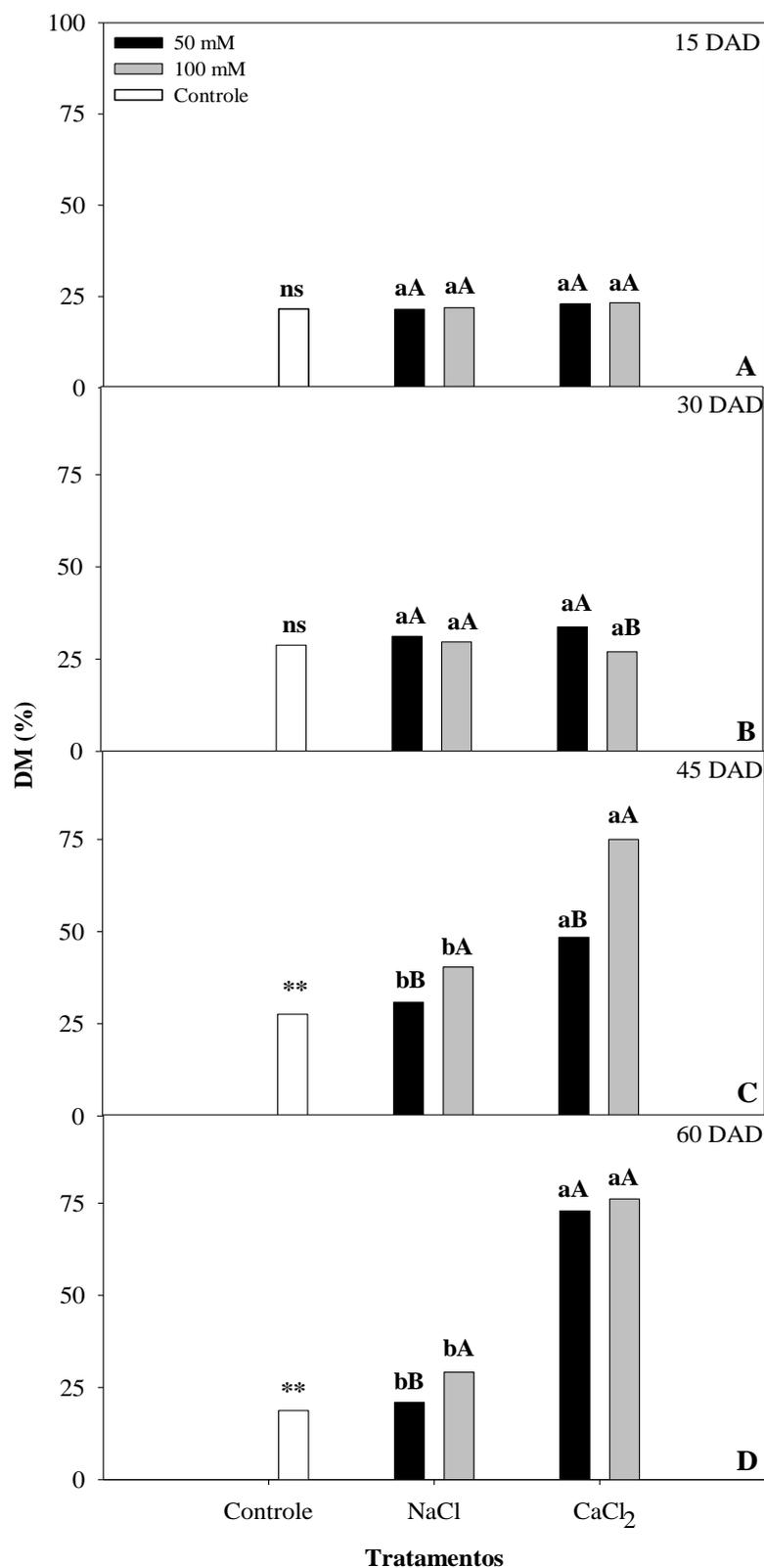
Na terceira coleta foi verificado um aumento significativo do percentual dos danos nas membranas nos tratamento severo dos dois sais, 31% e 55% maiores do que os moderado, para o NaCl e CaCl₂, respectivamente. Estes aumentos foram ainda mais

expressivos nos dois níveis de CaCl_2 , 57% e 86% para o 50 mM e 100 mM, respectivamente, em relação aos mesmos níveis do outro sal (Figura 20).

Já na última avaliação (60DAD), foram verificados aumentos de xx% novamente no nível severo, em relação ao moderado de NaCl. Já os dois níveis de CaCl_2 não diferiram entre si, no entanto eles foram quase 250% e 160% maiores (para 50 mM e 100 mM) do que os mesmos níveis de NaCl chegando aos maiores valores encontrados em todas as épocas de avaliação (Figura 20).

Resposta semelhante também foi encontrada por Brilhante et al. (2007), quando estudaram respostas à salinidade em mudas de cajueiro em função do período de aclimação. Os autores relataram que após sete dias de aclimação em solução nutritiva, o estresse de 200 mM de NaCl durante diferentes períodos (0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas), não causou efeitos significativos em relação as plantas controle, apresentando percentual de danos na membrana próximos a 20%. Enquanto que as plantas que foram aclimatadas por apenas um dia apresentaram ao final do período de estresse, um aumento desse percentual de danos para 43% aproximadamente, denotando que o tempo de aclimação é extremamente relevante para determinar performance das plantas quando submetidas a situações estressantes. No presente estudo, mesmo após 60 dias de salinidade por NaCl, os maiores danos encontrados foram de 40%. Isso pode denotar a tolerância do nim, já que mudas de cajueiro são classificadas por vários autores como tolerantes à salinidade.

Esta resposta não foi encontrada por Alves F. A. L. et al. (2009), que estudando a mesma espécie verificou perdas significativas na integridade das membranas, que chegaram a 80% em relação as plantas do tratamento controle. Isso se deve ao fato de neste trabalho, os autores testarem níveis bem maiores de NaCl (100, 200, 300 e 400 mM), por 48 horas, o que justifica os danos na membrana encontrados serem também maiores. No presente estudo, ainda que nenhum dos tratamentos corresponda a níveis tão altos de sal, as plantas que foram cultivadas em CaCl_2 , alcançaram valores semelhantes (76%), porém as mesmas passaram bem mais tempo sob estresse.



** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 20: Danos nas membranas (DM) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Em outro trabalho com cajueiro, Alves, F. A. L. et al. (2008) testaram a influência da adição de pequenas concentrações de KCl e CaCl₂ (5 mM e 3 mM, respectivamente) na respostas das plantas sob estresse por 200 mM de NaCl. Eles verificaram um aumento nos danos das membranas das raízes, ficando em torno de 80% e um aumento menos acentuado nas folhas (em torno de 25%). Esses valores não foram alterados em função da presença ou não dos sais adicionais, além disso, o efeito do NaCl foi verificado em menor magnitude nas folhas do que nas raízes, podendo ter relação com o período a que as plantas ficaram sob estresse (apenas 72 horas), não havendo tempo suficiente para os íons serem absorvidos pela planta e causar danos maiores na parte aérea.

Pode-se notar que ao longo do período de imposição ao estresse os danos nas membranas da presente pesquisa foram aumentados significativamente para a maioria dos tratamentos salinos testados, porém esse dano foi muito maior nas plantas submetidas aos níveis de CaCl₂. O que denota que ele causa um maior prejuízo às células, já que afetou mais intensamente as outras variáveis das relações hídricas (potencial hídrico e teor relativo de água), além daquelas envolvidas nas trocas gasosas (fotossíntese, transpiração e condutância estomática).

Esta variável é bastante relevante para a avaliação do dano causado por salinidade em plantas, pois esses efeitos sobre a integridade das membranas e do metabolismo celular, assim como a produção de moléculas tóxicas (Espécies Reativas de Oxigênio – ERO), são citadas por Taiz e Zeiger (2010) como algumas das respostas secundárias do efeito iônico da salinidade, efeitos estes que podem levar à morte celular. Se as plantas de nim estavam sofrendo com os efeitos do estresse iônico a partir dos 45 DAD, certamente estavam lançando mão de algum mecanismo para não alterar o seu crescimento, que teoricamente deveria ter sido o primeiro afetado pelo efeito osmótico que é inicial na salinidade.

5.2.4 Pigmentos fotossintéticos

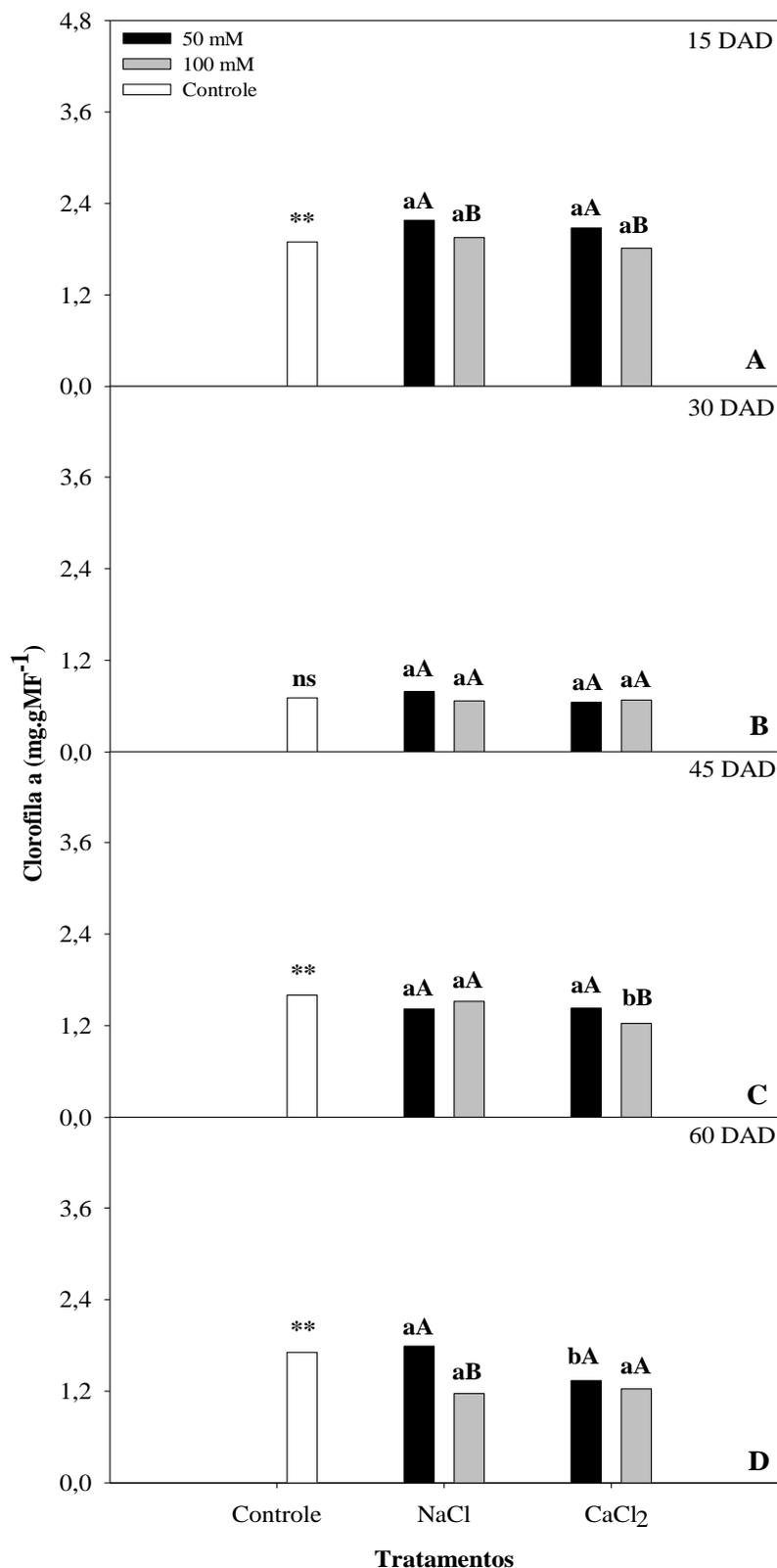
As clorofilas foram afetadas pela salinidade, sendo esse efeito mais pronunciado independentemente dos níveis, mais uma vez, nas plantas cultivadas com concentrações excessivas de CaCl₂.

Referente à clorofila *a*, foi observado aos 15 DAD ocorreu uma redução na concentração desse pigmento nos tratamentos severos de ambos os sais, sendo de 12% e 15% para o NaCl e CaCl₂, respectivamente (Figura 21).

Não foi observado nenhum efeito dos níveis ou dos sais testados depois de 30 dias de imposição do estresse. Já após 45 dias, foi verificada uma redução de 16% no teor desse pigmento nas plantas do tratamento severo (100 mM) de CaCl₂ em relação ao tratamento moderado do mesmo sal, além de ter sido também menor do que o 100 mM de NaCl. Enfim, na última coleta esse efeito foi pronunciado nos tratamentos 100 mM de NaCl, com teor de clorofila *a* 52% menor do que as plantas do 50 mM de NaCl e este por sua vez foi 25% maior em relação ao 50 mM de CaCl₂ (Figura 21).

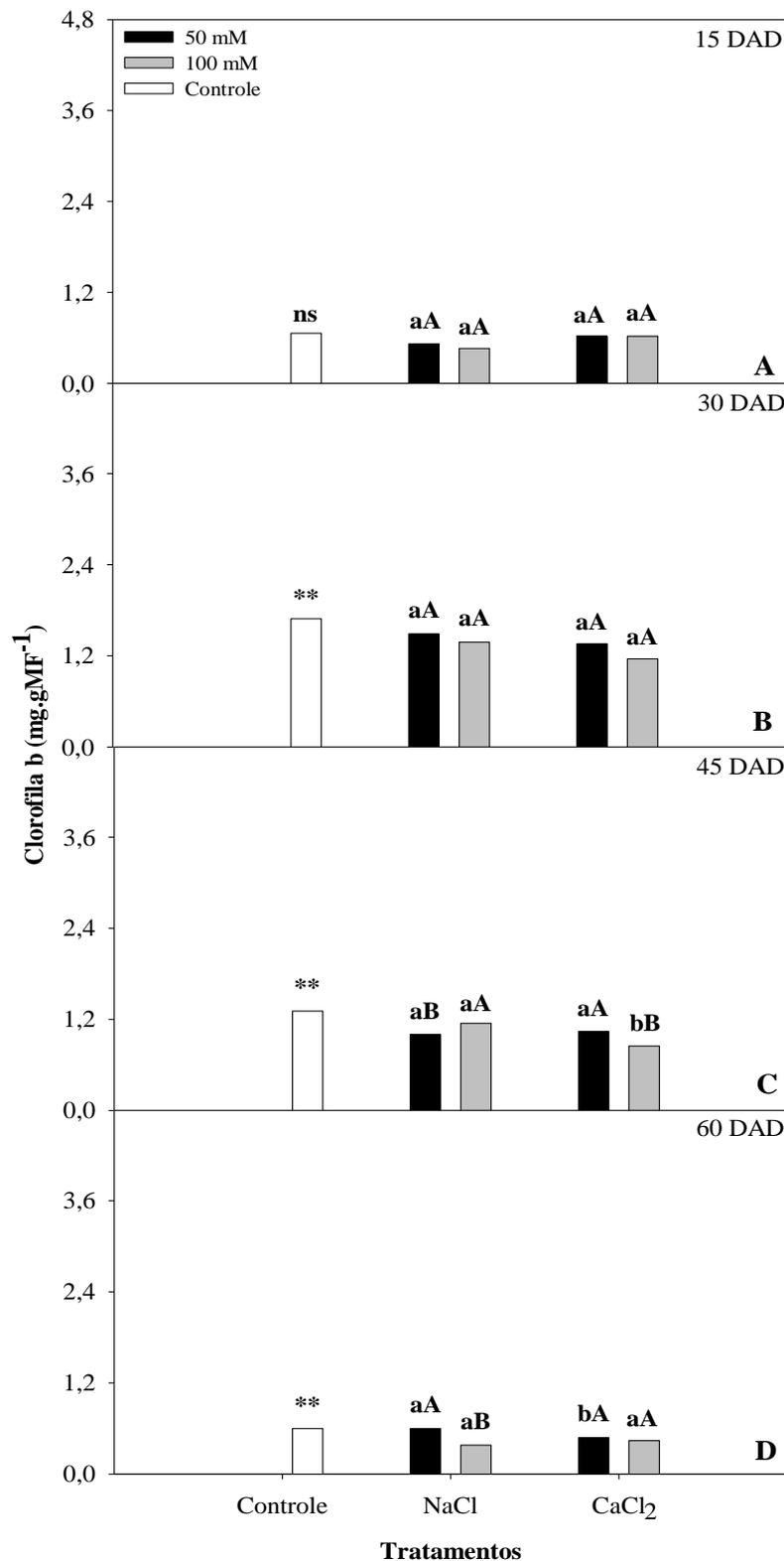
Para a clorofila *b*, apenas aos 15 DAD o tratamento controle não apresentou diferença significativa em relação ao fatorial, já nas demais épocas a interação fatorial x testemunha foi altamente significativo. Em relação a análise fatorial, aos 15DAD e aos 30 DAD não foi verificada nenhuma diferença entre os níveis ou entre os tipos de sais. Aos 45 DAD foram encontrados os menores valores para os tratamentos 50 mM de NaCl e para o e 100 mM de CaCl₂, com 1 mg.gMF⁻¹ e 0,85 mg.gMF⁻¹. Além disso o tratamento 100 mM de CaCl₂ foi xx% menor do que o 100 mM de NaCl. As plantas chegaram aos 60 dias de estresse com alterações (58% menor) no tratamento severo de NaCl em relação ao moderado do mesmo sal e também o tratamento moderado de CaCl₂ foi significativamente menor (25%) do que o mesmo tratamento do NaCl. (Figura 22).

Se analisarmos as épocas de avaliação, pode ser percebido que na primeira e segunda coleta (15 e 30 DAD) houve uma alternância na produção das clorofilas *a* e *b*, independente dos tratamentos, pois nestas épocas, quando havia um aumento no teor de clorofila *b*, o inverso ocorria na clorofila *a* e vice-versa. Isso é esperado, pois a concentração de pigmentos acessórios, que conseguem absorver luz em comprimentos de onda menores, pode ser aumentada à medida que a planta passa por algum tipo de estresse, isso pode explicar o aumento da clorofila *b* na segunda coleta, porém as plantas não mantiveram esse padrão nas demais coletas, pois houve uma redução independente dos tratamentos ao longo dos 45 e 60 DAD.



** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 21: Teores de clorofila *a* de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade



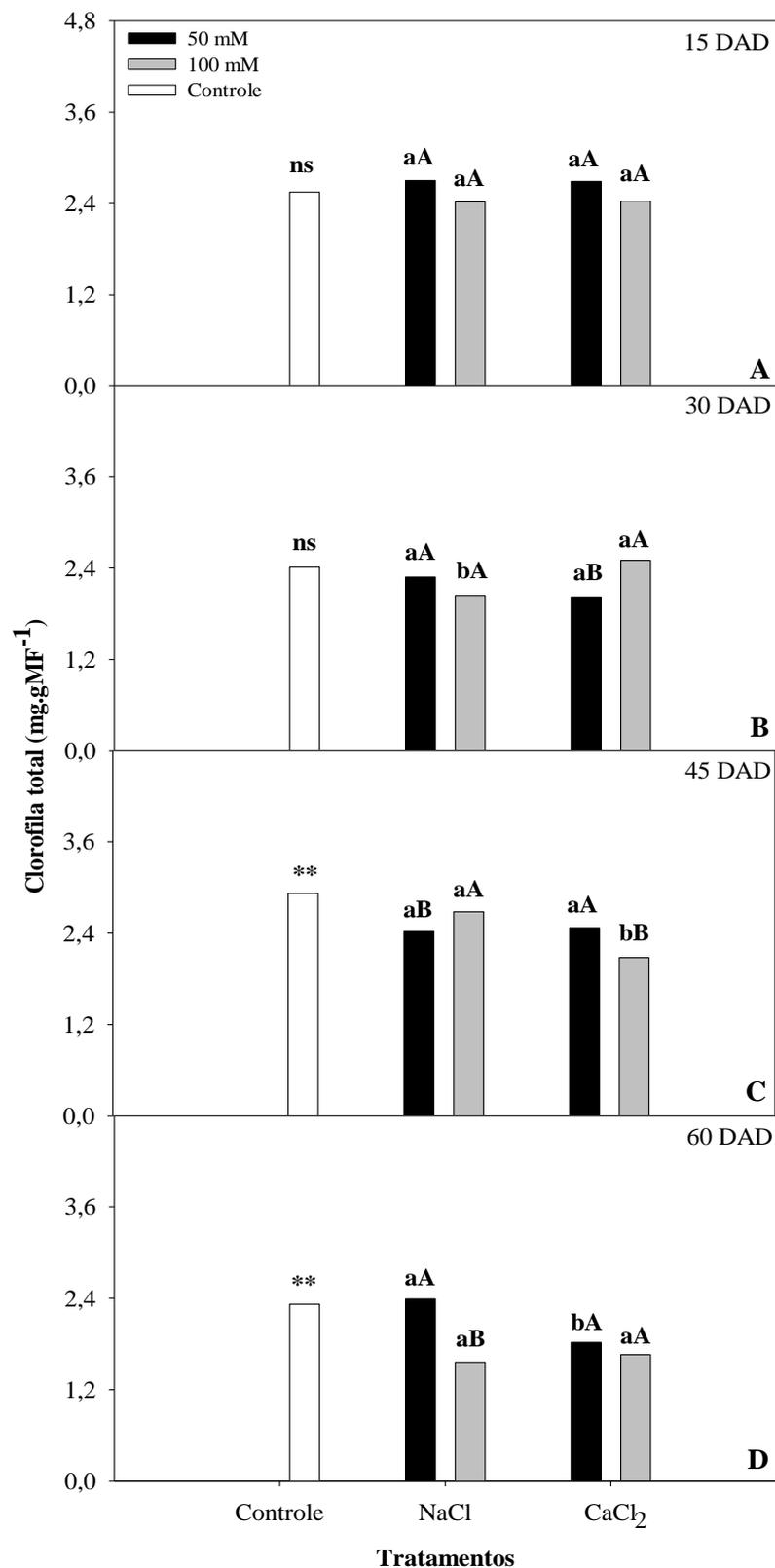
** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 22: Teores de clorofila *b* de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Para os teores de clorofila total das plantas aos 15 e 30 DAD não foi verificada diferença estatística para a interação tratamento controle e fatorial, sendo este altamente significativo das demais coletas. Analisando o fatorial após 15 DAD, não foi verificada diferença entre os níveis ou entre os sais utilizados. Já aos 30 DAD reduções começaram a ocorrer no nível moderado de CaCl_2 , de 24% em relação ao tratamento severo. Foi verificado também que o tratamento 100mM de CaCl_2 produziu 23% mais clorofila do que o mesmo nível de NaCl. Aos 45 DAD, houve reduções entre os níveis em ambos os sais, com teores 11% e 19% menores para os tratamentos 50 mM de NaCl e 100 mM de CaCl_2 em relação ao outro nível de cada um dos sais. As plantas chegaram aos 60 DAD com uma redução de 53% para o tratamento severo de NaCl, em relação ao moderado e para o nível de 50 mM, foi verificado o menor teor de clorofila para as plantas sob CaCl_2 (Figura 23).

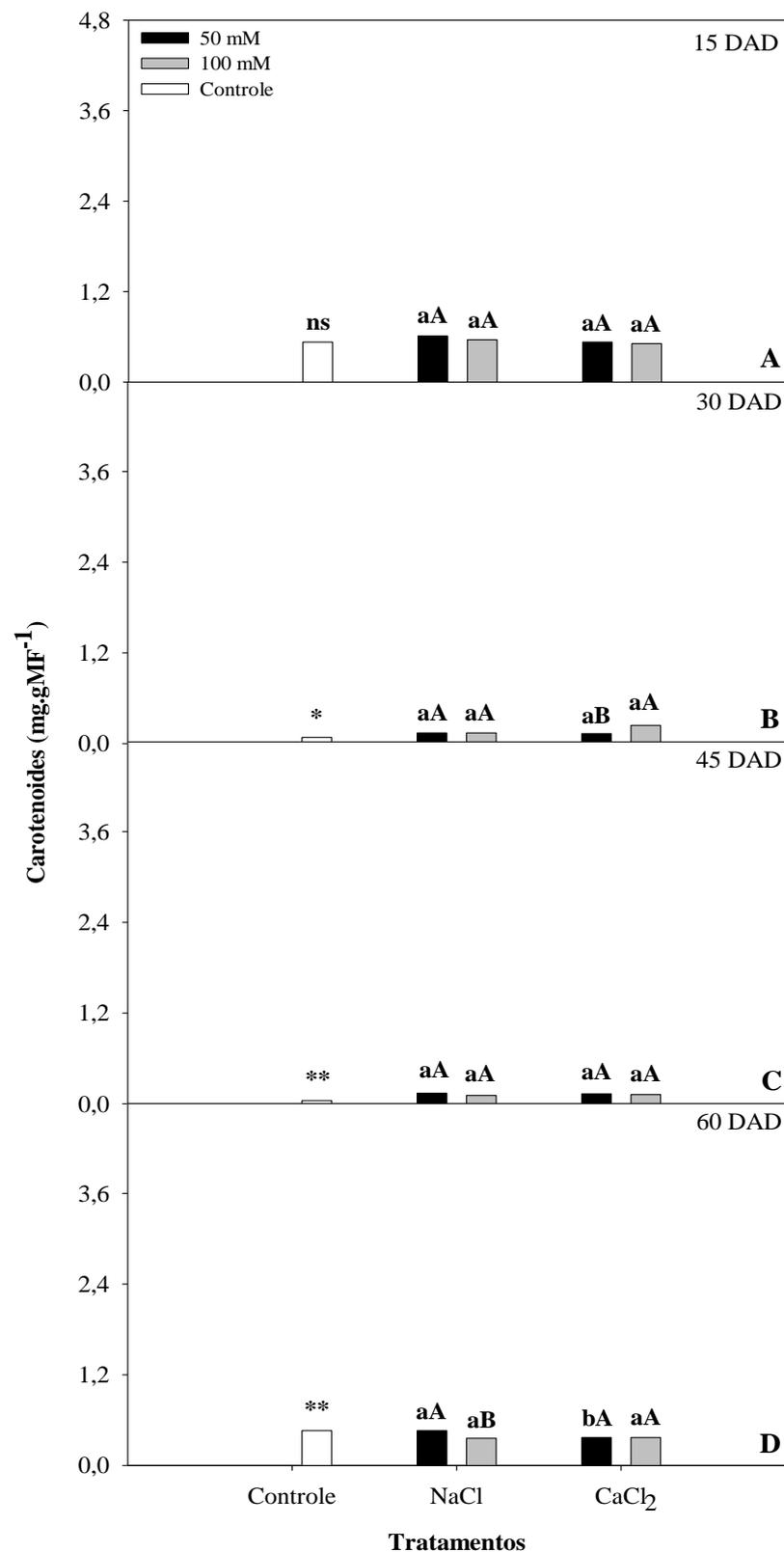
Os carotenoides não foram alterados na primeira avaliação (15 DAD), bem como a interação testemunha x fatorial que também não foi significativa, com valores que variaram de 0,51 a 0,61 mg.gMF^{-1} (Figura 24). Já na segunda coleta (30 DAD), todos os teores deste pigmento foram reduzidos em relação à coleta anterior, independente dos níveis e sais e foi encontrada uma redução em relação ao outro nível do mesmo sal para o tratamento moderado de CaCl_2 (85%). Na terceira coleta (45 DAD), esses teores se mantiveram reduzidos em relação aos encontrados na primeira coleta, e não foi verificada diferença significativa entre nenhum dos níveis ou sais. O que pode ser observado é que em relação ao tratamento controle os teores de todos os tratamentos testados foram bem maiores. Aos 60 DAD os teores de carotenoides de todos os tratamentos foram aumentados em relação a coleta anterior e foram observadas diferenças entre os níveis apenas para o NaCl, onde o tratamento 100 mM ficou com um teor 28% menor do que o 50 mM. Comparando-se o efeito dos sais observa-se que no nível de 50 mM as plantas sob CaCl_2 ficaram com 28% menos carotenoides (Figura 24).

As alterações encontradas ao longo das coletas podem indicar que plantas de nim, apesar de sofrer com a degradação de clorofilas, não sofrem com a degradação de carotenoides, permanecendo praticamente inalterada até os 60 DAD (Figura 24). Talvez isso tenha ocorrido pelo mesmo motivo discutido anteriormente no teor de clorofila *b*, pois quando as plantas estão sob estresse, elas podem investir na produção de pigmentos acessórios a fim de proteger o aparato fotossintético.



** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 23: Teores de clorofila total de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade



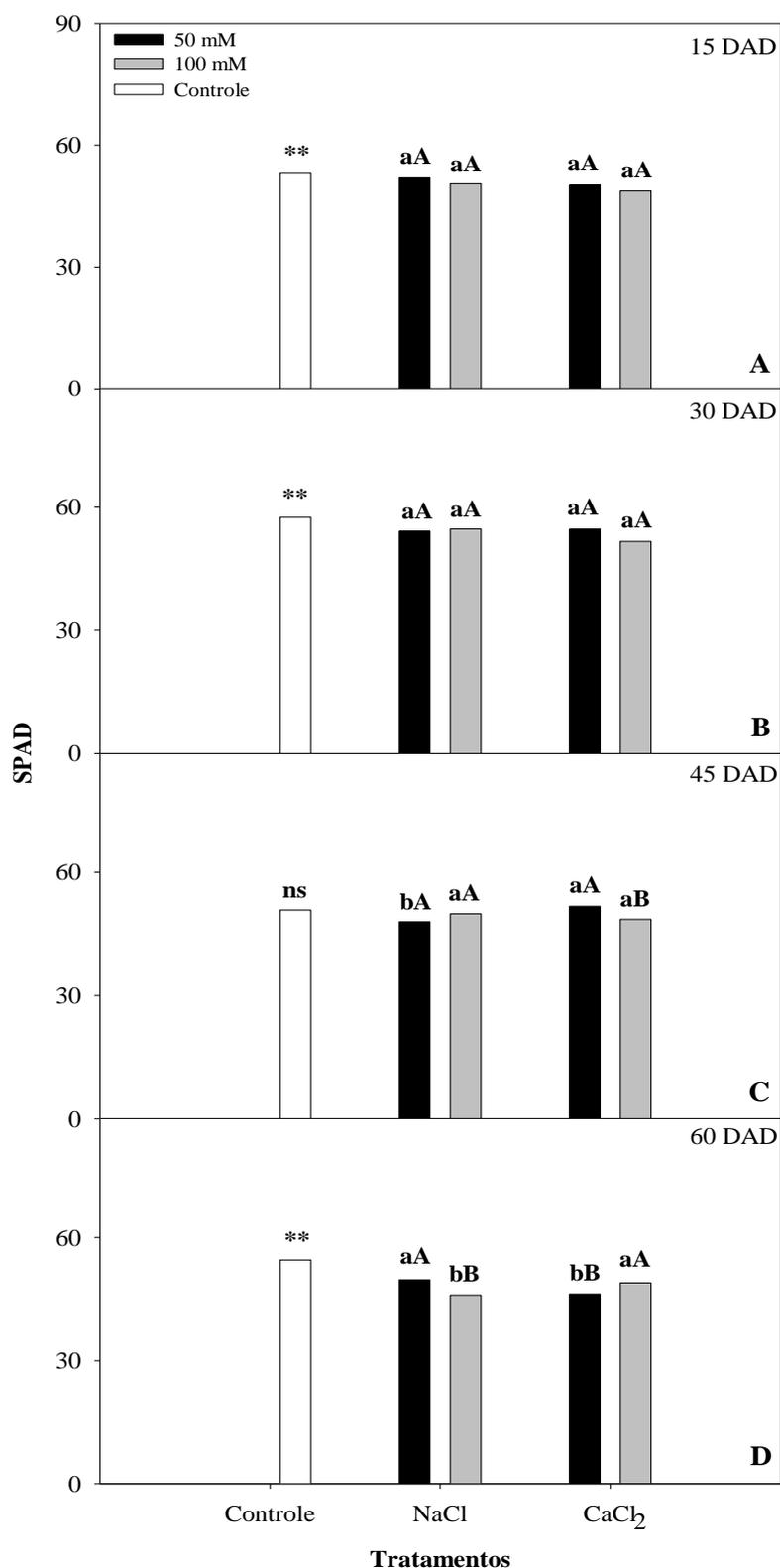
** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 24: Teores de carotenoides de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

No índice de clorofila estimado pelo método não destrutivo, pôde-se verificar que tanto aos 15 DAD quanto aos 30 DAD não houve diferença significativa entre os níveis e sais testados. Aos 45 DAD foi verificada uma redução nas plantas do tratamento severo em relação ao moderado de CaCl_2 (6%) e comparando os dois sais, o NaCl apresentou uma queda de 8 % no SPAD das plantas sob estresse moderado. Na quarta coleta os níveis severo e moderado causaram reduções no índice de clorofila das plantas cultivadas sob NaCl e CaCl_2 , respectivamente. Essas reduções foram de apenas 9% e 6% e esses tratamentos foram também menores em relação ao mesmo nível do sal oposto (Figura 25).

Comparando-se as épocas de avaliação, percebe-se que houve um leve incremento na segunda coleta, seguido de uma sensível redução dos índices de clorofila das plantas. Esse comportamento também foi verificado no teor de clorofila total, uma vez que este está ligado diretamente à intensidade da cor verde que é medida pelos clorofilômetros. Novamente percebe-se que não há reduções drásticas nas concentrações dos pigmentos fotossintéticos, o que pode indicar que a espécie em estudo se utilize de algum mecanismo relacionado a esta variável para suportar o estresse, ou que esta variável seja afetada mais tardiamente, como as de crescimento até então estudadas (Figura 25).

Valores mais baixos do índice SPAD foram verificados em plantas de pepino submetidas à salinidade por CaCl_2 por 64 dias. Porém, quando submetidas a níveis de NaCl e a uma combinação desses dois sais, em proporções equivalentes, as mesmas conseguiram manter essa variável semelhante à das plantas controle (COLLA et al., 2013). Os autores atribuíram essa resposta à capacidade limitada das plantas de restringir a passagem dos íons Cl^- para a parte aérea, portanto esse íon se tornou o componente mais tóxico da solução. No presente trabalho, também foi encontrado maior efeito para as plantas submetidas ao CaCl_2 , porém o nível de CaCl_2 utilizado pelos autores supracitados foi de 30 mM, enquanto que aqui a menor concentração foi de 50 mM, que só causou reduções após 60 dias de estresse, enquanto que o tratamento severo (100 mM) causou reduções após 45 dias de estresse.



** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 25: Índice de clorofila de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

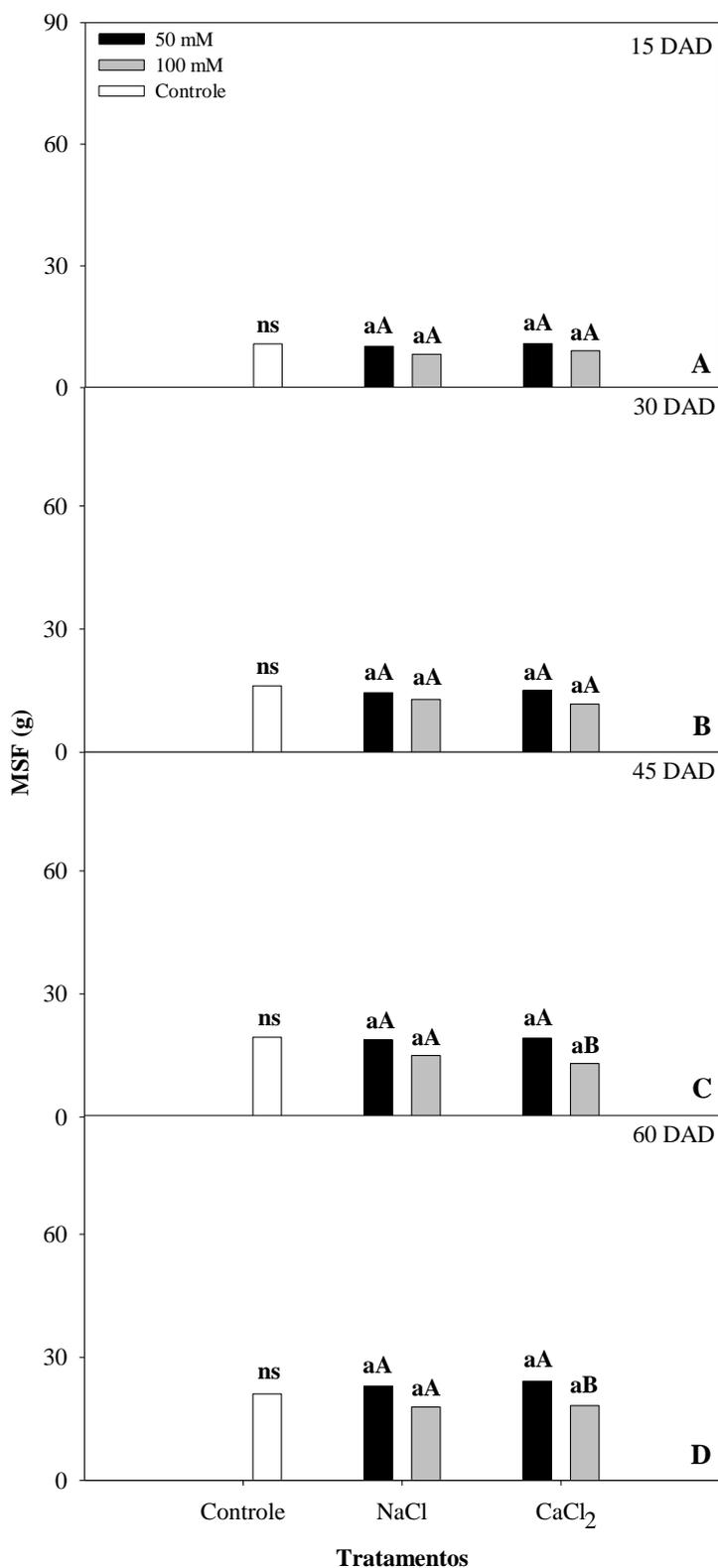
Na Tailândia, Cha-um et al. (2004), estudaram a tolerância à salinidade em plantas de nim e perceberam uma redução drástica dos pigmentos fotossintéticos avaliados (Clor a e Clor b), de cerca de nove e seis vezes, para os dois pigmentos, respectivamente, em comparação com a condição controle, acompanhado pela redução da taxa de fotossíntese. Porém o que deve ser apreciado é que estas plantas foram submetidas a uma concentração de 1,02 M de NaCl por 28 dias, o que significa uma concentração 10 vezes maior do que o nível mais severo utilizado na presente pesquisa. Por isso as reduções foram tão drásticas em comparação as que foram encontradas no presente estudo, mesmo passando por 60 dias de estresse. Os autores realizaram este ensaio em plantas cultivadas *in vitro* e além das variáveis fisiológicas, avaliaram a sobrevivência das plântulas no meio e testando os níveis de NaCl de 0,34; 0,68 M, além do 1,02 M, elegeram o nível de 0,34 M como 50% da dose letal para testar em nove clones tolerantes e em um sensível à salinidade. Ao final do trabalho eles conseguiram confirmar a tolerância a salinidade de alguns destes clones, servindo de base para o melhoramento genético da espécie.

Em plantas de *Moringa oleifera*, foram avaliados os teores de clorofila *a*, *b* e total e os carotenoides, e embora tenha sido avaliada a resposta ao estresse de curta duração, onde as plantas foram submetidas a salinidade por 2, 24 e 48 horas, ainda assim, foi encontrada uma pequena redução nos teores de pigmentos fotossintéticos quando submetidas aos tratamentos 75 mM e 150 mM de NaCl (ALVES, E. C. A., 2013)

5.2.5 Produção de matéria seca e alocação de biomassa para os diversos órgãos

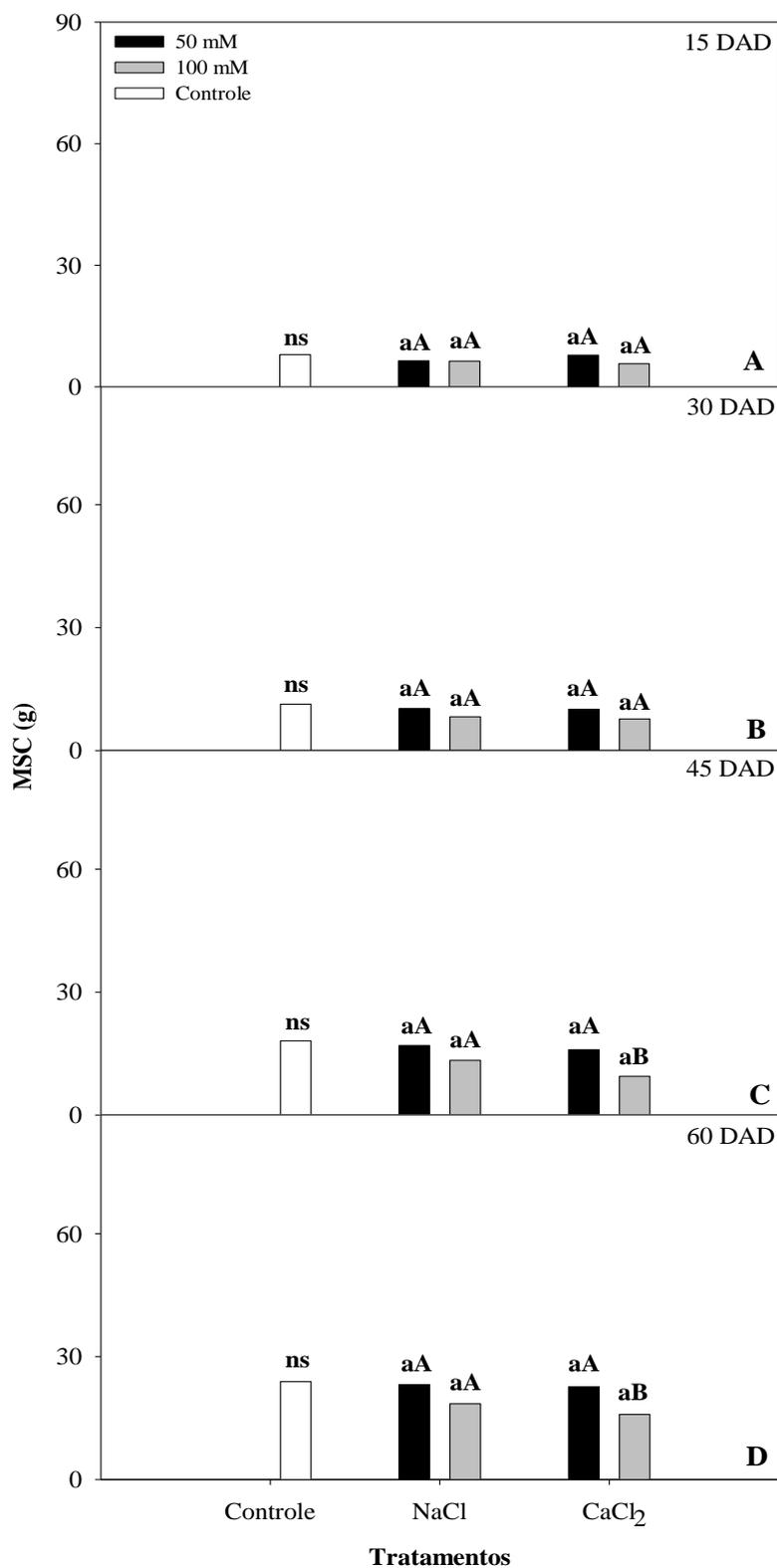
O estresse não causou efeito na produção de matéria seca para as partes da planta estudadas mesmo após 30 dias de submissão dos tratamentos salinos, sendo todas as partes das plantas do tratamento severo de CaCl₂ afetadas a partir dos 45 DAD.

Para a produção de matéria seca das folhas e do caule os resultados foram semelhantes. Para ambas o tratamento controle não apresentou interação significativa em relação ao fatorial. Analisando o fatorial, também para ambos essa variável só apresentou redução significativa no tratamento severo em relação moderado de CaCl₂ aos 45 e 60 DAD. Estas reduções foram de 47% e 33%, para a MSF e 69% e 42%, para a MSC para as épocas citadas, respectivamente (Figura 26 e 27).



** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 26: Produção de matéria seca das folhas de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade



** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 27: Produção de matéria seca dos caule de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

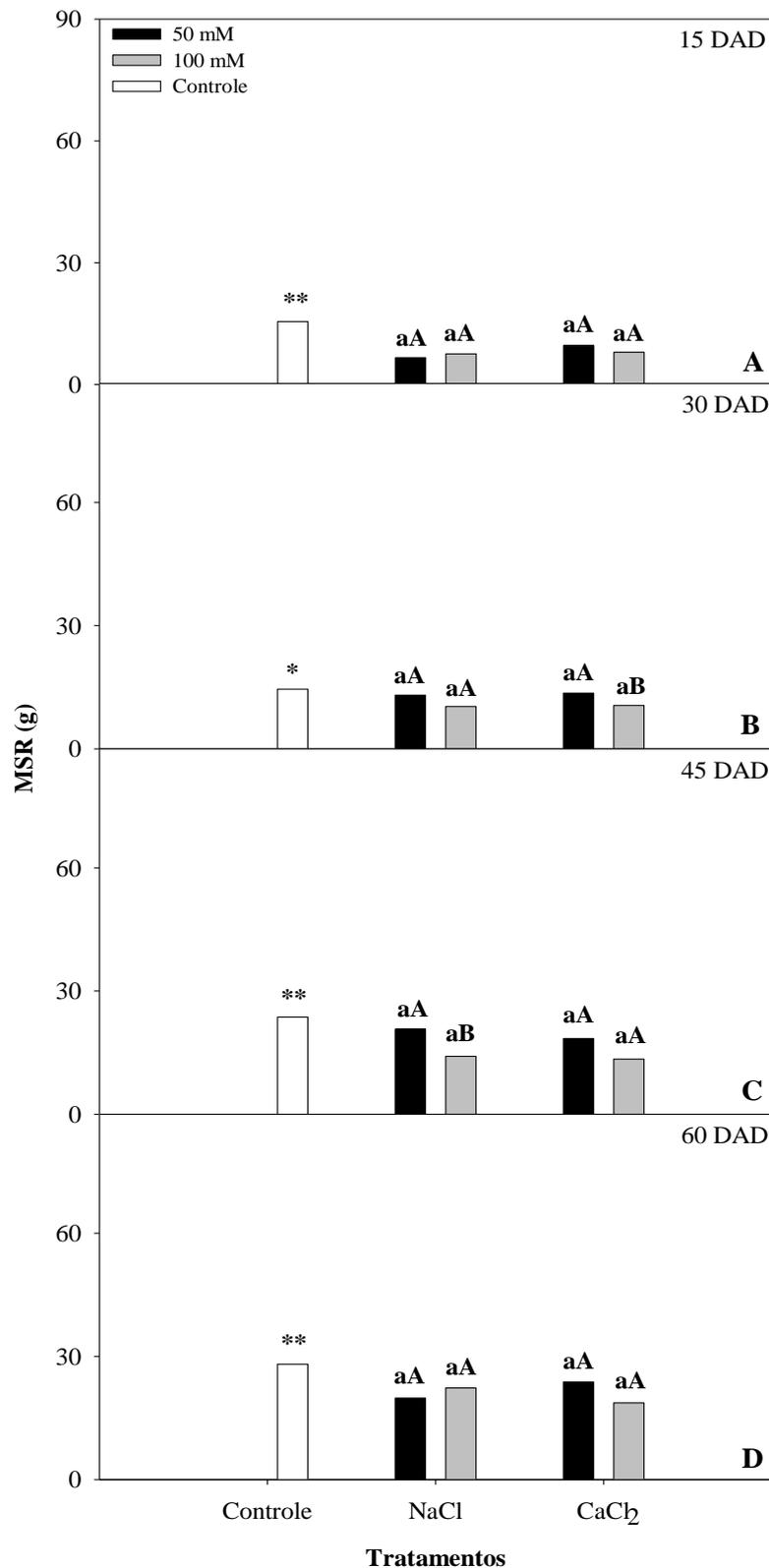
Para a produção de matéria seca das raízes já foi verificada interação significativa do tratamento controle com o fatorial em todas as épocas de avaliação, porém a análise fatorial foi um pouco diferente. Aos 15 DAD não foi verificada diferença estatística entre os níveis e os sais empregados. Porém aos 30 DAD o tratamento severo de CaCl_2 já foi reduzido (28%) em relação ao outro nível do mesmo sal. Aos 45 DAD essa redução foi novamente no nível severo, porém agora, para as plantas cultivadas sob NaCl , sendo esta redução de 47%. As plantas enfim chegaram aos 60 DAD novamente sem apresentar nenhuma diferença estatística entre os níveis ou entre os sais experimentados (Figura 28).

Para a matéria seca total, a situação já foi diferente daquela ocorrida para os órgãos, pois já aos 15 DAD as plantas cultivadas sob 100 mM de CaCl_2 apresentaram 24% menos produção de MST do que o nível moderado deste sal. Ainda nesta época, as plantas cultivadas sob 50 mM apresentaram uma maior MST quando sob CaCl_2 (Figura 29).

Após 30, 45 e 60 DAD as plantas apresentaram a mesma redução apenas no tratamento 100 mM de CaCl_2 , estas reduções foram de 29%, 49% e 34% em relação ao tratamento moderado deste sal (Figura 29).

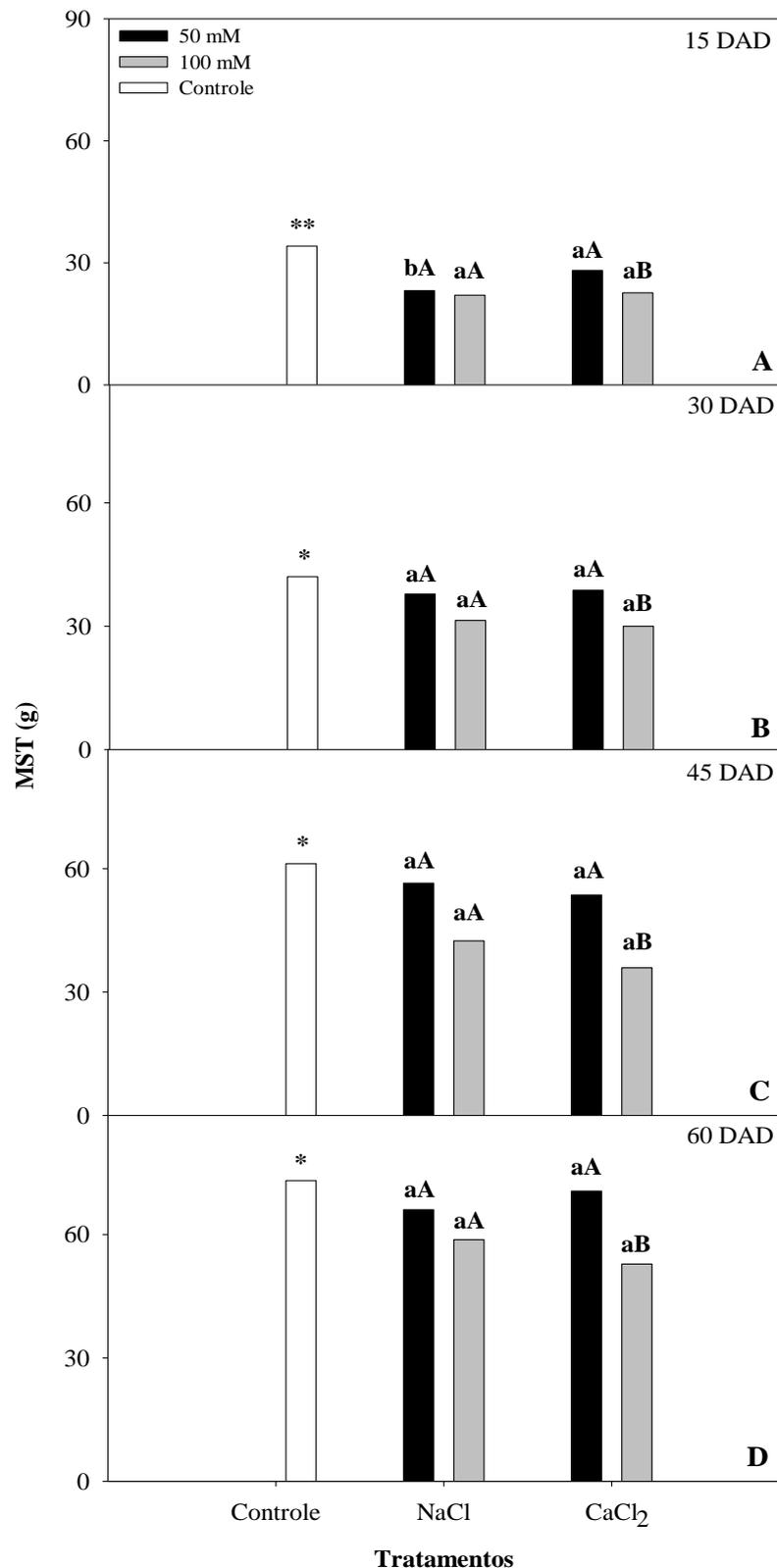
Esses resultados denotam tolerância às plantas de nim ao NaCl até 60 dias sob essas concentrações, e passado esse período, elas permanecem crescendo até 60 dias sem prejuízos quando cultivadas sob 100 mM de NaCl e CaCl_2 (Figura 29).

Isso pode ser confirmado, se avaliarmos as épocas de coleta, pois mesmo que de maneira singela, houve sempre um aumento da produção de matéria seca ao longo do tempo, o que seria esperado para plantas que estão sob boas condições de cultivo ou que estão conseguindo tolerar algum tipo de estresse. Esse comportamento pode ser notado principalmente na MST que teve seus maiores valores na última coleta, que foram, em sua maioria, maiores estatisticamente, se comparados aos valores obtidos na avaliação anterior (45 DAD) (Figura 29).



** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 28: Produção de matéria seca das raízes de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade



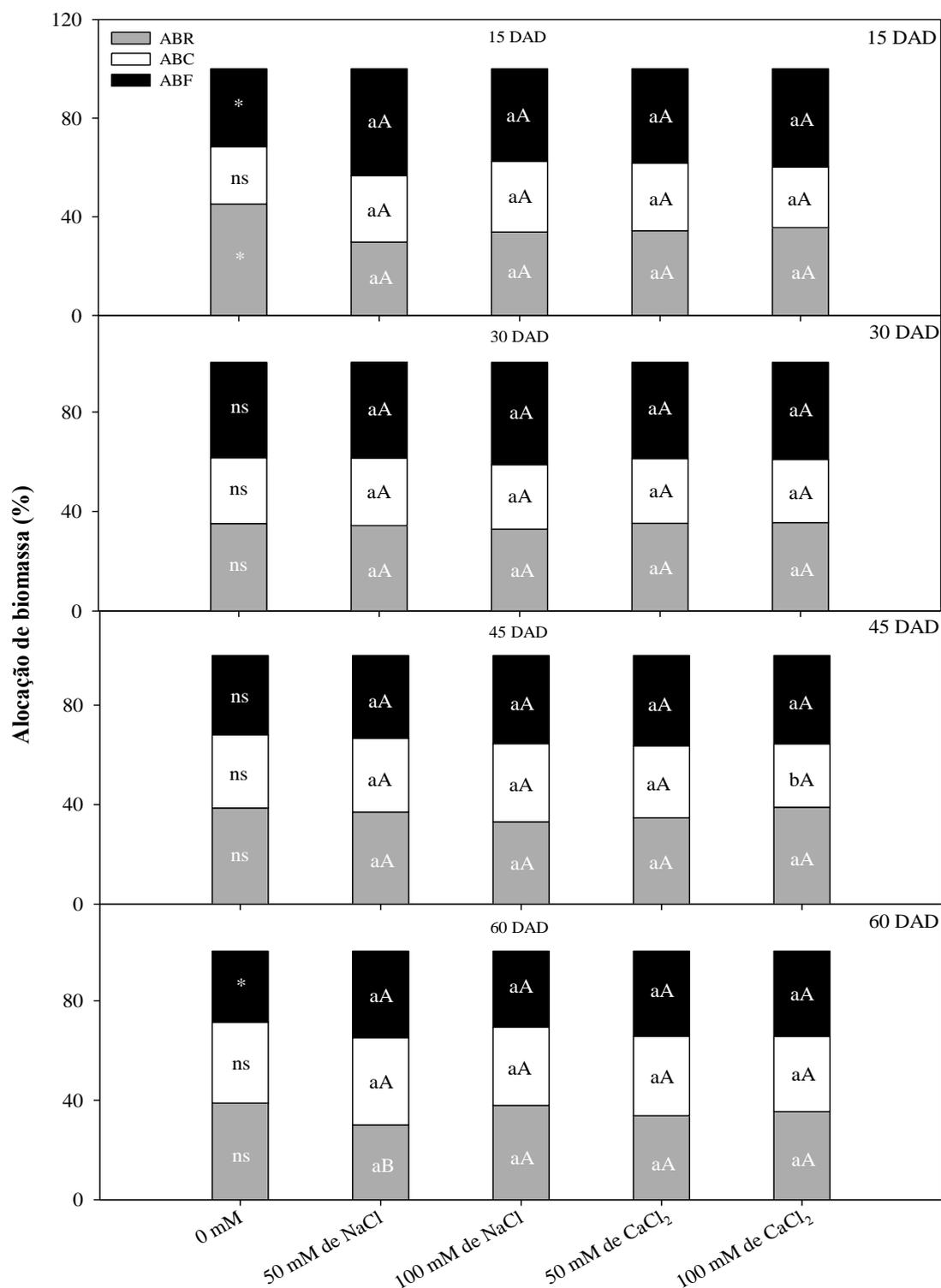
** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 29: Produção de matéria seca total de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Assim como foi visto nos resultados de produção de matéria seca, a alocação de biomassa para os diferentes órgãos, também não foram afetados pela salinidade. Além disso, pode ser observado que a interação tratamento controle x fatorial não foi significativo para a maioria das épocas, sendo significativo apenas para a ABF aos 15 e 60 DAD (Figura 30).

Avaliando cada época separadamente, os valores encontrados para a ABF, a ABC e a ABR, em média foi de 40%, 27% e 33% na primeira coleta (15 DAD), de 39%, 26% e 35% na segunda (30 DAD), de 34%, 29%, 37% na terceira (45 DAD) e de 33%, 32% e 35% na quarta coleta (60 DAD), respectivamente (Figura 30).

Analisando a tendência ocorrida entre as épocas de avaliação, percebe-se que ao longo do tempo os tratamentos controle e os dois níveis (50 mM e 100 mM) de NaCl foram reduzindo a sua ABF, com os menores valores aos 60 DAD (29%, 35% e 31%, respectivamente), no entanto essa proporção foi aumentada na ABC para os tratamentos controle e 50 mM de NaCl, com 32% e 35%, respectivamente, aos 60 DAD. Já para as plantas submetidas aos dois níveis de CaCl₂, não houve diferença entre as épocas de avaliação para a alocação de biomassa seca em nenhum dos órgãos (Figura 30). Isso pode ser justificado, pois nesses tratamentos, ao longo das épocas, foi encontrada uma redução na produção de matéria seca para todos os órgãos, portanto se todos os órgãos foram reduzidos na mesma proporção, a alocação dessa matéria seca para os órgãos também permaneceu inalterada.



Tratamentos salinos

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 30: Alocação de biomassa seca para as folhas (ABF), para o caule (ABC) e para as raízes (ABR) de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

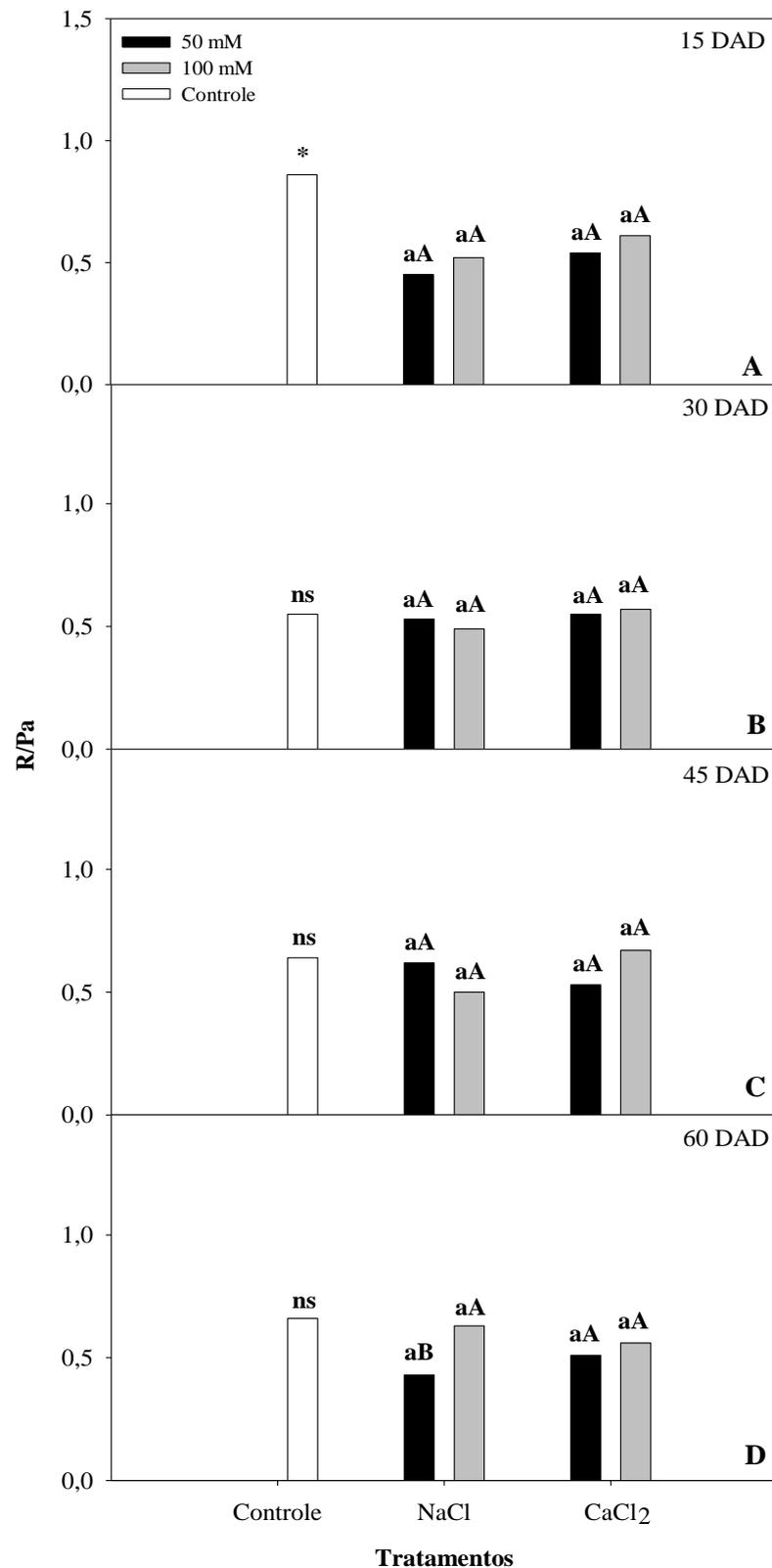
A relação raiz/parte aérea acompanhou o mesmo comportamento da produção de matéria seca e alocação de biomassa seca para todas as partes da planta, uma vez que foi praticamente inalterada nas plantas submetidas ao estresse salino. A interação do tratamento controle com o fatorial só foi significativa aos 15 DAD, não sendo observada interação nas demais épocas de avaliação (Figura 31).

Ao longo das coletas o único tratamento que apresentou redução em relação ao outro nível foi o 50 mM de NaCl, com uma relação raiz/parte aérea 47% menor na última coleta. Os valores encontrados variaram de 0,45 a 0,61 aos 15 DAD, de 0,49 a 0,57 aos 30 DAD, de 0,50 a 0,67 aos 45 DAD e de 0,43 a 0,66 aos 60 DAD (Figura 31).

Reduções significativas na produção total de matéria seca e fresca são verificadas em plantas de pinhão manso cultivadas em casa de vegetação por 28 dias sob níveis de salinidade – 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 mM de NaCl (CUNHA et al., 2013). As limitações do crescimento ocorreram a partir da submissão das plantas a níveis ≥ 60 mM de NaCl, atingindo reduções de até 36% em relação às plantas do tratamento controle, o que difere dos resultados encontrados nesta pesquisa, certamente pela diferença entre os níveis de tolerância à salinidade, retratado para ambas as espécies.

Em uma pesquisa desenvolvida com plantas de goiabeira, Ebert et al. (2002) encontraram aumento na produção de matéria seca das raízes em plantas submetidas a 60 mM de NaCl. Além disso, os autores testaram a influência da adição de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2^-$ juntamente com os tratamentos de NaCl, e houve um incremento da relação raiz/parte aérea das plantas acrescidas de 10 mM desse sal em relação aos tratamentos de NaCl, diferentemente do que foi encontrado neste trabalho, as plantas da presente pesquisa, ao longo do período de estresse não alteraram esta variável.

Resultados semelhantes aos que foram encontrados na presente pesquisa foram encontrados por Diniz et al. (2013). Os autores constataram que a irrigação com água salina de até $6,0 \text{ dS.cm}^{-1}$ (diluídos a partir de água fortemente salina), durante 117 dias, não causou efeitos significativos na produção total de matéria seca, nem para a parte aérea, tampouco para as raízes de plantas de nim indiano envasadas.



** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e ns não significativo ($p \geq .05$) para a interação Fatorial x Testemunha.

Figura 31: Relação raiz/parte aérea de plantas de nim indiano submetidas a diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ em quatro épocas de avaliação (A – 15 DAD, B – 30 DAD, 45 - DAD e 60 DAD), cultivadas em casa de vegetação. Para o fatorial 2 x 2 (2 tipos e 2 níveis de sais), médias seguidas por mesma letra, maiúsculas entre os níveis e minúsculas entre os tipos de sais, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Em mudas de seis espécies cultivadas em casa de vegetação sob irrigação de soluções adicionadas de cloreto de sódio e cloreto de cálcio (2:1), com CE de até 20 dS.cm⁻¹ por 360 dias, foi encontrada uma mortalidade em três das espécies a partir dos 150 dias de cultivo (GURUMURTHY et al., 2007). No entanto, entre as espécies estudadas estava o nim, que chegou ao final do período experimental com um incremento relativo de biomassa contínuo, o que indica, segundo os autores, que essas plantas estavam desenvolvendo tolerância à salinidade.

Mudas de nim cultivadas *in vitro* sob salinidade apresentam reduções drásticas, de mais de 100%, na produção de matéria fresca e seca total das plantas (CHA-UM et al., 2004). Isso foi atribuído pelos autores pela redução na taxa de fotossíntese também registrada no trabalho. Embora, esses resultados sejam divergentes dos encontrados na presente pesquisa, isso pode ser justificado, pois estas reduções ocorreram nas plantas submetidas a níveis de NaCl expressivamente maiores (1,02M) do que os testados aqui. Todavia, fato interessante que pode ser observado, é que os autores encontraram que a produção total de matéria fresca foi afetada apenas no tratamento mais severo (1,02M de NaCl), não havendo diferença entre os demais, e além disso, a produção total de matéria seca só foi afetada nos dois tratamentos mais severos (0,68M e 1,02M de NaCl), o que denota, embora os autores não tenham comentado, que essas plantas foram tolerantes a níveis de até 0,34M que representa 340 mM de NaCl com produtividade semelhantes ao tratamento controle. Esta concentração é três vezes maior do que a maior que foi testada na presente pesquisa (100 mM). Portanto estes resultados corroboram com a presente pesquisa, confirmando que plantas de nim não alteram o seu crescimento quando expostos a níveis consideráveis de sais no substrato.

Munns e Tester (2008) afirmam que curiosamente o crescimento da parte aérea é mais sensível do que o crescimento das raízes, e que embora não tenha nenhuma explicação científica, eles sugerem que isso ocorra, assim como em plantas sob déficit hídrico, para que haja uma redução da área foliar em relação à raiz, a fim de diminuir a superfície de perda de água e conservação da mesma, evitando assim a necessidade de absorção de mais água do meio salino. Isso poderia ter acontecido com as plantas em questão, porém elas continuaram crescendo e devido ao grande número de folhas prosseguiram com seu processo fotossintético e conseqüentemente permaneceram produzindo matéria seca, entretanto, esta foi alocada igualmente para todos os órgãos, denotando que o estresse não afeta de maneira alguma, as variáveis de crescimento

estudadas, permitindo que elas vivam em ambientes salinos com essas concentrações de sais sem prejuízos na produtividade.

Esse desempenho que as plantas apresentaram, pode estar relacionado à idade que elas tinham e ao período que elas passaram em aclimação na casa de vegetação, somando os seis meses de cultivo na sementeira e os 40 dias em aclimação, elas estavam com um pouco mais de sete meses quando foram expostas à salinidade, normalmente nos trabalhos que são encontrados as plantas são bem mais jovens, e certamente isso deve ter feito a diferença para que elas conseguissem enfrentar o estresse mantendo o seu crescimento em alta.

Apesar dessas respostas, foi percebido em quase todas as variáveis que os efeitos foram sensivelmente mais fortes nas plantas submetidas ao CaCl_2 , independente do nível. Na literatura, como já foi abordado, existe muitos trabalhos acerca dos efeitos benéficos que a adição desse sal, ou outros que sejam fonte de Ca^+ , pode causar em plantas submetidas à salinidade. O interessante é perceber que entre eles, as concentrações utilizadas variam de 0,5 mM - 20 mM, para os que encontraram efeitos positivos ou nulos. É difícil encontrar na literatura trabalhos que usem concentrações maiores do que estas e que ele seja utilizado isoladamente, tornando complexo o entendimento da ação desse sal, quando encontrado em excesso. Em trabalho com mudas de pepino, Colla et al. (2013) encontraram efeito similar ao que foi encontrado aqui com as plantas de nim, pois ele testou diferentes concentrações de CaCl_2 e de NaCl isoladamente, além de formar um tratamento com proporções equimolares de ambos. Os autores chamam atenção para o efeito danoso do CaCl_2 , porém não justifica esse comportamento das plantas.

É notório que o cloreto de sódio é um sal higroscópico, ou seja, que retém umidade do ar quando entra em contato com ele. Porém essa característica no cloreto de cálcio é muito mais marcante, uma vez que ele é utilizado como dessecante em vários seguimentos e visualmente, em poucos segundos ele já está aparentemente úmido. Talvez essa característica tenha relação com o seu efeito danoso às plantas e isso pode ser comprovado, pois em ensaios de germinação, onde só é exigida a presença de água, os sais têm ação osmótica preponderante no processo de absorção da mesma.

Alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos a fim de testar a influência de sais na água de irrigação das sementes, e utilizando diferentes sais reportam-se diferentes respostas, como é o caso da germinação de sementes de *Enterolobium schomburgkii*

onde é verificada uma menor porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação quando irrigadas com solução de NaCl e CaCl₂, porém com valores extremamente menores com submissão ao CaCl₂ (BRAGA; SOUSA; ALMEIDA, 2008). Além desta espécie, também foram encontrados maiores efeitos sobre as variáveis de germinação de cedro, quando irrigadas com solução de KCl e CaCl₂ nos níveis de 0, 25, 50, 75 e 100 mM (FERREIRA et al., 2013). Estudando germinação de catingueira e angico sob diferentes potenciais osmóticos de NaCl, CaCl₂ e polietilenoglicol - PEG6000, Santos (2014) encontrou tolerância à salinidade de até -1,2MPa de NaCl, no entanto essa tolerância foi reduzida para -0,4MPa, quando se tratou do CaCl₂.

Diante disso, é evidenciado que o efeito mais significativo desse sal deve estar relacionado à sua capacidade de retenção de água, se tornando mais agressivo também as plantas. Importante notar que todas as concentrações utilizadas para o cultivo de plantas são pequenas, sendo constatados então os benefícios dos íons Ca⁺ reportados em diversos trabalhos, porém no presente trabalho foram utilizados níveis bem maiores o pode ter intensificado os efeitos sobre as plantas, que nos deu a oportunidade de conhecer os limites de tolerância a este tipo de sal, tido até então como benéfico.

5.2.6 Ficha de descritores fisiológicos dos mecanismos de resposta à salinidade

Avaliando todas as variáveis estudadas, é verificado que a maioria delas foi afetada pelo estresse salino em algum nível e/ou época, com predominância desses efeitos sob as plantas cultivadas com CaCl_2 (Tabela 3). No conjunto das 27 variáveis que foram analisadas, vemos que 13 delas foram afetadas em pelo menos um tratamento salino na primeira e segunda coleta, 12 na terceira e 16 na quarta, comprovando que os efeitos da salinidade foram aumentados ao longo do período de imposição ao estresse. Em relação à severidade com que elas foram comprometidas, aquelas que foram levemente reduzidas, pelo menos em algum tratamento, permaneceram com um número estável (11 variáveis) até a última coleta, onde em 13 delas foram verificadas diferenças em relação ao tratamento controle, já para aquelas que foram severamente afetadas (>50%), vemos que esse número foi pequeno, atingindo o máximo de cinco na última coleta (Tabela 3).

Para ambos os sais, podemos verificar como era esperado, que em todas as épocas de avaliação o número de variáveis afetadas sempre foi maior para os tratamentos severos em relação aos moderados. Comparando os sais (independente do nível), é notório que o número de variáveis afetada foi maior para as plantas cultivadas em CaCl_2 , exceto na primeira coleta onde esse total foi maior para o NaCl , com uma diferença de apenas uma (Tabela 3).

Em relação aos parâmetros avaliados, verifica-se que todas as variáveis das trocas gasosas, das relações hídricas e dos pigmentos fotossintéticos foram atingidas em algum momento, porém se considerarmos as épocas de avaliação, observamos que os mais afetados foram as relações hídricas, seguido das trocas gasosas, logo após os pigmentos e por último o crescimento. As relações hídricas foram afetadas em todas as coletas, sendo cada vez mais atingida ao longo do estresse, chegando a maior intensidade dos efeitos na última avaliação (60 DAD). As trocas gasosas foram inicialmente afetadas de maneira severa, com uma amenização em todas as variáveis deste parâmetro nas coletas que se seguiram e então novamente foram reduzidas no final do período experimental. Os pigmentos fotossintéticos foram reduzidos a partir da segunda coleta, porém com poucas variações. Já para o crescimento, não foram verificadas alterações significativas para quase nenhuma variável até a última avaliação,

exceto para a produção de matéria seca que foi levemente reduzida em alguns órgãos nas últimas épocas de avaliação (Tabela 3).

Considerando essas informações em conjunto, podemos sugerir que o *nim* sofreu inicialmente o efeito osmótico da salinidade, onde as plantas respondem semelhantemente ao déficit hídrico, uma vez que inicialmente elas são afetadas pela falta de água, com alterações principalmente das trocas gasosas e das relações hídricas. Porém, esses não seguiram o mesmo padrão, uma vez que as trocas gasosas foram recuperadas e somente após 60 dias de estresse elas foram novamente afetadas, desta vez apenas nas plantas submetidas às condições mais estressantes. As relações hídricas por sua vez, foram cada vez mais afetadas, porém isso pode significar uma possível resposta das plantas ao estresse, já que as mesmas poderiam abaixar o seu potencial hídrico através da produção de solutos orgânicos, ou do acúmulo de íons inorgânicos em seus vacúolos e dessa forma manter a sua turgescência, fato que foi observado até a última época de avaliação. Esse mecanismo também justificaria a abertura estomática, que foi semelhante à das plantas controle até a última época de avaliação, isso fez com se mantivesse a assimilação de CO₂ pela planta e continuassem os ritmos de crescimento que apenas nas últimas coletas foram afetados. Com o passar do tempo os pigmentos fotossintéticos também foram alterados, talvez pelo efeito iônico da salinidade, que já começava a causar danos metabólicos. Seguindo a linha de resposta citada anteriormente, mesmo que as plantas tenham conseguido manter os estômatos abertos, essa redução dos pigmentos pode ter causado o prejuízo na fotossíntese observado no final do período experimental, o que tornaria possível que fossem observadas reduções significativas no crescimento mais tarde.

Tabela 3: Efeitos causados por diferentes níveis de NaCl e CaCl₂ por 60 dias, em variáveis fisiológicas avaliadas em plantas de nim indiano cultivadas em casa de vegetação

Parâmetros/ Variáveis	15 DAD				30 DAD				45 DAD				60 DAD				
	50N	100N	50C	100C	50N	100N	50C	100C	50N	100N	50C	100C	50N	100N	50C	100C	
<i>Crescimento</i>	Alt	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	Diam	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	NF	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
	MSF	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	●
	MSC	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
	MSR	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	○	○	●	●	○
	MST	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	○	●	○	●	○
	ABF	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	ABC	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	ABR	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	R/Pa	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	<i>T. gasosas</i>	A	○	○	○	●	●	●	○	○	●	●	●	●	●	○	●
E		○	●	●	○	●	●	●	○	●	○	●	●	●	○	○	○
gs		○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Ci		●	●	○	○	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●
EUA		○	○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●
EC		●	○	●	○	●	●	○	○	●	●	●	●	●	○	●	●
<i>R. Hídricas</i>	Ψ 4h	●	○	○	○	●	●	●	●	○	○	○	○	●	●	●	●
	Ψ 12h	●	●	●	●	●	○	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
	TRA 4h	●	○	●	●	○	○	○	○	○	●	○	○	●	●	○	○
	TRA 12h	●	○	●	●	●	●	●	○	●	○	○	○	○	○	○	○
	%DM	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	●	●	○	●	●
<i>Pigmentos</i>	Clor a	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	○	○	○
	Clor b	●	●	●	●	●	○	○	○	○	●	●	○	●	●	●	●
	Clor t.	●	●	●	●	●	●	○	○	○	●	○	○	●	○	○	○
	Carot	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	SPAD	●	●	●	○	○	●	●	○	●	●	●	●	○	○	○	○

*Comparados ao tratamento controle (●) Não houve diferença; (○) Leve redução; (●) Drástica redução >50%; (○) Leve aumento e (●) Drástico aumento >50%

**Siglas dos tratamentos: 50N – 50 mM de NaCl, 100N – 100 mM de NaCl, 50C – 50 mM de CaCl₂ e 100C – 100 mM de CaCl₂

Apesar de todas as reduções causadas pela salinidade, era perceptível que pouquíssimas plantas começaram a sofrer visualmente somente após 60 dias de estresse, com as bordas de algumas folhas necrosadas, apenas nos níveis mais severos, até então as plantas eram semelhantes entre si. O que pode indicar que a partir desse período essas plantas poderiam demonstrar os sintomas de injúria. Portanto as mudas de nim cultivadas sob essa condição podem ser classificadas como tolerantes à salinidade. Pois embora tenham sofrido inicialmente com o efeito osmótico, elas conseguiram de alguma forma, manter a sua produtividade tão satisfatória quanto a das plantas cultivadas em substrato isento de sais. O que pode ser comentado sobre os sais é que, plantas de nim conseguem manter a sua produtividade se cultivadas até concentrações de 100 mM de NaCl pelo período avaliado, e embora ambos os sais tenham causado efeitos sobre a fisiologia das plantas, o CaCl_2 foi mais invasivo causando graves danos celulares após 45 dias, com reduções consideráveis de produção de matéria seca a partir desse período, sendo portanto indicado que plantas de nim sejam cultivadas por esse período até a concentração de 50 mM de CaCl_2 sem prejuízos em sua produtividade.

6 CONCLUSÃO

Quanto às de sementes de nim, conclui-se que baixas temperaturas (5°C) inibem a sua germinação, enquanto que o armazenamento sob temperatura de 25°C permite uma manutenção de viabilidade e vigor até apenas três dias. Além disso, diante da variabilidade de respostas às condições de armazenamento, indica-se, portanto, que as sementes sejam semeadas o quanto antes após a coleta, e caso haja a necessidade de armazenar as sementes, sugere-se que sejam realizados pré testes especificamente para cada região. O que ressalta a extrema necessidade de estudo para estabelecer os padrões de coleta, de pré-tratamento e de armazenamento para essas sementes.

Quanto ao estabelecimento de mudas de nim sob salinidade, ambos os sais causam efeitos sobre a fisiologia das plantas, porém o CaCl_2 é mais invasivo do que o NaCl , causando graves danos celulares após 45 dias de cultivo. Portanto mudas de nim aclimatadas, podem ser cultivadas por 60 dias em concentrações de até 100 mM de NaCl e 50 mM de CaCl_2 sem prejuízos em sua produtividade. Indicando-se a realização de pesquisas que ultrapassem esses períodos de imposição do estresse para se definir o limite de cultivo de plantas de nim sob salinidade por NaCl .

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABROL, I. P.; YADAV, J. S. P.; MASSOUD, F. I. **Salt-affected Soils and their Management**. Food and Agriculture organization of the United Nations - FAO: Rome. 1998. (FAO Soils Bulletin).
- AKINCI, I. E.; SIMSEK, M. Ameliorative effects of potassium and calcium on the salinity stress in embryo culture of cucumber (*Cucumis sativas* L.). **Journal of Biological Sciences**. V. 4, n. 3, p. 361-365, 2004.
- ALLA, M. M. N. et al. Supplementary CaCl₂ ameliorates wheat tolerance to NaCl. **Acta Physiologiae Plantarum**. V. 36, p. 2103-2112, 2014.
- ALVES, F. A. L. et al. Efeitos do KCl e CaCl₂ na absorção e transporte de Na⁺ em cajueiro exposto ao NaCl. **Revista Ciência Agronômica**. V. 39, n. 2, p. 287-294, 2008.
- ALVES, F. A. L. et al. Mecanismos fisiológicos envolvidos com a diminuição de K⁺ em raízes de cajueiro causada por NaCl. **Revista Ciência Agronômica**. V. 40, n. 4, p. 588-595, 2009.
- ALVES, P. D. et al. Chromatographic evaluation and antimicrobial activity of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) leaves hydroalcoholic extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. V. 19, n. 2B, p. 510-515, abr/jun. 2009.
- ANDRADE, A. C. S.; PEREIRA, T. S. Efeito do substrato e da temperatura na germinação e no vigor de sementes de cedro – *Cedrela odorata* L. (MELIACEAE). **Revista Brasileira de Sementes**. V. 16, n. 1, p. 34-40, 1994.
- ANDRÉO, Y.; NAKAGAWA, J.; BARBEDO, C. J. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Ingá vera* Willd, subsp. *Affinis* (DC.) T. D. Pennington). **Revista Brasileira de Botânica**. V. 29, n. 2, p. 309-318. 2006.
- ARAÚJO, L. V. C.; RODRIGUEZ, L. C. E.; PAES, J. B. Características físico-químicas e energéticas das madeiras de nim indiano. **Scientia Florestalis**. Piracicaba, n. 57, p. 153-159, jun. 2000.
- ARSHI, A.; ABDIN, M. Z.; IQBAL, M. Sennoside content and yield attributes of *Cassia angustifolia* Vahl. As affected by NaCl and CaCl₂. **Scientia Horticulturae**. V111. P. 84-90, 2006.
- AZAD, S.; ZEDAN-AL-MUSA; MATIN, A. Effects of pre-sowing treatments on seed germination of *Melia azedarach*. **Journal of Forestry Research**. V. 21, n. 2, p. 193-196. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11676-010-0031-1>>. Acesso em: 22 nov. de 2014
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas**. 1ª Ed. FUNEP: Jaboticabal, 1988. 42 p.

BERJAK, P. et al. Responses of seeds of *Azadirachta indica* (neem) to short-term storage under ambient or chilled conditions. **Seed Science and Technology**. V. 23, N. 3, P. 779-792. 1995. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=3005138>>. Acesso em: 23 nov. de 2014.

BEZERRA NETO, E.; BARRETO, L. P. As técnicas de Hidroponia. **Anais da academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**. V. 8 e 9, p.107-137. 2012.

BHARATHI, A. et al. Effect of drupe maturity on seed germination and seedling vigour in neem. **Journal of Tropical Forest Science**. V. 9, n. 2, p. 147-150. 1996. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/23616365>. Acesso em: 23 nov. de 2014.

BISWAS, K. et al. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **Current Science**. Bangalore, V. 82, n. 11, p. 1336-1345, jun. 2002.

BONJOVANI M. R.; BARBEDO C. J. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. Subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. toleram temperatura sub-zero. **Revista Brasileira de Botânica**. n. 2, p. 345-356. 2008.

BRAGA, L. F.; SOUSA, M. P.; ALMEIDA, T. A. Germinação de sementes de *Enterolobium schomburgkii* (Benth.) submetidas a estresse salino e aplicação de poliamina. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. V. 11, n. 1, p. 63-70, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009.

BRILHANTE, J. C. A. et al. Influência do tempo de aclimação na resposta do cajueiro à salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. V. 11, n. 2, p. 173-179. 2007.

CAIRO, P. A. R. **Curso básico de relações hídricas de plantas**. Vitória da Conquista, UESB, 1995. 32 p.

CARPANEZZI, A. A.; NEVES, E. J. M. **Balanço dos aspectos técnicos do cultivo do nim no Brasil**. Colombo – PR: Embrapa Florestas, dez. 2010. 26 p. (Documentos).

CARVAJAL, M.; CERDÁ, A.; MARTÍNEZ, V. Does calcium ameliorate the negative effect of NaCl on melom root water transport by regulating aquaporin activity? **New Phytologist**. V. 145, p. 439-447, 2000.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4^a Ed. Funep: Jaboticabal. 2000. 588 p.

CHANEY, W. R.; KNUDSON, D. M. Germination of seeds of *Azadirachta indica* enhanced by endocarp removal. **The International Tree Crops Journal**. v. 5, n. 3, p. 135-161. 1988. Disponível em:<

http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01435698.1988.9752850#.VHJF4IFdV_8
>. Acesso em: 23 nov. de 2014.

CHA-UM, S. et al. Physiological responses of Thai neem (*Azadirachta siamensis* Val.) to salt stress for salt-tolerance screening program. **Science Asia**. V. 30, p. 17-23. 2004.

CHENG, T. et al. Calcium-induced proline accumulation contributes to amelioration of NaCl injury and expression of glutamine synthetase in greater duckweed (*Spirodela polyrhiza* L.). **Aquatic Toxicology**. V 144-145, p. 265-274, 2013.

COLLA, G. et al. The effectiveness of grafting to improve NaCl and CaCl₂ tolerance in cucumber. **Scientia Horticulturae**. V164, p. 380-391, 2013.

COSTA, J. V. T. A. et al. Óleo e extrato aquoso de sementes de nim, azadiractina e acefato no controle do pulgão-preto do feijão-de-corda. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. V. 40. N. 2, p. 238-241. 2010.

CSURHES, S. et al. **Pest plant risk assessment: Neem tree *Azadirachta indica***. Queensland – Austrália. 2008. 12 p.

CRUZ, E. D.; CARVALHO, E. U. Biometria de frutos e germinação de sementes de *Couratari stellata* A. C. Smith (LECYTHIDACEAE). **Acta Amazonica**. V. 33, n. 3, p. 381-388. 2003.

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

DAGAR, J. C. et al. Performance of some under-explored crop under saline irrigation in a semiarid climate in Northwest India. **Land Degradation & Development**. V. 17 p. 285-299. 2006.

DING, F. et al. Ca⁺ significantly enhanced development and salt-secretion rate of salt glands of *Limonium bicolor* under NaCl treatment. **South African Journal of Botany**. V. 76, p. 95-101, 2010.

DINIZ, B. L. M. T. et al. Crescimento inicial e consume hídrico de nim submetido ao estresse salino e biofertilizante bovino. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. V. 8, n. 3, p. 470-475. 2013.

EBERT, G. et al. Ameliorating effects of Ca(NO₃)₂ on growth, mineral uptake and photosynthesis of NaCl-stressed guava seedlings (*Psidium guajava* L.). **Scientia Horticulturae**. V. 93, p. 125-135, 2002.

EESWARA, J. P.; ALLAN, E. J.; POWELL, A. A. The influence of seed maturity, moisture content and storage temperature on the survival of neem (*Azadirachta indica*) seed in storage. **Seed Science and Technology**. V. 26, n. 2, p. 299-308. 1998. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=1620261>>. Acesso em: 23 nov. de 2014.

ESPARZA-DÍAZ, G. et al. Concentración de azadiractina, efectividad inseticida y fitotoxicidad de cuatro extractos de *Azadirachta indica* A. Juss. **Revista Agrociencia**. V. 44, p. 821-833, 2010.

FERREIRA, E. G. B. S. et al. Processo germinativo e vigor de sementes de *Cedrela odorata* L. sob estresse salino. **Ciência Florestal**. V. 23, n. 1, p. 99-105, 2013.

FLORIANO, E. P. **Armazenamento de sementes florestais**. ANORGS. 1ª Ed. Santa Rosa, 2004. (Série Cadernos Didáticos).

FREIRE, A. L. O. et al. Crescimento e nutrição mineral do nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) e Cinamono (*Melia azedarach* Linn.) submetidos à salinidade. **Ciência Florestal**. V. 20, n. 2, p. 207-215. 2010.

GONÇALVES, M. E. C.; BLEICHER, E. Atividade sistêmica de azadiractina e extratos aquosos de sementes de nim sobre o pulgão-preto em feijão-de-corda. **Revista Ciência Agronômica**. V. 37, n. 2, p. 177-181. 2006a.

GONÇALVES, M. E. C.; BLEICHER, E. Uso de extratos aquosos de nim e azadiractina via sistema radicular para o controle de mosca-branca em meloeiro. **Revista Ciência Agronômica**. V. 37, n. 2, p. 182-187. 2006b.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Reviews of Plant Physiology**. V. 31, p. 149-190. 1998.

GURUMURTHY, B. R. et al. Influence of soil salinity on relative biomass and critical limits of growth in selected tree species. **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**. V. 20, n. 1, p. 133-134. 2007

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water-culture method for growing plants without soil**. California, California Agricultural Experiment Station, 32p. (CAES. Circular, 347). 1950.

HOLANDA, A. C. et al. Desenvolvimento inicial de espécies arbóreas em ambientes degradados por sais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. V. 7, n. 1, p. 39-50. 2007.

HEGDE, N. G. Neem Production and the small farmer. In: READ, M. D.; FRENCH, J. H. **Genetic Improvement of Neem Strategies for the Future**. Bangkok: Winrock Internacional, 1993. 194 p.

LACERDA, C. F. et al. Influência do cálcio sobre o crescimento e solutos em plântulas de sorgo estressadas com cloreto de sódio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. V. 28, p. 289-295, 2004.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. RiMa: São Carlos – SP. 2004. 531 p.

LICHTENTHALER H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. In: WROLSTAD, R. E.; ACREE, T. E.; AN, H.; DECKER, E. A.; PENNER, M. H.; REID, D. S.; SCHWARTZ, S. J.; SHOEMAKER, C. F.; SPORNS, P. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. John Wiley & Sons, Inc: New Jersey. Unit F4.3, p. F4.3.1-F4.3.8, 2001.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop science**. Madson. V. 2, n. 2, p.176-177. 1962.

MARTINEZ, S. S. **O nim – *Azadirachta indica* – um inseticida natural**. Londrina, fev. 2008 (Documentos IAPAR).

MARTINS, M. O. **Aspectos fisiológicos do nim indiano sob déficit hídrico em condições de casa de vegetação**. 2008. 84f. Dissertação (Mestrado em Botânica) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MEDEIROS, A. C. S.; EIRA, M. T. S. **Comportamento Fisiológico, Secagem e Armazenamento de Sementes Florestais Nativas**. Colombo-PR: Embrapa Florestas. 13 p. Dez. 2006. (Circular técnica).

MELGAR, J. C.; BENLLOCH, M.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R. Calcium increases sodium exclusion in olive plants. **Scientia Horticulturae**. V. 109, p. 303-305, 2006 (Short communication)

MENDONÇA, R. M. N.; DIAS, D. C. F. Conservação de sementes de fruteiras tropicais recalcitrantes: uma abordagem. Revisão bibliográfica. **Agropecuária técnica**. V. 21, n. 1 / 2. p. 57-73. 2000.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant cell environment**. V. 25, n. 2, p. 239-250. 2002.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annual Review of Plant Biology**. V. 59, p. 651-681. 2008.

NASCIMENTO, H. H. C. **Mecanismos fisiológicos e bioquímicos em mudas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.), sob condições adversas**. 2013. 162F. Tese (Doutorado em Ciências Florestais). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

NASSIF, S. M. L.; VIEIRA, I. G.; FERNANDES, G. D. **Fatores externos (ambientais) que influenciam na germinação de sementes**. Piracicaba: Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais, 1998. Disponível em: <<http://www.ipef.br/tecsementes/germinacao.asp>> Acesso em: 21 out. 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Neem: a tree for solving global problems**. Washington: National Academy Press. 1992. 141 p.

- NEDJIMI, B.; DAOUD, Y. Ameliorative effect of CaCl_2 on growth, membrane permeability and nutrient uptake in *Atriplex halimus* subsp. *Schweinfurthii* growth at high (NaCl) salinity. **Desalination**. V. 249, p. 163-166, 2009.
- NEVES, C. S. V. J. Sementes recalcitrantes: Revisão de literatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. V. 29, n. 9, p. 1459-1467. Set, 1994.
- NEVES, E. J. M. Importância dos fatores edafo-climáticos para o uso do nim (*Azadirachta indica* A. Juss) em programas florestais e agroflorestais nas diferentes regiões do Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**. Colombo, n. 49, p. 99-107. 2004.
- NEVES, E. J. M.; CARPANEZZI, A. A. **Teores foliares de nutrientes em plantio de nim nos estados do Paraná e São Paulo**. Colombo – PR: Embrapa Florestas, dez. 2006. 5 p. (Comunicado técnico).
- NEVES, E. J. M.; CARPANEZZI, A. A. **O cultivo do nim para produção de frutos no Brasil**. Colombo – PR: Embrapa Florestas, dez. 2008. 8 p. (Circular técnica).
- NEVES, E. J. M. et al. Caracterização nutricional do nim em plantios no Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 17, n. 1, p. 26-32, 2013.
- NEYA, O. et al. Ageing increases the sensitivity of neem (*Azadirachta indica*) seeds to imbibitional stress. **Seed Science Research**. V. 14, n. 2, p. 205-217. 2004. Disponível em: <
<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=709680>>. Acesso em: 22 nov. de 2014.
- NUNES, J. C. et al. Comportamento de mudas de nim à salinidade da água em solo não salino com biofertilizante. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. V. 16, n. 11, p. 1152-1158. 2012.
- OLIVEIRA, I. P. et al. **Manejo sustentável e nutrição mineral do nim indiano**. Santo Antônio de Goiás – GO: Embrapa Arroz e Feijão, dez. 2005. 16 p. (Comunicado técnico).
- OLIVEIRA, M. T. R. et al. Avaliação do vigor de sementes de carambola em função da secagem e do armazenamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 13, n. 4, p. 477-482. 2009.
- PACHECO, M. V. et al. Efeito de temperatura e substratos na germinação de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). **Revista Árvore**. V. 30, n. 3, p. 359-367. 2006.
- PANDE, M. TARAFDAR, J. C. Effect of phosphorus, salinity and moisture on VAM fungal association in neem (*Azadirachta indica* Linn.). **Symbiosis**. V. 32, n. 3, p. 195-209. 2002.

PAULA, Y. C. M. et al. Influência da maturação do fruto na germinação de sementes de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. V. 4, n. 1, p. 64-68. 2009.

PEDROSO, L.; AZEREDO, G. A.; VANZOLINI, S. Germinação de sementes de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) em função do tipo de coleta e da coloração dos frutos. **Revista Nucleus**. V. 5, n. 2, p. 197-208. 2008.

PHOGAT, V. et al. Techniques of Neem Plantation and Its Economic Benefits. In: SINGH, K. K. ET AL. **Neem: a treatise**. IK International Publishing House: New Delhi, Índia. 2009. 568 p. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=PyYRUCoIDk4C&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 21 out de 2013.

READ, M. D.; FRENCH, J. H. **Genetic Improvement of Neem Strategies for the Future**. Bangkok: Winrock Internacional, 1993. 194 p.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**. V. 12, p. 499-514, 1973.

SACANDÉ, M. et al. Viability loss of neem (*Azadirachta indica*) seeds associated with membrane phase behavior. **Journal of Experimental Botany**. V. 52, n. 358, p.919-931. 2001.

SACANDÉ, M. BUITINK, J. HOEKSTRA, F. A. A study of water relations in neem seed that is characterized by complex storage behavior. In: SACANDÉ, M. Stress, storage and survival of neem seed. **Plantenfysiologie Wageningen Universiteit**. 2000. 124 p.

SANTOS, C. A. **Grau de resiliência em duas espécies do semiárido submetidas a estresses abióticos**. 2014. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SHIVANNA, M. B.; NAGASHREE, B. R.; GURUMURTHY, B. R. *In vitro* response of *Azadirachta indica* to salinity stress and its effect of certain osmoprotectants and antioxidative enzymes. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**. V. 4, n. 2, p. 591-602. 2013.

SCHOLANDER, P. F.; HAMMEL, H. T.; BRADSTREET, E. D.; HEMMINGSEN, E. A. Sap pressure in vascular plants. **Science**, v.148, n.3668, p.339-346, 1965.

SILVA, E. C. A. **Respostas fisiológicas, bioquímicas e enzimáticas em mudas de *Moringa oleifera* Lam. Submetidas a estresses abióticos**. 2013. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SILVA, E. N. et al. Salt stress induced damages on the photosynthesis of physics nut Young plants. **Scientia Agrícola**. V. 68, n. 1, p. 62-68. 2011.

SILVA, J. V. et al. Physiological responses of NaCl stressed cowpea plants grown in nutrient solution supplemented with CaCl₂. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. V. 15, n. 2, p. 99-105, 2003.

TAIZ, L. ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4^a Ed. Artmed: Porto Alegre. 2009. 848 p. (Reimpressão 2010).

TEWARI, D. N. Neem Research at ICFRE. In: READ, M. D.; FRENCH, J. H. **Genetic Improvement of Neem Strategies for the Future**. Bangkok: Winrock Internacional, 1993. 194 p.

VARGHESE, B.; NAITHANI, S. C. Desiccation-induced changes in lipid peroxidation, superoxide level and antioxidant enzymes activity in neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) seeds. **Acta Physiologiae Plantarum**. V. 24, n. 1, p.79-87. 2002. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11738-002-0025-5#page-1>. Acesso em: 22 nov. de 2014.

VARGHESE, B.; NAITHANI, S. C. Oxidative metabolism-related changes in cryogenically stored neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds. **Journal of Plant Physiology**. V.165, n. 7, p.755-765. 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161707001459>>. Acesso em: 22 nov. de 2014.

VARGHESE, B.; NAITHANI, S. C. Desiccation induced loss of vigour and viability during storage in neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds. **Seed Science and Technology**. V. 28, n. 2, p. 485-496. 2000a. Disponível em: <<http://www.cabdirect.org/abstracts/20026788477.html;jsessionid=05030495855AA51FF96237AD3EA6AD49>>. Acesso em 23 nov. de 2014.

VARGHESE, B.; NAITHANI, S. C. Dessication stress in neem seeds: Physiological and biochemical considerations. **DFSC Newsletter**. V. 8, p. 16-19. 2000b.

VERTUCI, C. W. Predicting the optimum storage conditions for seed using thermodynamic principles. **Journal of Seed Technology**. V. 17, n. 2, p. 41-52. 1993.

VIDIGAL, D. S. et al. Germinação e morfologia do desenvolvimento pós-seminal de sementes de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss. – Meliaceae). **Revista Brasileira de Sementes**. Londrina, V. 29, n. 3, p. 39-46, 2007.

VIEGAS JR., C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**. V. 26, n. 3, p. 390-400. 2003.