MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE

RESPOSTAS *IN VITRO* A ESTRESSES ABIÓTICOS EM *Gliricidia sepium*

RAFAELA DA MOTA ANDRADE

2025

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE

RAFAELA DA MOTA ANDRADE

RESPOSTAS *IN VITRO* A ESTRESSES ABIÓTICOS EM *Gliricidia sepium*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de "Mestre em Ciências".

Orientadora
Profª. Drª. Ana da Silva Lédo
Coorientador
Dr. Evandro Neves de Muniz

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2025

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Andrade, Rafaela da Mota.
A553r Respostas *in vitro* a estresses abióticos em *Gliricidia sepium* / Rafaela da Mota Andrade; orientadora Ana da Silva Lédo. – São Cristóvão, SE, 2025.
49 f.: il.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, 2025.

1. Salinidade. 2. Leguminosas. 3. Clorofila. 4. Biotecnologia vegetal. 5. Histologia. I. *Gliricidia sepium.* II. Lédo, Ana da Silva, orient. III. Título.

CDU 633.37

RAFAELA DA MOTA ANDRADE

RESPOSTAS *IN VITRO* A ESTRESSES ABIÓTICOS EM *Gliricidia sepium*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de "Mestre em Ciências".

APROVADA em 11 de julho de 2025.

Drª. Ana Veruska Cruz da Silva (UFS/Embrapa Tabuleiros Costeiros)

Drª. Juliana Lopes Souza (SEMA/SE)

gov.br
Documento assinado digitalmente
ANA DA SILVA LEDO
Data: 22/07/2025 13:44:42-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profª. Drª. Ana da Silva Lédo
Embrapa Tabuleiros Costeiros/UFS
(Orientador)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

Aos meus familiares
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, persistência, resiliência e por me permitir chegar até aqui.

À Universidade Federal de Sergipe, ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade (PPGAGRI), à Embrapa Tabuleiros Costeiros e ao Instituto Tecnológico de Pesquisa (ITP), por me permitirem realizar essas pesquisas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento deste estudo.

À minha filha Eva, pela força e energia.

Ao meu esposo Rivanilton, por todo amor, companheirismo e paciência.

Aos meus pais Lucélia e Roberto; ao meu irmão Rafael pelo apoio, torcida e amor.

Às minhas tias Dalva, Helena e Olga, por tanto exemplo e apoio.

Aos meus sogros Neide e Rildo, pelo carinho e apoio.

Às minhas amigas/irmãs: Camila, Carol, Cecília, Juliana, Rebeca e Shirley, pela torcida e parceria.

À minha orientadora Ana Lédo, pela confiança e incrível condução nesse processo.

Às minhas amigas e companheiras Jane e Gilmara, muito especiais nessa jornada da pós-graduação.

Ao técnico Inácio e ao analista Bruno da Embrapa, pela atenção, disposição e apoio.

Meus sinceros agradecimentos a todos!

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS i
LISTA DE TABELAS iii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS iv
RESUMO v
ABSTRACT vi
1. INTRODUÇÃO GERAL 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 2
2.1. Família Fabaceae: Diversidade que sustenta a vida 2
2.2. *Gliricidia sepium* 2
2.2.1. Origem, distribuição e descrição botânica 2
2.2.2. Importância da cultura 4
2.3. Estresses abióticos em plantas 4
2.3.1. Estresse salino 5
2.3.2. Estresse hídrico 5
2.3.3. Efeitos dos estresses abióticos nas plantas 5
2.4. Biotecnologia vegetal 6
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 8
4. ARTIGO 1: ESTRESSE SALINO *IN VITRO*: RESPOSTAS EM ACESSOS DE GLIRICÍDIA 14
Resumo 14
Abstract 14
4.1. Introdução 15
4.2. Material e Métodos 15
4.2.1. Material vegetal e condução dos experimentos 15
4.2.2. Condições de cultivo 16
4.2.3. Morfometria 16
4.2.4. Biomassa 16
4.2.5. Estimativa do conteúdo de clorofila 16
4.3. Resultados e Discussão 16
4.3.1. Morfometria 16
4.3.2. Biomassa 19
4.3.3. Quantificação Clorofila a e b nas folhas 21
4.4. Conclusões 22
4.5. Referências 22
5. ARTIGO 2: ACÚMULO DE PROLINA EM ACESSOS DE GLIRICÍDIA CULTIVADOS SOB ESTRESSE SALINO *IN VITRO* 26
Resumo 26
Abstract 26
5.1. Introdução 27
5.2. Material e Métodos 27
5.2.1. Material vegetal e condições de cultivo 27
5.2.2. Determinação do teor de prolina 28
5.2.3. Delineamento experimental e análises estatísticas 28
5.3. Resultados e Discussão 28
5.3.1. Quantificação de prolina nas folhas 28
5.3.2. Quantificação de prolina no caule 29
5.4. Conclusões 31
5.5 Referências 31

6. ARTIGO 3: MORFOFISIOLOGIA DE PLÂNTULAS DE *GLIRICIDIA SEPIUM* (JACQ.) KUNTH EX WALP SUBMETIDAS A ESTRESSE HÍDRICO *IN VITRO* 35
Resumo 35
Abstract 35
6.1. Introdução 36
6.2. Material e Métodos 36
6.2.1. Material vegetal e condições de cultivo 36
6.2.2. Análises histológicas 37
6.2.3. Análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV) 37
6.2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas 37
6.3. Resultados e Discussão 37
6.3.1. Análises de crescimento 37
6.3.2. Análises histológicas 39
6.3.3. Análises em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 41
6.4. Conclusões 45
6.5. Referências Bibliográficas 45

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura		Página
1	Comprimento total de microestacas de gliricídia sobre estresse salino *in vitro*. ■ Dores; • Vitrine.	17
2	Efeito do NaCl no desenvolvimento de microestacas *in vitro* de dois acessos de gliricídia. **A** – Acesso Dores **B** – Acesso Vitrine.....	18
3	Comprimento da raiz primária de microestacas de dois acessos de gliricídia sobre estresse salino *in vitro*. • Dores; ■ Vitrine.	19
4	Microestacas de gliricídia aos 45 dias de cultivo sob 250 mM de NaCl. **A** – Acesso Dores **B** – Acesso Vitrine	20
5	Massa seca do caule de microestacas de gliricídia do acesso Dores sob estresse salino *in vitro*.	21

ARTIGO 2

Figura		Página
1	Amostras de sobrenadante oriundas do caule de microestaca de gliricídia sob diferentes concentrações de NaCl, onde a intensidade do rosa é diretamente proporcional à concentração de prolina na amostra.	30
2	Teor de prolina no caule de microestacas de gliricídia cultivadas *in vitro* em função das concentrações de NaCl. • Dores; ▲ Vitrine.	31

ARTIGO 3

Figura		Página
1	Plântulas de gliricídia obtidas *in vitro* no cultivo sob diferentes concentrações de PEG 6000.	38
2	Porcentagem de germinação de sementes e formação de plântulas normais de gliricídia cultivadas *in vitro* aos 60 dias na presença de diferentes concentrações de PEG 6000.	38
3	Germinação de sementes e formação de plântulas normais *in vitro* em função das concentrações de PEG 6000.	39
4	Cortes transversais de folhas de gliricídia analisadas sob microscopia óptica, coradas com azul de toluidina. **A** – Controle (sem estresse); **B** – Sob estresse hídrico induzido por PEG 6000 (210 g L^{-1}).	40
5	Secções transversais de raízes de plântulas cultivadas *in vitro* de gliricídia, coradas com azul de toluidina. **A** – Controle; **B** – Sob estresse hídrico induzido por PEG 6000 (210 g L -1).	41
6	Folhas de gliricídia do tratamento controle em microscopia eletrônica de varredura (MEV). **A** – Predominância de estômatos abertos; **B** – Estômatos secretando potássio; **C** – Célula estomática aberta; **D** – Tricomas.	42

.....

7 Mapeamento elementar por EDS de potássio em células epidérmicas de *Gliricidia sepium*. **A** – Micrografia em MEV; **B** – Mapeamento evidenciando a distribuição de potássio (K) na área específica; **C** – Espectro EDS confirmando a presença majoritária do elemento K.
..... 43

8 Folhas de gliricídia dos tratamentos com maiores concentrações de PEG 6000 em microscopia eletrônica de varredura (MEV). **A** – Predominância de estômatos fechados e entreabertos; **B** – Célula estomática entreaberta; **C** – Célula estomática fechada; **D** – Tricomas.
..... 44

9 Raízes primárias de gliricídia do controle (A) e dos tratamentos com maiores concentrações de PEG 6000 (B) em microscopia eletrônica de varredura (MEV). 45

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela		Página
1	Médias do comprimento da raiz e comprimento da parte aérea de microestacas de acessos de gliricídia aos 45 dias de cultivo *in vitro* em concentrações crescentes de NaCl.	18
2	Médias da massa fresca e seca de folhas e raízes de microestacas de dois acessos de gliricídia.	19
3	Médias da quantificação de clorofila a e b em folhas de microestacas de dois acessos de gliricídia.	21

ARTIGO 2

Tabela		Página
1	Médias do teor de prolina em folhas de microestacas de dois acessos de gliricídia.	29

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CO2	Dióxido de Carbono
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
BAG	Banco Ativo de Germoplasma
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog
MF	Massa fresca
MS	Massa seca
PEG	Polietilenoglicol
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
WPM	Wood Plant Medium

RESUMO

ANDRADE, Rafaela da Mota. **Respostas *in vitro* a estresses abióticos em *Gliricidia sepium*.** São Cristóvão: UFS, 2025. 49p. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).*

O Brasil abriga a maior riqueza biológica do planeta, com uma flora altamente diversificada. A família Fabaceae ocupa a posição de terceira maior família botânica em número de espécies e possui uma expressiva diversidade taxonômica. Dentro dessa família, a *Gliricidia sepium* é uma leguminosa perene de grande interesse econômico devido à sua versatilidade, incluindo a fixação biológica de nitrogênio e adaptação a condições ambientais adversas. O estudo de genótipos sob estresses abióticos, como salinidade e déficit hídrico, é essencial, pois esses fatores impactam negativamente o desenvolvimento vegetal e podem desencadear respostas fisiológicas e bioquímicas. Este trabalho avaliou as respostas de dois acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Gliricidia sepium* da Embrapa Tabuleiros Costeiros ao estresse salino e hídrico em condições de cultivo *in vitro*. Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Tabuleiros Costeiros, utilizando meio de cultivo WPM (Wood Plant Medium) suplementado com diferentes concentrações de NaCl (0, 100, 150, 200 e 250 mM) para o estresse salino. Foram analisados parâmetros morfométricos, como biomassa (folhas, caule e raízes), teor de clorofila (a e b) e prolina. O aumento da salinidade reduziu significativamente o crescimento das plântulas, com diminuição no comprimento da raiz primária e da parte aérea. A massa fresca e seca das folhas e raízes também diminuiu progressivamente, enquanto a do caule aumentou em relação ao controle. Concentrações elevadas de NaCl inibiram o desenvolvimento foliar, impedindo a quantificação de clorofila e prolina nesses tratamentos. O acesso Vitrine apresentou maiores teores de clorofila a e b em comparação ao acesso Dores nas concentrações mais baixas. Quanto à prolina, o acesso Dores teve aumento significativo nas folhas em 100 mM, enquanto o Vitrine apresentou maior acúmulo na ausência de sal. No caule, a prolina foi mais elevada que nas folhas, aumentando com a salinidade em ambos os acessos. No ensaio de estresse hídrico, sementes foram cultivadas em meio WPM com polietilenoglicol - PEG 6000 (0, 70, 140 e 210 g/L). Observou-se redução linear na germinação e no desenvolvimento de plântulas normais conforme o aumento da concentração de PEG no meio. Alterações anatômicas foram detectadas nas células das folhas e raízes, indicando adaptações ao déficit hídrico. Conclui-se que o estresse salino e hídrico *in vitro* afetou significativamente o desenvolvimento da *Gliricidia sepium*, com respostas distintas entre os acessos. A prolina demonstrou ser um marcador bioquímico eficiente para avaliar a tolerância ao estresse nessa espécie. Esses resultados contribuem para a compreensão da adaptação da gliricídia a condições adversas, auxiliando em estratégias de manejo e melhoramento genético.

Palavras-chave: salinidade, estresse hídrico, prolina, clorofila, histologia.

---

* Comitê Orientador: Ana da Silva Ledo – Embrapa/UFS (Orientador), Evandro Neves Muniz – Embrapa (Coorientador).

ABSTRACT

ANDRADE, Rafaela da Mota. **In vitro responses to abiotic stresses in *Gliricidia sepium*.** São Cristóvão: UFS, 2025. 49p. (Dissertation - Master of Science in Agriculture and Biodiversity).*

Brazil is home to the greatest biological wealth on the planet, with a highly diverse flora. The Fabaceae family is the third largest botanical family in terms of species and boasts significant taxonomic diversity. Within this family, *Gliricidia sepium* is a perennial legume of great economic interest due to its versatility, including biological nitrogen fixation and adaptation to adverse environmental conditions. Studying genotypes under abiotic stresses, such as salinity and water deficit, is essential, given that these factors negatively impact plant development and can trigger physiological and biochemical responses. This study evaluated the responses of two accessions from the Active Germplasm Bank (AGB) of *Gliricidia sepium* at Embrapa Tabuleiros Costeiros to saline and water stress under *in vitro* culture conditions. The experiments were conducted at Embrapa Tabuleiros Costeiros, using WPM (Wood Plant Medium) culture medium supplemented with different concentrations of NaCl (0, 100, 150, 200 and 250 mM) for saline stress. Morphometric parameters such as biomass (leaves, stem and roots), chlorophyll (a and b) and proline content were analyzed. Increasing salinity significantly reduced seedling growth, with a decrease in primary root and shoot length. Fresh and dry matter of both leaves and roots also decreased progressively, while stem matter increased compared to the control. High NaCl concentrations inhibited leaf development, preventing the quantification of chlorophyll and proline levels in these treatments. The Vitrine accession had higher chlorophyll a and b contents compared to the Dores accession at lower concentrations. Regarding proline, the Dores accession showed a significant increase in leaves at 100 mM, while Vitrine showed greater accumulation in the absence of salt. Proline was higher in stems than in leaves, increasing with salinity in both accessions. In the water stress assay, seeds were grown in a WPM medium with Polyethylene glycol - PEG 6000 (0, 70, 140, and 210 g/L). A linear reduction in germination and development of normal seedlings was observed as the PEG concentration in the medium increased. Anatomical changes were detected in leaf and root cells, indicating adaptations to water deficit. We conclude that *in vitro* salt and water stress significantly affected the development of *Gliricidia sepium*, with distinct responses among accessions. Proline proved to be an effective biochemical marker for assessing stress tolerance in this species. These results contribute to understanding how *Gliricidia* adapts to adverse conditions, aiding management and genetic improvement strategies.

Key-words: salinity, water stress, proline, chlorophyll, histology.

---

* Guidance Committee: Ana da Silva Ledo – Embrapa/UFS (Advisor), Evandro Neves Muniz – Embrapa (Co-advisor).

1. INTRODUÇÃO GERAL

Ao longo do seu ciclo de vida, as plantas enfrentam diversas mudanças no ambiente, resultantes de fatores bióticos ou abióticos. Essas condições adversas exigem que as plantas demonstrem uma significativa capacidade de resiliência para garantir sua sobrevivência (Hilker; Schmülling, 2019).

Dentre as condições abióticas desfavoráveis enfrentadas pelas plantas no meio ambiente, destacam-se: secas, altas temperaturas, baixas temperaturas, carências nutricionais e excessos de sal ou de metais pesados no solo. Esses tipos de estresse abiótico restringem o uso global das terras aráveis e impactam de maneira negativa a produtividade das plantações (Bailey-Serres, 2019).

Um desafio inevitável que intensifica os estresses abióticos é a mudança climática, que coloca em risco a segurança alimentar em escala mundial por reduzir a produtividade das espécies em aproximadamente 70% (Raza *et al*., 2019). Tais alterações climáticas tendem a intensificar os estresses abióticos tanto isoladamente quanto em combinação, principalmente a seca e a salinidade, por exemplo (Anwar *et al*., 2022).

A salinidade é um importante fator de estresse abiótico que compromete o crescimento e a produtividade das plantas, dificultando a extração de água do solo e provocando o acúmulo tóxico de íons (Cirillo *et al*., 2019). Trata-se de um problema global que impacta 33% das terras irrigadas, 20% das áreas cultivadas e 7% de outras regiões terrestres no planeta (Zaman *et al*., 2018).

Pesquisas indicam que as plantas conseguem lidar relativamente bem com períodos curtos de seca leve. Porém, são significativamente afetadas por condições de seca intensa e prolongada (Khan; Singh, 2021). Ao longo da última década, as secas ocasionaram cerca de US$ 30 bilhões em perdas agrícolas ao redor do mundo (Gupta *et al*., 2020).

A resposta das plantas a esses estresses está associada à ativação de diversos genes (Sham *et al*., 2015). Os mecanismos de adaptação incluem o reparo de danos causados pelos estresses, o restabelecimento da homeostase celular e o ajuste do crescimento a níveis apropriados para enfrentar as condições específicas de estresse (Zhang *et al*., 2020).

No contexto de ambientes adversos, a *Gliricidia sepium*, uma espécie leguminosa, tem demonstrado sucesso considerável, sendo reconhecida por sua tolerância a condições de salinidade e déficit hídrico, especialmente quando seu sistema radicular apresenta bom desenvolvimento (Rahman *et al*., 2019).

A Embrapa Tabuleiros Costeiros vem trabalhando com gliricídia desde 1985. Atualmente, sua coleção de trabalho reúne diversidade genética, composta por 14 acessos coletados em cinco estados brasileiros — Sergipe, Pernambuco, Rondônia, Paraíba e Rio de Janeiro — além de materiais provenientes de três introduções internacionais. O Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Gliricídia foi oficialmente aprovado em dezembro de 2023 pela Rede de Recursos Genéticos da Embrapa (Carvalho *et al*., 2024).

Por meio das técnicas de biotecnologia vegetal, como a cultura de tecidos, torna-se viável analisar o crescimento e a multiplicação de células, tecidos e órgãos vegetais utilizando meios nutritivos artificiais em um ambiente controlado. Essa abordagem oferece diversas vantagens, como a possibilidade de propagar vegetais ao longo de todo o ano, evitando interferências causadas por mudanças climáticas ou condições desfavoráveis do solo. Além disso, facilita a seleção de genótipos específicos com características desejáveis que atendam a demandas particulares, diretamente a partir da cultura *in vitro* (Mahanta; Gantait, 2024).

Novos estudos *in vitro* são necessários para compreender o comportamento das plantas diante de estresses, visando o desenvolvimento de variedades com características específicas. Com base nessa necessidade, o presente estudo teve como objetivo avaliar as respostas de dois acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da *Gliricidia sepium* da Embrapa em relação aos estresses hídrico e salino em condições de cultivo *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Família Fabaceae: Diversidade que sustenta a vida

A família Fabaceae é a terceira maior família botânica em número de espécies, destacando-se por sua ampla diversidade taxonômica. São cerca de 19.400 espécies distribuídas em 730 gêneros, organizados nas subfamílias Papilionoideae (Faboideae), Caesalpinioideae e Mimosoideae (Lima *et al*., 2018).

As plantas desse grupo são altamente conhecidas devido à sua relevância nos âmbitos econômico, ornamental e alimentício (Moura *et al*., 2015; Sutjaritjai *et al*., 2019). Essas espécies são empregadas no uso sustentável da biodiversidade, contribuindo para a fixação biológica de nitrogênio, o que reduz a dependência de insumos químicos externos. Além disso, são essenciais para ampliar a segurança alimentar, favorecer a saúde humana e apoiar práticas agrícolas sustentáveis (Vasconcelos *et al*., 2020).

Espécies da família Fabaceae estão presentes de forma natural ou cultivada em quase todas as partes do mundo, com exceção das regiões polares (Messina, 1999; Sharma *et al*., 2017). Essas plantas se adaptam a diferentes hábitos e ocupam uma vasta diversidade de biomas, incluindo pastagens, florestas tropicais e temperadas (Schrire *et al*., 2003).

Esta família destaca-se como uma importante fonte de fitoquímicos, como flavonoides, lectinas, saponinas, alcaloides, carotenoides e ácidos fenólicos (Sebastian *et al*., 2020).

Atualmente, as pesquisas com leguminosas se concentram em acelerar os avanços genéticos relacionados à produtividade, à qualidade nutricional e à resistência ou tolerância a fatores de estresse (Baloglu *et al*., 2022).

2.2 *Gliricidia sepium*

2.2.1 Origem, distribuição e descrição botânica

Dentre as espécies que compõem a família Fabaceae, destaca-se a *Gliricidia sepium*, uma cultura introduzida no Brasil na década de 1970. Inicialmente, seu uso era voltado para o sombreamento das plantações de cacau no litoral da Bahia. Apenas na década de 1980 começou a ser empregada como alternativa para a alimentação animal na região do semiárido nordestino, mostrando-se bem adaptada às condições edafoclimáticas dessa região (Andrade *et al*., 2015).

A gliricídia, espécie de ciclo perene, é originária da América Central e do norte da América do Sul (Gómez *et al*., 2002). No Brasil, é amplamente conhecida pelo nome de gliricídia, enquanto no México e outros países da América Central é chamada de madre de cacao, madero negro, mata ratón, entre outras denominações. Trata-se de uma árvore leguminosa de crescimento rápido cuja versatilidade e múltiplos usos têm despertado interesse comercial e econômico em regiões tropicais (Kill e Drumond, 2001).

Essa espécie é adaptada a ambientes com precipitação anual entre 600 e 3500 mm, devido às suas raízes extensas e profundas. Apresenta baixa exigência quanto ao tipo de solo e se desenvolve bem tanto em temperaturas mais baixas (14 a 21 °C) quanto em mais altas (34 a 41 °C). Por essas características, é amplamente considerada uma planta adaptada ao clima semiárido (Baggio; Heuveldop, 1982).

É uma árvore leguminosa de crescimento rápido, capaz de rebrotar com facilidade, o que permite podas regulares. Essa espécie é reconhecida por sua versatilidade em diversas aplicações, como adubação verde, alimentação animal, reflorestamento e formação de cercas vivas (Carvalho Filho *et al*., 1997).

Esta árvore apresenta excelente adaptação à ecorregião dos Tabuleiros Costeiros, sendo uma opção eficaz como cultura complementar para recuperação e aproveitamento de áreas degradadas (Barreto *et al*., 2004). A Figura 1 mostra a ampla distribuição dessa espécie no Brasil.

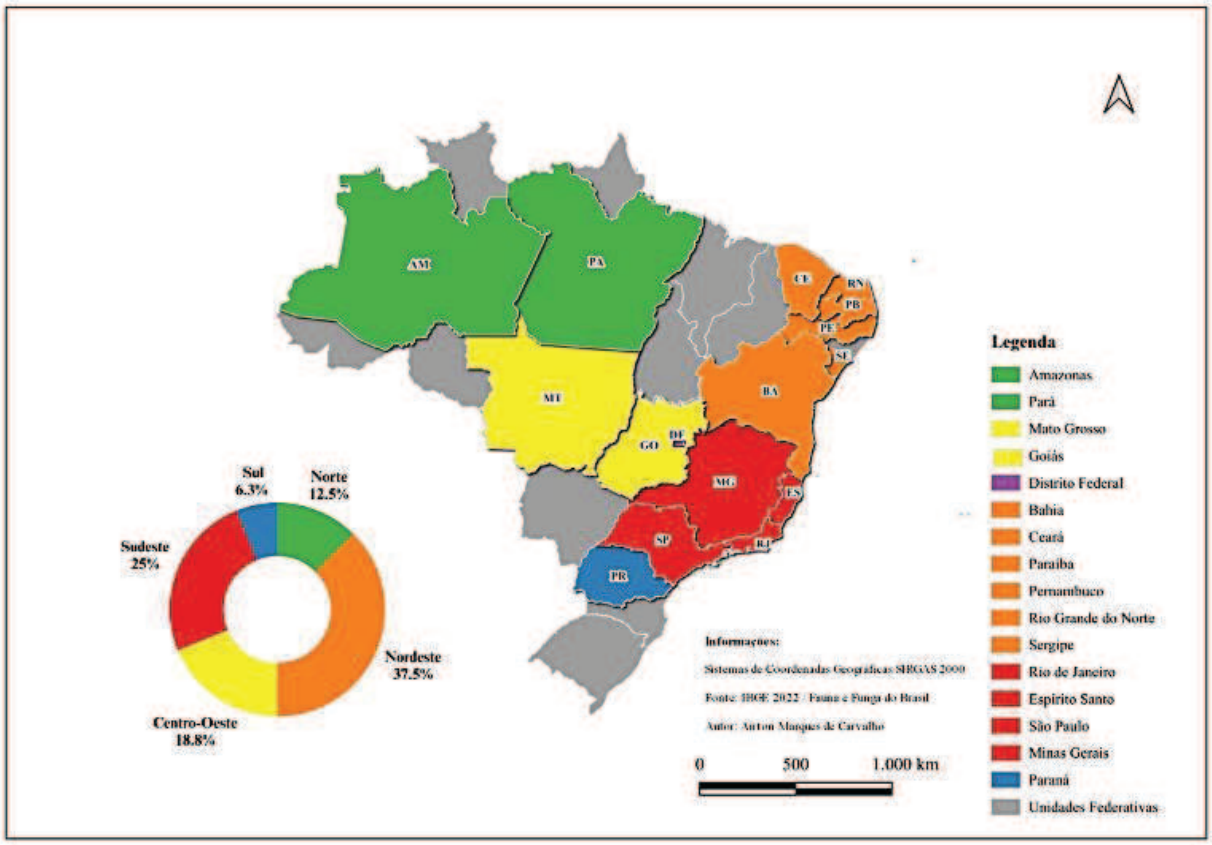


Figura 1. Mapa da distribuição geográfica da *Gliricidia sepium* no Brasil, onde a presença da espécie é indicada pelos estados em colorido. Fonte: Queiroz (2024).

No estado de Sergipe, a espécie está presente nos municípios de Frei Paulo, Itaporanga, Nossa Senhora das Dores, Nossa Senhora da Glória, Pacatuba, Riachão do Dantas, Salgado, Simão Dias, Tobias Barreto e Umbaúba, conforme a Figura 2 (Santos *et al*., 2014).

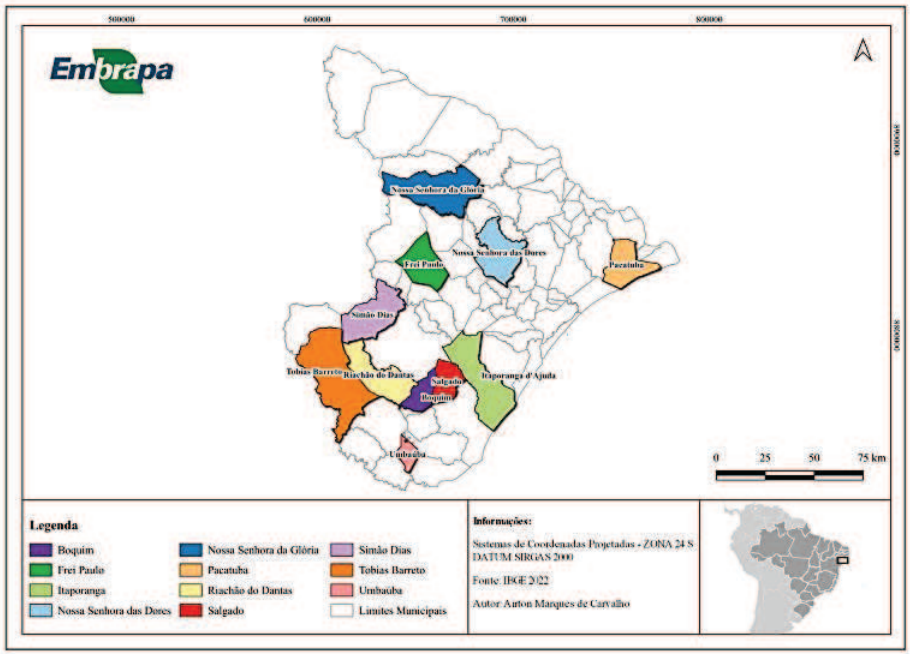


Figura 2. Municípios do estado de Sergipe, onde houve registro da ocorrência da espécie *G. sepium*. Fonte: Embrapa

2.2.2 Importância da cultura

A gliricídia apresenta múltiplas funcionalidades de relevância agroecológica, podendo ser empregada tanto para a melhoria da fertilidade do solo quanto como fonte suplementar de proteína na dieta animal em sistemas de consórcio com gramíneas ou outras culturas. Sua utilização tem sido particularmente expressiva em regiões tropicais, integrando sistemas agroflorestais (Rangel; Muniz, 2010; Alamu *et al*., 2023).

Dentre os benefícios proporcionados, destacam-se a capacidade de promover a ciclagem de nutrientes, o incremento do teor de matéria orgânica no solo e sua robusta adaptabilidade à seca, atribuída ao seu sistema radicular bem desenvolvido. Ademais, a leguminosa contribui significativamente para a fixação biológica de nitrogênio (Kaba *et al*., 2019), elevando os níveis de nutrientes no solo. Esta característica é especialmente útil em processos de recuperação de áreas degradadas e no controle da erosão, quando combinada com melhorias nas condições químicas, físicas e biológicas do solo (Andrade *et al*., 2015).

Além de suas aplicações agroambientais, essa espécie apresenta propriedades medicinais importantes. As folhas podem ser utilizadas no tratamento de enfermidades dermatológicas, como úlceras, tumores, icterícia e reações alérgicas. Ademais, os ramos terminais mais jovens possuem valor terapêutico e podem ser preparados na forma de supositórios com ação antitérmica (Drumond; Carvalho Filho, 2005).

Conforme estudado por Wartenberg *et al*. (2017), as árvores e folhas de *G. sepium*, quando utilizadas de diversas maneiras, têm sido empregadas para melhorar a fertilidade do solo. Essa melhoria é evidenciada por indicadores como o carbono total, nitrogênio, fósforo disponível, pH, capacidade de troca catiônica, saturação de bases, agregação do solo, densidade aparente e composição de ácidos graxos fosfolipídicos (PLFA).

Apesar dessas árvores leguminosas de rápido crescimento possuírem a capacidade de aumentar a acidez do solo e diminuir a diversidade da macrofauna, os impactos negativos são menos significativos quando comparados aos benefícios ambientais (Moura *et al*., 2015).

Plantas agroflorestais contribuem para a melhoria das propriedades físicas do solo ao incorporar grandes volumes de serapilheira, biomassa e atividade radicular, além de promoverem intensa atividade biológica, formando macroporos no solo, favorecendo sua estrutura (Akinnifesi *et al*., 2010).

No contexto brasileiro, o uso do esterco de gliricídia aumenta a produtividade de grãos de milho e eleva o teor de matéria orgânica no solo. Esse manejo também melhora as propriedades químicas do solo, incluindo o pH, a disponibilidade de fósforo, os níveis de potássio trocável, cálcio e magnésio, bem como a capacidade de troca catiônica e a saturação por bases na camada superficial do solo (Feitosa *et al*., 2022).

2.3 Estresses abióticos em plantas

O estresse abiótico é definido como o efeito prejudicial provocado por fatores abióticos em plantas submetidas a um dado ambiente. Esse impacto mobiliza uma ampla gama de respostas fisiológicas e bioquímicas que podem abarcar desde alterações na expressão gênica e no metabolismo celular até modificações nos processos de crescimento e desenvolvimento da planta (Zhang *et al*., 2023). Tal estresse induz alterações e respostas em níveis funcionais distintos, que inicialmente são passíveis de reversão, mas podem se consolidar como mudanças permanentes ao longo do tempo. Entre os principais fatores que provocam este tipo de estresse, destacam-se a deficiência de oxigênio, variações de temperatura, salinidade, congelamento e disponibilidade restrita de água, elementos que limitam o crescimento vegetal e, consequentemente, exercem impacto direto sobre a produtividade agrícola (Carvalho *et al*., 1997).

Entre os estressores abióticos mais significativos encontram-se eventos como seca, salinidade do solo, variações extremas de temperatura (calor ou frio) e outros fenômenos ambientais que constituem os principais limitantes da produção agrícola mundial, restringindo tanto a quantidade quanto a qualidade dos produtos agrícolas (Bashir *et al*., 2019).

Os estresses abióticos frequentemente se manifestam de maneira multifatorial, envolvendo interações entre distintas condições adversas (seca, enchentes, salinidade, frio e temperaturas elevadas). Esses fatores interrelacionados são atualmente considerados os maiores responsáveis por perdas substanciais na produtividade agrícola global anualmente (Ozturk Gokce *et al*., 2020).

2.3.1 Estresse salino

A salinização dos solos é um problema crítico para a agricultura, especialmente em regiões onde a irrigação se baseia no uso de águas subterrâneas, que frequentemente apresentam concentrações elevadas de sais dissolvidos. Geralmente, a origem dos solos salinizados está ligada ao manejo inadequado das práticas agrícolas. A salinidade é um fator importante que limita o crescimento das plantas e a absorção de nutrientes, principalmente em áreas com escassez de água (Dasgan *et al*., 2002; Castro; Santos, 2020).

Os efeitos adversos da salinidade nas plantas incluem alterações no potencial osmótico, presença de íons tóxicos e desequilíbrio na absorção de nutrientes. Essas mudanças resultam na inibição do crescimento vegetal e causam prejuízos consideráveis à agricultura (Távora *et al*., 2001).

O estresse salino primário, caracterizado pelo estresse osmótico e toxicidade iônica, desencadeia efeitos secundários como a redução na produção de assimilados, na expansão celular, na função da membrana e no metabolismo citosólico. Esses processos afetam significativamente o desenvolvimento e a saúde das plantas (Fahad *et al*., 2017).

2.3.2 Estresse hídrico

A deficiência hídrica ocorre quando o nível de água em um tecido ou célula fica abaixo do valor máximo registrado no estado de maior hidratação. Esse tipo de estresse é um dos principais responsáveis por danos e alterações nos processos fisiológicos e metabólicos das plantas, culminando em drásticas reduções na produtividade (Farook *et al*., 2009; Taiz; Zeiger, 2013). O déficit hídrico geralmente provoca o fechamento dos estômatos, como forma principal de evitar a cavitação e um possível colapso hidráulico catastrófico, o que tende a causar uma queda significativa na troca gasosa (Johnson *et al*., 2022).

A severidade do estresse hídrico está intrinsecamente dependente de fatores como a ocorrência e distribuição das precipitações, as demandas evaporativas e a capacidade dos solos de reter umidade, os quais apresentam alto grau de imprevisibilidade (Hazel, 1995).

A crescente gravidade do estresse hídrico causado pela seca tem se intensificado em virtude da redução na disponibilidade de água e do aumento na sua demanda global. Atualmente, o setor agrícola consome aproximadamente 70% da água doce utilizada mundialmente, e as projeções indicam uma elevação considerável nessa porcentagem nos próximos anos (Boretti; Rosa, 2019).

O impacto da seca apresenta consequências para a simbiose natural das leguminosas, resultando no retardamento do desenvolvimento dessas plantas e, em última instância, na redução do rendimento agrícola (Anjum *et al*., 2017).

Para simular o estresse hídrico *in vitro*, empregam-se diversos agentes osmóticos, tais como sacarose, manitol, sorbitol e polietilenoglicol (PEG). Entre esses compostos, o PEG destaca-se amplamente por sua aplicabilidade na restrição hídrica *in vitro*, devido à sua natureza atóxica e à incapacidade de penetração nas células, atributo derivado de seu elevado peso molecular. Por outro lado, cabe ressaltar que sua utilização pode ocasionar um atraso no processo de germinação das sementes (Villela *et al*., 1991).

2.3.3 Efeitos dos estresses abióticos nas plantas

A análise das características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares que se manifestam nas respostas das plantas a diferentes tipos de estresses é essencial para o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes. Tal conhecimento tem sido amplamente

empregado tanto em programas de melhoramento genético convencional quanto na aplicação de técnicas de engenharia genética para a obtenção de plantas mais resilientes (Bhatnagar-Mathur *et al*., 2008).

Entre os impactos mais significativos causados pelo excesso de sal no ambiente celular destaca-se o desequilíbrio iônico, uma alteração crítica ao metabolismo normal da célula vegetal (Yuan *et al.,* 2019). Adicionalmente, o estresse osmótico desencadeado pelo acúmulo de sais promove a geração de diversos sinais lipídicos, como esfingolipídios e ácido fosfatídico, que atuam nos mecanismos de sinalização e resposta celular (Hou *et al*., 2016).

Ambos os estresses – hídrico e salino – contribuem para a indução de uma condição osmótica adversa, que requer a regulação de uma variedade de metabólitos, sejam eles inorgânicos ou orgânicos. Contudo, tais situações são frequentemente associadas a danos nas plantas. Esses danos incluem a toxicidade provocada pelos sais, o aumento descontrolado de espécies reativas de oxigênio (ROS), a ruptura da membrana plasmática e alterações estruturais na parede celular, comprometendo gravemente a integridade e o funcionamento do organismo vegetal (Praveen *et al*., 2023).

Estresses como frio, seca e alta concentração de sal compartilham características semelhantes em relação aos seus impactos nas plantas e às estratégias de percepção desses estímulos pelas mesmas. Frequentemente, geram estresse osmótico nas células vegetais (Zhang *et al*., 2022). Além disso, provocam de maneira veloz um incremento temporário nos níveis de Ca^{2+} intracelular, o qual é visto como um mensageiro secundário universal nas sinalizações de estresse primário, devido às suas características que o tornam apropriado como uma molécula de sinalização multifuncional (Dong *et al*., 2022).

As plantas possuem a habilidade de utilizar Na^{+} e Cl^{-} de maneira eficiente, armazenando-os em vesículas ou empregando-os como solutos orgânicos *in vivo* para manter a osmorregulação e minimizar os danos causados por toxicidade iônica. Contudo, em condições de alta salinidade, as células exigem modificações na estrutura da parede ou o emprego de rotas eficazes para o transporte de água e sal, permitindo uma osmorregulação mais otimizada energeticamente (Zhang *et al*., 2022).

O início do estresse salino desencadeia sinais osmóticos que tornam as plantas mais tolerantes à alta salinidade e à seca. Isso resulta, por exemplo, na redução da abertura dos estômatos, contribuindo para a menor perda de água e auxiliando na adaptação ao ambiente adverso (Lizana *et al*., 2006).

Durante períodos de estresse hídrico ou salino, os níveis elevados de prolina agem como marcadores bioquímicos que indicam a capacidade adaptativa das plantas frente a estas condições (De Ronde *et al*., 2000).

De maneira geral, as plantas contam com cinco mecanismos de defesa contra estresses abióticos: a presença de cutícula, o uso de ácidos graxos insaturados, a regulação de espécies reativas oxidativas, o funcionamento de chaperonas moleculares e a atuação de solutos compatíveis. Esses fatores colaboram com a sobrevivência das plantas em ambientes hostis e representam características economicamente relevantes (Slama *et al*., 2015).

2.4 Biotecnologia vegetal

A cultura de tecidos vegetais, em âmbito global, tem adquirido crescente relevância, impulsionada pelos avanços no campo científico e tecnológico. Trata-se de uma ferramenta biotecnológica, cujo progresso está intrinsecamente ligado à sua natureza multidisciplinar (Krishnan *et al*., 2019). Essa abordagem tem se mostrado particularmente eficaz na investigação da tolerância das plantas a condições adversas do ambiente, dado que esses fatores podem ser rigorosamente controlados em condições *in vitro* (Altman, 2014).

A aplicabilidade dessa técnica se destaca especialmente no desenvolvimento de plantas capazes de resistir melhor a estresses abióticos, como a salinidade e a deficiência hídrica. Essa abordagem requer menos espaço físico e proporciona resultados em um período relativamente curto (Barroso *et al*., 2003; Malajovich, 2016).

Um número significativo de pesquisas tem sido conduzido com o objetivo de avaliar os impactos dos estresses hídrico e salino em culturas de interesse sob condições *in vitro*. Echer *et al*. (2010) investigaram os efeitos do déficit hídrico induzido por manitol sobre o crescimento inicial de plântulas de algodão. Ledo *et al*. (2013) analisaram como o manitol influenciou a desaceleração do crescimento de plântulas de jenipapeiro do acesso NB. Cha-Um *et al*. (2013) examinaram as respostas fisiológicas e as características de crescimento da *Echinopsis calochlora* sob estresse salino em ambiente *in vitro*. Da mesma forma, Claeys *et al*. (2014) observaram que mesmo níveis baixos de estresse salino podem resultar em uma significativa redução no crescimento radicular da *Arabidopsis thaliana* em tais condições.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINNIFESI, F. K.; AJAYI, O. C.; SILESHI, G.; CHIRWA, P. W.; CHIANU, J. Fertiliser trees for sustainable food security in the maize-based production systems of East and Southern Africa. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 30, p. 615-629, 2010.

ALAMU, E. O.; ADESOKAN, M.; FAWOLE, S.; MAZIVA-DIXON, B.; MEHRETEAB, T.; CHIKOYE, D. *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp applications for enhancing soil fertility and crop nutritional qualities: A review. **Forests**, v. 14, n. 3, p. 635, 2023.

ALTMAN, A. Plant tissue culture and biotechnology: perspectives in the history of IAPTC/IAPTC&B/IAPB. IAPB, 2014. Disponível em: http://www.iapb.org/about/History. Acesso em: 10 jun. 2025.

ANDRADE, B. M. S.; SOUZA, S. F.; SANTOS, C. M. C.; MEDEIROS, S. S.; MOTA, P. S. S.; CURADO, S. S. Uso da gliricídia (*Gliricidia sepium*) para alimentação animal em Sistemas Agropecuários Sustentáveis. **Scientia Plena**, v. 11, n. 4, 2015.

ANJUM, S. A.; ASHRAF, U.; ZOHAIB, A.; TANVEER, M.; NAEEM, M.; ALI, I.; TABASSUM, T.; NAZIR, U. Growth and development responses of crop plants under drought stress: a review. **Zemdirbyste**, v. 104, p. 267-276, 2017. DOI: 10.13080/z-a.2017.104.034.

ANWAR, A.; SINHA, A.; SHARIF, A.; SIDDIQUE, M.; IRSHAD, S.; ANWAR, W.; MALIK, S. The nexus between urbanization, renewable energy consumption, financial development, and CO2 emissions: Evidence from selected Asian countries. **Environment, Development and Sustainability**, v. 24, p. 6556-6576, 2022. DOI: 10.1007/s10668-021-01716-2.

BAGGIO, A. J.; HEUVELDOP, J. Implantação, manejo e utilização do sistema agroflorestal cercas vivas de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud. na Costa Rica. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 5, p. 19-52, 1982.

BAILEY-SERRES, J.; PARKER, J. E.; AINSWORTH, E. A.; OLDROYD, G. E. D.; SCHROEDER, J. I. Genetic strategies for improving crop yields. **Nature**, v. 575, p. 109-118, 2019.

BALOGLU, M. C.; CELIK ALTUNOGLU, Y.; BALOGLU, P.; YILDIZ, A. B.; TÜRKÖLMEZ, N.; ÖZDEN ÇIFTÇI, Y. Gene-editing technologies and applications in legumes: Progress, evolution, and future prospects. **Frontiers in Genetics**, v. 13, p. 859437, 2022.

BARRETO, A. C.; FERNANDES, M. F.; CARVALHO FILHO, O. M. **Cultivo de Alamedas de Gliricídia (*Gliricidia sepium*) em solos de tabuleiros costeiros**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2004.

BARROSO, P.; MOURA, G.; BRITO, L.; MARTINS, C.; MACEDO, C.; LOPES, D.; ALLOUFA, M. Efeito do cultivo in vitro na presença de NaCl em plantas de abacaxizeiro na fase de aclimatação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 7, n. 3, p. 473-477, 2003.

BASHIR, K.; MATSUI, A.; RASHEED, S.; SEKI, M. Recent advances in the characterization of plant transcriptomes in response to drought, salinity, heat, and cold stress. **Research**, v. 8, p. 658, 2019.

BHATNAGAR-MATHUR, P.; VADEZ, V.; SHARMA, K. K. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 411-424, 2008.

BORETTI, A.; ROSA, L. Reassessing the projections of the World Water Development Report. **NPJ Clean Water**, v. 2, p. 15, 2019.

CARVALHO, A. M. de; SOUZA, J. L.; SOUZA, S. F. de; RANGEL, J. H. de A.; MUNIZ, E. N.; SILVA, A. V. C. da. *Banco Ativo de Germoplasma de gliricídia em Sergipe: origem, implementação e manutenção*. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2024. 16 p. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1961; 252).

CARVALHO FILHO, O. M.; DRUMOND, M. A.; LANGUIDEY, P. H. ***Gliricidia sepium* leguminosa promissora para regiões semiáridas**. Petrolina: Embrapa/CPATSA, 1997.

CASTRO, F. C.; SANTOS, A. M. Salinidade do solo e risco de desertificação na região semiárida. **Mercador**, v. 19, p. e19002, 2020.

CHA-UM, S.; SAMPHUMPHUANG, T.; KIRDMANEE, C. Morphological and physiobiochemical changes of in vitro cactus (*Echinopsis calochlora*) in responses to salt stress. **European Journal of Horticultural Science**, v. 78, n. 5, p. 225-231, 2013.

CIRILLO, C.; DE MICCO, V.; ARENA, C.; CARILLO, P.; PANNICO, A.; DE PASCALE, S.; ROUPHAEL, Y. Biochemical, physiological and anatomical mechanisms of adaptation of *Callistemon citrinus* and *Viburnum lucidum* to NaCl and $CaCl_2$ salinization. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 742, 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.00742.

CLAEYS, H.; VAN LANDEGHEM, S.; DUBOIS, M.; MALEUX, K.; INZÉ, D. What is stress? Dose-response effects in commonly used in vitro stress assays. **Plant Physiology**, v. 165, n. 2, p. 519-527, 2014.

DASGAN, H. Y.; AKTAS, H.; ABAK, K.; CAKMAK, I. Determination of screening techniques to salinity tolerance in tomatoes and investigation of genotypes responses. **Plant Science**, v. 163, p. 695-703, 2002.

DE RONDE, J. A.; SPREETH, M. H.; CRESS, W. A. Effect of antisense L-Δ1-pyrroline 5-carboxylate reductase transgenic soybean plants subjected to osmotic and drought stress. **Plant Growth Regulation**, v. 32, p. 13-26, 2000.

DONG, Q.; WALLRAD, L.; ALMUTAIRI, B. O.; KUDLA, J. Ca2+ signaling in plant responses to abiotic stresses. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 64, p. 287-300, 2022.

DRUMOND, M. A.; CARVALHO FILHO, O. M. Gliricídia. *In*: KIILL, L. H. P.; MENEZES, E. A. (Ed.). **Espécies vegetais exóticas com potencialidades para o Semiárido brasileiro**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. cap. 10, p. 301-317.

ECHER, F. R.; CUSTÓDIO, C. C.; HOSSOMI, S. T.; DOMINATO, J. C.; MACHADO NETO, N. B. Water stress induced by mannitol in cotton cultivars. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 4, p. 638-645, 2010.

FAHAD, S.; BAJWA, A. A.; NAZIR, U.; ANJUM, S. A.; FAROOQ, A.; ZOHAIB, A. et al. Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1147, 2017.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S. M. A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 29, p. 185-212, 2009.

FEITOSA, A. L. P. M.; SIQUEIRA, G. M.; MOURA, E. G.; SILVA, A. J. C.; AGUIAR, A. C. F. Effect of different soil fertilization regimes on soil chemical properties and maize grains yield in humid tropic. **Research, Society and Development**, v. 11, p. e4511527635, 2022.

GÓMEZ, M. E.; RODRIGUEZ, L.; MURGUEITIO, E.; RIOS, C. L. I.; MÉNDEZ, M.; MOLINA, C. H. et al. **Árboles y arbustos forrajeros utilizados en alimentación animal como fuente proteica**. 3. ed. Cali: CIPAV, 2002. p. 1-147.

GUPTA, A.; RICO-MEDINA, A.; CAÑO-DELGADO, A. I. The physiology of plant responses to drought. **Science**, v. 368, p. 266-269, 2020.

HAZEL, J. R. Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation? **Annual Review of Physiology**, v. 57, p. 19-42, 1995.

HILKER, M.; SCHMÜLLING, T. Stress priming, memory, and signalling in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 42, p. 753-761, 2019.

HOU, Q.; UFER, G.; BARTELS, D. Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 39, p. 1029-1048, 2016.

JOHNSON, D. M.; KATUL, G.; DOMEC, J. C. Catastrophic hydraulic failure and tipping points in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 45, n. 8, p. 2231-2266, 2022.

KABA, J. S.; ZERBE, S.; AGNOLUCCI, M.; SCANDELLARI, F.; ABUNYEWA, A. A.; GIOVANNETTI, M.; TAGLIAVINI, M. Atmospheric nitrogen fixation by gliricidia trees (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp.) intercropped with cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Plant and Soil**, v. 435, p. 323-336, 2019.

KHAN, A.; SINGH, A. V. Multifarious effect of ACC deaminase and EPS producing *Pseudomonas* sp. and Serratia marcescens to augment drought stress tolerance and nutrient status of wheat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1-17, 2021.

KILL, L. H. P.; DRUMOND, M. A. Biologia floral e sistema reprodutivo de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud. (Fabaceae-Papilionoidae) na região de Petrolina, Pernambuco. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 597-601, 2001.

KRISHNAN, M. L.; ROY, A.; BHARADVAJA, N. Elicitation effect on the production of asiaticoside and asiatic acid in shoot, callus, and cell suspension culture of *Centella*

asiatica. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 9, p. 67-74, 2019. DOI: 10.7324/JAPS.2019.90609.

LEDO, A. S.; ALMEIDA, C. S.; ARAÚJO, A. G.; SILVA, A. V. C.; SILVA JUNIOR, J. F. S. Efeito do manitol no crescimento in vitro de acesso de jenipapeiro dos Cerrados para fins de conservação. **Magistra**, v. 25, p. 298-299, 2013.

LIMA, N. M.; SANTOS, N. C.; LA PORTA, A. Quimiodiversidade, bioatividade e quimiossistemática do gênero Inga (Fabaceae): uma breve revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 10, p. 459-473, 2018.

LIZANA, C.; WENTWORTH, M.; MARTINEZ, J. P.; VILLEGAS, D.; MENESES, R.; MURCHIE, E. H. et al. Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress: I. Effects of drought on yield and photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 685-697, 2006.

MAHANTA, M.; GANTAIT, S. Trends in plant tissue culture and genetic improvement of gerbera. **Horticultural Plant Journal**, 2024. DOI: 10.1016/j.hpj.2024.03.003.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia**: ensino e divulgação. 2. ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2016. ISBN: 978-85-921077-0-3.

MESSINA, M. J. Legumes and soybeans: Overview of their nutritional profiles and health effects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 439s-450s, 1999.

MOURA, E. G.; AGUIAR, A. C. F.; PIEDADE, A. R.; ROUSSEAU, G. X. Contribution of legume tree residues and macrofauna to the improvement of abiotic soil properties in the eastern Amazon. **Applied Soil Ecology**, v. 86, p. 91-99, 2015.

MOURA, O. N.; PASSOS, M. A. A.; FERREIRA, R. L. C.; MOLICA, S. G.; LIRA JUNIOR, M. D. A.; LIRA, M. D. A.; SANTOS, M. V. F. D. Distribuição da biomassa e nutrientes na área de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. **Revista Árvore**, v. 30, n. 6, p. 877-884, 2006.

OZTURK GOKCE, N. Z.; AKBAS, S.; AYTEN, S.; AZIMI, H.; DAS, R.; GUVEN, S. B.; UZUN, E. K.; YERLIKAYA, S.; UZER, Z.; YERLIKAYA, B. A.; BAKHSH, A. Abiotic stress tolerance in field crops: integration of Omics approaches. *In*: HASANUZZAMAN, M. (Ed.). **Agronomic Crops**. Springer, 2020. p. 503-526.

PRAVEEN, A.; DUBEY, S.; SINGH, S.; SHARMA, V.K. Abiotic stress tolerance in plants: A fascinating action of defense mechanisms. **Biotech**, v. 13, p. 102, 2023.

QUEIROZ, R. T. **Gliricidia**. *In*: Flora e Fauna do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB120375. Acesso em: 12 jul. 2025.

RAHMAN, M. A.; DAS, A. K.; SAHA, S. R.; UDDIN, M. M.; RAHMAN, M. M. Morphophysiological response of *Gliricidia sepium* to seawater-induced salt stress. **The Agriculturists**, v. 17, n. 1-2, p. 66-75, 2019.

RANGEL, J. H. de A.; MUNIZ, E. N.; SA, J. L. de; SA, C. O. de. **Implantação e manejo de sistema integração Lavoura/Pecuária/Floresta com *Gliricidia sepium***. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2010. (Circular Técnica).

RAZA, A.; RAZZAQ, A.; MEHMOOD, S. S.; ZOU, X.; ZHANG, X.; LV, Y.; XU, J. Impact of climate change on crops adaptation and strategies to tackle its outcome: **A review. Plants**, v. 8, p. 34, 2019.

SANTOS, C. M. C.; SOUZA, S. F. de; ANDRADE, B. M. S. Impacto da Gliricidia Sepium na Caracterização Química do Solo em Sistemas Agroflorestais no Estado de Sergipe. In: **IV Seminário de Iniciação Científica e Pós-Graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros** da Embrapa Tabuleiros Costeiros. 2014, Aracaju. Anais... Brasília, DF: Embrapa, 2014.

SCHRIRE, B. D.; LAVIN, M.; LEWIS, G. P. Global distribution patterns of the Leguminosae: insights from recent phylogenies. *In*: Plant Diversity and Complex Patterns in Local and Global Dimensions. **Proceedings...** International Symposium held at the Royal Danish Academy of Sciences and Letters, Copenhagen, Denmark, 25–28 May 2003.

SHAM, A.; MOUSTAFA, K.; AL-AMERI, S.; AL-AZZAWI, A.; IRATNI, R.; ABUQAMAR, S. Identification of *Arabidopsis* candidate genes in response to biotic and abiotic stresses using comparative microarrays. **PLoS ONE**, v. 10, p. e0125666, 2015.

SHARMA, A.; KAUR, R.; KATNORIA, J. K.; KAUR, R.; NAGPAL, A. K. Family Fabaceae: A boon for cancer therapy. *In*: MALIK, S. (Ed.). **Biotechnology and Production of Anti-Cancer Compounds**. Cham: Springer, 2017. p. 157–175.

SUTJARITJAI, N.; WANGPAKAPATTANAWONG, P.; BALSLEV, H.; INTA, A. Traditional uses of Leguminosae among the Karen in Thailand. **Plants**, v. 8, n. 12, p. 600, 2019.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre:Artemed, 2013. 954p.

TÁVORA, F. J. A. F.; FERREIRA, R. G.; HERNANDEZ, F. F. F. Crescimento e relações hídricas em plantas de goiabeira submetidas a estresse salino com NaCl. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 441-446, 2001.

VASCONCELOS, M.; GRUSAK, M.; PINTO, E.; GOMES, A.; FERREIRA, H.; BALAZS, B.; CENTOFANTI, T.; NTATSI, G.; SAVVAS, D.; KARKANIS, A.; WILLIAMS, M.; VANDENBERG, A.; TOMA, L.; SHRESTHA, S.; AKAICHI, F.; BARRIOS, C. O.; GRUBER, S.; JAMES, E. K.; MALUK, M.; KARLEY, A.; IANNETTA, P. The biology of legumes and their agronomic, economic, and social impact. *In*: HASANUZZAMAN, M.; ARAÚJO, S.; GILL, S. S. (Ed.). **The plant family Fabaceae**: biology and physiological responses to environmental stresses. Singapore: Springer, 2020.

VILLELA, A. F.; FILHO, L. D.; SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 11/12, p. 1957-1968, 1991.

WARTENBERG, A. C.; BLASER, W. J.; GATTINGER, A.; ROSHETKO, J. M.; VAN NOORDWIJK, M.; SIX, J. Does shade tree diversity increase soil fertility in cocoa plantations? **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 248, p. 190-199, 2017.

ZAMAN, M.; SHAHID, S. A.; HENG, L. **Guideline for salinity assessment, mitigation and adaptation using nuclear and related techniques**. Cham: Springer, 2018.

ZHANG, Y.; GE, Y. R.; ZHAO, R.; HU, Y. T.; CHEN, Y.; GUO, Y. Y.; LIN, J. X.; LI, R. L. Progress on the structural components, biosynthesis and functions of suberin. **Chinese Science Bulletin**, v. 67, p. 822-833, 2022.

ZHANG, H.; LIU, S.; REN, T.; NIU, M.; LIU, X.; LIU, C.; WANG, H.; YIN, W.; XIA, X. Crucial abiotic stress regulatory network of NF-Y transcription factor in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, p. 4426, 2023.

YUAN, F.; GUO, J.; SHABALA, S.; WANG, B. Reproductive physiology of halophytes: Current standing. Front. **Plant Sci**., 9, 1954, 2019.

ZHANG, H.; ZHAO, Y.; ZHU, J. K. Prosperando sob estresse: como as plantas equilibram o crescimento e a resposta ao estresse. **Developmental Cell**, v. 55, p. 529-543, 2020.

4. ARTIGO 1
ESTRESSE SALINO *IN VITRO*: RESPOSTAS EM ACESSOS DE GLIRICÍDIA

RESUMO

Um dos estresses abióticos que mais compromete o crescimento e desenvolvimento das espécies vegetais é a salinidade, uma vez que afeta negativamente processos fisiológicos e bioquímicos importantes. Este estudo teve como objetivo a avaliação das respostas fitotécnicas e fisiológicas de dois acessos de *Gliricidia sepium* (Dores e Vitrine) cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de NaCl (0, 100, 150, 200 e 250 mM). As microestacas foram cultivadas em meio de cultura WPM e avaliadas quanto ao desenvolvimento vegetativo, biomassa e conteúdo de clorofila. O aumento da salinidade promoveu a redução significativa no comprimento da raiz e na biomassa total, especialmente em concentrações superiores a 150 mM, com inibição completa do desenvolvimento radicular e foliar em alguns tratamentos. Em contrapartida, a massa fresca do caule apresentou aumento em concentrações salinas elevadas, mas não houve diferença estatística entre os acessos e entre os tratamentos. Em maiores concentrações de NaCl (200 e 250 mM), não foi possível realizar a quantificação de clorofilas em função da ausência de folhas. Observou-se que ambos os acessos são sensíveis ao estresse salino, embora o Vitrine tenha apresentado maior tolerância em concentrações moderadas. A triagem inicial de tolerância à salinidade em *Gliricidia sepium in vitro* se mostrou eficiente, contribuindo para programas de melhoramento genético.

Palavras-chave: *Gliricidia sepium*; salinidade; clorofila; groundeye.

ABSTRACT

Salinity is the abiotic stress which compromises the growth and development of plant species the most. It negatively affects important physiological and biochemical processes. This study aimed to evaluate the phytotechnical and physiological responses of two *Gliricidia sepium* accessions (Dores and Vitrine) grown *in vitro* under different NaCl concentrations (0, 100, 150, 200, and 250 mM). Microcuttings were grown in a WPM culture medium and evaluated for vegetative development, biomass, and chlorophyll content. Increasing salinity led to a significant reduction in root length and total biomass, especially at concentrations above 150 mM, with complete inhibition of root and leaf development in some treatments. In contrast, stem fresh weight increased at high saline concentrations, but there was no statistical difference between different accessions or treatments. At higher NaCl concentrations (200 and 250 mM), quantifying chlorophyll was not possible due to the absence of leaves. Both accessions were found to be sensitive to salt stress, although Vitrine showed greater tolerance at moderate concentrations. Initial *in vitro* salinity tolerance screening in *Gliricidia sepium* proved efficient, contributing to genetic improvement programs.

Key-words: *Gliricidia sepium;* salinity; chlorophyll; groundeye.

4.1. Introdução

O estresse abiótico é um estímulo que impacta negativamente o desenvolvimento das plantas e está ligado à sua capacidade de lidar com condições adversas no ambiente, desencadeando alterações e respostas em todos os níveis funcionais do organismo vegetal (LARCHER, 2000; ZHANG et al., 2019).

A salinidade é um dos estresses abióticos que mais afeta a produtividade agrícola, uma vez que limita a absorção de água pelas plantas e modifica o potencial osmótico, causando desequilíbrio no balanço hídrico, prejudicando diretamente a absorção e o metabolismo de nutrientes (SOUZA et al., 2019; SOUSA et al., 2021). Cerca de um bilhão de hectares de solo em todo o mundo são impactados pela salinidade excessiva (FAO, 2021).

A salinização do solo afeta processos fisiológicos essenciais para as plantas, induz o fechamento estomático, diminui a taxa de transpiração, reduz a concentração interna de CO_2 e compromete a eficiência fotossintética (SÁ et al., 2018). Dessa forma, a identificação de genótipos tolerantes à salinidade é fundamental para o desenvolvimento de sistemas agrícolas sustentáveis em solos afetados por sais (FLOWERS et al., 2015).

A avaliação da capacidade das plantas em suportar níveis elevados de sais pode ser realizada ao observar a taxa de germinação das sementes em um substrato salino. A diminuição na taxa de germinação em relação ao controle funciona como um indicador do grau de tolerância da espécie à salinidade (OLIVEIRA et al., 2007).

Em condições de cultivo *in vitro*, é viável simular esses estresses para avaliar o comportamento, a morfologia e a fisiologia das plantas, empregando agentes osmóticos como o cloreto de sódio, por exemplo (ORTIZ-HÉRNANDEZ, 2012; PEREIRA et al., 2014). Essa ferramenta pode ser aplicada para selecionar plantas com maior resistência a estresses abióticos como a salinidade e o déficit hídrico. Trata-se de uma abordagem econômica em espaço e ágil em resultados (BARROSO et al., 2003; MALAJOVICH, 2016).

A gliricídia (*Gliricidia sepium*), pertencente à família Fabaceae (ANG et al., 2019), é uma árvore multifuncional, de crescimento rápido e altamente produtiva, capaz de dispersar sementes a distâncias de até 40 metros da planta-mãe, por meio da abertura explosiva de suas vagens (PARK et al., 2018). Essa espécie realiza a ciclagem de nutrientes, aumentando o teor de matéria orgânica do solo e possui sistema radicular bem desenvolvido, o que lhe confere tolerância à seca. O uso dessa leguminosa também contribui para a fixação de nitrogênio (KABA et al., 2019). Pode ser propagada por meio de sementes ou estacas (RANGEL et al., 2011).

Apesar da sua ampla utilização agronômica, informações sobre as respostas fisiológicas e fitotécnicas dessa espécie à salinidade *in vitro* ainda são limitadas. Portanto, é importante identificar quais são as estratégias adotadas pelas espécies que são capazes de prosperar em ambientes adversos com alto teor de sais. O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas da *Gliricidia sepium* ao estresse salino em condições de cultivo *in vitro*.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Material vegetal e condução dos experimentos

O estudo foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no município de Aracaju, Sergipe. O material vegetal utilizado foi coletado de dois acessos (1- Dores e 2- Vitrine) do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa, localizado no campo experimental Jorge Sobral, da Embrapa, no município de Nossa Senhora das Dores, Sergipe.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5 (2 acessos e 5 concentrações de NaCl), com três repetições para cada tratamento. Cada unidade experimental correspondeu a uma microestaca cultivada em tubo de ensaio.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O efeito das concentrações de NaCl foi avaliado por meio de análise de regressão, enquanto as diferenças entre os acessos foram comparadas pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade e o teste de Bartlett para homogeneidade dos dados. O software estatístico Sisvar versão 5.7 foi utilizado para todas as análises (FERREIRA, 2014).

4.2.2. Condições de cultivo

As sementes foram submetidas à assepsia inicial utilizando água corrente e sabão neutro (fora da câmara de fluxo laminar). Posteriormente, dentro da câmara de fluxo laminar, as sementes foram imersas em álcool 70% durante 1 min, hipoclorito de sódio (NaOCl) 1% sob agitação por 20 min e três lavagens sucessivas em água destilada e esterilizada.

A inoculação das sementes foi realizada em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio WPM e suplementado com 30 g/L de sacarose para a obtenção das plântulas. Após 60 dias, foram excisadas microestacas dessas plântulas para inoculação em tubos de ensaio contendo o meio de cultura WPM (Sigma-Aldrich), suplementado com 20 g/L de sacarose e concentrações de NaCl (0, 100, 150, 200 e 250 mM) para o ensaio de estresse salino.

Os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,8 ± 1 e foram gelificados com Phytagel e autoclavados a 121 ºC e 1,0 atm por 15 min.

Sob condições controladas, as microestacas foram mantidas a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas, umidade relativa do ar média em torno de 70% e intensidade luminosa de 60 μmol m^{-2} s^{-1}.

4.2.3. Morfometria

Para a análise morfométrica, aos 45 dias, as microestacas foram cuidadosamente retiradas dos meios de cultivo e posicionadas na bandeja do equipamento Groundeye®, um sistema de análise de morfologia externa que possui uma câmera de alta resolução conectada a um computador. Esse sistema permite a visualização e avaliação em tempo real por meio de um software específico de análise de imagens. A avaliação do comprimento das plântulas foi realizada automaticamente, que também mediu, em centímetros, a média da largura da parte aérea e o tamanho da raiz primária. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística.

4.2.4. Biomassa

Aos 45 dias, as microestacas foram retiradas dos meios de cultivo, limpas com papel absorvente e levadas para quantificação da massa fresca (MF) em balança analítica. As massas obtidas foram registradas (em gramas) e submetidas à análise estatística posterior. Em seguida, foram acondicionadas em sacos de papel e levadas à estufa a uma temperatura de 60 ± 5 ºC. A cada 24 horas, foram feitas avaliações a fim de se observar a estabilização do peso das massas em balança analítica, para que fosse possível a determinação das respectivas massas secas (MS). As massas obtidas foram registradas (em gramas) e submetidas à análise estatística.

4.2.5. Estimativa do conteúdo de clorofila

O conteúdo de clorofila foi medido através de um clorofilômetro portátil da marca comercial ClorofiLOG®, modelo CFL 1030 da FALKER Automação Agrícola, que utiliza o Índice de Clorofila Falker para expressar os resultados. A leitura das clorofilas a e b foi realizada em seis folhas totalmente abertas de cada microestaca avaliada.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Morfometria

O aumento da salinidade do meio afetou significativamente o crescimento *in vitro* das microestacas de gliricídia (Figura 1). As concentrações de NaCl apresentaram um efeito significativo para as variáveis analisadas, indicando que a salinidade influencia fortemente o

crescimento das plantas. Sais em concentrações elevadas são um fator de estresse para as plantas, visto que a água é retida osmoticamente em solução salina, dessa forma, ficando cada vez menos disponível (MUNNS, 2002). Estudos indicam que a redução no crescimento vegetal pode apresentar uma resposta adaptativa das espécies frente a condições adversas, uma vez que, sob estresse salino, é possível observar que as plantas priorizam a conservação de energia metabólica antes de ativar mecanismos de defesa completos, visando prevenir danos celulares irreversíveis (JALEEL et al., 2007).

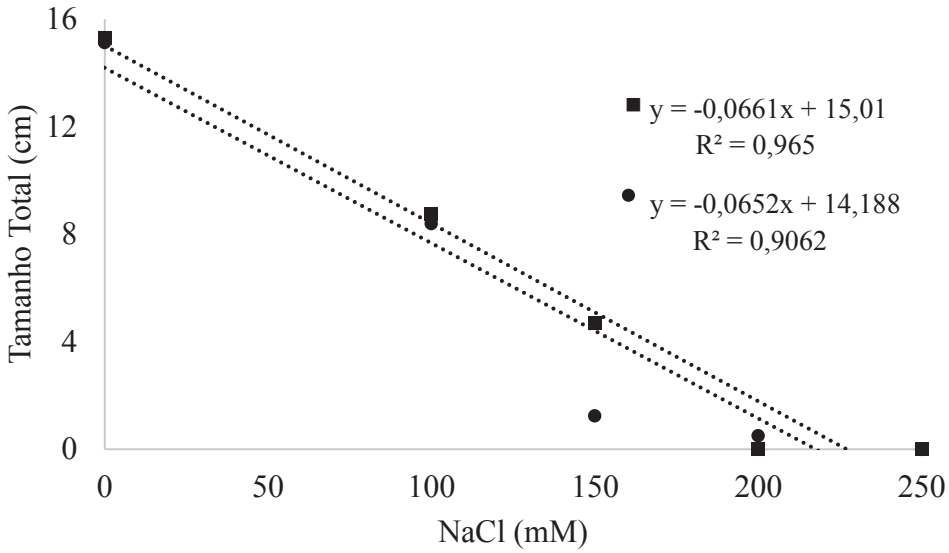
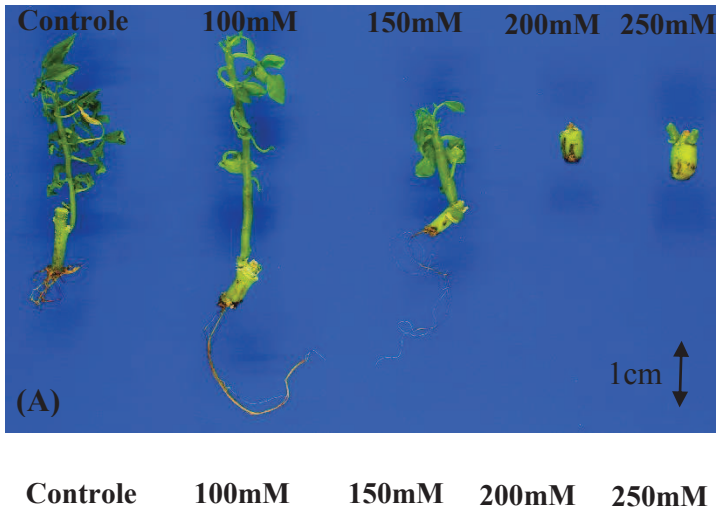


Figura 1. Comprimento total de microestacas de gliricídia sobre estresse salino *in vitro*. ■ Dores; ● Vitrine.

Houve redução do crescimento das microestacas sob estresse. A salinidade afetou significativamente o desenvolvimento das folhas e o comprimento das raízes (Figura 2). A disrupção na homeostase do potencial de água e o desbalanço iônico na interface solo-planta provocam a inibição do crescimento em plantas que se desenvolvem sob salinidade, de maneira que concentrações crescentes de NaCl tornam a água e os nutrientes cada vez menos disponíveis para a planta, podendo promover a toxicidade no vegetal em condições mais drásticas (CORDEIRO, 2001; ZHU, 2001; MELO et al., 2014).



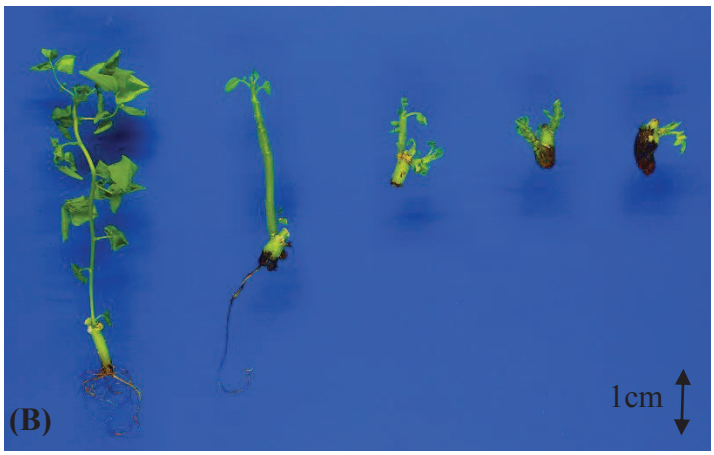


Figura 2. Efeito do NaCl no desenvolvimento de microestacas *in vitro* de dois acessos de gliricídia. **A** – Acesso Dores **B** – Acesso Vitrine

O NaCl no meio de cultivo promoveu uma redução no comprimento da raiz primária com o aumento de suas concentrações. O acesso Dores apresentou maior média na ausência de sal (7,81 cm), diminuindo nas concentrações de 100 e 150 mM e tendo seu desenvolvimento completamente inibido a partir de 200 mM (Tabela 1). Apesar do acesso Vitrine apresentar tolerância nas concentrações menores, também houve inibição completa do desenvolvimento radicular a partir de 150 mM. Para a variável comprimento da parte aérea observou-se uma variabilidade em resposta à salinidade, onde o acesso Dores manteve valores estáveis para todos os tratamentos e, em contrapartida, o acesso Vitrine aumentou progressivamente com os níveis de NaCl no meio. A parte aérea é a mais sensível em condições de salinidade (FAGERIA, 2010). Em culturas como arroz e trigo, o comprimento radicular, o desenvolvimento da parte aérea e a produção da biomassa vegetal são parâmetros eficazes para avaliar a tolerância ao estresse salino (ALI et al., 2014; GHOLIZADEH et al., 2014).

Tabela 1. Médias do comprimento da raiz e comprimento da parte aérea de microestacas de acessos de gliricídia aos 45 dias de cultivo *in vitro* em concentrações crescentes de NaCl.

Acessos	NaCl (mM)				
	0	100	150	200	250
Comprimento da raiz primária(cm)					
Dores	7,81A	2,26B	2,30	-	-
Vitrine	4,90B	4,24B	-	-	-
Comprimento da parte aérea (cm)					
Dores	0,43A	0,38A	0,40A	0,57A	0,52A
Vitrine	0,28A	0,27A	0,34A	0,40A	0,46A

Médias seguidas de mesma letra maiúsculas na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 0,05%.

Houve redução linear no comprimento da raiz primária para ambos os acessos à medida que a concentração salina aumentou (Figura 3). Observa-se que o nível de NaCl está explicando 89% da variação observada no comprimento da raiz primária do acesso Dores e 78% da variação para o acesso Vitrine. A redução no comprimento da raiz pode ser explicada pela inibição da expansão das células no tecido em crescimento e da divisão celular, ocasionados pela salinidade do meio (FORNER-GINER et al., 2011).

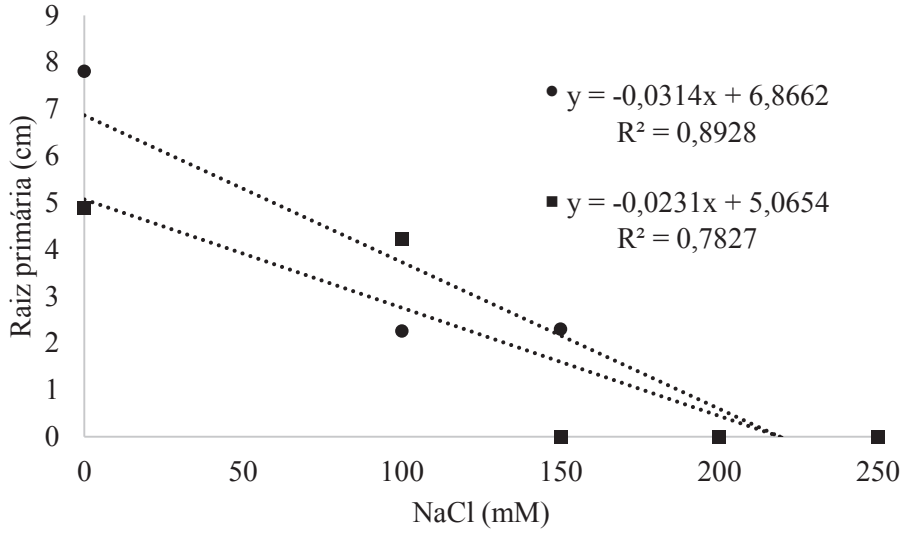


Figura 3. Comprimento da raiz primária de microestacas de dois acessos de gliricídia sobre estresse salino *in vitro*. ● Dores; ■ Vitrine.

4.3.2. Biomassa

O aumento da concentração de NaCl no meio de cultura ocasionou uma redução progressiva da biomassa das folhas e raízes, tanto para a massa fresca quanto para massa seca, nos dois acessos. Observou-se que as concentrações elevadas do NaCl afetaram o desenvolvimento das folhas e raízes principalmente de 150, 200 e 250 mM, em que os valores da biomassa das folhas e raízes são zero ou muito próximos de zero para o acesso Dores. O acesso Vitrine apresentou uma baixa biomassa na concentração 250 mM, podendo representar indícios de maior tolerância quando comparado ao acesso Dores (Tabela 2). Além disso, observa-se que este apresentou um melhor desenvolvimento inicial em condições sem salinidade, com valores de biomassa superiores ao acesso Dores, que demonstrou maior sensibilidade já em 150 mM, com uma diminuição drástica na biomassa da raiz (Tabela 1). O estresse leva ao fechamento estomático, resultando em menor uso de água, redução na assimilação de CO_2 e menor acúmulo de biomassa (LEITE et al., 2017).

Tabela 2. Médias da massa fresca e seca de folhas e raízes de microestacas de dois acessos de gliricídia.

NaCl (mM)	Acessos			
	Dores		Vitrine	
	Massa Fresca (g)			
	Folha	Raiz	Folha	Raiz
0	0,1751	0,0427	0,3209	0,0379
100	0,6333	0,0531	0,2560	0,0089
150	0,2759	0,0021	0,1985	-
200	-	-	0,0529	-
250	-	-	0,0165	-
	Massa Seca (g)			
	Folha	Raiz	Folha	Raiz
0	0,0373	0,0086	0,0631	0,0117
100	0,0559	0,0132	0,0263	0,0031
150	0,0238	0,0013	0,0127	-
200	-	-	0,0090	-
250	-	-	0,0022	-

(-) Material não desenvolveu.

As microestacas tiveram seu desenvolvimento comprometido nas concentrações mais elevadas de NaCl. O acesso Dores apresentou algumas brotações verdes, com a presença de folhas e manchas marrons. Já o acesso Vitrine apresentou coloração mais escura, devido à oxidação, com menos brotações aparentes e mais comprometido (Figura 4). Essa redução do crescimento pode estar associada a alterações na divisão e expansão celular que provocam o acúmulo de sais na parede da célula, reduzem o turgor e, consequentemente, o desenvolvimento da parte aérea e da raiz (TAIZ & ZEIGER, 2013).

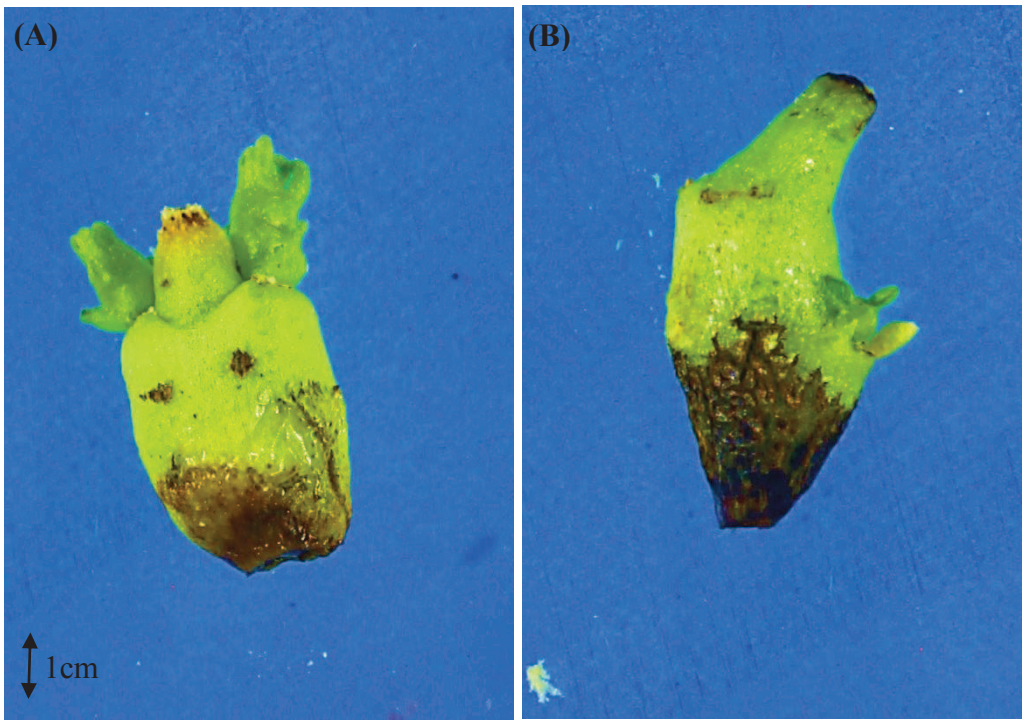


Figura 4. Microestacas de gliricídia aos 45 dias de cultivo sob 250 mM de NaCl.
A – Acesso Dores **B** – Acesso Vitrine

Para a variável massa fresca do caule não houve diferença estatisticamente significativa entre os acessos, com valores de massa fresca entre 0,2567 (controle) e 0,4680 (250 mM) para o acesso Dores e 0,2162 (controle) e 0,4050 (250 mM) para o acesso Vitrine. A massa fresca variou conforme a salinidade e os dois acessos comportaram-se de maneira similar. Esse resultado pode indicar tolerância sob salinidade moderada/alta. Estudos realizados por Mehmood et al. (2021) demonstraram que o aumento da salinidade afeta negativamente diversos aspectos do trigo, como o rendimento de grãos, a altura da planta e o conteúdo relativo de água nos tecidos. O incremento na biomassa do sistema radicular e/ou da parte aérea pode contribuir para a regulação da absorção de sódio (Na^+) pelo xilema, reduzindo seu transporte para o caule, excluindo e bloqueando a absorção de íons tóxicos durante esse processo (YUAN et al., 2019; FLOWERS & COLMER, 2015; ROY & CHAKRABORTY, 2015).

As concentrações de NaCl apresentaram efeito significativo sobre a massa seca ($p= 0,0148$) do caule, afetando a biomassa. A interação entre acesso e concentração NaCl não foi significativa, ou seja, o efeito da salinidade independe do acesso estudado. Entre os dois acessos testados não houve diferença significativa na massa seca e dentro de cada concentração de NaCl, ou seja, ambos responderam de maneira semelhante ao estresse salino. As produções de massa seca dos caules apresentaram modelos de resposta linear para o acesso Dores, com aumento nos valores dessa variável quando se aumentam as concentrações de NaCl no meio, o que pode indicar um mecanismo de tolerância dessa espécie à salinidade (Figura 5). Esse resultado foi contrário ao que já foi observado por Delgado et al. (1994), Tejera et al. (2006) e Taïbi et al. (2012) em estudos com leguminosas de grãos, como *Phaseolus vulgaris*, que

demonstraram o efeito inibitório da salinidade no crescimento vegetativo e acúmulo de biomassa.

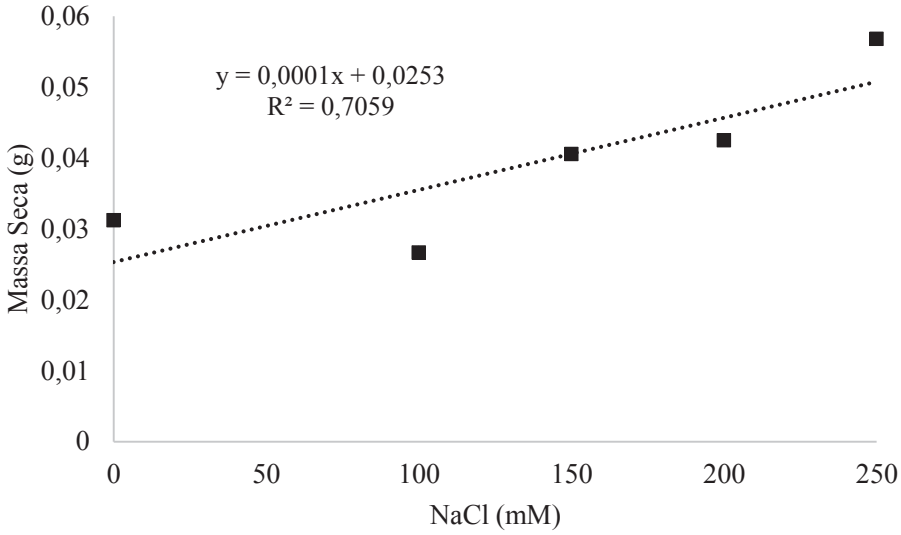


Figura 5. Massa seca do caule de microestacas de gliricídia do acesso Dores sob estresse salino *in vitro*.

4.3.3. Quantificação Clorofila a e b nas folhas

As concentrações mais elevadas de NaCl 200 e 250 mM para o acesso Dores e 150, 200 e 250 mM para o acesso Vitrine promoveram efeito negativo/deletério no desenvolvimento das folhas, impossibilitando a quantificação de clorofila a e b, pela ausência destas. Apesar de haver um declínio nos teores de clorofila com o aumento da salinidade no meio, o acesso Vitrine foi o que apresentou maiores teores de clorofila a e b (Tabela 3). Esse declínio em plantas sob estresse salino é amplamente conhecido como um marcador fisiológico de estresse oxidativo (SMIRNOFF, 1996).

A elevação da salinidade pode ocasionar uma redução significativa do potencial osmótico do meio de cultivo, o que reduz ou impede a absorção de água pela planta (MARTINS, 2012). Ainda, para manter a absorção de água e reduzir a transpiração, as plantas são capazes de reduzir o número e a área foliar. Flowers et al. (2015) demonstraram que a viabilidade da maioria das espécies benéficas é significativamente comprometida em concentrações elevadas (>200 mM) de NaCl.

Tabela 3. Médias da quantificação de clorofila a e b em folhas de microestacas de dois acessos de gliricídia.

Acessos	NaCl (mM)				
	0	100	150	200	250
			Clorofila a		
Dores	23,4833Aa	18,7000Ba	16,8666Ca	-	-
Vitrine	30,3500Ba	30,2666Ca	19,2333Cb	-	-
			Clorofila b		
Dores	2,7666Aa	1,8500Aa	1,5000Aa	-	-
Vitrine	3,1333Aa	1,7833Aa	2,0000Aa	-	-

Médias seguidas de mesma letra minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 0,05%.

Estes resultados corroboram estudos anteriores realizados com *Phaseolus vulgaris* (TURAN et al., 2007) e *Vigna subterrânea* (TAFFOUO et al., 2010) que demonstraram reduções significativas nos teores de clorofila a e b sob condições de estresse salino. Os resultados obtidos com os acessos de *G. sepium* cultivados sob diferentes concentrações de NaCl obtidos *in vitro* têm implicações práticas relevantes para a aplicação agropecuária. Considerando a expansão de áreas agrícolas em regiões afetadas por salinização secundária, intensificada por práticas de irrigação inadequadas, espécies com potencial forrageiro, fixadoras de nitrogênio e com rápido crescimento, como a gliricídia, são alternativas relevantes para uso em consórcios agroflorestais e na recuperação de áreas degradadas. A identificação de acessos com maior tolerância a salinidade pode, portanto, subsidiar estratégias de uso sustentável dessa espécie em ambientes degradados, contribuindo para a produção agrícola, conservação de solos e aplicação de recursos genéticos vegetais em cenários de mudança climática.

4.4. Conclusões

A salinidade impacta negativamente o desenvolvimento de *Gliricidia sepium* cultivada *in vitro*, com prejuízos morfofisiológicos em ambos os acessos avaliados.

As respostas foram mais severas a partir de 150 mM de NaCl.

Os resultados fornecem subsídios para programas de melhoramento genético de *G. sepium*.

4.5. Referências Bibliográficas

ALI, M. N.; YEASMIN, L.; GANTAIT, S.; GOSWAMI, R.; CHAKRABORTY, S. Screening of rice landraces for salinity tolerance at seedling stage through morphological and molecular markers. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 20, n. 4, p. 411-423, 2014.

ANG, A. M. G.; ENOT, M. M.; BALTAZAR, G. J. D.; ALINAPON, C. V.; BUNCALES, E. O.; BARBOSA, G. B. Antioxidant and cytotoxic activity of the leaf ethanolic extracts of *Tithonia diversifolia* and *Gliricidia sepium* from Bukidnon, Philippines. **Asian Journal of Biological and Life Sciences**, v. 8, n. 1, p. 8-15, 2019.

BARROSO, P. A. V.; MOURA, G. E. D. D.; BRITO, L. K. F.; MARTINS, C. P.; MACEDO, C. E. C.; LOPES, D. B.; ALLOUFA, M. A. I. Efeito do cultivo in vitro na presença de NaCl em plantas de abacaxizeiro na fase de aclimatação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 7, n. 3, p. 473-477, 2003.

CORDEIRO, G. G. **Salinidade em agricultura irrigada: conceitos básicos e práticos**. 1. ed. Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido, p. 38, 2001.

DELGADO, M. J.; LIGERO, F.; LLUCH, C. Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common-bean, and soybean plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, p. 371-376, 1994.

FAGERIA, N. K. Melhoramento genético vegetal e seleção de cultivares tolerante à salinidade. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. (org.). **Manejo da salinidade na agricultura**: estudos básicos e aplicados. 1. ed. Fortaleza: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade, p. 206-218, 2010.

FAO. **Partenariat mondial sur les sols:** lancement de la carte mondiale des sols touchés par la salinisation. Roma: FAO, 2021. Disponível em: https://www.fao.org. Acesso em: 22 maio 2025.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, dez. 2014.

FLOWERS, T. J.; COLMER, T. D. Plant salt tolerance: Adaptations in halophytes. **Ann. Bot**., v. 115, p. 327-331, 2015.

FLOWERS, T. J.; MUNNS, R.; COLMER, T. D. Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. **Annals of Botany**, v. 115, n. 3, p. 419-431, 2015.

FORNER-GINER, M. A.; LEGAZ, F.; PRIMO-MILLO, E.; FORNER VALERO, J. B. Nutritional responses of citrus rootstocks to salinity: performance of the new hybrids Forner-Alcaide 5 and Forner-Alcaide 13. **Journal of Plant Nutrition**, v. 34, n. 10, p. 1437-1452, 2011.

GHOLIZADEH, A.; DEHGHANI, H.; DVORAK, J. Determination of the most effective traits on wheat yield under saline stress. **Agriculture Advances**, v. 3, n. 4, p. 103-110, 2014.

KABA, J. S.; ZERBE, S.; AGNOLUCCI, M.; SCANDELLARI, F.; ABUNYEWA, A. A.; GIOVANNETTI, M.; TAGLIAVINI, M. Atmospheric nitrogen fixation by gliricidia trees (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp.) intercropped with cocoa (T*heobroma cacao* L.). **Plant and Soil**, v. 435, p. 323-336, 2019.

JALEEL, C. A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B.; KISHOREKUMAR, A.; GOPI, R.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Pseudomonas fluorescens enhances biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 60, n. 1, p. 7-11, 2007.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, p. 531, 2000.

LEITE, J. V. Q.; FERNANDES, P. D.; OLIVEIRA, W. J.; SOUZA, E. R.; SANTOS, D. P.; SANTOS, C. S. Efeito do estresse salino e da composição iônica da água de irrigação sobre variáveis morfofisiológicas do feijão-caupi. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 11, n. 6, p. 1825-1833, 2017.

MALAJOVICH, M. A. M. **Biotecnologia: ensino e divulgação**. 2. ed. Rio de Janeiro: Biotecnologia, 2016. ISBN 978-85-921077-0-3.

MARTINS, L. S. T.; PEREIRA, T. S.; CARVALHO, A. S. R.; BARROS, C. F.; ANDRADE, A. C. S. Seed germination of *Pilosocereus arrabidae* (Cactaceae) from a semiarid region of south-east Brazil. **Plant Species Biology**, v. 27, n. 3, p. 191-200, 2012.

MEHMOOD, H.; ABBASI, G. H.; JAMIL, M.; MALIK, Z.; ALI, M.; IQBAL, R. Assessing the potential of exogenous caffeic acid application in boosting wheat (*Triticum aestivum* L.) crop productivity under salt stress. **PLoS One**, v. 16, n. 11, e0259222, 2021.

MELO, G. M.; BARBOSA, M. R.; DIAS, A. L. F.; WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Pré-condicionamento in vitro de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) para tolerância ao estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 27-33, 2014.

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

OLIVEIRA, A. M. et al. Salinidade na germinação e desenvolvimento de plântulas de aroeira (*Myracroduon urundeuva* Fr All.). **Caatinga**, v. 20, n. 2, p. 39-42, 2007.

ORTIZ-HERNÁNDEZ, Y. D.; CARRILLO-SALAZAR, J. A. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a short review. **Comunicata Scientiae**, v. 3, n. 4, p. 220-237, 2012.

PARK, J.-H.; KANG, H.-J.; PARK, K.-H.; PARK, H.-D. Direct interspecies electron transfer via conductive materials: a perspective for anaerobic digestion applications. **Bioresource Technology**, v. 254, p. 300-311, 2018.

PEREIRA, M. R. R.; MARTINS, C. C.; MARTINS, D.; SILVA, R. J. N. Estresse hídrico induzido por soluções de PEG e de NaCl na germinação de sementes de nabiça e fedegoso. **Bioscience Journal**, Uberlândia, mai./jun. 2014.

RANGEL, J. H. de A.; MUNIZ, E. N.; SA, C. O. de; SA, J. L. de. **Implantação e manejo de legumineira com Gliricídia (*Gliricidia sepium*)**. [s.l]: [s.n.], 2011.

ROY, S., CHAKRABORTY, U. Cross-generic studies with rice indicate that ion homeostasis and antioxidant defense is associated with superior salinity tolerance in Cynodon dactylon (L.) Pers. Indian J. **Plant Physiol**. 20, 14–22, 2015.

SÁ, F. V. S.; NETO, M. F.; LIMA, Y. B.; PAIVA, E. P.; PRATA, R. C.; LACERDA, C. F.; BRITO, M. E. B. Growth, gas exchange and photochemical efficiency of the cowpea bean under salt stress and phosphorus fertilization. **Comunicata Scientia**e, v. 9, p. 668-679, 2018.

SMIRNOFF, N. Botanical briefing: the function and metabolism of ascorbic acid in plants. **Annals of Botany**, v. 78, p. 661-669, 1996.

SOUSA, H. C.; SOUSA, G. G.; LESSA, C. I. N.; LIMA, A. F. S.; RIBEIRO, R. M. R.; RODRIGUES, F. H. C. Growth and gas exchange of corn under salt stress and nitrogen doses. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 25, n. 3, p. 174-181, 2021.

SOUZA, M. V. P.; SOUSA, G. G.; SALES, J. R. S.; FREIRE, M. H. C.; SILVA, G. L.; VIANA, T. V. A. Saline water and biofertilizer from bovine and goat manure in the Lima bean crop. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 14, n. 3, e5672, 2019. DOI: http://doi.org/10.5039/agraria.v14i3a5672

TAÏBI, K.; TAÏBI, F.; BELKHODJA, M. Effects of external calcium supply on the physiological response of salt stressed bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genetics and Plant Physiology**, v. 2, p. 177-186, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TURAN, M. A.; TURKMER, N.; TABAN, N. Effect of NaCl on stomatal resistance and proline chlorophyll, NaCl and K concentrations of lentil plants. **Journal of Agronomy**, v. 6, p. 378-381, 2007.

TAFFOUO, V. D.; WAMBA, O. F.; YOUMBI, E.; NONO, G. V.; AKOA, A. Growth, yield, water status and ionic distribution response of three bambara groundnut (V*igna subterranean* (L.) verdc.) landraces grown under saline conditions. **International Journal of Botany**, v. 6, p. 53-58, 2010.

TEJERA, N. A.; SOUSSI, M.; LLUCH, C. Physiological and nutritional indicators of tolerance to salinity in chickpea plants growing under symbiotic conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 17-24, 2006.

YUAN, F.; GUO, J.; SHABALA, S.; WANG, B. Reproductive physiology of halophytes: Current standing. Front. **Plant Sci**., 9, 1954, 2019.

ZHANG, Y.; LIANG, Y.; ZHAO, X.; JIN, X.; HOU, L.; SHI, Y.; AHAMMED, G. J. Silicon compensates phosphorus deficit-induced growth inhibition by improving photosynthetic capacity, antioxidant potential, and nutrient homeostasis in tomato. **Agronomy**, v. 9, n. 11, p. 733, 2019.

ZHU, J. K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 56-71, 2001.

5. ARTIGO 2
ACÚMULO DE PROLINA EM ACESSOS DE GLIRICÍDIA CULTIVADOS SOB ESTRESSE SALINO *IN VITRO*

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o acúmulo de prolina em folhas e caules de microestacas de dois acessos (Dores e Vitrine) de *Gliricidia sepium* cultivados *in vitro* sob estresse salino. As microestacas oriundas de plântulas cultivadas *in vitro* foram transferidas para meio WPM com diferentes concentrações de NaCl (0, 100, 150, 200, 250 mM) + o controle e foram mantidas em condições controladas de cultivo. A prolina foi quantificada aos 60 dias em folhas e caules por meio do método de Bates et al. (1973). Os resultados mostraram respostas distintas entre os acessos. Observou-se um aumento significativo de prolina nas folhas do acesso Dores na presença de 100 mM de NaCl, enquanto nas concentrações superiores, houve inibição do desenvolvimento foliar. No acesso Vitrine houve maior concentração de prolina no controle e com redução sob condições de salinidade. Ambos os acessos apresentaram correlação linear positiva entre a concentração de NaCl e o acúmulo de prolina no caule, indicando que houve uma preferência no mecanismo de proteção osmótica. Conclui-se que o acesso Dores apresenta maior capacidade de ajuste osmótico sob estresse moderado, enquanto o acesso Vitrine apresentou menor tolerância. A prolina é um marcador bioquímico eficaz para ser quantificada em estudos preliminares de seleção in vitro. Estes resultados apontam a importância da cultura de tecidos como aliada nos estudos de avaliação precoce de respostas a estresses abióticos.

Palavras-chave: *Gliricidia sepium*, estresse abiótico, osmoproteção, leguminosas, cultura de tecidos.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the accumulation of proline in leaves and stems of microcuttings of two accessions (Dores and Vitrine) of *Gliricidia sepium*, grown *in vitro* under salt stress. The microcuttings from *in vitro*-grown seedlings were transferred to a WPM medium with different NaCl concentrations (0, 100, 150, 200, and 250 mM) plus the control, maintained under controlled culture conditions. Proline was quantified at 60 days in leaves and stems using the Bates et al. (1973) method. The results showed distinct responses among the accessions. A significant increase in proline was observed in the leaves of the Dores accession in the presence of 100 mM NaCl, while at higher concentrations there was inhibition of leaf development. In the Vitrine accession, there was a higher proline concentration in the control and a reduction under salinity conditions. Both accessions showed a positive linear correlation between NaCl concentration and proline accumulation in the stem, indicating a preference for the osmotic protection mechanism. We conclude that the Dores accession has a greater capacity for osmotic adjustment under moderate stress, while the Vitrine accession showed less tolerance. Proline is an effective biochemical marker for quantification in preliminary *in vitro* selection studies. These results highlight the importance of tissue culture as a tool in studies evaluating early responses to abiotic stresses.

Key-words: *Gliricidia sepium*, abiotic stress, osmoprotection, legumes, tissue culture.

5.1. Introdução

Solos salinizados são limitantes para a agricultura, especialmente em regiões áridas e semiáridas, em áreas onde a irrigação é realizada por águas subterrâneas, pois estas apresentam maiores concentrações de sais dissolvidos (DASGAN et al., 2002; CASTRO; SANTOS, 2020). A salinidade impacta aproximadamente 1,4 bilhão de hectares de terra em todo o mundo – o que equivale a mais de 10% da superfície terrestre global. Além disso, cerca de um bilhão de hectares adicionais estão sob ameaça devido aos efeitos da crise climática (FAO, 2024). Esse processo de degradação do solo também é causado, predominantemente, por práticas agrícolas inadequadas, como irrigação com água de baixa qualidade e drenagem ineficiente (CORWIN, 2021).

A salinidade desencadeia uma série de distúrbios bioquímicos e fisiológicos nas plantas, caracterizados pelo desequilíbrio osmótico e iônico. À medida que os sais se acumulam no solo, as plantas enfrentam dificuldade em absorver água, levando ao déficit hídrico celular. Aliado a isso, a entrada excessiva de sódio (Na+) e cloro (Cl-) desregula a homeostase iônica, prejudicando processos fisiológicos essenciais como a fotossíntese, com redução no crescimento desde a germinação até o desenvolvimento vegetativo (MUCHATE et al., 2016).

Plantas que são submetidas a estresse salino tendem a produzir intensivamente compostos osmoprotetores, que são altamente solúveis e não tóxicos em altas concentrações. Estes solutos são fundamentais para a manutenção do turgor celular e sua principal ação consiste em regular o equilíbrio osmótico (NAHAR et al., 2016).

A prolina é um dos osmoprotetores mais comuns e estudados por agir diretamente na capacidade de sobrevivência das plantas estressadas (GHOSH et al., 2022). O conteúdo de prolina pode aumentar em até 100 vezes em plantas sob estresse, quando em comparação com plantas cultivadas em condições normais (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008). Dentre as diversas funções da prolina, destaca-se a manutenção do turgor celular, funcionando como molécula de sinalização e fonte de nitrogênio e carbono (KAVI KISHOR; SREENIVASULU, 2014; BOUTHOUR et al., 2015; FREITAS et al., 2018; AGHDAM et al., 2019).

Estudos demonstraram que o acúmulo de prolina em muitas espécies tem forte correlação com a tolerância ao estresse, onde as plantas tolerantes à salinidade apresentam concentrações superiores do aminoácido (FOUGÈRE et al., 1991; PETRUSA; WINICOV, 1997).

A técnica da cultura de tecidos de plantas, uma ferramenta biotecnológica, pode ser aplicada para estudar e fazer triagem de genótipos com maior resistência a estresses abióticos como a salinidade. Essa técnica requer menos espaço físico e proporciona resultados em um período relativamente curto (ARAB et al., 2018).

A gliricídia (*Gliricidia sepium*) é uma leguminosa arbustiva de crescimento rápido e com raízes profundas, conferindo-lhe resistência à seca. Pertence à família Fabaceae, a mais diversificada e ecologicamente importante entre as angiospermas, desempenhando papel crucial em ecossistemas (EDVAN et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018). Essa espécie possui uma diversidade de aplicações, como adubação verde, alimentação animal, reflorestamento e formação de cercas vivas. Sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio e adaptação a condições edafoclimáticas adversas contribui para o seu valor agro e socioeconômico (GRYGIER et al., 2022).

Considerando a adaptação que essa espécie apresenta frente a condições adversas, objetivou-se neste estudo quantificar a prolina presente em folhas e caule de microestacas cultivadas *in vitro* sob estresse salino.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Material vegetal e condições de cultivo

Este estudo foi realizado nos laboratórios de Cultura de Tecidos de Plantas e Ecofisiologia Vegetal da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizada em Aracaju – Sergipe.

As sementes de gliricídia (*Gliricidia sepium*) de dois acessos (1- Dores e 2- Vitrine) utilizadas neste estudo foram submetidas à assepsia fora da câmara de fluxo laminar, onde foram higienizadas com água corrente e sabão neutro e, posteriormente, foram submetidas à assepsia em câmara de fluxo laminar, com a imersão das sementes em álcool 70% durante 1 min, hipoclorito de sódio (NaClO) 1% sob agitação por 20 min e três lavagens sucessivas em água destilada e esterilizada.

As sementes foram inicialmente inoculadas em tubos de ensaio com 15 mL de meio WPM suplementado com 30 g/L de sacarose para germinação e obtenção das plântulas. Após 60 dias de cultivo, foram obtidas microestacas de aproximadamente 2 cm de comprimento e transferidas para novos recipientes contendo meio WPM suplementado com 20 g/L de sacarose em diferentes concentrações de NaCl (0, 100, 150, 200 e 250 mM).

Todos os meios de cultura tiveram seu pH ajustado para 5,8 ± 1, gelificados com Phytagel e esterilizados em autoclave a 121 ºC e 1,0 atm por 15 min.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 25 ºC ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas, umidade relativa do ar em torno de 70% e intensidade luminosa de 60 µmol m^{-2} s^{-1}.

5.2.2. Determinação do teor de prolina

O teor de prolina das folhas e caule foi determinado de acordo com a metodologia de Bates et al. (1973). Aos 60 dias, um grama de cada tecido foliar e caulinar foi macerado em almofariz com 10 mL de solução de ácido 5-sulfosalicílico a 3%. O material macerado foi então transferido para tubos e centrifugados a 5.000 rpm por 20 minutos. Em seguida, 1 mL da solução do sobrenadante foi misturada com volumes iguais de ácido acético glacial e reagente de Ninidrina (1,25 mg de Ninidrina em 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de H_3PO_4 a 6 M). A mistura foi incubada a 100 °C por 1 h. Após a incubação, essa reação foi paralisada em banho de gelo. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de tolueno à solução, que foi agitada e deixada em repouso até a separação das fases. A fase colorida foi lida em um espectrofotômetro (Thermo Scientific, Genesys 10S UV – VIS) a 520 nm, utilizando L-prolina como padrão e tolueno como branco de referência.

5.2.3. Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, seguindo um esquema fatorial composto por 2 acessos x 5 concentrações de NaCl, com três repetições por tratamento. Cada unidade experimental foi representada por uma microestaca por tubo de ensaio.

Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para a avaliação dos efeitos do NaCl, utilizou-se o teste de regressão, enquanto a comparação entre os acessos foi realizada por meio do teste de Tukey, adotando um nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas foram processadas no software Sisvar versão 5.7 (FERREIRA, 2014).

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Quantificação de prolina nas folhas

A manutenção do crescimento e do potencial produtivo de plantas em condições adversas são parâmetros relevantes para a identificação e seleção de cultivares com maior tolerância (SINGH et al., 2020). No estudo em questão, a determinação da tolerância dos acessos de gliricídia à salinidade foi feita com base nos teores de prolina expressos. Para os acessos Dores e Vitrine, observou-se um aumento significativo de prolina a partir do controle até a concentração de 100 mM de NaCl. Houve um efeito negativo/deletério da salinidade nas microestacas, impossibilitando o desenvolvimento foliar na presença de 200 e 250 mM de NaCl

(Tabela 1). A toxicidade provocada pelo excesso de sais, assim como outros estresses ambientais, afeta negativamente a morfologia e a fisiologia vegetal, comprometendo seu desenvolvimento e funcionalidade (KHAN et al., 2020).

O acesso Vitrine apresentou maior teor de prolina na ausência de sal, reduzindo esse valor na concentração de 100 mM e com ausência de folhas, também em concentrações superiores. O efeito sobre o desenvolvimento foliar devido às concentrações altas de sal presentes no meio de cultura é devido ao desequilíbrio osmótico (GOMES et al., 2019). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Souza et al. (2015), que verificaram menor número de folhas em goiabeiras *in vitro* sob salinidade elevada. Os autores associaram a queda foliar a um mecanismo de adaptação ao estresse, em que a planta reduz a transpiração para reduzir a perda de água.

Tabela 1. Médias do teor de prolina em folhas de microestacas de dois acessos de gliricídia.

Acessos	**NaCl (mM)**				
	0	100	150	200	250
	Teor de prolina (µM/g)				
Dores	1,2433Aa	8,7530Bb	0,8600Cc	-	-
Vitrine	1,6886Bb	1,1883Cc	-	-	-

Médias seguidas de mesma letra minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 0,05%.

A ausência de folhas na presença de concentrações elevadas de NaCl limitou a análise de regressão. Entretanto, observa-se que o acesso Dores acumulou maior valor numérico de prolina sob estresse moderado (100 mM), apresentando possível resposta adaptativa inicial, ou seja, demonstrou melhor capacidade de ajuste osmótico sob estresse salino leve, enquanto o acesso Vitrine é menos tolerante. Os compostos osmoprotetores atuam na regulação da homeostase redox, facilitando a desintoxicação das espécies reativas de oxigênio (ROS), que se acumulam excessivamente em plantas sob condições de estresse (SEMIDA et al., 2021).

5.3.2. Quantificação de prolina no caule

O maior acúmulo de prolina foi detectado no caule em comparação com as folhas (Tabela 1). Nos resultados obtidos por Santos et al. (2011), folhas de microestacas de mangabeira também acumularam prolina em quantidades inferiores em comparação aos segmentos caulinares.

Aos 60 dias, ambos os acessos apresentaram respostas semelhantes. Houve um incremento nos teores de prolina em função do aumento da concentração de NaCl no meio de cultura (Figura 1), com resposta linear positiva, ou seja, o aumento do NaCl no meio de cultura promoveu maior acúmulo de prolina no caule das microestacas (Figura 2). O estresse salino induz a superprodução desse aminoácido nas plantas (GUAN et al., 2020; LOZANO-MONTAÑA et al., 2021).

A prolina atua como um importante osmorregulador, ajudando a manter o equilíbrio osmótico das células sob condições de estresse salino. Além disso, ela auxilia na neutralização dos efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio (EROS), reduzindo o dano oxidativo. Dessa forma, plantas que acumulam uma maior quantidade de prolina geralmente apresentam maior resistência à salinidade (AKBARI et al., 2018).

A variação do teor de prolina em diferentes concentrações de NaCl (0, 100, 150, 200 e 250 mM) ficou evidente na Figura 1, onde por meio de uma escala de cor rosa foi possível observar o acúmulo progressivo (maior intensidade indica maior concentração de prolina). O método utilizado para quantificar a prolina baseia-se na reação com ninidrina, reagente responsável por formar um complexo rosa/vermelho-amarelado na presença desse aminoácido, com absorbância máxima em ~520 nm (BATES et al., 1973). Esse aumento da prolina em concentrações elevadas de NaCl indica que o caule está ativando mecanismos de tolerância ao

sal. Esses resultados confirmam que a variação nos teores de prolina está diretamente relacionada à capacidade adaptativa das plantas às condições de salinidade. Há evidências em espécies como a *Simmondsia chinensis* (jojoba), em que o acúmulo de prolina livre funcionou como marcador metabólico em condições salinas (FAYEK et al., 2010).

O controle apresentou coloração rosa fraca, confirmando que o acúmulo de prolina é maior com a presença de NaCl em concentrações crescentes (Figura 1). Segundo a Lei de Beer-Lambert, a intensidade do rosa está diretamente relacionada à quantidade de prolina na amostra (relação linear entre absorbância e concentração). A salinidade induz a produção da prolina como osmólito protetor, mantendo o equilíbrio osmótico e protegendo proteínas e membranas celulares (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010).

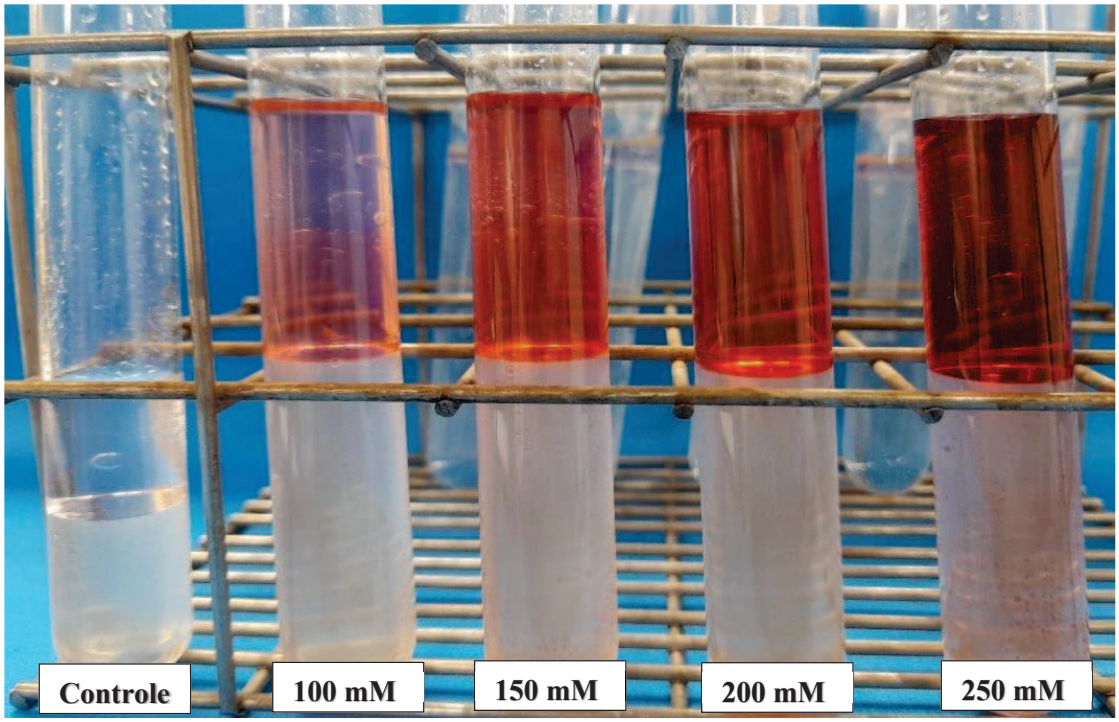


Figura 1. Amostras de sobrenadante oriundas do caule de microestaca de gliricídia sob diferentes concentrações de NaCl, onde a intensidade do rosa é diretamente proporcional à concentração de prolina na amostra.

O efeito das diferentes concentrações de NaCl foi altamente significativo ($p<0,05$) no acúmulo de prolina no caule das microestacas dos dois acessos, funcionando como uma molécula sinalizadora, uma vez que na presença de Na e Cl em excesso na rizosfera, o potencial osmótico do meio aumenta, comprometendo a capacidade de absorção de água pelas raízes, causando seca fisiológica (DOĞRU; CANAVAR, 2020).

O acúmulo de prolina representa uma das principais respostas metabólicas ao estresse em plantas, por ser um marcador fisiológico ativo em condições adversas (HAYAT et al., 2012) e, no presente estudo, este fator ficou evidente. Observou-se que o teor de prolina apresentou comportamento linear positivo aos 60 dias de cultivo para o acesso Dores, com uma correlação forte ($R^2= 0,87$), demonstrando um aumento significativo desse aminoácido nas amostras com o aumento da concentração de NaCl no meio de cultivo (Figura 2). Esse resultado reforça a hipótese de que o estresse salino induz respostas bioquímicas mensuráveis, como o acúmulo desse osmólito, em microestacas de gliricídia.

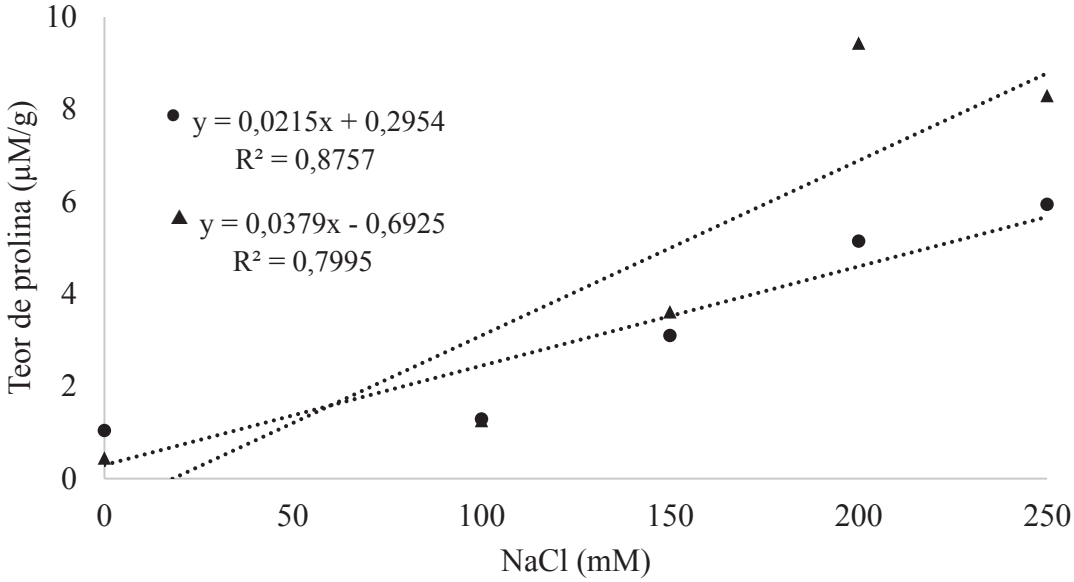


Figura 2. Teor de prolina no caule de microestacas de gliricídia cultivadas *in vitro* em função das concentrações de NaCl. ● Dores; ▲ Vitrine.

A produção de prolina no caule de microestacas de gliricídia no acesso Vitrine aumentou de forma proporcional ao aumento da salinidade do meio. Na análise de regressão, observou-se um comportamento linear positivo, onde concentrações crescentes de NaCl na solução aumentam significativamente a concentração desse aminoácido em relação à testemunha, sendo evidenciado pelo coeficiente de determinação (R^2= 0,79). De acordo com essa correlação, 79,95% da variação observada pode ser atribuída a salinidade, corroborando a ação de mecanismos de adaptação bioquímica em condições de estresse (Figura 2). De modo semelhante ao que foi observado neste estudo para os dois acessos de gliricídia, pesquisas com mandioca (CARDOSO et al., 2019), amaranto (MENEZES et al., 2017) e noni (COVA et al., 2016) também relataram elevação nos níveis de prolina sob condições salinas. Além de sua atuação fisiológica, a prolina apresenta potencial para ser empregada como marcador bioquímico auxiliar em programas de seleção de genótipos tolerantes à salinidade, especialmente em fases precoces de desenvolvimento ou em triagens *in vitro*. Sua quantificação relativamente simples, associada à estabilidade como indicador em diferentes tecidos, permite sua aplicação em protocolos de melhoramento assistido por fenótipos. Para espécies nativas ou subutilizadas, como *Gliricidia sepium*, que apresentam ampla diversidade genética em bancos de germoplasma, a utilização da prolina como critério complementar pode otimizar a identificação de materiais com maior capacidade adaptativa. Assim, os dados aqui apresentados fornecem subsídios importantes para a construção de estratégias de avaliação rápida e de baixo custo, com aplicabilidade direta na conservação e uso sustentável da variabilidade genética da espécie em ambientes com risco de salinização.

5.4. Conclusões

A prolina pode ser utilizada como um indicador bioquímico para a seleção de genótipos de gliricídia em testes preliminares *in vitro.*

5.5. Referências Bibliográficas

AGHDAM, M. S.; LUO, Z.; JANNATIZADEH, A.; SHEIKH-ASSADI, M.; SHARAFI, Y.; FARMANI, B.; FARD, J. R.; RAZAVI, F. O uso de melatonina exógena confere tolerância ao frio em frutos de tomate ao aumentar a expressão de ZAT2/6/12, resultando na promoção do

acúmulo de poliaminas endógenas, prolina e óxido nítrico, desencadeando a atividade da via da arginina. **Food Chemistry**, v. 275, p. 549-556, 2019.

AKBARI, M.; MAHNA, N.; RAMESH, K.; BANDEHAGH, A.; MAZZUCA, S. Homeostase iônica, osmorregulação e alterações fisiológicas nas raízes e folhas de porta-enxertos de pistache em resposta à salinidade. **Protoplasma**, v. 255, p. 1349-1362, 2018.

ARAB, M. M.; YADOLLAHI, A.; EFTEKHARI, M.; AHMADI, H.; AKBARI, M.; KHORAMI, S. S. Modeling and optimizing a new culture medium for in vitro rooting of G× N15 Prunus rootstock using artificial neural network-genetic algorithm. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-18, 2018.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for waterstress studies. **Plant Soil**, v.39, n.1, p.205-207, 1973.

BOUTHOUR, D.; KALAI, T.; CHAFFEI, H. C.; GOUIA, H.; CORPAS, F. J. Resposta diferencial de NADP-desidrogenases e metabolismo de carbono em folhas e raízes de duas cultivares de trigo duro (*Triticum durum* Desf.) (Karim e Azizi) com diferentes sensibilidades ao estresse salino. **Journal of Plant Physiology**, v. 179, p. 56-63, 2015.

CARDOSO, M. N.; ARAÚJO, A. G. D.; OLIVEIRA, L. A. R.; CARDOSO, B. T.; MUNIZ, A. V. C. S.; SANTOS, P. S. N.; OLIVEIRA, A. C. A.; MACHADO, C. A.; LEDO, A. S. Proline synthesis and physiological response of cassava genotypes under in vitro salinity. **Ciência Rural**, v. 49, n. 6, e20170175, 2019.

CARVALHO FILHO, O.M.; DRUMOND, M.A.; LANGUIDEY, P.H. ***Gliricidia sepium* leguminosa promissora para regiões semiáridas.** Petrolina, Embrapa/CPATSA, 1997. Disponível em: https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/131682/gliricidia-sepium-leguminosa-promissora-para-regioes-semi-aridas. Acesso em: 12 jun. 2025

CASTRO, F. C.; SANTOS, A. M. Salinidade do solo e risco de desertificação na região semiárida. **Mercador**, v. 19, p. e19002, 2020.

CORWIN, D. L. Climate change impacts on soil salinity in agricultural areas. **European Journal of Soil Science**, v. 72, n. 2, p. 842-862, 2021.

COVA, A. M. W.; AZEVEDO NETO, A. D.; RIBAS, R. F.; GHEYI, H. R.; MENEZES, R. V. Effect of salt stress on growth and contents of organic and inorganic compounds in noni (*Morinda citrifolia* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 43, p. 2401-2410, 2016.

DASGAN, H.Y.; AKTAS, H.; ABAK, K.; CAKMAK. I. Determination of screening techniques to salinity tolerance in tomatoes and investigation of genotypes responses. **Plant Sci**., v. 163, p. 695-703, 2002.

DE FREITAS, P. A. F.; DE SOUZA MIRANDA, R.; MARQUES, E. C.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. A tolerância ao sal induzida por prolina exógena em milho está relacionada a baixo dano oxidativo e homeostase iônica favorável. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 37, p. 911-924, 2018.

DOĞRU, A.; CANAVAR, S. Bitkilerde tuz toleransının fizyolojik e biyokimyasal bileşenleri. **Akademik Platform Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi**, v. 8, n. 1, p. 155-174, 2020.

EDVAN, R. L.; CARNEIRO, M. S. DE; SILVA, S. E. B.; ALBUQUERQUE D. R.; PEREIRA, E. S.; BEZERRA, L. R.; SILVA, A. L.; ARAÚJO, M. J. Análise de crescimento da gliricídia submetida a diferentes manejos de corte. **Archivos de Zootecnia**, v. 65, n. 250, p. 166, 2016.

FAO. **Global Map of Salt-Affected Soils**. Food and Agriculture Organization, 2024. 20p. Disponível em: https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/31be1fac-a057-4b6b-80ea-a4554910368c/content Acesso em: 3 jun. 2025

FAYEK, M. A.; SHAABAN, T. E. A.; ZAYED, N. S.; OBEIDY, A. A. B.; TABA, T. A. Effect of salt stress on chemical and physiological contents of jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider) using *in vitro* culture. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 6, p. 446-450, 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2014.

FOUGÈRE, F.; LE RUDULIER, D.; STREETER, J. G. Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant Physiology**, v. 96, n. 4, p. 1228-1236, 1991. DOI: 10.1104/pp.96.4.1228.

GHOSH, K.; ISLAM, N.; SIDDIQUI, N.; CAO, X.; KHAN, R. Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. **Plant Biology**, v. 24, p. 227-239, 2022.

GOMES, F. A.; RODRIGUES, E. N.; RODRIGUES, T. C.; SANTOS, V. J. N.; ALCÂNTARA, S. F.; DE SOUZA, F. N. Estresse hídrico e salino na germinação de sementes de feijão-caupi cv. BRS Pajeú. **Colloquium Agrariae**, v. 15, n. 4, p. 60-73, 2019.

GRYGIER, A.; CHAKRADHARI, S.; RATUSZ, K.; RUDZINSKA, M.; PATEL, K.S.; LAZDIN, D.; GORNAS, P. Seven underutilized species of the Fabaceae family with high potential for industrial application as alternative sources of oil and lipophilic bioactive compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 186, n. 115251, 2022.

GUAN, C.; CUI, X.; LIU, H.; LI, X.; LI, M.; ZHANG, Y. Proline biosynthesis enzyme genes confer salt tolerance to switchgrass (*Panicum virgatum* L.) in cooperation with polyamines metabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 46, 2020.

HAYAT, S.; HAYAT, Q.; ALYEMENI, M. N.; WANI, A. S.; PICHTEL, J.; AHMAD, A. Papel da prolina em ambientes em mudança: uma revisão. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, p. 1456-1466, 2012.

KAVI KISHOR, P. B.; SREENIVASULU, N. O acúmulo de prolina per se está correlacionado com a tolerância ao estresse ou a homeostase da prolina é uma questão mais crítica? **Plant, Cell & Environment**, v. 37, p. 300-311, 2014.

KHAN, M. A.; RAZA, A.; AWAN, S. A.; SHAH, G. A.; RIZWAN, M.; ALI, B.; HUANG, L. Melhoria da toxicidade induzida por sal em milheto perolado por meio da preparação de

sementes com nanopartículas de prata (AgNPs): o dano oxidativo, as enzimas antioxidantes e a captação de íons são os principais determinantes da capacidade de tolerância ao sal. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 156, p. 221-232, 2020.

LOZANO-MONTAÑA, P. A.; SARMIENTO, F.; MEJÍA-SEQUERA, L. M.; ÁLVAREZ-FLÓREZ, F.; MELGAREJO, L. M. Physiological, biochemical and transcriptional responses of *Passiflora edulis* Sims f. edulis under progressive drought stress. **Scientia Horticulturae**, v. 275, p. 109655, 2021.

MENEZES, R. V.; AZEVEDO NETO, A. D.; RIBEIRO, M. D. O.; COVA, A. M. W. Growth and contents of organic and inorganic solutes in amaranth under salt stress. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, n. 1, p. 22-30, 2017.

MUCHATE, N. S.; NIKALJE, G. C.; RAJURKAR, N. S.; SUPRASANNA, P.; NIKAM, T. D. Estresse Salino em Plantas: Respostas Adaptativas, Mecanismo de Tolerância e Bioengenharia para Tolerância ao Sal. **The Botanical Review**, v. 82, n. 4, p. 371-406, 2016.

NAHAR, K.; HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M. Funções dos Osmólitos na Adaptação de Plantas à Seca e à Salinidade. In: Osmólitos e Aclimatação de Plantas a Ambientes em Mudança: Tecnologias Ômicas Emergentes. **Springer Índia**, p. 37-68, 2016.

OLIVEIRA, A. P. D.; BAGALDO, A. R.; LOURES, D. R. S.; BEZERRA, L. R.; MORAES, S. A.; YAMAMOTO, S. M.; ARAÚJO, F. L.; CIRNE, R. L.; OLIVEIRA, R. L. Effect of ensiling gliricidia with cassava on silage quality, growth performance, digestibility, ingestive behavior and carcass traits in lambs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 241, p. 198-209, 2018.

PETRUSA, L. M.; WINICOV, I. Proline status in salt tolerant and salt sensitive alfalfa cell lines and plants in response to NaCl. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 4, p. 303-310, 1997.

SANTOS, M. D. A. C.; LEDO A. S.; LEDO, C. A. S.; SOUZA, F. V. D.; SILVA JUNIOR, J. F. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação in vitro de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p.735-741, 2011.

SEMIDA, W. M.; EL-MAGEED, A.; TAIA, A.; ABDELKHALIK, A.; HEMIDA, K. A.; ABDURRAHMAN, H. A.; RADY, M. O. O selênio modula a atividade antioxidante, osmoprotetores e a eficiência fotossintética da cebola em condições de solo salino. **Agronomy**, v. 11, n. 5, p. 855, 2021.

SINGH, D.; KAUR, S.; KUMAR, A. Tolerância à seca in vitro em clones elite selecionados de Eucalyptus tereticornis Sm. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, p. 17, 2020.

SOUZA, L. P.; NOBRE, R. G.; SILVA, E. M.; PINHEIRO, F. W. A.; ALMEIDA, L. L. S. Crescimento de porta-enxerto de goiabeira sob águas salinizadas e doses de nitrogênio. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 1, p. 53-60, 2015.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: A multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v. 15, p. 89-97, 2010.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, p. 753-759, 2008.

6. ARTIGO 3
MORFOFISIOLOGIA DE PLÂNTULAS DE *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp SUBMETIDAS A ESTRESSE HÍDRICO *IN VITRO*

RESUMO

O estresse hídrico é um dos principais fatores abióticos que afetam o crescimento e o desenvolvimento vegetal, sendo particularmente relevante em regiões com escassez de água. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do déficit hídrico induzido por diferentes concentrações de PEG 6000 em sementes e plântulas de *Gliricidia sepium* cultivadas *in vitro*. Foram realizadas análises morfológicas, histológicas e em microscopia eletrônica de varredura (MEV) em folhas e raízes. Os resultados indicaram que o aumento da concentração de PEG promoveu redução na porcentagem de germinação de sementes e no desenvolvimento de plântulas normais. Alterações estruturais foram observadas nas folhas, incluindo aumento dos espaços intercelulares, colapso celular e sinais de lignificação. As raízes apresentaram menor diâmetro cortical. Análises ultraestruturais revelaram uma redução na abertura estomática e desorganização da epiderme. Adicionalmente, foram observados aglomerados de sais de potássio, indicativos da presença de glândulas de sal atuando na eliminação de íons K+ em resposta ao estresse hídrico. Essas glândulas desempenham um mecanismo de tolerância à salinidade, evitando a toxicidade iônica e o desequilíbrio osmótico interno. Os resultados indicam que *G. sepium* responde ativamente ao estresse hídrico com modificações morfofisiológicas características de espécies adaptadas a ambientes áridos, o que pode favorecer sua seleção em programas de melhoramento voltados à tolerância à escassez hídrica.

Palavras-chave: *Gliricidia sepium*, anatomia, morfologia, MEV, estresses abióticos, PEG 6000.

ABSTRACT

Water stress is one of the main abiotic factors affecting plant growth and development, being particularly relevant in regions with water scarcity. This study aimed to evaluate the effects of water deficit induced by different concentrations of PEG 6000 on *Gliricidia sepium* seeds and seedlings grown *in vitro*. Morphological, histological, and scanning electron microscopy (SEM) analyses were performed on leaves and roots. The results indicated that increasing PEG concentrations led to a reduction in the percentage of seed germination and normal seedling development. Structural changes were observed in the leaves, including increased intercellular spaces, cell collapse, and signs of lignification. The roots showed a smaller cortical diameter. Ultrastructural analyses revealed a reduction in stomatal aperture and disorganization of the epidermis. Additionally, clusters of potassium salts were observed, indicative of the presence of salt glands acting to eliminate K+ ions in response to water stress. These glands play a role in salinity tolerance, preventing ionic toxicity and internal osmotic imbalance. The results indicate that *G. sepium* actively responds to water stress with morphophysiological modifications characteristic of species adapted to arid environments, which may favor its selection in breeding programs focused on tolerance to water stress.

Key-words: *Gliricidia sepium*, anatomy, morphology, SEM, abiotic stresses, PEG 6000.

6.1. Introdução

A espécie *Gliricidia sepium* é uma leguminosa que possui alta relevância comercial e econômica para regiões tropicais, pelas suas múltiplas funcionalidades de relevância agroecológica, podendo ser empregada como cerca viva, para o reflorestamento, como adubo verde e para a suplementação animal (RAHMAN et al., 2019). Essa cultura contribui para a ciclagem de nutrientes e eleva os teores de matéria orgânica no solo, em sistemas de consórcio com gramíneas ou outras culturas. Além disso, possui sistema radicular robusto e promove a fixação biológica de nitrogênio (KABA et al., 2019).

As mudanças climáticas representam uma das maiores ameaças ao desenvolvimento sustentável. Dentre os fatores ambientais intensificados pelas mudanças climáticas, que causam danos significativos aos processos fisiológicos e metabólicos das plantas, destaca-se o estresse hídrico (DU et al., 2020), um dos estresses abióticos mais estudados devido ao seu impacto direto na produtividade das culturas (FILIPPOU et al., 2014).

Nas plantas, déficit hídrico é detectado através das respostas fisiológicas à deficiência no abastecimento de água (IHUOMA; MADRAMOOTOO, 2017). A baixa disponibilidade de água para as plantas desencadeia alterações na anatomia, fisiologia e bioquímica dos vegetais, com graus de impacto distintos entre as espécies, afetando o crescimento e desenvolvimento das mesmas através da redução da área foliar (diminuição do crescimento ou senescência), redução da taxa fotossintética (fechamento dos estômatos), translocação de fotoassimilados e absorção de nutrientes (BERGAMASCHI et al., 2006; SINGH et al., 2015).

Apesar dos extensos estudos sobre os efeitos do estresse hídrico em plantas, há uma carência de informações específicas sobre como esse estresse afeta a morfofisiologia de *Gliricidia sepium* cultivada *in vitro*. Essa lacuna pode estar relacionada às particularidades do cultivo *in vitro*, que, ao isolar as plantas de condições ambientais naturais, modifica suas respostas fisiológicas em comparação com plantas cultivadas *in vivo*. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do déficit hídrico – induzido por diferentes concentrações de PEG 6000 – sobre sementes e plântulas de *G. sepium* cultivadas *in vitro*, buscando compreender como essa espécie se adapta a condições de escassez hídrica em um sistema controlado.

6.2. Material e Métodos

6.2.1. Material vegetal e condições de cultivo

As análises foram conduzidas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Tabuleiros Costeiros – Aracaju e no Instituto Tecnológico de Pesquisa – Universidade Tiradentes.

Inicialmente, as sementes de gliricídia (*Gliricidia sepium*) foram submetidas à assepsia fora da câmara de fluxo laminar, onde foram higienizadas com água corrente e sabão neutro e, posteriormente, foram levadas para dentro da câmara de fluxo laminar, onde a assepsia foi feita com a imersão em álcool 70% durante 1 min, hipoclorito de sódio (NaClO) 1% sob agitação por 20 min e três lavagens sucessivas em água destilada e esterilizada.

A simulação do estresse hídrico foi realizada com a inoculação das sementes em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio WPM, suplementado com 20 g/L de sacarose e concentrações de PEG 6000 (0, 70, 140 e 210 g/L).

Os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,8 ± 1, foram gelificados com Phytagel e autoclavados a 121 ºC e 1,0 atm por 15 min.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ºC ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas, umidade relativa do ar média em torno de 70% e intensidade luminosa de 60 μmol m^{-2} s^{-1}.

Aos 40 dias, foram avaliadas a porcentagem de germinação e porcentagem de plântulas normais. Todas as plântulas que desenvolveram parte aérea e raiz foram consideradas normais.

6.2.2. Análises histológicas

Após 60 dias de cultivo *in vitro*, foram retiradas amostras de folhas e raízes provenientes dos diferentes tratamentos. Esse material foi fixado em FAA 70% (Formaldeído, ácido acético glacial, etanol 70%) por 72 horas, desidratado em série etílica crescente (80%, 90% e 100%) em intervalos de 1 hora, pré-infiltrado e infiltrado em solução apropriada (kit de historesina Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha) e polimerizado em histomoldes. Foi realizada a microtomia com o auxílio de um micrótomo semiautomático (modelo YD335) utilizando cortes com a espessura de 8 μm que foram corados com azul de toluidina (pH 4.8) e observados em microscópio óptico, onde foram realizadas as fotomicrografias obtidas através de câmera digital acoplada ao microscópio.

6.2.3. Análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras de folhas e de raízes primárias foram retiradas dos tratamentos aos 60 dias de cultivo *in vitro*. O protocolo de fixação seguiu a metodologia proposta por Talbot & White (2013). Os tecidos foram fixados inicialmente em metanol 100% por 10 minutos e, em seguida, transferidos para etanol absoluto por 30 minutos. Essas amostras foram secas por ponto crítico utilizando o equipamento Tousimis Samdri – 795. Posteriormente, foram montadas em cilindros porta-amostra com fita dupla face, colocadas no equipamento Denton Vacuum Desk V para metalização com uma camada de ouro e, por fim, levadas para avaliação no microscópio eletrônico de varredura (MEV) JEOL JSM – IT200.

6.2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas

O desenho experimental realizado foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições, com três sementes por repetição.

Todas as médias obtidas das variáveis foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade através do software estatístico Sisvar versão 5.7 (FERREIRA, 2014).

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Análises de crescimento

O desenvolvimento das plântulas de gliricídia foi afetado à medida que se aumentou a concentração de PEG 6000 do meio, em que as maiores doses na solução reduziram o tamanho das plântulas em relação à testemunha (Figura 1). De acordo com Santos et al. (2016) e Gonçalves et al. (2020), a água é o fator que mais exerce influência no processo de germinação das sementes, uma vez que promove a reidratação dos tecidos e a retomada das atividades metabólicas do embrião. Entretanto, o PEG 6000, em elevadas concentrações, dificulta a absorção de água, impedindo que a semente complete o processo germinativo.

Figura 1. Plântulas de gliricídia obtidas *in vitro* no cultivo sob diferentes concentrações de PEG 6000.

As sementes reduziram significativamente o seu potencial germinativo e, consequentemente, a formação de plântulas normais em concentrações mais elevadas (Figura 2), pois o déficit hídrico dificulta a absorção de água, atrasando a ativação metabólica e a protrusão da radícula (TORRES et al., 2020).

As sementes tiveram boa germinação até a concentração 140 g L^{-1}, demonstrando que a espécie apresenta tolerância ao estresse hídrico (Figura 2). Resultados similares foram observados em outras espécies típicas de regiões semiáridas, como *Pilosocereus arrabidae* (Lem.), *Cereus jamacaru* subsp. jamacaru (Cactaceae), *Dimorphandra gardneriana* Tul. (Fabaceae) e Byles & Rowley (Cactaceae) (MEIADO et al., 2010; MARTINS et al., 2012; URSULINO et al., 2016).

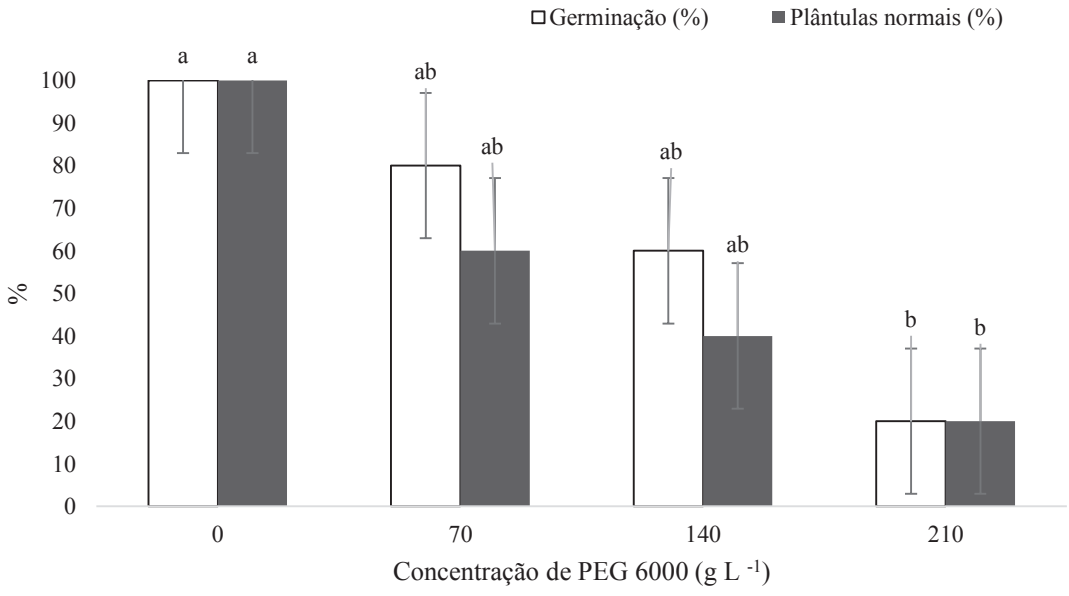


Figura 2. Porcentagem de germinação de sementes e formação de plântulas normais de gliricídia cultivadas *in vitro* aos 60 dias na presença de diferentes concentrações de PEG 6000. *Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 0,05%.

A porcentagem de germinação e de plântulas normais de gliricídia apresentou comportamento linear negativo aos 60 dias de cultivo, observando-se uma redução significativa com o aumento da concentração de PEG 6000 no meio de cultivo (Figura 3). Aos 60 dias de cultivo, foram observadas plântulas que emitiram radícula, mas não desenvolveram sistema radicular completo e parte aérea (folhas/brotos) em concentrações crescentes de PEG 6000. A maior concentração testada (210 g L^{-1}) apresentou a menor porcentagem de germinação e de formação de plântulas normais. O PEG inibe a germinação de sementes devido à redução na taxa de umidade das mesmas (BOUSBA et al., 2021).

A avaliação da porcentagem de germinação é um dos métodos mais utilizados para avaliar a tolerância das plantas ao estresse, isso porque a germinação é o evento mais importante e crítico no ciclo de vida das plantas, visto que assegura a continuidade dos processos fisiológicos que a planta necessita para se desenvolver. Dessa forma, o estresse no meio pode provocar alguns efeitos nas sementes, como distúrbios osmóticos, que pode ocasionar danos antes ou depois da germinação (GORDIN et al., 2012; LIMA et al., 2015; METIVIER, 1986).

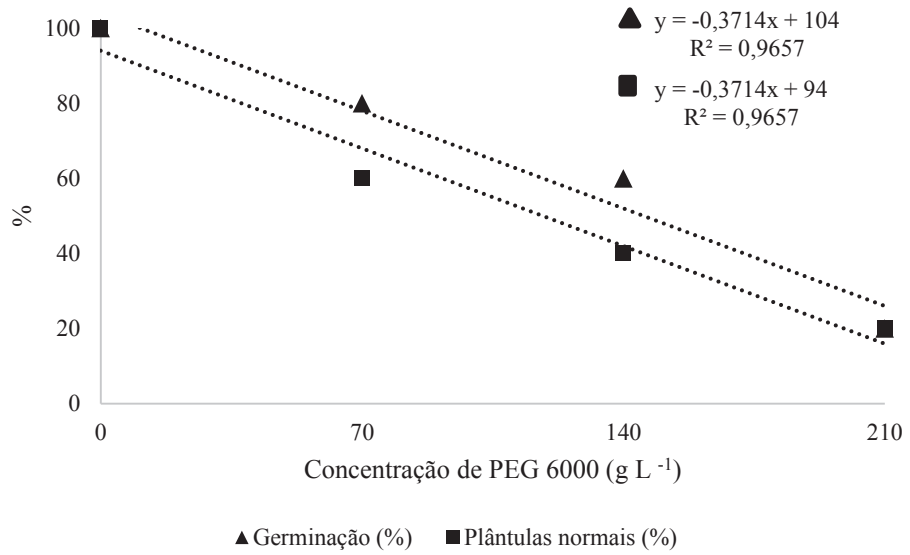


Figura 3. Germinação de sementes e formação de plântulas normais *in vitro* em função das concentrações de PEG 6000.

6.3.2. Análises histológicas

No controle, observou-se um parênquima bem desenvolvido com células de tamanho relativamente uniforme, com bom estado fisiológico, turgidez celular e menores espaços intercelulares perceptíveis. A epiderme apresentou-se com células bem definidas e regulares (Figura 4A). Já na folha sob estresse, as células apresentaram formato irregular, com aumento dos espaços intercelulares e colapso ou retração celular. A coloração mais intensa em algumas regiões pode representar o aumento de compostos fenólicos ou lignificação, sendo uma resposta comum em casos de estresse (Figura 4B). Esse efeito pode ser atribuído ao estresse osmótico causado pelo polietilenoglicol, o qual promove a expansão celular como resposta fisiológica (ELMAGHRABI et al., 2017).

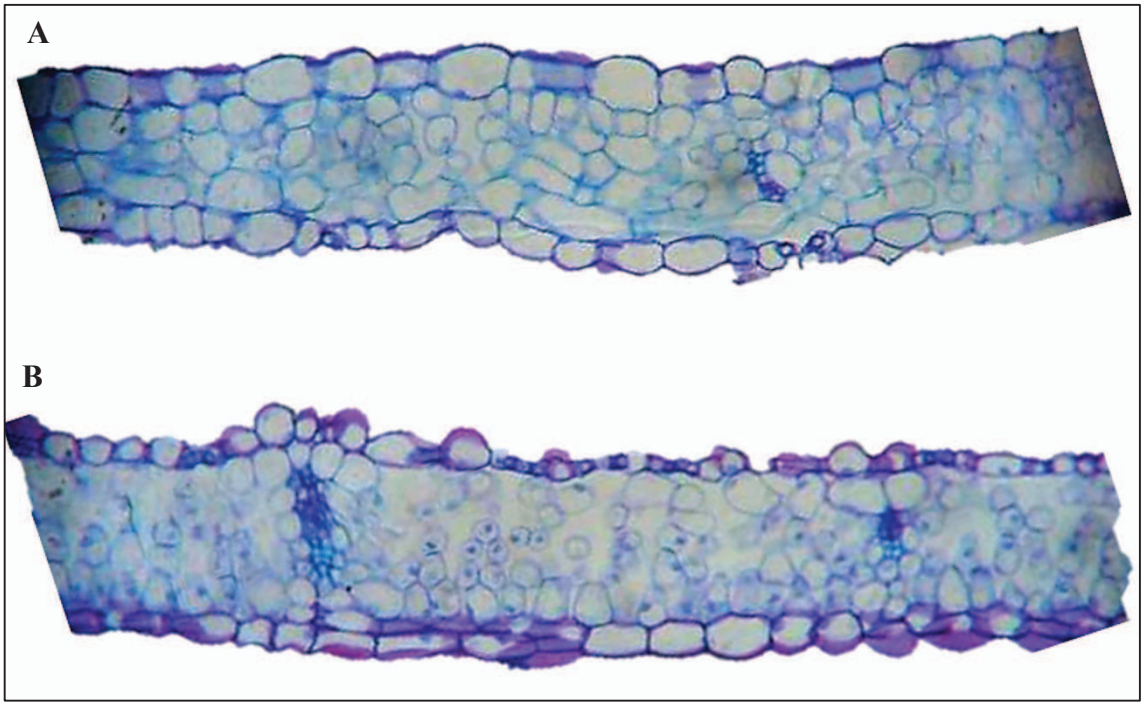


Figura 4. Cortes transversais de folhas de gliricídia analisadas sob microscopia óptica, coradas com azul de toluidina. **A** – Controle (sem estresse); **B** – Sob estresse hídrico induzido por PEG 6000 (210 g L^{-1}).

A análise da anatomia das secções transversais das raízes de plântulas de *Gliricidia sepium* cultivadas *in vitro* apresentou alterações estruturais significativas sob diferentes condições hídricas simuladas com PEG 6000. A organização celular da raiz no controle mostrou-se com córtex composto por células parenquimáticas de grande diâmetro, paredes celulares delgadas e disposição regular. A região do cilindro central apresentou-se bem delimitada, sem sinais de colapso celular ou alterações evidentes (Figura 5A). Em condições de estresse hídrico, genótipos tolerantes tendem a apresentar um crescimento no comprimento radicular, enquanto os sensíveis demonstram uma redução no tamanho das raízes (MAQBOOL et al., 2022).

Em contraste, observou-se sob a maior concentração de PEG 6000 que as células do córtex apresentaram menor diâmetro. Esse resultado corrobora os achados de Burnett et al. (2005), que observaram uma redução característica no diâmetro do caule e do floema, em resposta ao incremento nas concentrações de PEG. Também houve maior compactação, com coloração azul intensa na região central, provavelmente devido à deposição de compostos fenólicos e lignificação (Figura 5B). Há estudos que indicam que a formação de vasos condutores de menor diâmetro, inseridos em tecidos lignificados, resulta em fluxo hídrico reduzido (CARLQUIST, 1975).

Conforme destacado por Pereira et al. (2008), a espessura do córtex radicular apresenta uma correlação direta com a condutividade hidráulica, influenciando a eficiência do transporte de água nas plantas.

As alterações na estrutura das raízes, como a desorganização do córtex e o colapso parcial de células parenquimáticas, sugerem prejuízos à condução de água e à absorção de nutrientes. Tais modificações podem afetar diretamente a eficiência do sistema radicular e contribuir para a limitação do crescimento observado nas plântulas expostas às maiores concentrações de PEG, indicando uma possível resposta de comprometimento funcional associada ao estresse osmótico.

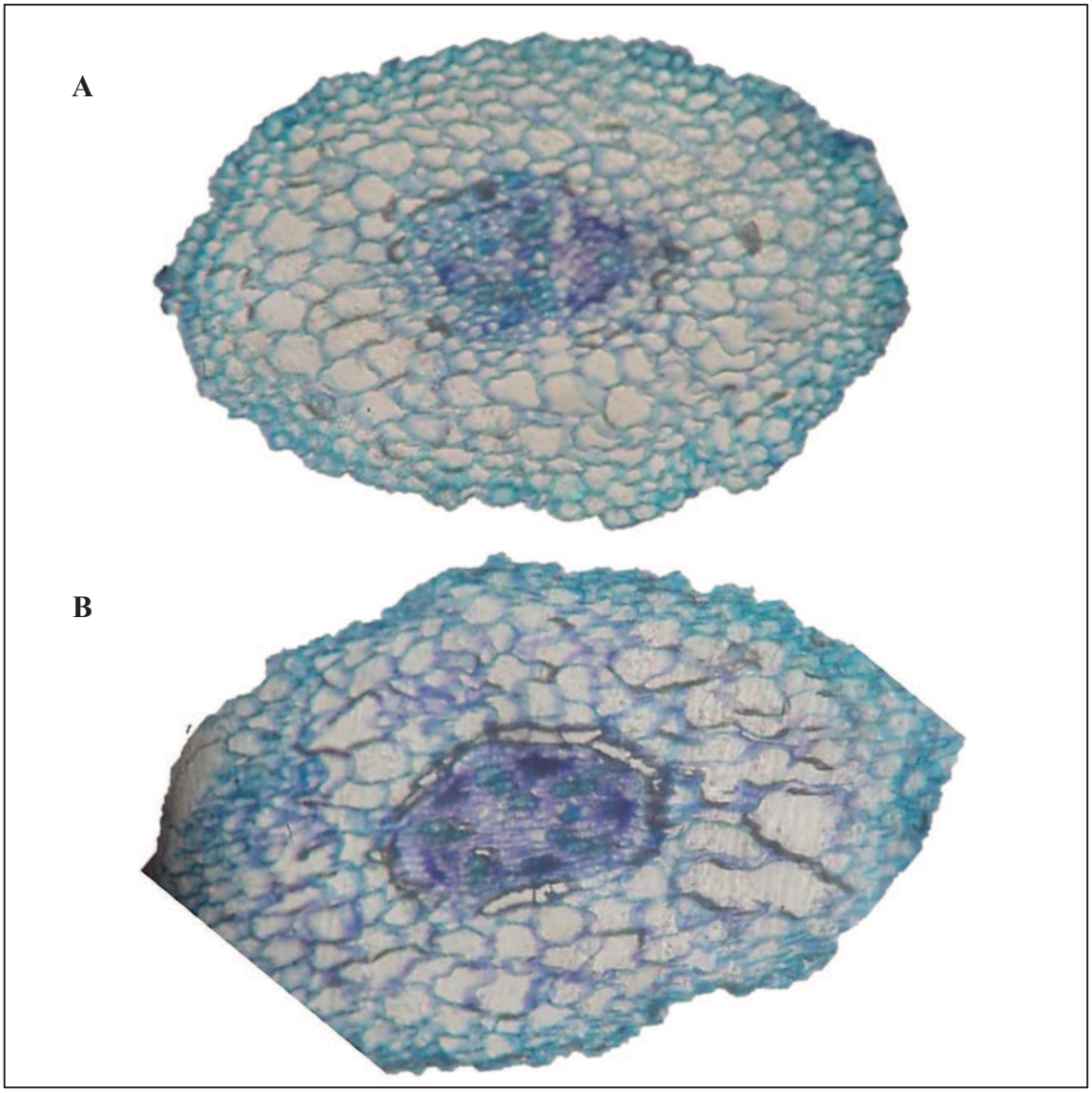


Figura 5. Secções transversais de raízes de plântulas cultivadas *in vitro* de gliricídia, coradas com azul de toluidina. **A** – Controle; **B** – Sob estresse hídrico induzido por PEG 6000 (210 g L^{-1}).

6.3.3. Análises em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises ultraestruturais das folhas de *Gliricidia sepium*, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), revelaram alterações morfológicas marcantes na epiderme e nos estômatos em resposta ao estresse hídrico simulado por PEG 6000. No controle (Figura 6), as células epidérmicas apresentaram-se bem organizadas, com contornos regulares e cutícula lisa, com estômatos amplamente distribuídos e em maior número (Figura 6A), com ostíolos bem abertos em sua maioria (Figura 6C). Este resultado está em concordância com diversos estudos que reportam maiores aberturas estomáticas em folhas cultivadas *in vitro* em comparação com folhas desenvolvidas *ex vitro* (ALINIAEIFARD et al., 2020). Também foram observadas estruturas globulares densamente distribuídas na região adjacente ao ostíolo estomático, que são compatíveis com células secretoras de potássio (K) (Figura 6B). A ativação dos canais de efluxo de K^+ desencadeia a liberação simultânea de íons e ânions de potássio acompanhados por efluentes de água. Essa perda osmótica resulta na redução da pressão de turgor nas células-guarda, culminando no fechamento estomático (PANDEY & ZHANG, 2007). Na Figura 6D é possível observar a presença de tricomas tectores no pecíolo da superfície abaxial da folha.

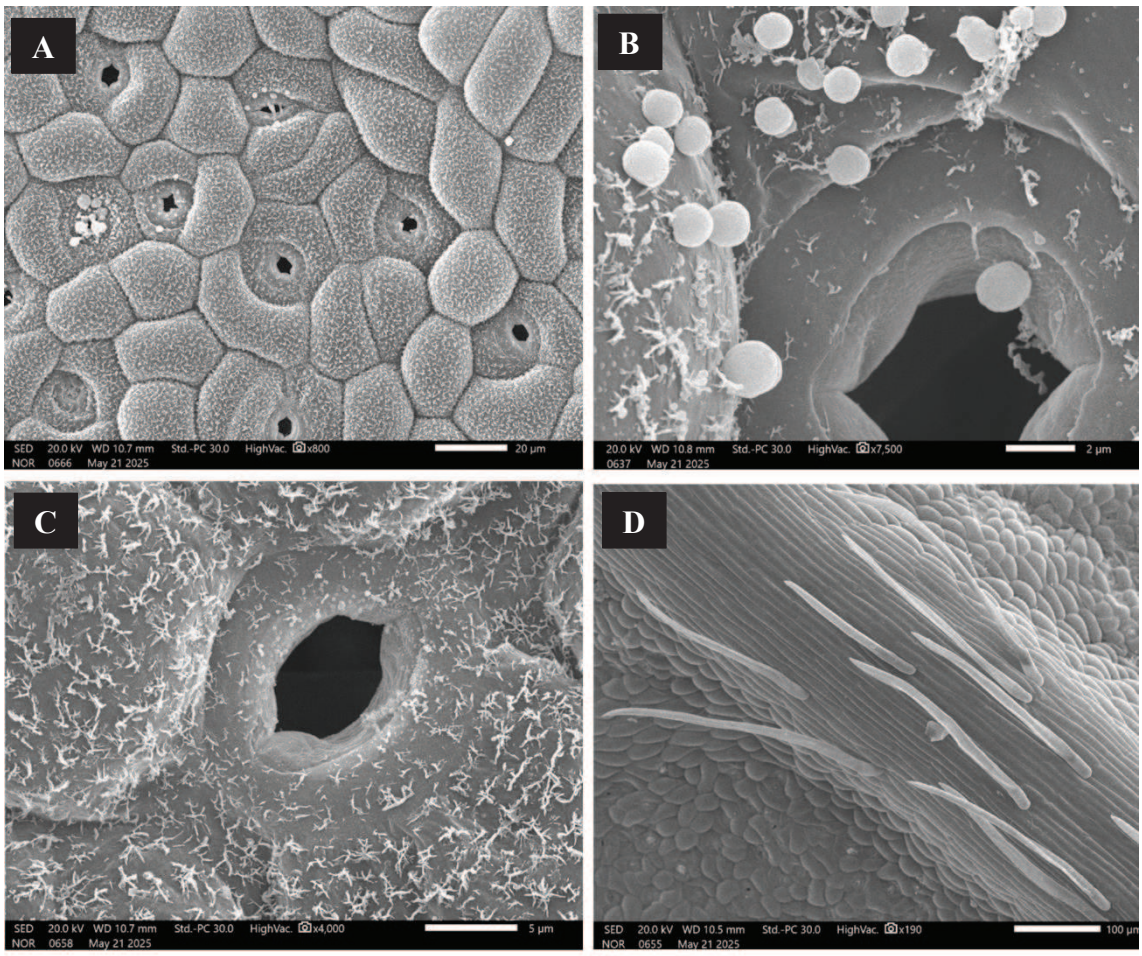


Figura 6. Folhas de gliricídia do tratamento controle em microscopia eletrônica de varredura (MEV). **A** – Predominância de estômatos abertos; **B** – Estômatos secretando potássio; **C** – Célula estomática aberta; **D** – Tricomas.

A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada à espectroscopia de dispersão de energia (EDS) demonstrou a presença de estruturas especializadas com atividade secretora localizada na epiderme foliar. Apesar da sua utilização predominante nas ciências dos materiais, essa técnica de MEV-EDS apresenta diversas aplicações em estudos biológicos, como sua utilização para o mapeamento espacial da distribuição de cádmio (Cd) em tecidos foliares de *Lemna polyrhiza* (L.), permitindo a análise da acumulação desse metal pesado em estruturas celulares específicas (UNADKAT & PARIKH, 2019).

Na micrografia (Figura 7A), há uma célula epidérmica contendo vesículas esféricas próximas à região estomática. No mapeamento químico da amostra (Figura 7B), evidenciou-se forte sinal de fluorescência para potássio (K), inferindo acúmulo desse elemento nas estruturas intracelulares identificadas. O espectro de energia (Figura 7C) confirmou a presença de alguns elementos, com um pico expressivo de potássio (K) para a região em destaque. O potássio K^+ constitui o principal cátion inorgânico no citosol vegetal. Esse macronutriente desempenha funções fisiológicas importantes, como homeostase osmótica, modulação da atividade enzimática e eficiência do aparato fotossintético (RAGEL et al., 2019). Durante o estresse hídrico, o potássio (K^+) age na manutenção da homeostase osmótica, conservando turgescência celular e regulando a abertura e fechamento dos estômatos, o que reduz a perda de água por transpiração e melhora a eficiência no uso hídrico da planta (XU et al., 2021). Além disso, o K^+ é fundamental para a atividade enzimática, ativando enzimas relacionadas à fotossíntese e ao metabolismo energético, garantindo a produção de ATP necessária para processos metabólicos e reparos celulares durante o déficit hídrico (FARAHANI et al., 2018). O potássio também contribui para a eficiência do aparato fotossintético, mantendo a fixação de carbono e

facilitando o transporte de fotoassimilados, minimizando impactos negativos do estresse sobre o crescimento e produtividade.

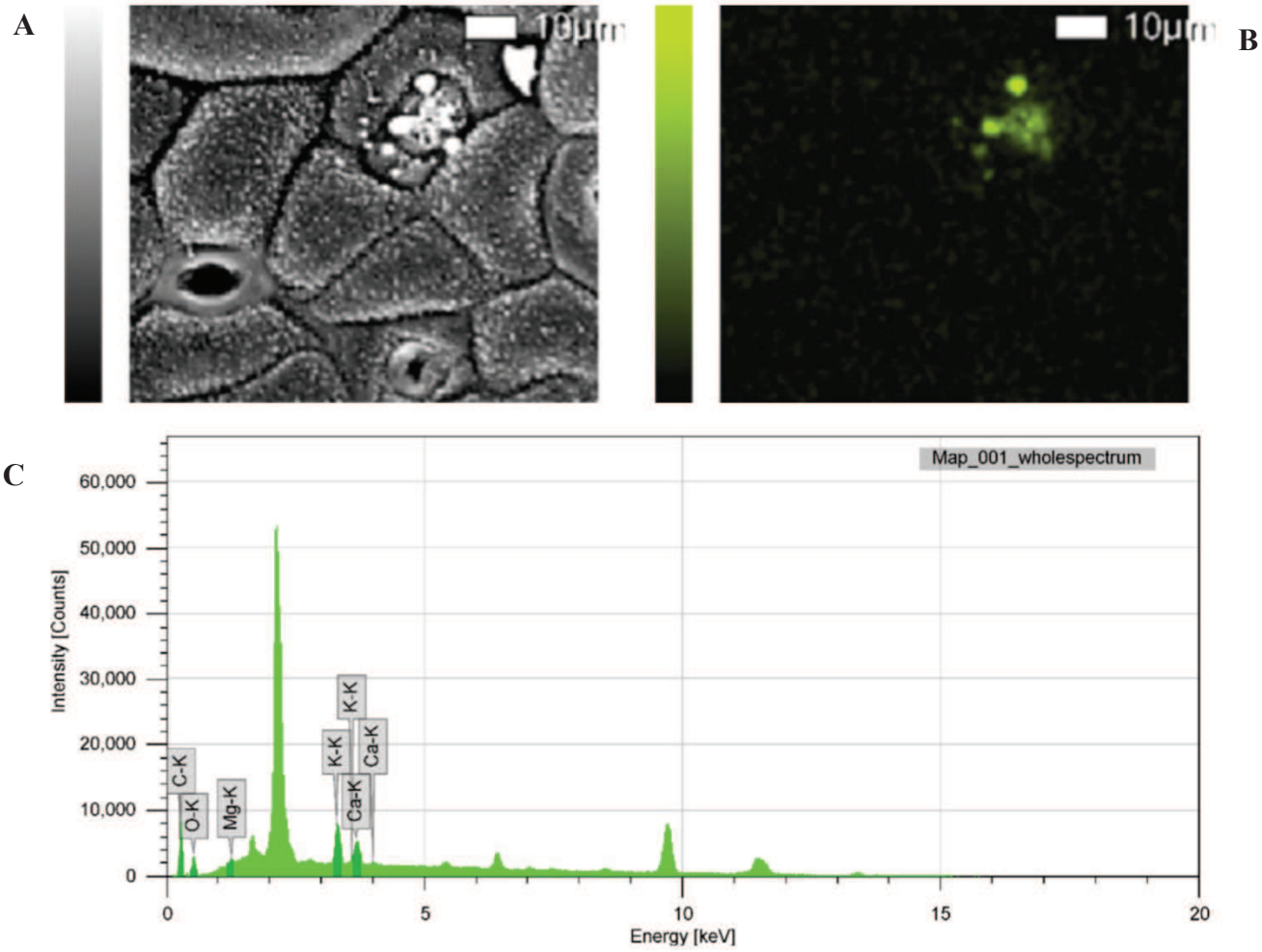


Figura 7. Mapeamento elementar por EDS de potássio em células epidérmicas de *Gliricidia sepium*. **A** – Micrografia em MEV; **B** – Mapeamento evidenciando a distribuição de potássio (K) na área específica; **C** – Espectro EDS confirmando a presença majoritária do elemento K.

Sob estresse hídrico (Figura 8), foram observadas uma série de alterações estruturais. As células epidérmicas apresentaram-se menos definidas e com depressões na superfície (Figura 8A); os estômatos estavam em menor número e, quando presentes, mostravam-se com os ostíolos entreabertos ou completamente fechados, em sua maioria (Figura 8B e C). O fechamento estomático surge como o principal mecanismo de defesa contra o déficit hídrico, sendo mediado por alterações estruturais nas células-guarda. Estudos têm demonstrado que, sob estresse, ocorre um espessamento diferencial e maior lignificação das paredes ventrais em comparação às paredes dorsais dessas células, favorecendo o fechamento dos estômatos (ABD ELBAR et al., 2019). Arve et al. (2011) demonstraram que a redução na abertura estomática limita a absorção de CO_2, diminuindo consequentemente a taxa de transpiração.

Observou-se uma redução significativa na densidade e integridade dos tricomas tectores no pecíolo e nas extremidades da superfície abaxial das folhas. Estes apresentaram-se deformados, rompidos ou ausentes em determinadas áreas da superfície foliar (Figura 8D). De maneira geral, as diferentes espécies de plantas adotam estratégias semelhantes para resistir ao estresse hídrico, envolvendo principalmente a redução da área foliar, presença de espinhos e pelos curtos e folhas revestidas por cera (MARENCO & LOPES, 2005).

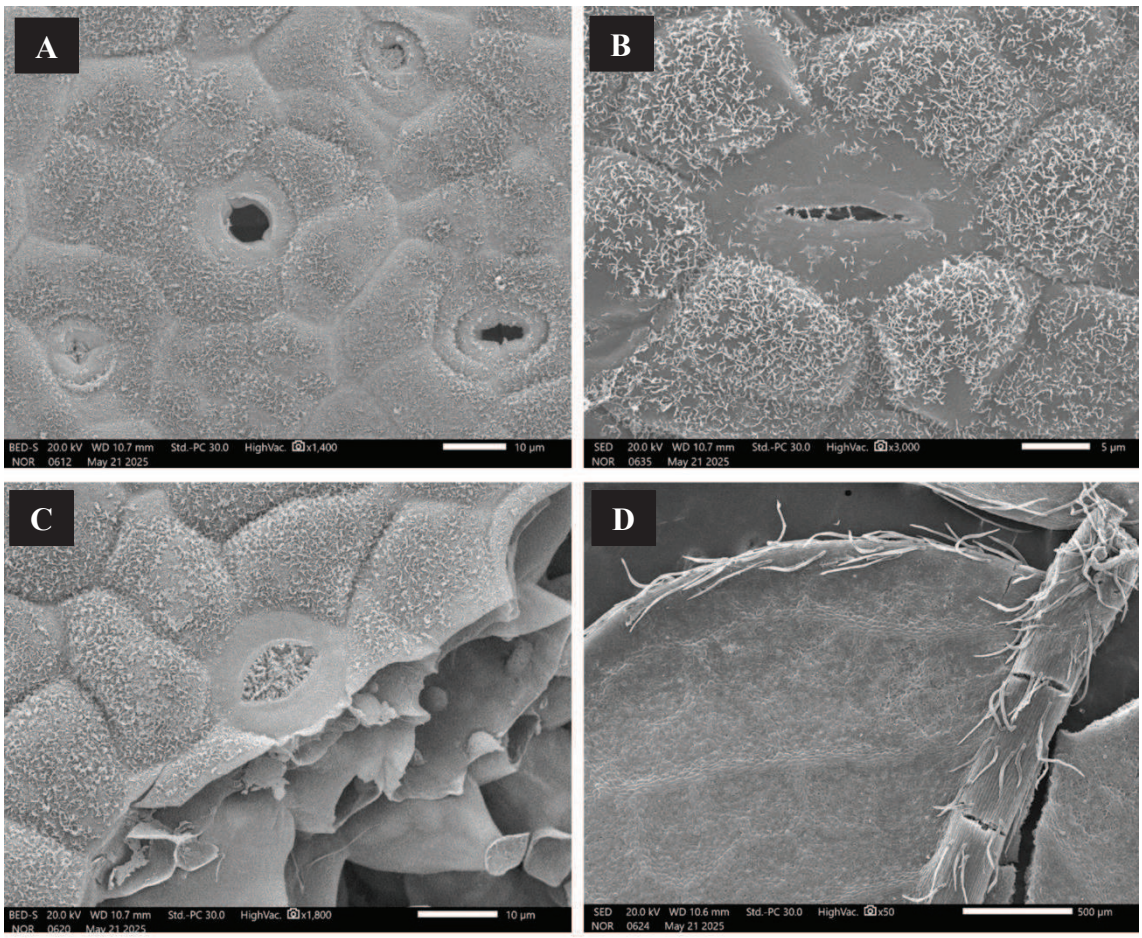


Figura 8. Folhas de gliricídia dos tratamentos com maiores concentrações de PEG 6000 em microscopia eletrônica de varredura (MEV). **A** – Predominância de estômatos fechados e entreabertos; **B** – Célula estomática entreaberta; **C** – Célula estomática fechada; **D** – Tricomas.

Na análise ultraestrutural das raízes primárias de gliricídia por microscopia eletrônica de varredura, foram observadas superfícies relativamente lisas e contínuas, com epiderme estruturalmente organizada no controle (Figura 9A). A raiz primária sob estresse apresentou desorganização da epiderme, com superfície irregular e presença de fissuras (Figura 9B). A escassez de água é detectada primeiramente pelas raízes da planta, desencadeando adaptações moleculares e morfológicas para a sua proteção (KIM et al., 2020). A redução da espessura do mesófilo observada nas folhas submetidas ao estresse hídrico pode comprometer diretamente a capacidade fotossintética das plântulas. Essa diminuição implica menor volume de parênquima clorofiliano, o que reduz a superfície de contato entre as células fotossintéticas e os espaços intercelulares, limitando a difusão interna de CO_2. Além disso, o número de cloroplastos por unidade de área foliar tende a diminuir, uma vez que está relacionado ao volume celular total disponível. Essa menor densidade funcional de cloroplastos, associada à possível descontinuidade nos espaços intercelulares, eleva a resistência difusiva ao CO_2 e reduz a eficiência da carboxilação. Em conjunto, essas alterações anatômicas contribuem para a limitação da assimilação de carbono em ambientes sob déficit hídrico severo.

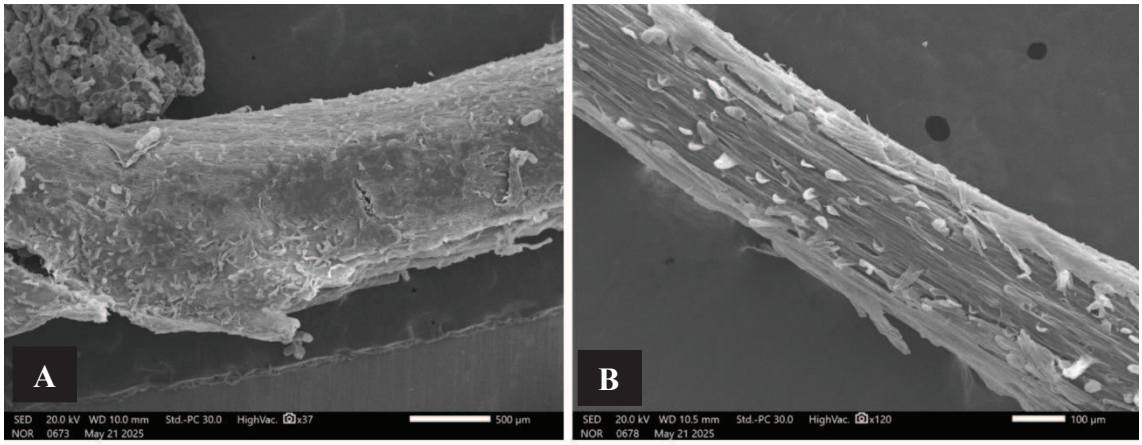


Figura 9. Raízes primárias de gliricídia do controle (A) e dos tratamentos com maiores concentrações de PEG 6000 (B) em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

6.4. Conclusões

Altas concentrações de PEG 6000 reduziram o potencial germinativo das sementes e o desenvolvimento de plântulas normais de *G. sepium* cultivadas *in vitro*.

A presença de estruturas secretoras de potássio sugere um possível mecanismo osmoprotetor.

G. sepium é sensível a altas concentrações de PEG, mas apresenta adaptações estruturais de resposta ao estresse.

6.5. Referências Bibliográficas

ABD ELBAR, O. H.; FARAG, R. E.; SHEHATA, S. A. Effect of putrescine application on some growth, biochemical and anatomical characteristics of *Thymus vulgaris* L. under drought stress. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 64, p. 129-137, 2019.

ALINIAEIFARD, S.; ASAYESH, Z. M.; DRIVER, J.; VAHDATI, K. Stomatal features and desiccation responses of *Persian walnut* leaf as caused by in vitro stimuli aimed at stomatal closure. **Trees**, v. 34, p. 1219-1232, 2020.

ARVE, L.; TORRE, S.; OLSEN, J.; TANINO, K. Stomatal responses to drought stress and air humidity. In: **Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and Adaptations**. London: Intech Open, 2011.

BERGAMASCHI, H.; DALMAGO, G. A.; COMIRAN, F.; BERGONCI, J. I.; MÜLLER, A. G.; FRANÇA, S.; SANTOS, A. O.; RADIN, B.; BIANCHI, C. A. M.; PEREIRA, P. G. Déficit hídrico e produtividade na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 243-249, 2006.

BOUSBA, R.; BOUNAR, R.; SEDRATI, N.; LAKHAL, R.; HAMLÀ, C.; RACHEDKANOUNI, M. Effects of osmotic stress induced by polyethylene glycol (PEG) 6000 and mannitol on seed germination and seedling growth of durum wheat. **Journal of Bioresource Management**, 2021. DOI: 10.35691/JBM.1202.0195.

BURNETT, S. E.; PENNISI, S. V.; THOMAS, P. A.; VAN IERSEL, M. W. Controlled drought affects morphology and anatomy of *Salvia splendens*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 130, n. 5, p. 775-781, 2005.

DU, Y.; ZHAO, Q.; CHEN, L.; YAO, X.; ZHANG, W.; ZHANG, B.; XIE, F. Effect of drought stress on sugar metabolism in leaves and roots of soybean seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 146, p. 1-12, 2020.

ELMAGHRABI, A. M.; ROGERS, H. J.; FRANCIS, D.; OCHATT, S. J. PEG induces high expression of the cell cycle checkpoint gene WEE1 in embryogenic callus of *Medicago truncatula*: potential link between cell cycle checkpoint regulation and osmotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1479, 2017.

FARAHANI, H. A. et al. Potassium: a vital regulator of plant responses and tolerance to abiotic stresses. **Agronomy**, v. 8, n. 3, p. 31, 2018. DOI: 10.3390/agronomy8030031.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2014.

FILIPPOU, P.; BOUCHAGIER, P.; SKOTTI, E.; FOTOPOULOS, V. Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 97, p. 1-10, 2014.

GONÇALVES, M. D. P. M.; FELICIANO, A. L. P.; SILVA, A. P.; SILVA, L. B.; SILVA, K. M. JÚNIOR, F. S. S.; GRUGIKI, M. A.; SILVA, M. I. O. Influência de diferentes tipos de solos da Caatinga na germinação de espécies nativas. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 1, p. 1216-1226, 2020.

GORDIN, C. R. B.; MARQUES, R. F.; MASETTO, T. E.; SOUZA, L. C. F. Estresse salino na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de niger (*Guizotia abyssinica* (L.F) Cass.). **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 4, p. 966-972, 2012.

IHUOMA, S. O.; MADRAMOOTOO, C. A. Recent advances in crop water stress detection. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 141, p. 267-275, 2017.

KABA, J. S.; ZERBE, S.; AGNOLUCCI, M.; SCANDELLARI, F.; ABUNYEWA, A. A.; GIOVANNETTI, M.; TAGLIAVINI, M. Atmospheric nitrogen fixation by gliricidia trees (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp.) intercropped with cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Plant and Soil**, v. 435, p. 323-336, 2019.

KIM, Y.; CHUNG, Y. S.; LEE, E.; TRIPATHI, P.; HEO, S.; KIM, K. H. Root response to drought stress in rice (*Oryza sativa* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 1513, 2020.

LIMA, M. F. P.; PORTO, M. A. F.; TORRES, S. B.; FREITAS, R. M. O.; NOGUEIRA, N. W.; CARVALHO, D. R. Emergência e crescimento inicial de plântulas de albízia submetidas à irrigação com água salina. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 2, p. 106-112, 2015.

MAQBOOL, M.; AHMAD, S.; KAINAT, S.; KHAN, Z.; MAQBOOL, M. I.; HASSAN, A.; RASHEED, M. A.; HE, A. Root system architecture of historical spring wheat cultivars is associated with alleles and transcripts of major functional genes. **BMC Plant Biology**, v. 22, p. 590, 2022.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 451 p.

MARTINS, L. S. T.; PEREIRA, T. S.; CARVALHO, A. S. R.; BARROS, C. F.; ANDRADE, A. C. S. Seed germination of *Pilosocereus arrabidae* (Cactaceae) from a semiarid region of south-east Brazil. **Plant Species Biology**, v. 27, n. 3, p. 191-200, 2012.

MEIADO, M. V.; ALBUQUERQUE, L. S. C.; ROCHA, E. A.; ROJASARÉCHIGA, M.; LEAL, I. R. Seed germination responses of *Cereus jamacaru* DC. ssp. *jamacaru* (Cactaceae) to environmental factors. **Plant Species Biology**, v. 25, n. 2, p. 120-128, 2010.

METIVIER, J. R. Dormência e germinação. In: FERRI, M. G. (Coord.). **Fisiologia vegetal**. 2. ed. São Paulo: EPU, 1986. p. 343-392.

PANDEY, S.; ZHANG, W.; ASSMANN, S. M. Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2325-2336, 2007.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M. D.; SOUZA, T. C. D.; MAGALHÃES, P. C. Evolution of the root anatomy of 'Saracura' maize in successive selection cycles. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1649-1656, 2008.

RAGEL, P.; RADDATZ, N.; LEIDI, E. O.; QUINTERO, F. J.; PARDO, J. M. Regulation of K+ nutrition in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 281, 2019.

RAHMAN, M.; DAS, A.; SAHA, S.; UDDIN, M.; RAHMAN, M. Morphophysiological response of *Gliricidia sepium* to seawaterinduced salt stress. **Agriculturists**, v. 17, p. 66-75, 2019. DOI: 10.3329/agric.v17i1-2.44697.

SANTOS, C. A.; SILVA, N. V.; SIQUEIRA WALTER, L.; SILVA, E. C. A.; CUSTÓDIO NOGUEIRA, R. J. M. Germinação de sementes de duas espécies da caatinga sob déficit hídrico e salinidade. **Brazilian Journal of Forest Research**, v. 36, p. 87, 2016.

CARLQUIST, S. **Ecological Strategies of Xylem Evolution**. Berkeley: University of California Press, 1975.

SINGH, M.; BHARDWAJ, S.; HUSEIN, A.; KHAN, N. A.; ANAND, A.; SHARMA, P. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. **Review in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 14, p. 407-426, 2015.

TALBOT, M. J.; WHITE, R. G. Methanol fixation of plant tissue for Scanning Electron Microscopy improves preservation of tissue morphology and dimensions. **Plant Methods**, v. 9, p. 36, 2013. DOI: 10.1186/1746-4811-9-36.

TORRES, M. F. O.; DANTAS, S. J.; SOUZA, J. L.; NUNES, V. N.; CALAZANS, C. C.; FERREIRAS, O. J. M.; SILVAMANN, R.; FERREIRA, R. A. Curva de embebição e viabilidade de sementes de *Sapindus saponaria* L. **Global Science and Technology**, v. 13, n. 1, p. 211-218, 2020.

UNADKAT, K.; PARIKH, P. Localization of Cadmium metal ion in *Lemna polyrhiza* L. using SEM morphology and EDX analysis. **Environmental Conservation Journal**, v. 20, p. 81-86, 2019.

URSULINO, M. M.; COSTA, M. D. P. S. D.; MEDEIROS, J. G. F.; ALVES, E. U.; ARAÚJO, P. C.; BRUNO, R. D. L. A.; ARAÚJO, L. R. D. Seed viability of *Dimorphandra gardneriana* subject to water stress in different temperatures. **Ciência Rural**, v. 46, n. 12, p. 2090-2095, 2016.

XU, Q. et al. Potassium improves drought stress tolerance in plants by affecting root morphology, root exudates and microbial diversity. **Metabolites**, v. 11, n. 3, p. 131, 2021. DOI: 10.3390/metabo11030131.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, foi possível observar que os estresses abióticos salino e hídrico afetam significativamente o desenvolvimento *in vitro* de *Gliricidia sepium*, promovendo alterações morfológicas, fisiológicas e anatômicas nos acessos avaliados.

As análises histológicas e em microscopia eletrônica de varredura confirmaram a ocorrência de alterações anatômicas em folhas e raízes, como espessamento de tecidos, deformações celulares e modificações na densidade estomática.

A visualização da distribuição de potássio e o acúmulo de prolina demonstraram os mecanismos fisiológicos ativos de osmorregulação e proteção celular da espécie, que podem ser explorados em programas de melhoramento genético para ambientes com limitações hídricas ou salinas.

Estes resultados podem contribuir com informações relevantes para o manejo de *Gliricidia sepium* em condições adversas.

A aplicação de técnicas biotecnológicas, como a cultura de tecidos, associada a análises fisiológicas e anatômicas, mostrou-se eficiente para estudos de tolerância ao estresse abiótico.