

## Desenvolvimento inicial *in vitro* de gliricídia em diferentes níveis de salinidade

F. P. Sá<sup>1</sup>; C. O. Sá<sup>2</sup>; J. L. Sá<sup>3</sup>; J. A. E. Amorim<sup>1</sup>; T. S. A. Menezes<sup>4</sup>; A. S. Lédo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UFS/Embrapa Tabuleiros Costeiros, CEP 49025040, Aracaju-SE, Brasil.

<sup>2</sup>Embrapa Tabuleiros Costeiros, CEP 49025040, Aracaju-SE, Brasil.

<sup>3</sup>Embrapa Semiárido, CEP56302970, Petrolina-PE, Brasil.

<sup>4</sup>UFS/Universidade Federal de Sergipe, CEP 49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

(Recebido em 10 de setembro de 2013; aceito em 03 de abril de 2014)

A salinização é um processo comum nas regiões semiáridas do Brasil, provocado principalmente por ações antrópicas como manejo inadequado da irrigação e/ou em razão ao déficit de precipitação em relação à evapotranspiração. O acúmulo de sais nas camadas superficiais do solo prejudica o desenvolvimento das plantas, gerando problemas econômicos e ambientais, como menor produtividade das culturas e, degradação e abandono da terra. Diante disso, os sistemas agrossilvipastoris são indicados para recuperação de tais áreas e, uma das espécies indicadas para compor este sistema é a gliricídia. Existem poucos trabalhos relacionados com a tolerância desta espécie à salinização. O objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação e o crescimento inicial de sementes de gliricídia cultivadas *in vitro* sob diferentes níveis de estresse salino. Sementes foram inoculadas em meio MS e submetidas a diferentes concentrações de NaCl (0, 30, 60, 90 e 120 mM). Após 30 e 60 dias de cultivo *in vitro* foram avaliados o percentual de germinação e de plântulas normais, o comprimento da parte aérea e a viabilidade das plântulas. O maior tempo de exposição das sementes de gliricídia ao estresse salino promoveu os maiores resultados para todas as variáveis analisadas, exceto para viabilidade. Ocorreu a redução de 5% da porcentagem de germinação das sementes inoculadas no meio de cultura suplementado com a maior concentração de NaCl em relação à testemunha. Contudo, o aumento da concentração de NaCl promoveu uma redução na porcentagem de plântulas normais, sugerindo que gliricídia seja sensível ao estresse salino durante seu desenvolvimento inicial *in vitro*.

Palavras-chave: salinidade, *Gliricidia sepium*, cultivo *in vitro*

### Initial development *in vitro* of gliricidia in different levels of salinity

The salinity is a common process in semiarid regions of Brazil, caused mainly for anthropogenic action as inadequate irrigation management and/or due to rainfall deficit relative to evapotranspiration. The accumulation of salts in the superficial layers of soil affect the plant development, resulting an economic and environmental problems, like lower crop yields and land degradation and abandonment. Therefore, the agroforestry systems was indicated to recover these areas and, the gliricidia is one species indicated for compose this systems. There are few works related with salinity tolerance of this species. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* germination and initial development of gliricidia cultivated at different levels of salt stress. Seeds was inoculated in cultured medium consisted of MS salts and different concentrations of sodium chloride (0, 30, 60, 90 e 120 mM). After 30 and 60 days of *in vitro* culture were evaluated the percentage of seed germination and normal plantlets, shoot length and plantlet viability. The longer exposure of seeds to salt stress promoted the greatest results for all variables analyzed, except for viability. Occurred reduction of 5% in germination of the seeds inoculated in a culture medium supplemented with the highest concentration of NaCl compared to control. However the increase of NaCl concentration promoted a decrease in percentage of normal seedlings, suggesting the gliricidia is sensitive to salt stress during initial development *in vitro*.

Keywords: salinity, *Gliricidia sepium*, cultive *in vitro*

## 1. INTRODUÇÃO

Estima-se que 4,5 milhões de hectares dos solos brasileiros estejam degradados em virtude do processo da salinização, sobretudo no semiárido nordestino [16], constituindo-se em um dos fatores limitantes do crescimento e desenvolvimento de plantas nessa região [6]. Nestes locais os solos possuem baixa capacidade de infiltração de água, e a elevação do lençol freático

provoca o acúmulo de sais nas camadas superficiais do solo [14]. Este acúmulo pode ocorrer naturalmente devido a alta taxa de evapotranspiração e baixa pluviosidade [2]. Irrigações mal conduzidas e o manejo incorreto da adubação se constituem em causas da salinização dos solos [17], aumentando o teor de sais na superfície do solo, prejudicando o desenvolvimento das plantas.

Os estágios de desenvolvimento mais sensíveis à salinidade ocorrem durante a germinação e o crescimento inicial, pois a redução no potencial hídrico provocado pelo aumento na concentração de sais no substrato resulta em menor capacidade de absorção de água pelas sementes [13].

Em ambientes salinos a maioria das injúrias que ocorrem nas plantas é causada principalmente pelo cloreto de sódio (NaCl) [22]. O excesso de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> influencia o intumescimento protoplasmático e afeta a atividade de enzimas, promovendo alterações no metabolismo da planta [14]. Além disso, a salinização dos solos danifica determinados processos nos vegetais, tais como síntese de proteínas, metabolismo de lipídios e fotossíntese [5].

A determinação da tolerância das plantas ao excesso de sais pode ser por meio da observação do percentual germinativo das sementes em substrato salino, sendo que a redução do poder de germinação, comparada ao controle, serve como indicador do índice de tolerância da espécie à salinidade [18].

O excesso de sais e sódio trocável, o alto do pH e reduzida disponibilidade de nutrientes limitam o desenvolvimento de muitas culturas em ambientes salinos, devido a ocorrência de distúrbios nutricionais [11]. Os processos adaptativos que envolvem absorção, transporte e distribuição de íons nos vários órgãos da planta são determinantes na sobrevivência das plantas em tais ambientes [6].

A cultura de tecidos é uma ferramenta biotecnológica que pode ser empregada a fim de obter plantas mais tolerantes a estresses abióticos, tais como a salinidade, demandando reduzido espaço físico e obtendo-se resposta em curto espaço de tempo [2]. O estudo do efeito do estresse salino em plantas tem sido conduzido em inúmeras culturas, com os mais diversos objetivos, como em abacaxizeiro na fase de aclimatação [2], no enraizamento de microestacas de amoreira-preta [16], sobre a germinação de sementes de leucena [4].

A gliricídia (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Steud) é uma leguminosa perene de porte arbóreo, nativa da América do Sul e Central [20]. Apresenta crescimento rápido e enraizamento profundo, conferindo-lhe tolerância à seca, sendo o seu plantio recomendado na região da caatinga [1]. Apresenta interesse econômico, principalmente na região Nordeste do Brasil, devido seu uso múltiplo [20], tais como: adubação verde, forragem, reflorestamento, cerca viva, componente de sistemas agrossilvipastoris, entre outros [3]. Apesar de suas potencialidades são escassas as informações da tolerância da gliricídia à salinidade.

A salinização e/ou sodificação é um problema com reflexos econômicos, sociais e ecológicos, pois provocam a redução da produtividade das culturas e abandono das terras [9]. Porém, as atividades agrossilvipastoris ou agrofloretais constituem-se como forma alternativa para a recuperação dos solos degradados pela salinidade [6]. Desta forma, é necessário identificar as espécies tolerantes às condições adversas do meio salino.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação e o crescimento inicial de sementes de gliricídia cultivadas *in vitro* sob diferentes níveis de estresse salino.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de gliricídia, oriundas do Campo experimental da Embrapa Semiárido, localizado no município de Nossa Senhora da Glória-SE (10°13'S, 37°25'13"W). As sementes foram lavadas em água corrente por 20 minutos e, em câmara de fluxo laminar foram imersas em álcool 70% por 1 minuto, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 2% (2:1) sob agitação durante 20 minutos, seguido da tríplice lavagem em água destilada e esterilizada.

Posteriormente foram inoculadas em frascos de vidro com capacidade para 250 mL, contendo 30 mL de meio de Murashige & Skoog-MS [15], suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de

sacarose e diferentes concentrações de NaCl (0, 30, 60, 90 e 120 mM). Os meios de cultura com pH ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  foram gelificados com  $6,5 \text{ g L}^{-1}$  de ágar e, submetidos a autoclavagem ( $121^\circ\text{C}$  e 1,0 atm por 15 minutos). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $25^\circ\text{C} \pm 2$ , umidade relativa do ar média em torno de 70%, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

Após 30 e 60 dias de cultivo foram avaliadas a porcentagem de germinação, porcentagem de plântulas normais, comprimento da parte da aérea (cm) e viabilidade, seguindo uma escala de notas (5: folhas totalmente verdes; 4: início do secamento e morte das folhas; 3: entre 30 e 50% das folhas e brotos mortos; 2: mais de 50% das folhas mortas e mais de dois brotos vivos; 1: folhas e brotos totalmente mortos; 0: plantas que não desenvolveram brotos, adaptada de Lemos et al. [12]. Foram consideradas normais as plântulas que desenvolveram parte aérea e raiz.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e cinco repetições, sendo que cada repetição representada por três frascos com quatro sementes.

As médias das variáveis foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 5% e as médias de tratamentos quantitativos foram ajustadas equações de regressão polinomial utilizando o programa estatístico SISVAR [7].

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a análise de variância (Tabela 1), as concentrações de NaCl não apresentaram efeito significativo na porcentagem de germinação ( $G_{30}$ ) após 30 dias de cultivo e na porcentagem de plântulas normais aos 60 dias ( $PN_{60}$ ). No entanto, foram altamente significativas (1% de probabilidade) para as variáveis porcentagem de plântulas normais ( $PN_{30}$ ) e viabilidade ( $V_{30}$ ) e, significativa (5% de probabilidade) para o comprimento da parte aérea das plântulas ( $A_{30}$ ). Diferentemente, após 60 dias no meio de inoculação, houve efeito altamente significativo das concentrações do sal na germinação ( $G_{60}$ ), sendo que esta aumentou em 22% em relação à avaliação realizada após 30 dias no meio de cultivo. Além disso, ocorreu interação significativa para o comprimento da parte aérea das plântulas ( $A_{60}$ ) e viabilidade ( $V_{60}$ ).

Após 60 dias de cultivo, ocorreu aumento de todas as variáveis analisadas, excetuando a viabilidade, na qual houve a redução do seu valor, em relação à primeira avaliação.

*Tabela 1. Resumo da análise de variância aos 30 e 60 dias de cultivo, respectivamente, para porcentagem de germinação ( $G_{30}$  e  $G_{60}$ ), porcentagem de plântulas normais ( $PN_{30}$  e  $PN_{60}$ ), comprimento da parte aérea (cm) ( $A_{30}$  e  $A_{60}$ ) e viabilidade ( $V_{30}$  e  $V_{60}$ ).*

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio							
		$G_{30}^1$	$G_{60}^1$	$PN_{30}$	$PN_{60}$	$A_{30}$	$A_{60}$	$V_{30}$	$V_{60}$
<b>Tratamentos</b>	4	0,05	0,15**	2.905,38**	2.245,50	9,00*	11,00*	0,37**	0,57*
<b>Resíduo</b>	57	0,02	0,04	398,83	955,18	2,87	3,10	0,10	0,17
<b>Total</b>	61								
<b>CV%</b>		18,65	10,95	42,70	49,77	37,38	39,68	6,44	9,62
<b>Média geral</b>		71,29	94,76	46,77	62,10	4,44	4,54	4,86	4,29

<sup>1</sup> Dados transformados por  $\text{Asen} \sqrt{\frac{x}{100}}$

\*\* e \* significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

Aos 60 dias de cultivo, a porcentagem de germinação da gliricídia apresentou comportamento linear (Figura 1), verificando-se redução progressiva com o aumento da salinidade do meio de cultivo. As sementes ao absorverem água do substrato, absorvem também os sais que, por excesso provocam distúrbios fisiológicos resultando em perda do potencial germinativo<sup>8</sup>. Efeito semelhante ao obtido em aroeira, onde a maior concentração de sais no meio de cultura ( $3,28 \cdot 10^{-4}$  mM) resultou em menor porcentagem de germinação [18] e em sementes de girassol [19] e leucena [4] cultivadas em solução salina de NaCl.

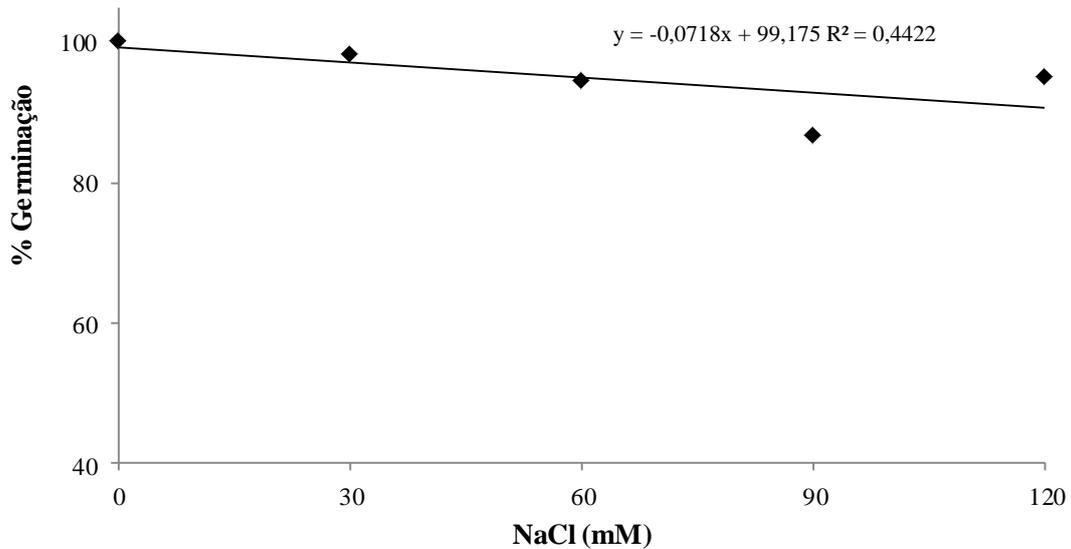


Figura 1. Porcentagem de germinação de plântulas de gliricídia cultivadas in vitro aos 60 dias na presença de diferentes concentrações de NaCl.

As crescentes concentrações de NaCl no meio de cultura reduziram o percentual de plântulas normais em relação à testemunha, seguindo um modelo quadrático, tanto aos 30 como aos 60 dias (Figura 2). Foram observadas plântulas que emitiram a radícula, mas não desenvolveram um sistema radicular completo ou a formação de brotos e/ou folhas.

Provavelmente o estresse salino afetou o crescimento celular e o desenvolvimento das raízes da gliricídia, resultado contrário ao obtido em microestacas de amoreira-preta, nas quais emitiram raízes mesmo na presença do NaCl [23]. Segunda Silva et al. citado por Martins et al. [14] o aumento da salinidade resulta na redução potencial osmótico do meio de cultivo, reduzindo ou impedindo a absorção de água pela planta. Ainda segundo esses autores, a fim de manter a absorção de água e reduzir a taxa de transpiração, as plantas reduzem o número de folhas e a área foliar. Além disso, o incremento da salinidade é acompanhado de reduções significativas no peso e comprimento da parte aérea, número de folhas, comprimento de raízes e superfície de raízes por planta (Mohammad et al. 1998 citado por Esteves & Susuki [5]).

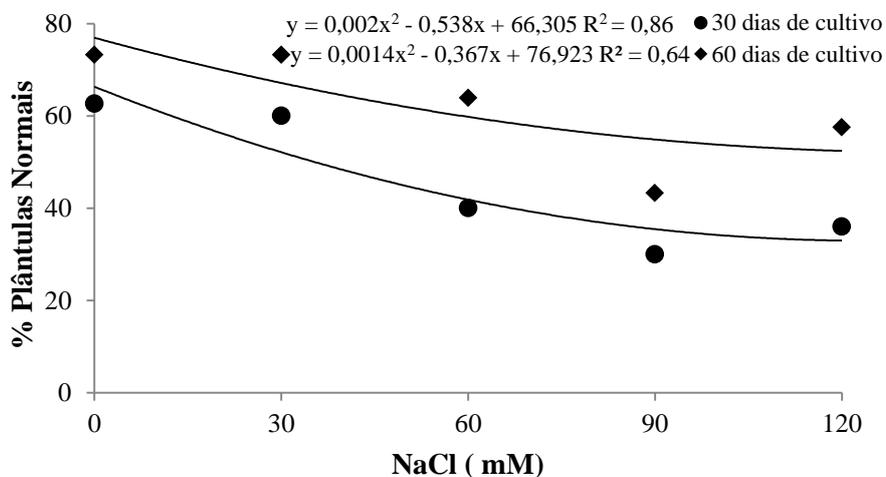


Figura 2. Porcentagem de plântulas normais de gliricídia cultivadas in vitro aos 30 e 60 dias na presença de diferentes concentrações de NaCl.

Aos 30 dias de cultivo verificou-se que a adição de 30 mM de NaCl promoveu maior desenvolvimento da parte aérea, conseqüentemente, maior comprimento (Figura 3). Possivelmente, isto ocorre devido à necessidade do NaCl no desenvolvimento inicial de plântulas de gliricídia cultivadas *in vitro*. Efeito semelhante foi observado em segmentos nodais de amoreira-preta, nas quais atingiram maior comprimento da parte aérea (7,71 cm) na presença de 50 mg L<sup>-1</sup> de NaCl [23].

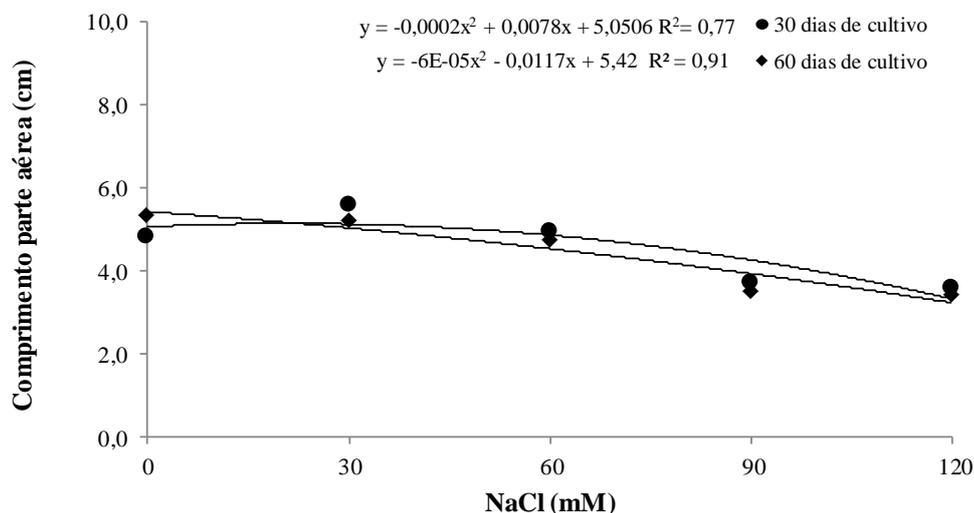


Figura 3. Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de gliricídia cultivadas *in vitro* na presença de diferentes concentrações de NaCl.

No entanto, este efeito positivo vai de encontro com o resultado obtido por Farias et al. [6] estes testaram concentrações maiores em solução nutritiva que as utilizadas no presente estudo (0, 100, 200 e 400 mM) e, verificaram que concentrações crescentes de NaCl na solução reduziram o comprimento da parte aérea das plantas em relação à testemunha.

Aos 60 dias de cultivo verificou-se uma redução gradativa do comprimento da parte aérea da plântula em função do aumento da concentração do sal. Provavelmente devido ao efeito osmótico provocado pelo sal, associado à toxidez de íons pela absorção excessiva de Na e Cl e ao desequilíbrio nutricional causado pelos distúrbios na absorção e, ou, distribuição dos nutrientes (Lacerda, 2005 citado por Farias et al. [6]). Além disso, o menor comprimento de plântulas é uma das características de plântulas submetidas ao estresse salino, pois o excesso de sal no meio provoca menor absorção de água por parte das mesmas, reduzindo a velocidade dos processos fisiológicos e bioquímicos afetando negativamente o desenvolvimento das plântulas [21].

Na análise de regressão, o modelo quadrático foi o que melhor se ajustou aos dados da viabilidade aos 30 dias de cultivo, porém a viabilidade aos 60 dias de cultivo apresentou um comportamento linear em função dos tratamentos (Figura 4).

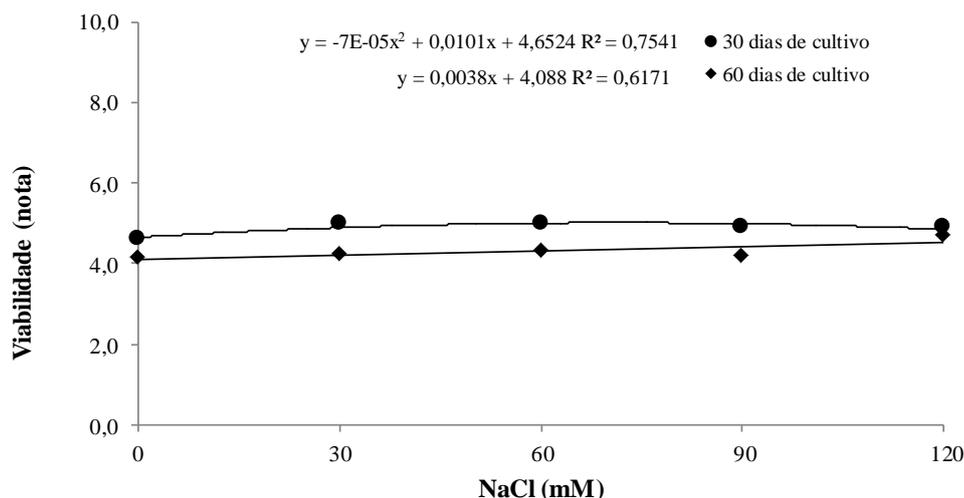


Figura 4. Viabilidade de plântulas de gliricídia cultivadas *in vitro* na presença de diferentes concentrações de NaCl.

Após 30 dias no meio de inoculação, verificou-se o aumento da viabilidade das plântulas de gliricídia com o aumento da concentração de NaCl, sendo que a maior nota obtida, de uma escala variando de 1 a 5, foi 5 nas concentrações 30 e 60 mM de NaCl, quando comparadas a testemunha. Porém, o maior tempo de permanência no meio de cultivo, após 60 dias, provocou uma redução da viabilidade das plântulas, sendo que a nota média de viabilidade foi 4,3. Os efeitos negativos dos íons Na e Cl estão relacionados ao estresse hídrico provocado às plantas e ao efeito tóxico, principalmente sobre os sistemas enzimáticos e de membranas [23].

Aos 60 dias no meio de cultura, a concentração de 120 mM de NaCl proporcionou maior nota de viabilidade (4,7) em relação a plântulas cultivadas na ausência do sal, isto demonstra que a viabilidade da espécie não foi afetada pela elevação de sais no meio.

#### 4. CONCLUSÕES

- O aumento de NaCl até a concentração de 120 mM reduz o potencial germinativo das sementes da gliricídia;
- O comprimento da parte aérea das plântulas de gliricídia é afetado negativamente com o aumento da concentração do sal no meio de cultivo *in vitro*;
- Durante o desenvolvimento inicial *in vitro* a gliricídia apresenta-se sensível ao estresse salino.

#### 5. AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa, à Embrapa Tabuleiros Costeiros por disponibilizar as instalações e equipamentos utilizados no estudo e à Embrapa Semiárido pelo fornecimento das sementes.

1. Barreto AC, Fernandes MF. Cultivo de alamedas de gliricídia (*Gliricidia sepium*) em solos de Tabuleiros Costeiros. Aracaju: Embrapa, 2004. 4p. (Circular Técnica, 36).
2. Barroso PAV, Moura GEDD, Brito LKF, Martins CP, Macedo CEC, Lopes DBL, Alloufa MAL. Efeito do cultivo *in vitro* na presença de NaCl em plantas de abacaxizeiro na fase de aclimação. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.7, n.3, p.473-477, 2003.
3. Carvalho Filho OM, Drumond MA, Languidey PH. *Gliricidia sepium* leguminosa promissora para regiões semiáridas. Petrolina, Embrapa/CPATSA, 1997.

4. Cavalcante AMB, Perez SCJGA. Efeitos dos estresses hídrico e salino sobre a germinação de sementes de *Leucaena Leucocephala* (Lam.) de Wit. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.30, n.2, p.281-289, 1995.
5. Esteves BS, Susuki MS. Efeito da salinidade sobre as plantas. Oecologia Brasiliensis, n.12, v.4, p. 662-679, 2008.
6. Farias SGG, Santos DR, Freire LOF, Silva RB. Estresse salino no crescimento inicial e nutrição mineral de gliricídia (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Steud) em solução nutritiva. Revista Brasileira da Ciência do Solo, v.33, n.5, p.1499-1505, 2009.
7. Ferreira DF. SISVAR: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
8. Ferreira PA. Aspectos físico-químicos do solo. In: Gheyi HR, Queiroz JE, Medeiros JF. Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada. UFPB/SBEA, Campina Grande, p.37-67, 1997.
9. Ferreira PA, Moura RF, Santos DB, Fontes PCR, Melo RF. Efeitos da lixiviação e salinidade da água sobre um solo salinizado cultivado com beterraba. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.10, n.3, p.570-578, 2006.
10. Holanda AC, Santos RV, Souto JS, Alves RA. Desenvolvimento inicial de espécies arbóreas em ambientes degradados por sais. Revista de Biologia e Ciências da Terra, n.1, p.39-50, 2007.
11. Leite MJH, Santos RV, Gomes ADV, Vital AFM. Aplicação de corretivos e crescimento de oleaginosas em solos salinizados do semiárido. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, v.7, n.1, p.87-95, 2012.
12. Lemos EEP de, Ferreira M de S, Alencar LMC de A, Neto Ramalho CE, Albuquerque M de. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.37, n.10, p.1359-1364, out. 2002.
13. Matias JR, Pereira AL, Silva RCB, Nascimento MA, Reis RCR, Dantas BF. Efeito de estresse salino no processo germinativo de sementes de angico (*Anadenanthera colubrina*). In: Jornada de iniciação científica da Embrapa Semiárido, 6., 2011, Petrolina. Anais... Petrolina: Embrapa Semiárido, p. 297-302, 2011.
14. Martins SS, Pereira MC, Lima MAG, Queiroz AA, Silva ASB, Mistura C, Rodrigues JD, Orika Ono E. Morfofisiologia da cunhã cultivada sob estresse salino. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, v.13, n.1, p.13-24, 2012.
15. Murashige T, Skoog FA. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, v.15, p.473-497, 1962.
16. Neto Silva MF, Macedo MLA, Andrade ARS, Freitas JC, Pereira ERR. Análise do perfil agrícola do perímetro irrigado de São Gonçalo-PB. Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada em Ciências Agrárias, v.5, n.2, p.155-172, 2012.
17. Nobrega JA, Azevedo CAV, Neto Dantas J, Lima VLA, Neto Gouveia GC. Crescimento do pinhão-manso sob irrigação com água salina e adubação orgânica em condições de campo. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, v.7, n.1, p. 61- 60, 2012.
18. Oliveira AM, Linhares PCF, Maracajá PB, Ribeiro MC, Benedito CP. Salinidade na germinação e desenvolvimento de plântulas de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* FR ALL). Caatinga, v.20, n.2, p.39-42, 2007.
19. Rabbani ARC, Silva-Mann, R, Ferreira RA, Carvalho SVA, Nunes FBS, Brito AS. Efeito do estresse salino sobre atributos da germinação de sementes de girassol. Scientia Plena, v.9, n.5, p. 1-6, 2013.
20. Reis RC, Pelacani CR, Antunes CG, Dantas BF, Castro RD. Physiological quality of *Gliricidia sepium* (jacq.) Steud. (Leguminosae - Papilionoideae) seeds subjected to different storage conditions. Revista Árvore, v.36, n.2, p.229-235, 2012.
21. Sá ME. Relações entre qualidade fisiológica, disponibilidade hídrica e desempenho de sementes de soja (*Glycine* Max (L.) Merrill). Piracicaba: ESALQ-USP, 1987. 147p. (Tese).
22. Tyerman D, Skerrett IM. Root ion channels and salinity. Science Horticulture, v.78, p.175-235, 1999.
23. Villa F, Pasqual M, Pio LAS, Teodoro GS. Cloreto de sódio e ácido naftalenoacético no enraizamento de microestacas de amoreira-preta cv. brazos *in vitro*. Ciência e Agrotecnologia, v.33, Edição Especial, p.1819-1824, 2009.