

PERSISTÊNCIA DE COTILÉDONES NA PLÂNTULA COMO PARÂMETRO PARA AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM LEUCAENA LEUCOCEPHALA¹

ANGELA MARIA MALUF², PAULO SODERO MARTINS³ e WILSON ROBERTO MALUF⁴

RESUMO - O objetivo do presente trabalho foi verificar se o parâmetro persistência dos cotilédones nas plântulas, anteriormente utilizado para a discriminação de grandes diferenças em tolerância ao alumínio entre populações de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, também seria bom parâmetro para distinguir níveis de tolerância entre e dentro de populações tolerantes. Para isto foram utilizadas doze progênie de plantas individuais referentes a três populações consideradas tolerantes, uma população intolerante e uma progênie de uma planta individual de tolerância desconhecida, cultivadas em solução nutritiva contendo 9 ppm de Al. Foram analisados os parâmetros percentagem de plântulas com cotilédones caídos ou amarelecidos e peso seco total das plântulas. O primeiro parâmetro foi capaz de discriminar não somente as populações tolerantes das intolerantes, mas também diferentes níveis de tolerância dentro de populações consideradas tolerantes, contrastando, neste aspecto, com o segundo parâmetro.

Termos para indexação: toxidez de alumínio, solução nutritiva, variabilidade genética, variabilidade intrapopulacional, leucena.

COTYLEDON PERSISTENCE IN THE SEEDLING AS A PARAMETER FOR EVALUATION OF ALUMINUM TOLERANCE IN LEUCAENA LEUCOCEPHALA

ABSTRACT - Cotyledon persistence in seedlings grown under aluminum stress, previously found to be a good parameter to discriminate large differences in Al tolerance among *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. introductions, was evaluated as a method to discriminate different levels of tolerance between and within tolerant populations. Twelve single plant progenies obtained from three tolerant populations, one intolerant introduction and one single-plant introduction of unknown tolerance were screened in nutrient solution under 9 ppm of Al. Percentage of plants with yellowed or fallen cotyledons and total dry weight of the seedlings were recorded. The former parameter was efficient not only in the discrimination of tolerant versus intolerant populations, but also in the discrimination of different levels of tolerance within tolerant populations, contrasting in this respect with the latter parameter.

Index terms: aluminum toxicity, nutrient solution, genetic variability, intrapopulation variability, leucaena.

INTRODUÇÃO

A *Leucaena leucocephala*, conhecida popularmente como leucena, é uma leguminosa forrageira que não suporta solos ácidos com elevados teores de Al tóxico (Brewbaker s.n.t., National Academy of Sciences 1977 e Jones 1979).

As cultivares Cunningham e Gigante K 8 de *L. leucocephala* mostraram-se intolerantes ao alu-

mínio, em trabalhos desenvolvidos no CIAT (Cali, Colômbia), de acordo com Hutton (1982).

Maluf (1984) e Maluf et al. (1984a) demonstraram haver pelo menos dois grupos bem distintos de introduções de leucena quanto à tolerância ao Al. A distinção entre os grupos foi clara com o uso de análise multivariada (análise de conglomeração das distâncias euclidianas), notando-se o grupo das tolerantes nitidamente distintos do grupo das intolerantes. Para esta análise foram estudados simultaneamente sete parâmetros (comprimento da parte aérea, comprimento da maior raiz, peso seco da parte aérea, peso seco das raízes, comprimento da primeira folha, número de ramificações e relação peso seco da parte aérea/peso seco das raízes), em cinco diferentes concentrações de Al (0,3, 6,9 e 12 ppm).

¹ Aceito para publicação em 24 de janeiro de 1985.

² Eng. - Agr., M.Sc., Instituto de Botânica, Caixa Postal 4005, CEP 01000 São Paulo, SP.

³ Eng. - Agr., Ph.D., Prof. Assist. Dr. ESALQ/USP/Dep. de Genét., Caixa Postal 83, CEP 13400 Piracicaba, SP.

⁴ Eng. - Agr., Ph.D., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças (CNPq), Caixa Postal 11 - 1316, CEP 70000 Brasília, DF.

Embora a análise multivariada não tenha deixado dúvida alguma de interpretação (Maluf et al. 1984a), a análise individual de cada uma dessas sete características foi bem menos clara (Maluf et al. 1984b). Assim, apenas grandes diferenças no tocante à tolerância foram detectadas, e técnicas de análise multivariada foram necessárias para uma clara distinção entre grupos.

Em trabalho posterior, Maluf et al. (1984c) verificaram que os parâmetros persistência de cotilédones, comprimento da parte aérea, comprimento da maior raiz, peso seco da parte aérea e peso seco das raízes, às concentrações de 6, 9 e 12 ppm de Al, foram os que individualmente levaram a resultados concordantes com a análise multivariada, na discriminação da tolerância diferencial ao Al entre populações de leucena.

O caráter persistência dos cotilédones tem vantagem sobre os demais por ser facilmente avaliado, exigir pouco manuseio da planta e não destruí-la. Além disto, este caráter dispensa a necessidade de trabalhar com grande número de populações, para se obter uma distribuição de valores aproximadamente normal, quando se usam dados padronizados, como fizeram Maluf (1984) e Maluf et al. (1984b), desde que haja testemunhas tolerantes e intolerantes conhecidas.

Utilizando somente os cinco melhores parâmetros de avaliação de tolerância, medidos na concentração de 9 ppm de Al, Maluf (1984) e Maluf et al. (1984d) estudaram o comportamento de 18 progênies de leucena, oriundas de populações consideradas como tolerantes pela análise multivariada realizada anteriormente. Verificaram a existência de variabilidade genética para tolerância ao Al tanto entre progênies como dentro de algumas progênies.

Para a variável persistência dos cotilédones nas plântulas não houve possibilidade de discriminação da tolerância ou intolerância ao Al entre progênies (Maluf et al. 1984d), uma vez que, para todas as progênies, a proporção de plântulas com persistência de cotilédones foi de 100% ou próxima desta. Isto sugere que este caráter, ou não consegue discriminar as pequenas diferenças de tolerância, que ocorrem entre e dentro de progênies oriundas de populações tolerantes, ou há necessidade de padronização do método, pois este trabalho não

levou em conta a idade fisiológica da planta, que é alcançada em período diferente, conforme as condições físicas do ambiente, como, por exemplo, a temperatura.

O objetivo deste trabalho foi verificar se a persistência dos cotilédones nas plântulas seria um parâmetro útil para distinguir diferentes níveis de tolerância ao alumínio entre as populações de leucenas tidas como tolerantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido em casa de vegetação, no Laboratório de Genética Ecológica do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, SP, no ano de 1984.

Foram utilizadas doze progênies de plantas individuais de *L. leucocephala* (introduções 1 a 12), obtidas na região de Piracicaba, referentes a três populações tidas como tolerantes ao Al pela análise multivariada feita por Maluf (1984) e Maluf et al. (1984a), uma testemunha intolerante ao Al (introdução 13) e uma progênie de uma planta individual de tolerância ainda desconhecida (introdução 14), descritas na Tabela 1.

As sementes utilizadas foram escarificadas mecanicamente, tratadas com fungicida e colocadas para germinar em caixas de germinação, em germinador a 25°C, durante cinco dias, e, em seguida, transplantadas para o meio contendo solução nutritiva.

A metodologia utilizada foi semelhante à descrita por Maluf (1984) e Maluf et al. (1984b), porém, neste caso, utilizaram-se somente quatro tanques contendo solução nutritiva com 9 ppm de Al. As concentrações dos elementos em ppm foram: 50,8 de Ca; 6,6 de Mg 56 de N (51,9 como NO_3^- e 4,1 como NH_4^+); 3,8 de S (como SO_4^{2-}); 29,4 de K; 0,01 de Na; 3 de P; 0,34 de Cl; 0,13 de Mn; 0,07 de B; 0,04 de Zn; 0,01 de Cu e 0,005 de Mo. Uma ppm de ferro foi adicionada separadamente como Fe EDTA. O alumínio (9 ppm) foi fornecido na forma de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$. O pH manteve-se estável, em torno de 4,0 e 4,2, durante o período experimental.

Fez-se um experimento em blocos casualizados, com quatorze tratamentos, quatro repetições (tanques) e dez plantas por parcela.

O experimento foi analisado usando-se os recursos do procedimento GLM (General Linear Methods) do pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System Institute 1979). Como houve uma parcela perdida no tratamento 9, usaram-se as somas de quadrados do tipo IV (Statistical Analysis System Institute 1979), ajustando-se as médias através da instrução LSMEANS (Statistical Analysis System Institute 1979). As somas de quadrados de tratamentos são, pois, ajustadas para os efeitos de blocos.

Assim que a testemunha intolerante ao Al (introdução

TABELA 1. Introduções de *Leucaena leucocephala* testadas.

Introdução de <i>L. leucocephala</i>	Origem	Identificação (em Maluf 1984)
1	Estrada Piracicaba - Tietê; Piracicaba, SP ^{a,d}	T-1/P-2
2	Estrada Piracicaba - Tietê; Piracicaba, SP ^a	T-1/P-4
3	Estrada Piracicaba - Tietê; Piracicaba, SP ^{a,d}	T-1/P-5
4	Estrada Piracicaba - Tietê; Piracicaba, SP ^a	T-1/P-6
5	Estrada Piracicaba - Limeira; Piracicaba, SP ^{a,d}	T-2/P-7
6	Estrada Piracicaba - Limeira; Piracicaba, SP ^a	T-2/P-9
7	Estrada Piracicaba - Limeira; Piracicaba, SP ^{a,d}	T-2/P-11
8	Estrada Piracicaba - Limeira; Piracicaba, SP ^a	T-2/P-12
9	Estrada do Bongue; Piracicaba, SP ^{a,b}	T-3/P-14
10	Estrada do Bongue; Piracicaba, SP ^{a,b}	T-3/P-15
11	Estrada do Bongue; Piracicaba, SP ^a	T-3/P-16
12	Estrada do Bongue; Piracicaba, SP ^{a,d}	T-3/P-18
13	NO 749; IPEAN, Belém, PA ^b	T-10
14	Brasília, DF ^c	—

^a Progenie de uma planta individual de uma população classificada por Maluf (1984) e Maluf et al. (1984d) como tolerante ao Al.

^b Sementes "bulk" de uma população classificada por Maluf (1984) e Maluf et al. (1984a) como intolerante ao Al.

^c Sementes de uma planta individual não previamente classificada quanto à tolerância ao Al.

^d A existência de variabilidade genética dentro da progênie foi demonstrada por Maluf (1984) e Maluf et al. (1984d).

^e A inexistência de variabilidade genética dentro da progênie foi demonstrada por Maluf (1984) e Maluf et al. (1984d).

13) teve abscisão dos cotilédones, foram analisados os seguintes parâmetros:

- percentagem de plântulas com cotilédones caídos ou amarelados (transformada em Arc. sen. $\sqrt{\%}$). Esta medida foi tomada aos 27 dias após o transplante das sementes germinadas para a solução nutritiva e consideraram-se como plântulas com cotilédones caídos as que tinham abscisão dos cotilédones, e como plântulas com cotilédones amarelados as que os apresentavam amarelados em, no mínimo, 50% da área.
- Peso seco total da plântula, em gramas. Esta medida foi efetuada aos 27 dias após o transplante das sementes germinadas para a solução nutritiva, após secagem do material em estufa a 35°C - 40°C, durante cinco dias.

A correlação genotípica entre esses dois parâmetros foi determinada estimando-se as variâncias genotípicas e a covariância genotípica entre eles, o que se fez igualando-se as somas de quadrados ajustadas às suas respectivas esperanças matemáticas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância (Tabela 2) revelou haver diferenças altamente significativas ($\alpha = 0,01$), entre as introduções de leucena, para percentagem de plântulas com cotilédones caídos ou amarelados.

A testemunha intolerante ao Al (introdução 13) foi a que teve maior percentagem de cotilédones amarelados ou caídos. A única que se igualou a ela foi a introdução 14, originária de Brasília, sobre a qual não se dispunha de informação alguma a respeito da tolerância ao Al. Embora seja originária de Brasília (região de solos ácidos, de cerrado) esta progênie mostrou-se intolerante ao Al (Tabela 3).

Os demais materiais vieram de três populações, classificadas por Maluf (1984) e Maluf et al. (1984a) como tolerantes ao Al. Maluf et al. (1984d) demonstraram que, mesmo dentro dessas populações tolerantes ao Al, ainda havia variabili-

dade genética para tolerância; assim, é de se esperar que progênies de diferentes plantas dessas populações venham a apresentar diferentes níveis de tolerância a Al.

O fato de a maioria das introduções de 1 a 12 terem menor percentagem de plântulas com coti-

TABELA 2. Análises de variância referentes às variáveis percentagem de plântulas com cotilédones caídos ou amarelecidos (dados transformados em Arc. sen $\sqrt{\%}$) e peso seco médio por plântula, medidas em quatorze introduções de *Leucaena leucocephala*.

Causa de variação	G.L.	Quadrado médio	
		Arc. sen. $\sqrt{\%}$	Peso seco médio por planta
Blocos	3	0,240928	1145,87
Introduções de <i>L. leucocephala</i>	13	0,712808**	8897,59**
Resíduo	38	0,084933	741,41
		CV 36,2%	CV = 14,8%

** Significativo ao nível $\alpha = 0,01$.

TABELA 3. Percentagem média de plântulas com cotilédones caídos ou amarelecidos e peso seco médio por plântula, em quatorze introduções de *Leucaena leucocephala*.

Introdução	Percentagem de plântulas com cotilédones caídos ou amarelecidos ^x	Arc. sen.	Peso seco médio por plântula, em mg ^{xy} (média \pm erro padrão)
		$\sqrt{\% \text{ colit. caídos ou amarelecidos}} \times y$ (média \pm erro padrão)	
1	47,5	0,759 abc	226 ef
2	32,5	0,593 abc	217 ef
3	32,5	0,589 abc	225 ef
4	81,7	1,185 cd	261 f
5	77,5	1,203 cd	217 ef
6	20,6	0,439 ab	202 def
7	48,1	0,751 abc	198 cdef
8	33,3	0,640 abc	143 abcd
9	0,0	0,138 a	75 a
10	15,0	0,369 ab	167 bcde
11	55,0	0,901 bcd	202 def
12	29,4	0,562 abc	188 bcde
13	100,0	1,570 d	129 ab
14	100,0	1,570 d	131 abc

^x Médias corrigidas por causa da parcela perdida no tratamento 9

^y Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $\alpha = 0,05$.

lédones caídos ou amarelecidos do que a testemunha, introdução 13 (Tabela 3), confirma a utilidade desse parâmetro para avaliar tolerância ao Al em leucena, como foi sugerido por Maluf (1984) e Maluf et al. (1984c).

Assim, os tratamentos 9,10 e 6 são considerados os de maior tolerância ao Al, por apresentarem as menores percentagens de cotilédones caídos ou amarelecidos. São progênies de plantas individuais obtidas de duas populações, conforme descrito na Tabela 1. Por outro lado, os tratamentos 4 e 5 (também progênies de plantas individuais) são considerados menos tolerantes, não diferindo significativamente da testemunha suscetível (tratamento 13) nem do tratamento 14. Outros tratamentos, como 1, 7 e 11 apresentaram níveis de tolerância intermediários entre os dois extremos (Tabela 3).

Cumpre observar que Maluf (1984) e Maluf et al. (1984d) demonstraram a existência da variabilidade genética para tolerância ao Al dentro de algumas progênies de plantas individuais, como é o caso daquelas representadas pelos tratamentos 1, 3, 5, 7 e 12, e a ausência dessa variabilidade den-

tro de outras progênies, como as representadas pelos tratamentos 9 e 10 (Tabela 1). Como 9 e 10 representam os mais altos níveis de tolerância ao Al, é provável que a menor tolerância mostrada por alguns tratamentos, como 1, 3, 5, 7 e 12, seja reflexo da existência, dentro dessas progênies, de diferentes proporções de plantas tolerantes e intolerantes ao Al (Tabela 1 e 3).

Maluf (1984) e Maluf et al (1984c) demonstraram que a variável peso seco (da raiz e/ou parte aérea) também permitiu boa discriminação entre introduções tolerantes e intolerantes ao Al. Neste estudo, no entanto, foram utilizadas médias padronizadas dos pesos secos, adotando-se como critério de tolerância o fato de a variável peso seco, após padronização, ser maior do que zero, e como critério de intolerância o fato de ser menor que zero. Isto leva a crer que este critério venha a ser bom quando são testadas muitas populações, de maneira que haja uma distribuição aproximadamente normal de valores. A utilidade do parâmetro peso seco em situações em que se pretenda avaliar diferentes níveis de tolerância dentro de populações previamente classificadas como tolerantes é, pois, duvidosa.

O coeficiente de correlação genotípica entre a percentagem (transformada) de plântulas com cotilédones caídos ou amarelecidos e o peso seco médio por planta, foi de $r = 0,007$ (não-significativo ao nível $\alpha = 0,05$), o que demonstra a independência entre os dois parâmetros. Assim, o parâmetro peso seco médio por planta não é capaz de discriminar, com eficiência, diferentes níveis intermediários de tolerância, embora possa ser eficiente na detecção de grandes diferenças, como foi o caso de Maluf (1984) e Maluf et al. (1984c).

O fenômeno da não-persistência dos cotilédones nas introduções intolerantes ao Al parece ser análogo ao relatado por Armiger et al. (1968) e Foy et al. (1969) quando associaram a clorose da folha e o colapso do pecíolo da soja com a deficiência de Ca induzida pela presença de Al.

Os resultados ressaltam a utilidade do parâmetro percentagem de plantas com cotilédones caídos ou amarelecidos, para avaliação de diferentes níveis de tolerância ao Al entre introduções de leucenas tidas como tolerantes ao Al.

Por se tratar de medida não-destrutiva, facilmente avaliada ao nível de progênies, presta-se como método de seleção de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. para tolerância a alumínio, em programas de melhoramento genético.

CONCLUSÕES

1. A percentagem de plântulas com cotilédones caídos ou amarelecidos testada sob a concentração de 9 ppm de Al foi um bom parâmetro para discriminar níveis de tolerância ao Al em *L. leucocephala*.
2. O parâmetro peso seco médio por plântulas cultivadas em solução nutritiva com 9 ppm de Al, conquanto eficiente para discriminar grandes diferenças de tolerância ao Al, não é eficiente para discriminar diferentes níveis de tolerância dentro de populações heterogêneas consideradas, no geral, tolerantes.
3. A introdução 13 (NO 749, procedente do IPEAN, Belém, PA), e a 14 (Brasília, DF) foram as mais intolerantes ao Al entre todas as testadas, com base no parâmetro percentagem de plantas com cotilédones caídos ou amarelecidos.
4. As introduções 9 e 10, nas quais não existe variabilidade genética para tolerância ao Al, foram as mais tolerantes, com base no parâmetro percentagem de plântulas com cotilédones caídos ou amarelecidos.
5. As introduções 1, 3, 5, 7 e 12 mostraram um nível moderado de tolerância ao Al, que pode ser reflexo da existência, dentro dessas progênies, de diferentes proporções de plantas tolerantes e intolerantes.

REFERÊNCIAS

- ARMIGER, W.H.; FOY, C.D.; FLEMING, A.L. & CALDWELL, B.E. Differential tolerance of soybean varieties to an acid soil high in exchangeable aluminum. *Agron. J.*, Madison, 60:67-70, 1968.
- BREWBAKER, J.L. The woody legume, *Leucaena*; promising source of feed, fertilizer, and fuel in the tropics. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE GANADERIA TROPICAL, Acapulco, México, 1976. *Proceedings...* s.n.t. p.13-27.
- FOY, C.D.; FLEMING, A.L. & ARMIGER, W.H. Aluminum tolerance of soybean varieties in relation to calcium nutrition. *Agron. J.*, Madison, 61:505-11, 1969.

- HUTTON, E.M. Interrallation of Ca and Al in adaptation of *Leucaena* to very acid soils. *Leucaena Res. Rep.*, Taiwan, 3:9-11, 1982.
- JONES, R.J. The value of *Leucaena leucocephala* as a feed for ruminants in the tropics. *World Anim. Rev.*, Rome, 31:13-23, 1979.
- MALUF, A.M. Avaliação da variabilidade intra e interpopulacional para tolerância ao alumínio em leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.). Piracicaba, ESALQ/USP, 1984. 110p. Tese Mestrado.
- MALUF, A.M.; MARTINS, P.S. & MALUF, W.R. Avaliação de populações de leucena para tolerância ao alumínio. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 19(7):859-66, jul. 1984b.
- MALUF, A.M.; MARTINS, P.S.; FERREIRA-ROSSI, P.E. & MALUF, W.R. Avaliação de populações de leucena para tolerância ao alumínio. II. Análise de conglo-
meração. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 19(8): 999-1002, ago. 1984a.
- MALUF, A.M.; MARTINS, P.S. & MALUF, W.R. Avaliação de populações de leucena para tolerância ao alumínio. III. Critérios para avaliação de tolerância. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 19(9):1131-4, set. 1984c.
- MALUF, A.M.; MARTINS, P.S. & MALUF, W.R. Variabilidade genética para tolerância ao alumínio entre e dentro de progênes de leucena. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 19(11):1373-83, nov. 1984d.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, Washington, EUA. *Leucaena*; promising forage and tree crop for the tropics. Washington, 1977. 115p.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE, Raleigh, EUA. SAS user's guide. Ralcih, 1979. 494p.