

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
DEPARTAMENTO DE PLANTAS FORRAGEIRAS E AGROMETEOROLOGIA**

**MELHORAMENTO GENÉTICO DE *Lotus corniculatus* VISANDO  
TOLERÂNCIA À TOXIDEZ POR ALUMÍNIO**

Armando Martins dos Santos  
Mestre em Zootecnia /UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau Doutor em  
Zootecnia  
Área de Concentração Plantas Forrageiras

Porto Alegre (RS), Brasil  
Agosto de 2009

## **Dedico**

À minha esposa Lidiane e meu filho Bernardo  
Sem vocês, nada na minha vida teria sentido!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter iluminado e acompanhado minhas escolhas, por mais absurdas que parecessem.

Às minhas famílias, de sangue ou não, especialmente minha mãe Maria, meu pai Antonio (*in memoriam*), tia Dina, minha sogra Cecília, meu sogro Xisto e minha cunhada Mauri. Obrigado por me apoiarem, orientarem e auxiliarem ao longo destes últimos anos, que não foram nada fáceis.

Ao meu orientador Miguel Dall' Agnol, um agradecimento especial pela oportunidade de retornar a esta instituição que tanto estimo, pela paciência, pela confiança no trabalho e fora dele, pela orientação plena e onipresente, e pela grande parceria e amizade formadas ao longo destes mais de 48 meses de curso.

Aos professores da Pós-Graduação que fizeram parte da minha formação. Agradeço pelo aprendizado e estímulo, em especial aos professores Carlos Nabinger, Carlos Bissani, Maria Teresa, Fernanda Bered e Marcelo Gravina.

Aos amigos que sempre me apoiaram nos momentos difíceis e comemoraram as etapas conquistadas. Em especial: Marcelo Steiner, Paula Menna, Fernanda Bortolini, Ricardo Flores, Joaquim Sawasato, Aline Janke, Vilmar Tafernaberi, Emerson Pereira, Marcos Leão, Luciana Carvalho e Kátia Huber.

Aos médicos, Dr. Albert Brasil e sua equipe, Dr. Anderson Aurélio, Dr. André Dalben e Dr. Claudemir Trapp, responsáveis pela identificação e remoção do meu tumor, sempre serei grato pela atenção e dedicação dispensadas.

A equipe da Acqua Hidroponia, em especial Jonata Monteiro, que levaram um projeto semi-utópico adiante e me ajudaram a transformá-lo em realidade.

Ao CNPq pela concessão da bolsa, e ao projeto LOTASSA pelo fornecimento de recursos científico-financeiros para o bom andamento deste trabalho.

## MELHORAMENTO GENÉTICO DE *Lotus corniculatus* VISANDO TOLERÂNCIA À TOXIDAZ POR ALUMÍNIO <sup>1</sup>

Autor: Armando Martins dos Santos

Orientador: Prof. Miguel Dall' Agnol

### RESUMO

Solos ácidos com toxidez por Al são comuns, sendo geralmente destinados à pecuária. A utilização de leguminosas forrageiras adaptadas a esta situação minimizaria o uso de correção de acidez e ainda possibilitaria um aporte de N ao sistema via fixação biológica. A caracterização e a identificação de mecanismos de tolerância ao Al tóxico são os passos iniciais em um programa de seleção e melhoramento visando maior adaptação a esta condição de estresse. Este trabalho objetivou: (i) caracterizar genótipos de cornichão (*L. corniculatus*), espécies diplóides, inclusive da espécie modelo *L. japonicus* e linhas endogâmicas recombinantes (LER) de *Lotus*, quanto à tolerância ao Al tóxico; (ii) identificar o acúmulo de Al e exsudação radicular de ácidos orgânicos nas espécies cultivadas; e (iii) selecionar genótipos com respostas contrastantes ao Al tóxico, comparando-os através de características agrônomicas e moleculares. Os resultados da caracterização mostraram que as espécies modelo diplóides MG-20 e GIFU, a população UFRGS, e as cvs. San Gabriel e São Gabriel foram as mais produtivas de maneira geral. A população UFRGS apresentou ainda uma grande superioridade em situações de moderada acidez do solo (22,2% de Al), demonstrando um potencial de utilização em regiões onde se realize correção parcial do solo. Das 180 LERs testadas, 24 foram superiores e 39 foram inferiores a espécie modelo GIFU. Com relação à exsudação radicular de ácidos orgânicos, na ausência de Al observaram-se baixos níveis de exsudação para todos os genótipos. Já na presença do Al, os resultados mostraram que o genótipo UFRGS, selecionado para tolerância ao Al (UF-T2), apresentou aumento significativo (pelo menos 50% superior) da exsudação de ácido oxálico em relação aos demais genótipos, assim como a população UFRGS mostrou-se superior à cv. Draco em todas as avaliações. O resultado de dois ciclos de seleção massal visando tolerância ao Al mostrou incrementos na produção de matéria seca em todas as concentrações de Al testadas, enquanto que a seleção para sensibilidade ao Al pareceu estar relacionada com o baixo vigor das plantas, uma vez que na ausência de Al estes genótipos apresentaram menor acúmulo de matéria seca em relação às populações originais. A grande diversidade observada nos genótipos avaliados pode indicar que mecanismos de tolerância ao Al possam atuar em diferentes intensidades. A exsudação de ácido oxálico parece ser um mecanismo que permite a manutenção do crescimento do cornichão em condições de Al tóxico, sendo que a seleção de um genótipo mais tolerante ao Al proporcionou aumentos significativos neste mecanismo de defesa.

---

<sup>1</sup>Tese de Doutorado em Zootecnia - Plantas Forrageiras, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (181 p.) Agosto, 2009.

# ***Lotus corniculatus* BREEDING FOR TOLERANCE TO ALUMINUM TOXICITY<sup>1</sup>**

Author: Armando Martins dos Santos  
Adviser: Miguel Dall' Agnol

## **ABSTRACT**

Acid soils with aluminum (Al) toxicity are common, being generally destined for cattle livestock. The utilization of forage legumes adapted to this situation would minimize the use of agricultural liming materials and still allow a nitrogen input to the system via biological fixation. The characterization and identification of tolerance mechanisms to toxic Al are the initial steps in a selection and breeding program aiming a greater adaptation to this stress condition. This work was aimed to: (i) characterize cultivated populations of birdsfoot trefoil (tetraploid), model species (diploid) and recombinant inbred lines (RIL) of *Lotus*, regarding toxic Al tolerance; (ii) identify the accumulation of Al and root exudation of organic acids in the cultivated species; and (iii) select genotypes with contrasting responses to the toxic Al, comparing their morphological and molecular characteristics. The results of the characterization showed that the diploid genotypes, MG-20 and GIFU, and the cultivated UFRGS genotypes, San Gabriel and São Gabriel were the most productive in a general matter. The UFRGS genotype also presented a great superiority in situations of moderate soil acidity (22,2% of Al), demonstrating a utilization potential in regions where partial soil amelioration is done. Of the 180 RILs tested, 24 were superior and 39 were inferior to the GIFU genotype. Regarding root exudation of organic acids, in the absence of aluminum, low levels of exudation were observed for all genotypes. However, in the presence of aluminum, the results showed that the UFRGS genotype selected for Al tolerance presented a significant increase (at least 50% higher) of oxalic acid exudation compared to the other genotypes, and the UFRGS genotype proved superior to the Draco genotype in all evaluations. The result of two mass selection cycles aiming Al tolerance showed increments in dry matter production in all of the toxic aluminum concentrations tested, while the selection for Al sensibility seemed to be related to the plants' low vigor, since in the absence of Al these genotypes presented a lower accumulation of dry matter compared to the original populations. The great diversity observed in the evaluated genotypes may indicate that the Al tolerance mechanisms may act in different intensities. The exudation of oxalic acid is apparently a mechanism that permits the maintenance of the birdsfoot trefoil growth in different conditions of toxic Al, as well as the selection of a more tolerant genotype to aluminum permitted a significant increase in this defense mechanism.

---

<sup>1</sup> Doctoral thesis in Forrage Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (181 p.) August, 2009.

## SUMÁRIO

	Página
<b>CAPÍTULO 1. Introdução e Revisão Bibliográfica.....</b>	1
Introdução.....	2
Revisão Bibliográfica.....	5
1 <i>Lotus corniculatus</i> .....	5
2 Acidez do Solo e Al Tóxico.....	9
3 Fitotoxidez Causada pelo Al.....	11
3.1 Al e Crescimento Radicular.....	13
3.2 Deposição de Calose.....	14
3.3 Acúmulo de Al nos tecidos.....	16
4 Mecanismos de Tolerância ao Al.....	17
4.1 Complexação do Al por Compostos Orgânicos.....	17
4.2 Outros Mecanismos de Tolerância.....	19
5 Identificação de Regiões Genômicas Associadas com a Tolerância ao Al.....	20
6 Cátions Divalentes e a Membrana Plasmática.....	23
7 Al x Rizóbio.....	26
8 Métodos de Seleção Usados para a Identificação de Plantas Tolerantes ao Al.....	29
9 Solução Nutritiva e Al.....	32
10 Análise da diversidade via marcadores microssatélites (SSR).....	34
11 O Uso de Espécies Modelo para a Pesquisa Genética.....	39
Hipóteses.....	43
Objetivos.....	44
<b>CAPÍTULO 2. Caracterização de populações de <i>Lotus corniculatus</i> em resposta a toxidez por Al.....</b>	45
Resumo.....	46
Abstract.....	47
Introdução.....	48
Material e Métodos.....	50
Resultados e Discussão.....	53
Conclusões.....	61
Referencias Bibliográficas.....	62
<b>CAPÍTULO 3. Caracterização de genótipos diplóides de <i>Lotus</i> em resposta a toxidez por Al.....</b>	68
Resumo.....	69
Abstract.....	70
Introdução.....	71
Material e Métodos.....	72
Resultados e Discussão.....	77
Conclusões.....	87
Referencias Bibliográficas.....	88
<b>CAPÍTULO 4. Aluminum accumulation and root exudation of oxalic acid in <i>Lotus corniculatus</i> germoplasms in response to aluminum toxicity.....</b>	89

Abstract.....	90
Introduction.....	91
Material and Methods.....	92
Results and Discussion,.....	93
Acknowledgements.....	99
Referencias Bibliográficas.....	100
<b>CAPÍTULO 5. Construção e avaliação morfológica de populações de <i>Lotus corniculatus</i> contrastantes ao Al tóxico.....</b>	<b>102</b>
Resumo.....	103
Abstract.....	104
Introdução.....	105
Material e Métodos.....	107
Resultados e Discussão.....	110
Conclusões.....	118
Referencias Bibliográficas.....	118
<b>CAPÍTULO 6. Análise da diversidade genética de genótipos de <i>Lotus corniculatus</i> através de marcadores microssatélites.....</b>	<b>124</b>
Resumo.....	125
Abstract.....	126
Introdução.....	127
Material e Métodos.....	128
Resultados e Discussão.....	132
Conclusões.....	138
Referencias Bibliográficas.....	139
<b>CAPÍTULO 7. Conclusões Gerais.....</b>	<b>141</b>
Conclusões Gerais.....	142
Referências Bibliográficas.....	143
<b>CAPÍTULO 8. Apêndices.....</b>	<b>156</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
<b>CAPÍTULO II</b>	
1. Valores de pH do solo e de saturação por Al na CTC do solo, aos 80 dias após a incubação com carbonato de cálcio e magnésio (3:1), submetido a seis níveis de correção da acidez do solo. Porto Alegre, 2005.....	65
<b>CAPÍTULO III</b>	
1. Valores de pH do solo e de saturação por Al na CTC do solo, aos 80 dias após a incubação com carbonato de cálcio e magnésio (3:1), submetido a seis níveis de correção da acidez do solo. Porto Alegre, 2005.....	74
<b>CAPÍTULO IV</b>	
1. . Morphological characteristics evaluated after the last evaluation of oxalic acid (Experiment I).Porto Alegre, 2008.....	98
<b>CAPÍTULO V</b>	
1. Matéria seca da parte aérea (MSPA) de cinco germoplasmas originais de <i>L. corniculatus</i> , de nove populações de <i>L. corniculatus</i> contrastantes em relação a tolerância ao Al e de alfafa crioula. Porto Alegre, 2009.....	120
<b>CAPÍTULO VI</b>	
1. Primers de microssatélites utilizados na amplificação de cinco germoplasmas e nove genótipos contrastantes ao Al de <i>Lotus corniculatus</i> . Porto Alegre, RS, 2009 .....	131
2. Tamanho alélico (pb) e número de alelos (A) de cada um dos dezessete marcadores de microssatélites analisados na caracterização de cinco germoplasmas e nove genótipos contrastantes ao Al de cornichão ( <i>Lotus corniculatus</i> ). Porto Alegre, RS, 2009.....	133
3. Matriz de similaridade genética de cinco germoplasmas e nove genótipos contrastantes ao Al de <i>Lotus corniculatus</i> analisados pela técnica de microssatélites. Porto Alegre, 2009 .....	134



## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
<b>CAPÍTULO II</b>	
1. Matéria seca da parte aérea (MSPA) de cinco genótipos de cornichão e de alfafa crioula submetidos a seis níveis de saturação por Al. Letras maiúsculas e minúsculas indicam diferenças significativas pelo Teste a 5% de probabilidade entre os valores de saturação por Al e entre os genótipos em determinado valor de saturação por Al, respectivamente. Porto Alegre, 2005.....	66
2. Crescimento radicular médio (avaliação final – avaliação inicial) em função da concentração de alumínio (A, médias dos genótipos) e em relação a dois genótipos de cornichão e de alfafa crioula (B, média das concentrações de Al) cultivadas durante 20 dias em solução nutritiva contendo 200µM de Ca e diferentes concentrações de Alumínio. Letras maiúsculas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Porto Alegre, 2006.....	66
3. Comprimento da raiz principal (cm) de dois genótipos de cornichão e de alfafa crioula cultivadas durante 20 dias em solução de cultivo contendo 200 µM de Ca e diferentes concentrações de alumínio. Letras maiúsculas diferem os genótipos dentro de cada dose pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas diferem os genótipos dentro de cada concentração de Al e letras maiúsculas diferem cada genótipo nas diferentes concentrações pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Porto Alegre, 2006.....	67
<b>CAPÍTULO III</b>	
1. MSPA de quatro germoplasmas diplóides de Lotus e de alfafa submetidos a seis níveis de saturação por Al. Letras minúsculas e maiúsculas indicam diferenças significativas pelo Teste a 5% de probabilidade entre os valores de saturação por Al de um mesmo germoplasma e entre os germoplasmas em determinado valor de saturação por Al, respectivamente. Porto Alegre, 2005.....	77
2. Comprimento da raiz principal (CF) de quatro germoplasmas diplóides de Lotus e alfafa crioula cultivadas durante 20 dias em solução nutritiva contendo 200 µM de Ca e diferentes níveis de alumínio. Letras maiúsculas diferem os genótipos dentro de cada dose e letras minúsculas diferem cada genótipo nas diferentes doses, ambos pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Porto Alegre, 2007.....	81
3. Crescimento radicular em função da concentração de alumínio (A) e de quatro germoplasmas diplóides de Lotus e alfafa crioula (B) cultivadas durante 20 dias em solução nutritiva contendo 200 µM de Ca e diferentes concentrações de alumínio. Letras maiúsculas diferem os genótipos dentro de cada dose e letras minúsculas diferem cada genótipo nas diferentes doses, ambos pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Porto Alegre, 2007.....	83
4. Crescimento radicular relativo (CRR) em quatro germoplasmas	

diplóides de Lotus e em alfafa cultivadas em solução nutritiva por um período de 30 dias. Letras minúsculas diferem os genótipos dentro de cada dose pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Porto Alegre, 2007..... 84

#### **CAPÍTULO IV**

1. Aluminum (Al) accumulation in roots tissue of three L. corniculatus germplasms cultivated in nutrient solution, in the presence and absence of 200  $\mu$ M of Al during 120 hours. Lower case letters differentiate genotypes in each Al concentration by the Tukey test (5%). Porto Alegre, 2009..... 94
2. Oxalic acid exudation pattern of Lotus corniculatus germplasms (A and B for Experiment I and II, respectively) and Crioula alfalfa (B), after exposition to 200  $\mu$ M to Al for 24, 72 and 120 hours. Lower case letters differentiate genotypes in each Al concentration level and capital letters differentiate the same germplasms in relation to exposition time, by the Tukey test (5%). Porto Alegre, June of 2008 (Experiment I) and March of 2009 (Experiment II)..... 95

#### **CAPÍTULO V**

1. Análise de regressão para MSPA de germoplasmas de L. corniculatus e de suas respectivas populações contrastantes ao Al tóxico. (A) UFRGS, (B) Draco, (C) São Gabriel, (D) San Gabriel e (E) Estanzuela. Porto Alegre, 2009..... 121
2. Distancia Euclidiana (dissimilaridade) em quatorze materiais de Lotus corniculatus submetidos a 0% de saturação por Al no solo. Média=17,37. Porto Alegre, 2009..... 122
3. Distancia Euclidiana (dissimilaridade) em quatorze materiais de Lotus corniculatus submetidos a 25,1% de saturação por Al no solo. Média=11,40. Porto Alegre, 2009..... 122
4. Distancia Euclidiana (dissimilaridade) em quatorze materiais de Lotus corniculatus submetidos a 41,9% de saturação por Al no solo. Média=7,78. Porto Alegre, 2009..... 123

#### **CAPÍTULO VI**

1. Dendrograma obtido com base na similaridade genética de cinco materiais e nove genótipos contrastantes ao Al de cornichão (Lotus corniculatus L.), utilizando-se dezessete marcadores microssatélites. A linha tracejada indica a distância média e o ponto de corte no dendrograma. Porto Alegre, 2009..... 135

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

A.....	Número de alelos por loco
AF.....	Área foliar
AFLP.....	Polimorfismo de fragmentos amplificados via reação de PCR
Al.....	Alumínio
Al <sup>3+</sup> .....	Al trivalente, nesta tese foi utilizada a sigla Al
{Al <sup>3+</sup> } <sub>50</sub> .....	Atividade de Al requerida para decrescer o CRR em 50%
ALF.....	Alfafa
C.....	Carbono
Ca <sup>2+</sup> .....	Íon cálcio
CF.....	Comprimento radicular final
CI.....	Comprimento radicular inicial
CIMMYT.....	Centro Internacional de Melhoramento de Trigo e Milho
CR <sub>0</sub> .....	Crescimento radicular na ausência de Al
CR <sub>δ</sub> .....	Crescimento residual em concentrações de Al saturantes ao CR
CR <sub>al</sub> .....	Crescimento radicular em determinada dose de Al
CR.....	Crescimento radicular
CRR.....	Crescimento radicular relativo
cv.....	Cultivar
DNA.....	Ácido desoxiribonucléico
DPFA.....	Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia
DR.....	Cultivar de <i>Lotus corniculatus</i> Draco
DR-S1.....	Genótipo Draco após um ciclo de seleção para sensibilidade ao Al
DR-S2.....	Genótipo de Draco após dois ciclos de seleção para sensibilidade ao Al
DR-T1.....	Genótipo de Draco após um ciclo de seleção para tolerância ao Al
DR-T2.....	Genótipo de Draco após dois ciclos de seleção para tolerância ao Al
ES.....	Cultivar de <i>Lotus corniculatus</i> Estanzuela
ES-S1.....	Genótipo de Estanzuela após um ciclo de seleção para sensibilidade ao Al
ES-S2.....	Genótipo de Estanzuela após dois ciclo de seleção para sensibilidade ao Al
ES-T1.....	Genótipo de Estanzuela após um ciclo de seleção para tolerância ao Al
ES-T2.....	Genótipo de Estanzuela após dois ciclo de seleção para tolerância ao Al
ESTs.....	Seqüências alvo
F <sub>1</sub> .....	Geração após o primeiro ciclo de seleção
F <sub>2</sub> .....	Geração após o segundo ciclo de seleção
Fe.....	Ferro
H.....	Altura da planta, determinada em centímetros
H <sup>+</sup> .....	Íon hidrogênio
H <sup>+</sup> -ATP <sub>ase</sub> .....	Bombas de prótons localizadas nas membranas celulares
K.....	Potássio
Km <sup>2</sup> .....	Quilômetro quadrado
LER.....	Linha endogâmica recombinante
LOTASSA.....	Projeto denominado "Lótus Adaptation and Sustainability for South América"
Mg <sup>2+</sup> .....	Íon magnésio
mm.....	Milímetro
Mo.....	Molibdênio
MP.....	Membrana plasmática ou plasmalema
MSPA.....	Matéria seca da parte aérea
MSR.....	Matéria seca de raiz
N.....	Nitrogênio

NF.....	Número de folhas
P.....	Fósforo
PA/R.....	Relação parte aérea / raiz
pb.....	par de base
PC.....	Parede celular
PDTZ.....	Células da porção distal da zona de transição, localizadas no ápice radicular
PIC.....	Conteúdo de informação de polimorfismo
pH.....	Potencial hidrogeniônico
QTL.....	<i>Quantitative Trait Loci</i>
R.....	Número de ramificações
RAPD.....	Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso
RLFP.....	Análise de restrição de fragmentos polimórficos
rpm.....	Rotações por minuto
RR.....	Número de ramificações radiculares
RS.....	Rio Grande do Sul
SA.....	Cultivar de <i>Lotus corniculatus</i> San Gabriel
SA-S1.....	Genótipo San Gabriel após um ciclo de seleção para sensibilidade ao Al
SA-S2.....	Genótipo de San Gabriel após dois ciclos de seleção para sensibilidade ao Al
SA-T1.....	Genótipo de San Gabriel após um ciclo de seleção para tolerância ao Al
SA-T2.....	Genótipo de San Gabriel após dois ciclos de seleção para tolerância ao Al
SG.....	Cultivar de <i>Lotus corniculatus</i> São Gabriel
SG-S1.....	Genótipo São Gabriel após um ciclo de seleção para sensibilidade ao Al
SG-S2.....	Genótipo de São Gabriel após dois ciclos de seleção para sensibilidade ao Al
SG-T1.....	Genótipo de São Gabriel após um ciclo de seleção para tolerância ao Al
SG-T2.....	Genótipo de São Gabriel após dois ciclos de seleção para tolerância ao Al
SSR.....	Microssatélite
UF.....	População de <i>Lotus corniculatus</i> UFRGSI
UF-S1.....	População UFRGS após um ciclo de seleção para sensibilidade ao Al
UF-S2.....	População UFRGS após dois ciclos de seleção para sensibilidade ao Al
UF-T1.....	População UFRGS após um ciclo de seleção para tolerância ao Al
UF-T2.....	População UFRGS após dois ciclos de seleção para tolerância ao Al
UFC.....	Unidade Formadora de Colônia
UFRGS.....	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USDA.....	<i>United States Department of Agriculture</i>
VR.....	Volume radicular
WAK.....	Proteína quinase associada a PC

# **CAPÍTULO I**

## INTRODUÇÃO

Na pecuária da América do Sul, a alimentação do rebanho depende basicamente das pastagens e, desta forma, a produção animal é determinada pela produtividade vegetal. O uso de leguminosas forrageiras pode melhorar o valor nutricional e a produtividade das pastagens, maximizando assim o desempenho animal. Somente na região do Cone Sul da América do Sul, 45 milhões de hectares de pastagens podem ser melhorados pelo uso de leguminosas (Kirkbride, 1999).

No entanto, a crescente pressão imposta pela exploração intensiva das grandes monoculturas tem levado as áreas de pastagens para regiões marginais, que geralmente apresentam, entre outras limitações, baixa fertilidade dos solos. Como conseqüência, as pastagens crescem geralmente no limite de sua adaptação, sendo submetidas, ainda, a freqüentes estresses abióticos. A tolerância a estresses abióticos em pastagens e plantas cultivadas vem se tornando mais importante com as mudanças climáticas globais e devido a outras ações antropogênicas, tal como a desertificação. Um dos principais desafios para os melhoristas de plantas é a produção de um germoplasma superior que seja capaz de manter produtividades aceitáveis em condições ambientais adversas. Para aumentar a produtividade, não se deve buscar somente o aumento, mas também a estabilidade da produção.

Dentre os estresses abióticos, destaca-se a acidez do solo, associada à toxidez por Al, pois grande parte dos solos apresenta algum nível de acidez, principalmente nas áreas tropicais e subtropicais úmidas. Somente na América tropical, cerca de 850 milhões de hectares apresentam este tipo de problema (Rao *et al.*, 1993). No Brasil, a ocorrência de solos com problemas de toxidez de Al é da ordem de 60% da área, considerando-se as terras com potencial para atividade agrícola (Abreu Jr., 2003).

No caso das leguminosas, os solos ácidos representam um desafio adicional, porque os rizóbios simbióticos são sensíveis a esta condição (Hartel & Bouton, 1989). Portanto, os fatores que contribuem para a baixa fertilidade dos solos ácidos e seus efeitos no crescimento vegetal são complexos, dado a variedade de restrições químicas específicas (Kamprath & Foy, 1985).

A prática cultural mais utilizada para corrigir a acidez do solo é a aplicação de calcário (calagem), que visa elevar o pH do solo, evitando a formação de espécies tóxicas de Al e disponibilizando outros nutrientes essenciais para o crescimento vegetal (Taiz & Zeiger, 2003). No entanto, a calagem pode ser limitada pelo custo do calcário, pelo seu transporte, pela sua aplicação, e pela dificuldade de se corrigir horizontes mais profundos, devido à baixa mobilidade dos produtos de sua reação no solo (Rao *et al.*, 1993). Embora existam práticas alternativas, como a incorporação profunda do calcário, ou o uso de sais mais solúveis, como o gesso, tais opções sofrem restrições de ordem técnica ou econômica, que podem inviabilizar sua utilização, particularmente no caso da chamada agricultura de baixos insumos.

Em vista dessa situação, muitos pesquisadores, em diferentes lugares do mundo, postulam que a seleção e o melhoramento de variedades produtivas e tolerantes à toxidez de Al sejam considerados componentes de grande importância dentro das estratégias de manejo em regiões com solos ácidos. Esta técnica, apesar de ser mais complexa e apresentar resultados em médio e longo prazo, pode baratear os custos de produção e, ainda, aumentar a persistência, no caso de espécies perenes (Milan *et.al.*, 1991).

Dentre as leguminosas forrageiras, algumas espécies do gênero *Lotus* (*L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. subbiflorus*, *L. glaber*) destacam-se devido ao potencial de adaptação a regiões que apresentem moderada acidez do solo (Blumenthal & McGraw, 1999).

Com intuito de minimizar estes problemas e superar estas dificuldades, foi desenvolvido um projeto denominado LOTASSA (*Lotus* Adaptation and Sustainability in South América), objetivando selecionar genótipos superiores de *Lotus* tolerantes a diversos estresses ambientais (seca, alagamento, acidez do solo e salinidade), comumente encontrados nos ambientes da América do Sul.

Devido à esperada sintonia entre as espécies de *Lotus*, o projeto LOTASSA objetiva aumentar a adaptação a estresses abióticos, e a sustentabilidade de produção de espécies de *Lotus* agronomicamente importantes pelo uso de recursos genéticos da planta modelo *L. japonicus*, assim como de outras espécies diplóides como *L. burtii* e *L. filicaulis*.



Dentro deste projeto, a UFRGS é responsável pela parte de caracterização, seleção e melhoramento de *Lotus corniculatus* tolerantes a solos ácidos, fração esta que constituiu este trabalho de pesquisa.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1) *Lotus corniculatus*

Nos países do Cone Sul da América do Sul (Brasil, Argentina, Uruguai e Chile), as produções bovina e ovina em sistemas extensivos representam uma porção significativa da economia destes países. Existe uma demanda crescente para produtos animais de alta qualidade produzidos extensivamente em todo o mundo, no entanto o aumento da produção de carne fica limitado geralmente pela estacionalidade de produção e de qualidade das forrageiras.

Embora algumas pastagens utilizando leguminosas forrageiras tenham sido implantadas nestas regiões, particularmente em sistemas intensivos de rotação de culturas, cerca de 70% do total da área disponível para pastejo é representada apenas por pastagem nativa (FAO, 1993).

O cultivo de leguminosas forrageiras temperadas (*Lotus corniculatus*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Medicago sativa*) em áreas da América do Sul iniciou-se pela introdução de sementes misturadas de diversas origens (principalmente Europa e Oceania) (Frame *et al.*, 1998).

As espécies de *Lotus* apresentam uma série de vantagens que podem permitir seu sucesso na região do Cone Sul, tais como: (i) boa produção de forragem em relação a outras leguminosas; (ii) o crescimento sob baixa

disponibilidade de fósforo e melhor adaptabilidade a solos ácidos (Risso & Carambula, 1998); (iii) o conteúdo de tanino, que beneficia o comportamento animal, uma característica importante sob pastejo, uma vez este atua como regulador do consumo, permitindo uma maior persistência da espécie no sistema, além de contribuir para aumentar o conteúdo de proteína não degradada no rúmen .

Este gênero compreende aproximadamente 125-180 espécies, perenes e anuais, exibe uma grande diversidade de formas e adapta-se a vários ambientes. As principais espécies de *Lotus* com alta produção de forragem no Cone Sul são: *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* (Kirkbride, 1999). Estas quatro espécies crescem em condições naturais ou em pastagens cultivadas e sua distribuição varia de acordo com as condições locais de solo e clima. Além disto, uma das mais marcantes características das leguminosas perenes nesta região é seu uso em áreas de rotação de culturas, onde arroz, trigo, cevada, aveia e girassol são plantados.

*L. corniculatus* destaca-se como uma das principais espécies agrônomicas deste gênero, principalmente pela sua ampla distribuição e pelo seu elevado valor forrageiro (Sokoloff & Lock, 2005). É uma leguminosa perene, hibernal, de origem européia e mediterrânea, amplamente distribuída no mundo, ausente apenas em regiões muito frias, tendo sido naturalizada nas regiões temperadas da América do Sul e do Norte, Austrália e Nova Zelândia.

Grande parte da facilidade de sua adaptação está relacionada com a elevada variabilidade genética desta espécie. É uma espécie considerada polimórfica em função do ambiente para os vários caracteres, tais como:

pilosidade; cor da folha; número de flores por umbela; compatibilidade reprodutiva; morfologia radicular; qualidade de forragem; resistência a insetos; e para constituintes bioquímicos e moleculares (Beuselinck & Steiner, 1992; Garcia de Los Santos, 1997; Steiner, 1999).

Em geral, o cornichão apresenta-se como uma planta herbácea, glabra ou pouco pilosa, com hábito de crescimento variável de decumbente a ereto. A raiz é pivotante com ramificações laterais, sendo que alguns genótipos possuem rizoma. As hastes principais se desenvolvem a partir de gemas situadas na coroa da planta; as ramificações secundárias e terciárias surgem das axilas das folhas, formando multirramificações. As folhas são trifolioladas e possuem um par de estípulas grandes. A inflorescência é do tipo umbela, geralmente com quatro a seis flores amarelas, apresentando polinização cruzada. Os estames são diadelfos, com filetes engrossados no ápice; ovário reto, estilete longo e estigma capitado. O fruto é um legume, linear e elasticamente deiscente (Izaguirre & Beyhaut, 1998; Kirkbride, 1999).

O cornichão é classificado como uma planta de dia longo, necessitando de pelo menos 15 horas de luz por dia para obtenção de um florescimento abundante. Com um menor fotoperíodo, as plantas produzem poucas inflorescências e mais flores estéreis, quando comparado a plantas que crescem sob um fotoperíodo longo (Jones & Turkington, 1986).

No Brasil, a única cultivar (cv) comercialmente disponível é a São Gabriel. O material foi desenvolvido pela Estação Experimental Agrônômica da Secretaria de Agricultura de São Gabriel, RS, a partir de pesquisas realizadas entre os anos de 1955 e 1965. A cultivar é caracterizada pela boa

produtividade e elevada qualidade de forragem, tendo sido difundida em outros estados e também em países vizinhos, como o Uruguai e a Argentina (Paim, 1988).

Assim como em outras espécies de valor agrônômico, a produtividade de pastagens de cornichão pode ser limitada por restrições ambientais que afetam a germinação de sementes, o estabelecimento, o crescimento e a produção de sementes. Limitações nutricionais, tais como a disponibilidade de nitrogênio e fósforo, são comuns em todos os solos da América do Sul. Adicionalmente, estresses climáticos estão entre os fatores limitantes à produção mais importantes na Região do Cone Sul (Blumenthal & McGraw, 1999).

Dentre estas limitações, a acidez do solo e a toxidez por Al se destacam no Brasil e Chile. Pode-se observar a existência de uma ampla variabilidade entre as espécies com relação a este estresse em plantas forrageiras (Edmeades, *et al.*, 1991). Algumas espécies de *Medicago* mostram-se muito sensíveis, enquanto que espécies do gênero *Lotus* toleram moderadas concentrações de Al e baixo pH (Blamey *et al.*, 1990; Bolan *et al.*, 1991).

O uso de espécies do gênero *Lotus*, reconhecidamente tolerantes ao Al, em programas de melhoramento, é de fundamental importância para o desenvolvimento de forrageiras mais adaptadas a solos com alta acidez e toxidez por Al. A obtenção de materiais genéticos deste tipo permitirá a melhoria da produção e qualidade das pastagens em áreas marginais que atualmente vem sendo subutilizadas.

No entanto, a seleção e melhoramento são limitados pelo modo de reprodução destas espécies (alógamas), que dificulta a manutenção da identidade de um genótipo pela facilidade de cruzamentos entre espécies, e pela complexidade das respostas fisiológicas e metabólicas aos estresses. Um outro problema comum no melhoramento de muitas destas espécies forrageiras está na limitada base genética utilizada no desenvolvimento de cultivares (Baker, 1994). Este problema afeta também o cornichão, e para evitar gargalos genéticos no futuro devem-se utilizar eficientemente os recursos e a diversidade genética, através de estudos para caracterizar esta diversidade e do uso de ferramentas adequadas de melhoramento.

## **2) Acidez do solo e toxidez de alumínio**

Considera-se a toxidez por Al um dos principais fatores limitantes da produtividade agrícola em solos ácidos (Foy *et al.*, 1978). Em escala global, os solos ácidos ocupam uma superfície estimada em 37,8 milhões de km<sup>2</sup>, dos quais 67 % possuem valores de pH inferiores a 5,5 (Eswaran *et al.*, 1997). As áreas de acidez natural dos solos concentram-se em duas amplas regiões: uma no hemisfério norte, coberta por bosques de coníferas, sob clima temperado, e uma outra, de distribuição intertropical, coberta por savanas e florestas úmidas (Von Uexküll & Mutert, 1995).

Um estudo abrangendo 26 solos de regiões brasileiras mostrou que 75 % dos valores de pH da camada superficial variaram entre 3,78 e 5,52, e que o Al foi o cátion trocável predominante em mais de um terço dos solos com pH inferior a 5,6 (Abreu Jr *et al.*, 2003). A avaliação realizada por Rheinheimer

*et al.*, (2001) para o Estado do Rio Grande do Sul, mostrou que 45% das amostras de solos deste estado, analisadas até ano 2000, apresentaram pH abaixo de 5,5, sendo as frequências das amostras enquadradas nas classes muito baixa e extremamente baixa ( $\text{pH} < 5,0$ ) ficando em cerca de 17,3% e das amostras na classe baixa (pH entre 5,0 e 5,4) em 27,3%.

Além disso, em outras partes do mundo, os níveis de acidez dos solos estão aumentando, em decorrência de atividades humanas. Entre os motivos da acidificação antropogênica dos solos estão: a liberação atmosférica de poluentes industriais; a lixiviação de solos com chuvas ácidas; as atividades de mineração e; no setor agrícola, a nitrificação decorrente da aplicação de altas doses de fertilizantes amoniacais (Rengel e Zhang, 2003).

Em ambientes tropicais, o termo "acidez do solo" abrange um conjunto de características químicas distintas, que compreendem tanto situações de toxidez iônica (excesso de Al,  $\text{H}^+$  e, às vezes, Mn) como limitações nutricionais, devido a deficiências de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ , e Mo, aliadas a uma baixa disponibilidade de P (Marschner, 1991). Adicionalmente, os teores de K e N em muitos solos ácidos tropicais tendem à deficiência, devido ao alto grau do intemperismo ou aos baixos conteúdos de matéria orgânica. Portanto, em solos com tais características químicas, o crescimento radicular poderá ser afetado por vários estresses que poderão atuar de maneira conjunta.

Na maioria dos solos ácidos, o Al e o Mn são mais importantes que o  $\text{H}^+$  na toxidez das plantas, sendo os problemas com Al mais severos em solos com pH abaixo de 5,0. O Al removido dos solos sob condições de acidez ocorre sob as formas  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ ,  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$  e  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})^{3+}$ , sendo esta a forma mais

tóxica para as plantas, referida nas literaturas como Al ou  $\text{Al}^{+3}$  (Kinraide, 1991). No entanto, o ponto crítico em que o Al torna-se solúvel e trocável depende de muitos fatores do solo e da planta.

Um correto entendimento da toxidez pelo Al e dos mecanismos de tolerância é importante para o desenvolvimento de testes apropriados para seleção de germoplasmas tolerantes e para o desenvolvimento de plantas com performance superior em solos ácidos.

### **3) Fitotoxidez causada pelo alumínio**

É possível encontrar grandes diferenças nos limites dados para os efeitos estimulantes ou inibitórios do Al, em função de fatores como a força iônica e composição da solução nutritiva. Diversas espécies vegetais, como o trigo (Kinraide, 1993) e o milho (Barceló & Poschenraider, 2002) apresentaram estímulo do crescimento radicular em baixas concentrações de Al. Em todos os trabalhos, os autores atribuíram os efeitos de hormese à redução da toxidez de  $\text{H}^+$ , em espécies ou variedades sensíveis a uma alta concentração de  $\text{H}^+$  na região de crescimento radicular.

Excluindo situações mais específicas, admite-se que a forma trivalente ( $\text{Al}^{+3}$ , denominado Al nesta tese) é a mais fitotóxica entre as espécies monoméricas de Al. De acordo com o comportamento das espécies iônicas de Al em solução, espera-se que o poder fitotóxico de uma solução contendo Al seja maximizado a valores de pH 4,0 ou inferiores (Ernani, 2008). Todavia, a maioria das plantas cultivadas não tolera níveis tão altos de acidez, de forma que as suas respostas ao Al devem ser testadas com valores de pH maiores

que 4,0, em que o Al, mesmo com a sua atividade mais reduzida, pode ainda causar sérias lesões em genótipos mais sensíveis (Ma, 2000).

Quando se refere à descrição das respostas induzidas pelo Al, especialmente as relacionadas ao crescimento radicular e aos seus reflexos na planta inteira, diversas referências são encontradas na literatura (Rhue, 1979; Delhaize & Ryan, 1995; Hede, *et al.*, 2001; Rout *et al.*, 2001; Samac & Tesfaye, 2003; Kochian *et al.*, 2002, 2005; Pavlovkin *et al.*, 2009). Embora os mecanismos causais da toxidez do Al possam parecer complicados, não se deve esquecer que eles são resultados, na sua essência, da ligação do Al com substâncias situadas na parede celular (PC), na membrana plasmática (MP), no citoplasma ou no núcleo da célula. Como já foi observado, o Al possui forte afinidade por compostos doadores de elétrons, o que inclui uma longa lista de ligantes, desde moléculas estruturalmente simples, como os fosfatos inorgânicos, até algumas bastante complexas, como antocianinas e outros flavonóides (Tolrà *et al.*, 2005). Isso significa um amplo leque de oportunidades de ligação a diversos sítios nos domínios apoplástico e simplástico.

Dentro da ampla variedade de reações induzidas pelo Al nas plantas, três destas se destacam, pela sua universalidade e precocidade de expressão, supondo estarem relacionadas direta ou indiretamente com os mecanismos causadores da toxidez. São elas: (a) inibição do crescimento radicular, incluindo a localização do sítio de percepção do estresse no ápice radicular; (b) acúmulo de calose na membrana plasmática; e (c) acúmulo e distribuição de formas de Al nas células.



### 3.1) Alumínio e crescimento radicular

O principal alvo da toxidez por Al é o ápice radicular (Samac & Tesfaye, 2003). O Al afeta uma série de funções celulares, dificultando a identificação dos principais efeitos da toxidez por este metal. A exposição ao Al causa atrofia da raiz principal e inibição da formação de raízes secundárias, resultando na formação de um sistema radicular sensível, que prejudica a absorção de nutrientes e água que torna a planta mais susceptível ao estresse hídrico.

Ryan *et al.* (1993), trabalhando com plântulas de milho, demonstraram que a inibição do crescimento radicular ocorria apenas quando a região apical (2-3 mm) da raiz era exposta ao Al. A aplicação de qualquer outra porção da raiz ao Al não influenciou no crescimento radicular.

O ápice radicular também acumula mais Al que outras porções da raiz. Na literatura, existem algumas evidências de que a inibição do crescimento radicular ocorre devido a uma inibição da elongação celular (Kochian, 1995; Ma, 2000; Ciamporová, 2002). Estudos demonstraram que esta inibição ocorre rapidamente (minutos ou horas) após a exposição ao Al, enquanto que a divisão celular requer de 6 a 24 horas para ocorrer (Ciamporová, 2002). Kollmeier *et al.* (2000), trabalhando com milho, identificaram as células da porção distal da zona de transição (PDZT) do ápice radicular como as mais sensíveis à toxidez causada pelo Al. A parede celular desta zona acumula Al mais rapidamente do que em outras células, devido a mais alta proporção de pectina (Ciamporová, 2002). A ligação do Al na parede celular das raízes desprende cálcio da pectina, o qual inibe o crescimento

radicular (Rengel & Reid, 1997; Ryan *et al.*, 1997). Tratamentos de Al tem mostrado também uma rápida inibição do fluxo de auxina nas células PDTZ, a qual está relacionada com a inibição da elongação radicular (Kollmeier *et al.*, 2000).

Por mais precoce que seja a inibição do crescimento celular, este não é um evento primário em relação à toxidez pelo Al. Existe uma rede de processos bioquímicos e fisiológicos que podem ser bloqueados previamente à inibição da extensibilidade celular (Rengel e Zhang, 2003). Destes mecanismos, alguns vêm sendo estudados com mais atenção, como o caso das propriedades viscoelásticas da parede celular (Ma *et al.*, 2005), da despolarização da membrana plasmática associada à redução da atividade das bombas de prótons ( $H^+$ -ATP<sub>ase</sub>) nessa membrana (Pavlovkin *et al.*, 2009), dos aumentos nos teores de  $Ca^{2+}$  citossólico, do acúmulo de calose, e das alterações da dinâmica do citoesqueleto (Rengel & Zhang, 2003).

### **3.2) Deposição de calose**

A calose é um  $\beta$ -1,3-glucano<sub>4</sub>, sintetizada nos elementos crivados do floema, sendo a 1-3- $\beta$ -glucano-sintetase responsável pela sua síntese, e 1,3- $\beta$ -glucanase, responsável pela sua degradação. Estas enzimas se localizam na membrana plasmática, mais especificamente ao redor dos plasmodesmos (Sivaguru *et al.*, 2001).

Geralmente sua deposição ocorre em resposta a lesões provocadas pela invasão de fungos ou bactérias e de outros estresses ambientais, como altas temperaturas (Sivaguru *et al.*, 2000). Nas respostas patogênicas, a

deposição de calose nos poros das placas crivadas serve como uma barreira física, bloqueando os organismos invasores e prevenindo sua propagação ao resto da planta.

É notável que uma das respostas mais sensíveis à toxidez de Al nas raízes seja a rápida síntese deste polissacarídeo, indicando que a percepção que a planta tem da injúria causada pelo Al seja semelhante a de um ferimento. A formação de calose, através da toxidez causada pelo Al, é induzida primariamente nas células apicais do córtex periférico (Sivaguru & Horst, 1998).

Devido à sensibilidade do mecanismo, a síntese da calose é considerada um bom indicativo do grau de injúria, podendo, inclusive, ser utilizado como um critério de seleção, conforme sugerido por Wissemeier *et al.* (1992). De acordo com estudos de Sivaguru & Horst (1998), a máxima acumulação de calose acontece nas células periféricas da zona distal de alongamento, coincidindo com o pico de inibição do alongamento celular e de acúmulo de Al nessa região apical.

O acúmulo de calose, principalmente na face externa da membrana plasmática e no lúmen do plasmodesma, tem como consequência o bloqueio da comunicação entre células contíguas, impedindo o transporte de água e solutos por via simplástica (Sivaguru *et al.*, 2000). É possível, portanto, que várias das manifestações de toxidez na parte aérea, particularmente a interferência nas relações hídricas celulares, sejam reflexo deste bloqueio dos plasmodesmas pela calose. Dada à magnitude desses efeitos secundários, tem havido interesse em determinar os eventos fisiológicos e moleculares relacionados ao acúmulo da calose. Resultados de pesquisas mais recentes

indicam que a indução da síntese de calose depende tanto da despolarização da membrana plasmática quanto do aumento nas concentrações do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Sivaguru *et al.*, 2005). Estes resultados reforçam que o aumento temporário no teor de  $\text{Ca}^{+2}$  pode ter um papel na redução da expressão da toxidez por Al (Rhengel & Zhang, 2003).

### **3.3) Acúmulo de alumínio nos tecidos**

Um outro sintoma característico, de rápido aparecimento após a exposição ao Al, é o aumento da concentração deste elemento nos tecidos radiculares. A acumulação significativa, em termos de toxidez, é aquela que se processa no extremo apical das raízes, região na qual se situam as células mais sensíveis. Os experimentos de Sivaguru & Horst (1998) e Kollmeier *et al.* (2000), com uma cultivar sensível de milho, demonstraram que na zona de máxima sensibilidade (zona de transição) verificou-se o maior acúmulo de Al, além do fato de que a indução da síntese de calose foi maximizada.

Estudos realizados com outras espécies (anuais ou perenes) têm mostrado esta mesma associação entre alta concentração de Al, inibição do crescimento radicular e acúmulo de calose, nos primeiros 5-10 mm a partir do extremo apical, dependendo da espécie. Supõe-se que células maduras não contribuam para o efeito inibitório do Al, uma vez que já cessaram o seu crescimento, mantendo, todavia, sua capacidade de absorver o metal.

Samuels *et al.* (1997) observaram que o teor de Al na zona entre zero e dois mm da raiz primária de uma cultivar tolerante de trigo foi sempre inferior em comparação com os das regiões mais maduras, ao passo que numa

cultivar sensível o padrão foi exatamente o inverso, com maior acúmulo na zona apical. Esse resultado é típico e ilustra o fato de que o mecanismo de defesa ou proteção se expressa na região de máxima sensibilidade, excluindo e neutralizando parcialmente os íons  $Al^{+3}$  potencialmente tóxicos.

Com relação à natureza das lesões geradas pelo Al, ainda pairam dúvidas: aqueles pesquisadores que sustentam que a natureza das lesões causadas pelo Al é primariamente apoplástica não podem deixar de reconhecer a possibilidade da participação de fatores citossólicos, em vista da rápida penetração do Al no simplasma, enquanto os que pensam que a toxidez decorre da interação do Al com componentes citossólicos também não podem descartar um papel para o apoplasto, tendo em vista que o Al acumula-se em altíssimas quantidades neste compartimento (Horst *et al.*, 2007).

#### **4) Mecanismos de tolerância ao alumínio**

As estratégias de tolerância ao Al identificadas podem ser divididas nas que envolvem a exclusão do Al do ápice radicular, e nos mecanismos que levam a planta a tolerar o Al dentro da célula (Taylor, 1991; Samac e Tesfaye, 2003). Dentre estes mecanismos, destaca-se a complexação do Al por compostos orgânicos.

##### **4.1) Complexação do alumínio por compostos orgânicos**

Os dois grupos mais importantes em relação à toxicidade de Al são o dos materiais húmicos complexos, de alto peso molecular (ácidos húmicos e fúlvicos), e o representado por compostos bioquímicos de baixo peso

molecular, como os ácidos orgânicos (Haynes & Mokolobate, 2001). Ambos os grupos podem formar complexos de estabilidade variada com formas de Al monomérico. As espécies de Al complexado com humatos e fulvatos, devido ao seu grande tamanho, não podem permear os poros da parede celular nem, portanto, ser absorvidas como tais.

Os efeitos benéficos dos ácidos orgânicos de baixo peso molecular têm sido demonstrados tanto em solos ácidos como em solução nutritiva (Hue *et al.*, 1986), havendo, entretanto, diferenças entre eles quanto à sua efetividade. Essas diferenças resultam de suas configurações estruturais: os mais efetivos têm dois pares de grupos funcionais OH/COOH ligados a dois C adjacentes (caso dos ácidos cítrico e tartárico) ou dois grupos COOH conectados diretamente (ácido oxálico), configurações essas que permitem a formação de estruturas cíclicas estáveis com o Al (Hue *et al.*, 1986).

Além da fonte exógena representada pela matéria orgânica solúvel, a detoxificação do Al rizosférico pode acontecer via exsudação radicular de ácidos orgânicos (Miyazawa *et al.*, 1992; Jones, 1998; Ma *et al.*, 2001). Uma série de estudos realizados em genótipos tolerantes ao Al de trigo, milho, girassol, soja e feijão, entre outras espécies, demonstram que a exclusão do Al ocorre via excreção de ácidos orgânicos que quelam o Al (Jones, 1988; Ma, 2000; Ma *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2001; Kochian *et al.*, 2002). Dentre os ácidos orgânicos, o citrato é o que apresenta o maior poder de ligação ao Al, seguido pelo ácido oxálico, malato e succinato, respectivamente (Hue *et al.*, 1986). A ativação do efluxo dos ácidos orgânicos ocorre rapidamente após a exposição ao Al em várias espécies, como no caso do trigo (Ryan *et al.*, 1995). Em outras,

um intervalo entre a exposição e o efluxo é observado, sugerindo que a indução gênica e a síntese de proteína são necessárias (Ma *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2001; Piñeros *et al.*, 2002).

Em plantas de trigo e de milho, têm sido identificados e caracterizados canais aniônicos, localizados na membrana plasmática de células da região apical das raízes. Tais canais, que têm permeabilidade para malato, no caso do trigo (Kochian, 1995; Zhang *et al.*, 2001), ou citrato, em cultivares tolerantes de milho (Kollmeier *et al.*, 2001; Piñeros *et al.*, 2002), são ativados especificamente por meio do Al extracelular, por mecanismos até agora desconhecidos.

#### **4.2) Outros mecanismos de tolerância**

Embora os ácidos orgânicos apresentem um papel central na exclusão do Al, outros mecanismos de tolerância têm sido identificados.

Mutantes de *Arabidopsis* tolerantes ao Al (alr-104), quando expostos ao Al, aumentam a taxa de influxo de prótons no ápice radicular na ordem de 100%, resultando em um incremento líquido do pH da superfície radicular (Degenhardt *et al.*, 1998). Esta alteração no pH poderia precipitar o Al da solução do solo próximo à rizosfera, inibindo sua entrada nas raízes, ou talvez alterar o equilíbrio dos íons de Al para formas menos tóxicas.

Em feijão caupi, a formação de uma mucilagem na ponta da raiz aumentaria a tolerância ao Al (Samac & Tesfaye, 2003). Esta mucilagem ajudaria na formação de uma barreira à difusão do Al ou concentraria ácidos orgânicos que quelariam este metal (Li *et al.*, 2000). Outro mecanismo de

exclusão do Al inclui a ligação de proteínas secretadas (Basu *et al.*, 1999), que associado à permeabilidade seletiva das membranas, também atua como uma barreira para o movimento do Al em direção ao citossol.

Os mecanismos de tolerância ao Al dentro da célula são bem menos estudados de maneira geral (Samac & Tesfaye, 2003). Plantas sensíveis e tolerantes acumulam Al quando crescem em condições de acidez do solo (Foy *et al.*, 1992). A acumulação de Al pelas plantas está associada com ligantes orgânicos, tais como ácidos fenólicos, que complexam e seqüestram este elemento para células especializadas, como as da epiderme foliar (Jensen *et al.*, 2002). Algumas variedades de trigo secretam ácido oxálico nas raízes em resposta ao Al, acumulando também o complexo Al-ácido oxálico nas células da folha (Ma *et al.*, 1998). Já em uma variedade de milho Al-tolerante, o Al é acumulado nos vacúolos das células da raiz (Vasquez *et al.*, 1999).

O mais provável é que as plantas utilizem uma série de mecanismos de tolerância ao Al atuando em conjunto, sendo alguns específicos para o Al e outros relacionados de maneira geral com a resposta a estresses (Samac & Tesfaye, 2003).

## **5) Identificação de regiões genômicas associadas com a tolerância ao alumínio**

A variabilidade genética para a tolerância ao Al tem sido explorada para desenvolver variedades tolerantes de várias espécies e para explorar o número de genes envolvidos na tolerância ao Al. Segundo Samac & Tesfaye (2003), estes estudos têm por objetivo determinar a natureza e o número de



genes que controlam a tolerância ao Al nas plantas, incluindo: (a) estudos genéticos para identificar *loci* para tolerância ao Al, bem como o mapeamento molecular para a identificação de marcadores de DNA; (b) o isolamento e a caracterização de genes induzidos durante a toxidez causada pelo Al; (c) produção e avaliação de plantas mutantes; e (d) o uso de plantas transgênicas em estudos de tolerância.

O trigo é a espécie mais amplamente estudada com relação à tolerância ao Al. No entanto, poucos estudos têm sido realizados no sentido de correlacionar os mecanismos de tolerância ao Al nesta espécie baseando-se em populações segregantes ou em linhas isogênicas. Em geral, a tolerância ao Al em trigo aparece atribuída à ação de um gene dominante, no entanto outros genes têm sido associados ao grau de tolerância em algumas variedades de trigo (Riede & Anderson, 1996).

O uso de cruzamentos entre genótipos tolerantes e sensíveis ao Al e o desenvolvimento de bibliotecas de *cDNA* tem possibilitado o desenvolvimento de marcadores de DNA e a identificação de genes relacionados à tolerância ao Al (Riede & Anderson, 1996; Camargo *et al.*, 2000; Hamel *et al.*, 1998).

Em espécies como a alfafa, a seleção para a tolerância ao Al é complexa devido a sua herança tetraplóide e porque a autogamia leva a depressão endogâmica, que pode de alguma forma mascarar a tolerância ao Al (Samac & Tesfaye, 2003). Extensivos esforços foram direcionados no sentido de se selecionar alfafa resistente ao Al (Bouton, 1996; Dall' Agnol *et al.*, 1996). Plantas de alfafa cultivada, assim como plantas oriundas de introduções, apresentaram aumento da resistência quando selecionadas em solos ácidos,

no entanto, o progresso obtido não foi suficiente para se obter um genótipo com produção de matéria seca substancial. Recentemente, QTLs condicionadas à tolerância ao AI em alfafa diplóide têm sido identificadas usando RFLP em populações F<sub>2</sub>, e nas populações retrocruzadas (Sledge *et al.*, 2002), o que pode facilitar o desenvolvimento de variedades mais tolerantes ao AI.

Genomas grandes e a poliploidia têm limitado o entendimento da base genética e molecular da tolerância ao AI em várias espécies estudadas. Adicionalmente, poucas investigações têm sido realizadas usando germoplasmas isogênicos com contrastantes tolerâncias ao AI, complicando desta forma as análises genéticas e moleculares (Samac & Tesfaye, 2003). Alguns estudos vêm sendo realizados usando linhas mutantes de *Arabidopsis thaliana*, gerando, descrevendo e caracterizando vários mutantes sensíveis (als) e tolerantes (alr) ao AI (Larsen *et al.*, 1997). Populações F<sub>2</sub> provenientes do cruzamento de cada mutante com o tipo selvagem foram utilizadas para o mapeamento e para a determinação da herança. Oito mutantes als apresentaram mutações recessivas representando 7 *loci* únicos, embora uma outra tenha se apresentado como uma mutação semi-dominante. Três mutantes als, que foram escolhidos por Larsen *et al.* (1997) para serem mapeadas, se localizaram no cromossomo 5. Análises de sete mutantes alr confirmados indicaram mutações semi-dominantes para todos os mutantes avaliados (Larsen *et al.*, 1997; Degenhardt *et al.*, 1998). Destes, cinco mutantes alr foram submetidos a mapeamento baseado em RAPD e SSR, e as mutações foram localizadas no cromossomo 1 para quatro mutantes (alr-108, alr-128, alr-

131, alr-139) e no cromossomo 4 para alr-104 do genoma de *Arabidopsis* (Larsen *et al.*, 1997; Degenhardt *et al.*, 1998).

## **6) Cátions divalentes e a membrana plasmática**

As interações mais estudadas entre o Al e os cátions divalentes são aquelas com o  $\text{Ca}^{2+}$  e o  $\text{Mg}^{2+}$ . Um quadro complexo surge, visto os importantes papéis que esses cátions desempenham na transdução de sinais, no metabolismo e no crescimento vegetal.

Uma concentração basal de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio é essencial para o alongamento radicular (Koyama *et al.*, 2001). Isso porque na PC, o íon  $\text{Ca}^{2+}$  desempenha papel-chave na manutenção da conformação espacial das redes de pectina. Portanto, o deslocamento do  $\text{Ca}^{2+}$  ligado às pectinas inevitavelmente alterará as propriedades físicas da parede, incluindo sua extensibilidade, rigidez e permeabilidade (Rengel & Zhang, 2003).

Como a inibição do alongamento celular envolve, necessariamente, o bloqueio dos processos responsáveis pelo afrouxamento da parede celular (relaxamento do estresse), foi suposto que uma razão primária da ação fitotóxica do Al poderia implicar no deslocamento de íons  $\text{Ca}^{2+}$  de sítios críticos no apoplasto (Rengel, 1992). Essa idéia é a chamada "hipótese do deslocamento", segundo a qual um cátion é tóxico porque desloca  $\text{Ca}^{2+}$  da superfície celular (Kinraide, 1998), induzindo, portanto, uma situação de deficiência do cátion deslocado. No que diz respeito ao Al, não existem dúvidas de que, sendo um competidor muito forte por sítios de ligação eletrostática, o  $\text{Al}^{3+}$  se liga às pectinas muito mais fortemente que o  $\text{Ca}^{2+}$ , chegando a deslocar

em alguns casos, até 99,99 % do  $\text{Ca}^{2+}$  ligado à parede celular (Taylor *et al.*, 2000).

A hipótese do deslocamento foi revisada criticamente por Ryan *et al.* (1993, 1997), que apresentaram evidências de que o efeito amenizador não era exclusividade do  $\text{Ca}^{2+}$ , podendo também ser obtido pela adição de quantidades apropriadas de cátions monovalentes. Nesses experimentos, evidenciou-se igualmente que, na presença de baixas concentrações de Al, a inibição do crescimento poderia acontecer sem envolver, necessariamente, a inibição da absorção de  $\text{Ca}^{2+}$ . Portanto, o bloqueio, pelo Al, de canais permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ , situados na membrana plasmática, embora se manifeste muito rapidamente, não parece ser o motivo da inibição do alongamento celular (Rengel & Zhang, 2003).

Há uma outra possibilidade indireta, resultante do deslocamento do  $\text{Ca}^{2+}$  ligado às pectinas, que consistiria na interferência do Al nos elementos do citoesqueleto (microtúbulos, filamentos de actina) via conexões estabelecidas pelas WAKs (wall-associated kinase) e outras proteínas com funções similares no *continuum* PC-MP- citoesqueleto (Horst *et al.*, 1999; Sivaguru *et al.*, 2003).

As WAKs são uma, entre as várias famílias de proteínas quinases caracterizadas nos últimos anos, muito abundantes em plantas, atuam na conexão entre a parede celular e a membrana plasmática (MP). WAK1, uma das cinco isoformas encontradas em *Arabidopsis thaliana*, é uma proteína integral da membrana, onde foi identificada uma seqüência de aminoácidos (o peptídeo WAK67\_254) que se liga ao ácido poligalacturônico por meio da formação de pontes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Decreux & Messiaen, 2005). O gene WAK1 se

expressa em resposta a ferimentos ou infecção de patógenos, o que sugere que a WAK1, localizada na zona de alongamento celular, atua na percepção e transferência de estímulos externos ao citoplasma, por meio de um receptor localizado no domínio citoplasmático da proteína (Decreux & Messiaen, 2005). Muitas rotas de sinalização utilizam proteínas quinases e, nesse contexto, Sivaguru *et al.* (2003) observaram que a exposição de plântulas de *A. thaliana* ao Al e pH 4,0, durante 12 h, resultou por um lado, em inibição do crescimento radicular e, por outro, em rápida indução de WAKs, um tipo de resposta cujo significado funcional ainda não foi resolvido, embora seja significativo que estudos usando plantas transgênicas tenham revelado a essencialidade das WAKs para o alongamento celular (Baluska *et al.*, 2003).

O conhecimento das propriedades eletrofisiológicas das membranas, particularmente da MP, é essencial para a compreensão dos mecanismos de transporte iônico através delas. Em relação aos estudos envolvendo o Al, é necessário considerar duas dessas propriedades: o potencial elétrico através da membrana plasmática (a diferença de potencial, normalmente negativa, entre os dois lados da membrana é o chamado "potencial zeta"), que representa um valor aproximado do potencial elétrico da superfície externa da membrana plasmática (Kinraide *et al.*, 1998b). Nessa superfície, existe uma quantidade de cargas negativas, oriundas de grupos carboxílicos e radicais fosfato, estes integrando moléculas de glicerolipídeos, componentes estruturais da membrana plasmática.

É possível então que diferenças em magnitude do potencial zeta entre genótipos esteja relacionada, de alguma forma, com diferenças em

sensibilidade ao Al. Kinraide *et al.* (1998b) e Ahn *et al.* (2004) estimaram que o potencial zeta foi quase 30% mais negativo numa cultivar sensível do que numa tolerante. Como consequência disto, a espécie sensível atraiu mais Al do que a tolerante e expressou desta forma maior toxidez.

Uma forma de reduzir a negatividade da MP, e por essa via decrescer a atividade de Al na superfície da membrana, é aumentar a concentração de cátions na solução. É justamente neste ponto que se mostra a efetividade dos íons divalentes, especialmente do  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Esses cátions, além de contribuírem para o aumento da força iônica, estabelecem, dentro da faixa de  $\text{mmol L}^{-1}$ , uma forte competição com o Al pelos sítios eletronegativos, de forma que um aumento da sua atividade implica menor ligação do Al, tanto na superfície da MP como na PC (Kinraide, 1993, 1998a).

### **7) Alumínio x rizóbio**

A relação entre as leguminosas fixadoras de nitrogênio e o rizóbio é de vital importância na agricultura. A simbiose entre os nódulos radiculares e as leguminosas é altamente específica e geralmente requer uma espécie particular de rizóbio para uma determinada espécie de planta. Apesar disso, em algumas situações, uma espécie de leguminosa pode ser nodulada por distintas espécies de bactérias (Glenn & Dilworth, 1991).

A eficácia desta relação pode ser afetada em solos ácidos, pois o Al se liga as células do rizóbio, interferindo na síntese de DNA dessas bactérias, levando a uma redução na colonização do solo (Johnson & Wood, 1990). O número de rizóbios em solos corrigidos pode chegar a  $10^5$  unidades

formadoras de colônia (UFC)/g, enquanto que em solos ácidos esse valor não ultrapassa  $10^2$  UFC/g (Brockwell *et al.*, 1991).

As bases da sensibilidade desta interação foram estabelecidas por Robson & Lonergan (1970), que mostraram que a espécie *Medicago truncatula* cresceu bem em solo ácido se adubado com nitrogênio, não demonstrando a mesma ser dependente da fixação simbiótica deste elemento. Os autores também constataram que estirpes do rizóbio selecionadas em solos ácidos foram mais hábeis na colonização e sobrevivência que estirpes presentes em inóculos comerciais.

No caso de microrganismos, estes devem possuir tolerância a baixos valores de pH antes de serem tolerantes ao Al (Flis *et al.*, 1993). Além do efeito direto do Al nas raízes, o elemento pode afetar o funcionamento dos nódulos. Isso pode ser demonstrado em estudos de ultra-estrutura do nódulo. No entanto, são escassos na literatura os trabalhos que demonstram o efeito direto do Al na ultra-estrutura de nódulos e raízes das leguminosas fixando  $N_2$  atmosférico. Jacob Neto (1993) observou, em seus estudos sobre o efeito de Al na morfologia interna de raízes e nódulos de plantas de soja, que a cultivar tolerante IAC-9 apresentava, mesmo sem adição de Al, nas células corticais externas à camada de escleróides do nódulo, depósitos de material amorfo, que era mais denso à passagem dos elétrons. Já na cultivar UFV-1, considerada mais susceptível ao Al, não foi encontrada essa estrutura amorfa, que foi sugerida no trabalho como sendo a razão da maior tolerância da cultivar IAC-9

Dependendo da diferença na tolerância, pode-se inviabilizar ou impossibilitar a utilização de uma determinada cultura em condições de acidez do solo. Alguns trabalhos revelam que o Al em altas concentrações e o baixo pH afeta com maior severidade a formação dos nódulos e a fixação simbiótica de nitrogênio, quando comparado ao crescimento radicular das plantas hospedeiras (Jo *et al.*, 1980).

Watkin *et al.* (2000) analisaram a tolerância a solos ácidos de seis estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii em trevo subterrâneo (*T. subterraneum*). Uma delas foi identificada como tolerante, apresentando maior capacidade de colonização e persistência, além de fixar uma maior quantidade de nitrogênio nas plantas em relação às demais estirpes estudadas. Brose (1992) relatou resultados semelhantes em cornichão quando avaliou estirpes de *Rhizobium loti* em relação à acidez do solo. As estirpes tolerantes ao Al mostraram-se tão produtivas e eficientes na fixação de nitrogênio quanto às recomendadas para a espécie, sendo que as menos tolerantes apresentaram menor eficiência simbiótica. Entretanto, nem sempre as estirpes que apresentam maior tolerância ao Al foram as mais produtivas, indicando a dificuldade de selecionar rizóbios tolerantes e ao mesmo tempo eficientes.

Neste mesmo estudo, o autor observou que estirpes de *Rhizobium loti* mais tolerantes ao Al mostraram maior produção de matéria seca da parte aérea e teor de N no tecido de cornichão, que estirpes mais sensíveis (recomendadas comercialmente). Da mesma forma, testando *Rhizobium leguminosarum* em cornichão, as estirpes tolerantes ao Al foram mais eficientes na fixação de N que muitas estirpes recomendadas, demonstrando



que estirpes relacionadas com tolerância ao Al têm apresentado maior sobrevivência e melhor nodulação da planta hospedeira em comparação a estirpes susceptíveis (Brose, 1994).

Devido à importância da associação benéfica entre as bactérias fixadoras de nitrogênio e as leguminosas, bem como a existência de diferenças entre as estirpes em relação a resposta ao Al, os trabalhos de melhoramento que envolvam a seleção de leguminosas para solos ácidos devem também ser associados a programas de seleção de rizóbio tolerante visando à futura utilização desta relação simbiótica em condições de acidez do solo e com presença de Al tóxico.

#### **8) Métodos de seleção usados para a identificação de plantas tolerantes ao alumínio**

O objetivo principal do desenvolvimento e utilização de métodos de seleção de plantas mais tolerantes a estresses, é a simulação do ambiente em que a planta vive, proporcionando ainda um maior controle dos fatores de estresse e facilitando o trabalho de melhoramento. Portanto, o melhor método de seleção é aquele que melhor simula o ambiente no qual as plantas serão utilizadas. No entanto, a seleção em campo, no ambiente estressante, é mais cara, pois requer mais tempo, mais área, mais mão-de-obra e envolve um complexo de fatores de solo e clima, o que torna a avaliação muito mais difícil. Desta forma, o que se busca é um método rápido, barato, simples e que simule o estresse ocorrido sob condições normais. A partir da seleção de plantas mais tolerantes a acidez, pode-se incorporar estas plantas a um programa de

melhoramento, possibilitando a melhor adaptação e estabilidade de produção em ambientes diferentes daqueles em que foram selecionados.

Até o fim da década passada, poucos eram os trabalhos que contemplavam todas as fases de desenvolvimento de uma linhagem ou cultivar. Os trabalhos se concentravam mais na escolha de métodos de seleção ou em teste de cultivares comerciais, já disponíveis no mercado. Esta tendência pouco contribuía para o desenvolvimento adequado de plantas mais tolerantes a solos ácidos e ao mesmo tempo com potencial comercial, pois a simples comparação não contribuía para a melhoria das plantas, nem influenciava de forma adequada as técnicas envolvidas no meio de produção (Caetano, 1998).

Muitas são as técnicas utilizadas para identificar plantas tolerantes ao Al, baseadas principalmente em soluções nutritivas ou solos. Estes trabalhos se baseiam na inibição do crescimento radicular, ou na medição da acumulação de Al dentro das raízes, ou da avaliação do acúmulo de biomassa.

Geralmente, as plantas são colocadas para crescer em vasos contendo solo ácido por aproximadamente um mês, ou a campo para se avaliar uma estação de crescimento. São avaliadas a MSPA, a matéria seca de raízes (MSR) e a concentração de Al no tecido vegetal, comparando-se as plantas crescendo em solos corrigidos com carbonato, cujo pH não é limitante, e plantas crescendo em solos ácidos. Estes experimentos podem avaliar plantas em estágios jovens, quando o crescimento radicular é importante para o estabelecimento da planta, e também estágios avançados, nos quais as

deficiências nutricionais e o estresse hídrico podem afetar o crescimento vegetal (Samac & Tesfaye, 2003).

No entanto, estas metodologias podem não ser tão eficientes para espécies sensíveis. Isto ocorre porque em situações com alta saturação de Al ( $\text{pH} \leq 4,0$ ), pode-se não separar genótipos tolerantes e sensíveis, uma vez que a pressão de seleção imposta é muito grande. Foy *et al.* (1993), trabalhando com trigo duro, conseguiram separar genótipos tolerantes e sensíveis ao Al somente após uma correção parcial da acidez do solo, elevando o pH para 4,3. Adicionalmente ao problema citado anteriormente, observa-se o confundimento em solos com mesmo pH, mas que apresentam diferentes níveis de saturação por Al, fato este que ocorre amplamente segundo Jonhson *et al.* (1997), uma vez que o crescimento em solos ácidos é tão dependente da saturação por Al quanto do pH, dentre outros fatores.

Experimentos usando soluções nutritivas têm sido amplamente utilizados para identificar e testar variedades de plantas para a tolerância ao Al (Riede & Anderson, 1996; Villagarcia *et al.*, 2001). Na maioria dos casos, plântulas são condicionadas em um meio com baixo pH por vários dias e então transportadas para meios contendo Al. Convencionalmente, a tolerância ao Al é deduzida a partir da comparação do crescimento radicular na presença e na ausência de Al. O inconveniente desta comparação está no fato de que plantas que apresentem crescimento lento talvez apareçam como mais tolerantes do que realmente são, pois a porcentagem de redução no crescimento radicular (crescimento relativo) é menos importante que o crescimento radicular absoluto (Dall' Agnol *et al.*, 1996).

O uso de soluções nutritivas em experimentos permite avaliar os estresses individualmente (pH, Al, Mn). No entanto, este método não é recomendado para plantas com longo ciclo de vida e que manifestem a tolerância ao Al apenas na fase adulta (Kinraide e Sweeney, 2001).

### **9) Solução Nutritiva e Al**

Uma dificuldade em relação aos estudos com Al em plantas é a complexidade química deste metal em solução nutritiva (Kochian, 1995). Em solução aquosa, o Al existe numa variedade de formas ou espécies iônicas: quando a espécie está constituída por só um átomo de Al, é denominada mononuclear (ou monomérica), e quando contém mais de um átomo, a espécie, ou complexo, é reconhecida como uma forma polinuclear. A ocorrência e as atividades químicas das diversas formas de Al em solução estão reguladas, primariamente, pela inter-relação de três variáveis: o pH, a composição e a força iônica total da solução.

Um caminho natural para contornar o problema das mudanças simultâneas e não controladas das propriedades químicas que ocorrem nos solos é a realização de estudos em condições de solução nutritiva. Dada a natureza do estresse de Al, o meio hidropônico oferece óbvias vantagens, como o fácil acesso ao sistema radicular e a possibilidade de monitorar e controlar o pH e as concentrações de Al e outros íons relevantes (Menosso *et al.*, 2000).

Nas soluções nutritivas com elevada força iônica, a fitotoxicidade potencial do Al encontra-se atenuada não somente pelo efeito da alta força

iônica, mas também pelas interações físico-químicas que se estabelecem entre o Al e os outros íons. Com isso, aumentam bastante a concentração de Al e o tempo necessário à indução e sintomas de toxidez nas plantas, resultando em uma progressiva acumulação de formas trocáveis e não-trocáveis de Al no apoplasto dos tecidos apicais das raízes, as quais podem ter pouca ou nenhuma relação com os mecanismos indutores da toxidez (Caetano, 1998).

Esta situação conduziu à formulação de soluções salinas quimicamente mais simples, formadas pela dissolução de cloretos de Ca e de Al, em meio ácido, as quais minimizam os problemas relacionados com a precipitação e polimerização do Al, devido à ausência de outros ligantes que não o OH<sup>-</sup>. Também por essa razão, essas soluções permitem uma computação mais precisa da especiação do Al e o nível de fitotoxidez da espécie Al<sup>3+</sup>, que pode ser facilmente regulado por meio de variações no pH ou na concentração de Ca<sup>2+</sup>. Uma vantagem adicional é que tais soluções simulam, de forma mais adequada, as concentrações iônicas características de soluções de solos ácidos, em que os teores de Al monomérico extraíveis raramente excedem 150-200 μmol L<sup>-1</sup> (Schöttelndreier *et al.*, 2001; Wenzl *et al.*, 2003).

Este tipo de solução salina, uma vez desprovida dos nutrientes essenciais (exceto o Ca<sup>2+</sup>), é própria para estudos de curta duração, que geralmente utilizam plântulas com poucos dias de germinação, com reservas seminais suficientes para sustentar o seu crescimento inicial. Segundo Samac e Tesfaye (2003), o uso de solução nutritiva se mostra adequado, embora em

apenas alguns casos a tolerância observada em culturas de seleção são correlacionadas com a tolerância em solos ácidos.

### **10) Análise da diversidade genética através de marcadores microssatélites (SSR)**

O uso de marcadores moleculares ligados a genes que confirmam tolerância ao Al pode auxiliar na seleção com base no genótipo ou em uma combinação de genótipo-fenótipo. Adicionalmente, os marcadores moleculares também podem ser vantajosos para identificar plantas com mecanismos de tolerância ativos em diferentes estágios de crescimento, fato este difícil ou até impossível de ser alcançado através da seleção fenotípica (Wu *et al.*, 2000).

O primeiro requerimento para qualquer abordagem molecular visando acessar o germoplasma de uma coleção é a habilidade de distinção entre genótipos e acessos (Gilbert *et al.*, 1999). O conhecimento da distância genética entre diferentes cultivares é muito utilizado nos programas de melhoramento de plantas, pois permite uma eficiente amostragem e utilização dos recursos genéticos (Kongkiatngam *et al.*, 1996). Conforme Dolanská & Curn (2004), a avaliação da variação genética para espécies forrageiras alógamas é importante para o processo de identificação de cultivares e análise de pureza de sementes, análises ecológicas de população de pastagens, seleção de pais geneticamente divergentes para estudos de mapeamento e para a prática de melhoramento.

Existem muitas técnicas moleculares disponíveis para acessar a variabilidade genética de populações e indivíduos (Gilbert *et al.*, 1999).

Marcadores baseados no princípio do PCR (Polimerase Chain Reaction ou Reação e Cadeia da Polimerase), como o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA ou Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) e microssatélites (Simple Sequence Repeats ou Seqüências Simples Repetidas ou SSR) têm sido desenvolvidos para acessar a variabilidade genética tanto ao nível intra como interespecífico (Kongkiatngam *et al.*, 1996). De modo geral, marcadores moleculares multilocos utilizados em DNA “fingerprinting”, como RAPD, AFLP, microssatélites e minissatélites, são mais apropriados para estudos de identidade genética, testes de paternidade e estudos de variabilidade dentro da mesma espécie.

Os microssatélites são seqüências de um a seis nucleotídeos repetidos de 10 a 60 vezes em tandem ao longo da molécula de DNA, as quais são flanqueadas por seqüências conservadas (Zhivotovsky & Feldman, 1995); são altamente polimórficos devido ao alto nível de variação no número de repetições. Esses apresentam várias vantagens em relação a outros marcadores moleculares, sendo abundantes em muitos dos genomas e, geralmente, distribuídos uniformemente; são hipervariáveis e co-dominantes, portanto seu conteúdo de informação de polimorfismo é muito alto; são baseados no princípio do PCR, requerendo, desse modo, pouco DNA para a amplificação, além de cada loco de SSR ser definido por um único par de iniciadores, facilitando a troca de informação entre laboratórios. As únicas desvantagens estão relacionadas à necessidade de géis de alta resolução para

explorar totalmente o conteúdo de informação dos SSRs e ao grande esforço inicial requerido para clonar e seqüenciar os nucleotídeos que flanqueiam esses microssatélites (Gianfranceschi *et al.*, 1998).

O uso de marcadores multialélicos e co-dominantes, ou seja, que detectem mais de um alelo por loco, permite que os indivíduos heterozigotos sejam diretamente discriminados dos homozigotos. Para a análise de espécies heterozigotas alógamas, é extremamente útil, uma vez que permite que os indivíduos sejam exclusivamente genotipados (Powell *et al.*, 1996). Isso é particularmente importante para a identificação de cultivares e para o aprimoramento da caracterização de coleções de germoplasma e populações naturais, auxiliando na conservação eficaz dos recursos genéticos da espécie.

Morgante *et al.* (2002), analisando a distribuição de SSRs entre regiões transcritas e não transcritas e a relação dessas características com o tamanho do genoma haplóide de *Arabidopsis thaliana*, arroz (*Oryza sativa*), soja (*Glycine max*), milho (*Zea mays*) e trigo (*Triticum aestivum*), verificaram que a freqüência de SSRs foi significativamente maior em ESTs (expressed sequence tag) do que em DNA genômico para todas as espécies estudadas. Os autores observaram também relação linear positiva e altamente significativa entre a freqüência de SSR e a porcentagem de DNA de cópia única das espécies, tanto para as repetições perfeitas quanto para as imperfeitas, indicando que, nessas plantas, a freqüência de SSR não se dá em função ao tamanho total do genoma, mas da proporção de DNA de cópia única que ele apresenta, e que os SSRs são mais abundantes em DNA de cópia única/baixa do que em DNA repetitivo. Assim sendo, os SSRs ocorrem em alta freqüência



em regiões expressas do genoma de plantas. Li *et al.* (2002), estudando a evolução dos SSRs, concluíram que há numerosas linhas de evidência disponíveis, as quais sugerem que a distribuição genômica dos SSR é ao acaso em regiões codificantes e não codificantes. Como uma parte significativa da estrutura dos SSRs é funcionalmente importante para transcrição gênica, translação, organização da cromatina, recombinação, replicação do DNA, sistema de reparo de DNA, ciclo celular, etc., a seleção parece atuar contra a aleatória expansão ou compactação de tamanho nas regiões genômicas correspondentes.

Uma das principais aplicações dos SSR é em estudos de diversidade genética e caracterização de germoplasma, tanto dentro como entre populações, cultivares, acessos e espécies (Li *et al.*, 2002). Sawasato *et al.* (2008) discriminaram 64 acessos de *Paspalum urvillei* Steudel, os quais formaram sete grupos. Dias *et al.* (2008) observaram a existência de uma elevada diversidade genética entre os acessos da coleção básica de trevo vermelho (*T. pratense*) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), utilizando sete marcadores de SSR. Já Sardaro *et al.* (2008) avaliaram a diversidade genética presente em populações italianas de cornichão com SSR e AFLP. Ambos marcadores apresentaram medidas similares de variabilidade entre os indivíduos, entretanto os SSR permitiram uma melhor diferenciação genética entre as populações.

Marcadores moleculares têm sido usados com sucesso na construção de mapas genéticos de ligação e para a identificação e localização de genes economicamente importantes e de locos para caracteres

quantitativos (QTLs, denominação dada aos diversos locos envolvidos no caráter de herança quantitativa) em um grande número de espécies de plantas. Além disso, o alto conteúdo de informação dos SSR pode ser completamente aplicado ao mapeamento de QTL e no melhoramento em geral, aumentando o poder de tal análise (Gianfranceschi *et al.*, 1998).

Genes que conferem tolerância ao AI já foram identificados em trigo, sorgo e cevada. Nestas espécies, a tolerância é atribuída a ação de um gene dominante envolvido no transporte de malato (Delhaize *et al.*, 1995; Magalhães *et al.*, 2007). Sasaki *et al.* (2004) identificaram no trigo o gene ALTM1 que atua na exudação de malato e, Magalhães *et al.* (2007) descobriram o gene SbMATE, que libera ácido cítrico quando as plantas estão em contato com AI. Em um estudo realizado com cevada, foram identificados quatro marcadores SSR (Bmac310, Bmag353, HVM68 e HVMCABG) fortemente ligados ao gene Alt responsável pela tolerância ao AI nesta espécie. O marcador Bmag353 detectou grande variação alélica permitindo sua implementação em programas de seleção assistida por marcadores (Raman *et al.*, 2002).

Com relação a leguminosas, foram identificados cinco QTLs em soja com auxílio de marcadores SSR (Nguyen *et al.*, 2001). Vários esforços tem sido direcionados para estudos em alfafa tolerante a solos ácidos (Bouton, 1996). Genótipos diplóides de *M. sativa* e em germoplasmas de *M. truncatula* foram identificados como tolerantes (Sledge *et al.*, 2005), sendo identificadas três regiões genômicas (QTLs putativos) responsáveis pela tolerância ao AI através do uso de marcadores SSR (Narasimhamoorthy & Bouton, 2007).

Os estudos para tolerância ao AI em trigo são os mais amplos e têm sido realizados a mais de uma década (Riede & Anderson, 1996). Estes autores identificaram um gene para tolerância ao AI localizado no braço longo do cromossomo 4D, entre os marcadores Xgdm125 e Xpsr914 (Milla & Gustafson, 2001). Ma *et al.* (2005) identificaram dois marcadores SSR (Xwmc331 e Xgdm125) flanqueados a um dos principais QTLs responsáveis pela tolerância ao AI, neste mesmo cromossomo, da cultivar tolerante de trigo Atlas 66. Atualmente, Ryan *et al* (2009), usando marcadores SSR conseguiram construir um mapa de ligação do cromossomo 4B do trigo. Análises de regressão mostraram alta significância do QTL *Qce-4BL* para o efluxo de citrato, sendo o marcador *Xgwm495* responsável pela detecção de 51% da variação fenotípica deste efluxo.

A utilização de SSR como uma ferramenta auxiliar em programas tradicionais de melhoramento apresenta grande relevância, pois permite diferenciar indivíduos muito próximos, além de atuar na identificação de genes associados a características importantes. Dessa maneira, a escolha de progenitores pode ser realizada através de características fenotípicas e genotípicas.

### **11) O uso de espécies modelo para a pesquisa genética**

Existem cerca de 18.000 espécies de leguminosas com diversas características importantes do ponto de vista agrônomo. Estas características vêm sendo objeto de programas de melhoramento e é neste contexto que a genômica pode ser mais benéfica. O conhecimento genético tem avançado

rapidamente através do uso de espécies modelo, embora muito pouco sobre o melhoramento de leguminosas tenha sido explorado até o momento (Sato *et al.*, 2001). Por outro lado, de acordo com Kölliker *et al.* (2006), a análise genômica e a genética molecular em leguminosas avançaram rapidamente nos últimos anos, com uma atenção especial nas duas espécies modelo, *Lotus japonicus* e *Medicago truncatula*.

*Lotus japonicus* é uma espécie de clima temperado, exibindo características importantes na genômica, tais como: ciclo de vida curto (2-3 meses); auto-polinização; diploidia ( $n=6$ ); e pequeno tamanho do genoma (472,1Mb). Filogeneticamente, *L. japonicus* está incluída, juntamente com *M. truncatula* no grupo denominado leguminosas temperadas. No entanto, *L. japonicus* forma nódulos radiculares, tais quais de leguminosas tropicais, como a soja e o feijão.

*L. japonicus* é altamente relacionada com espécies do gênero *Lotus* que apresentam importância agrônômica na América do Sul, principalmente com o cornichão. Diversos recursos genéticos têm sido usados para a pesquisa genética e genômica em *L. japonicus*, principalmente na Europa e Japão. Membros da “Rede Européia de *Lotus*” têm desenvolvido um grande conjunto de marcadores moleculares distribuídos ao longo de todo o genoma deste modelo (Hayashi *et al.*, 2001; Sandal *et al.*, 2002). Além disso, vem se realizando também um mapa genético integrado de *Lotus* (Gueta-Dahan *et al.*, 1997).

Um grande conjunto de seqüências alvo para *L. japonicus* (ESTs) tem sido disponibilizado nos bancos de dados públicos e o seqüenciamento

completo da espécie esta sendo realizado (Cyranoski & Tokio, 2001; Sato *et al.*, 2001; Smirnov, 1993). Amplas bibliotecas genômicas dos ecótipos GIFU e MG-20 de *L. japonicus* estão disponíveis (Sato *et al.*, 2001; Smirnov, 1993), além de duas populações mapeadas de linhas endogâmicas recombinantes provenientes de cruzamentos intra e interespecíficos (Sandal *et al.*, 2002).

Este mapeamento genômico possibilita comparações dentro e entre espécies. A macrosintenia se refere às regiões genômicas conservadas entre espécies, sendo revelada pela genética comparativa através de marcadores de DNA. O mapeamento comparativo entre dois tipos de feijão e a soja mostraram grupos de ligação fortemente correlacionados entre os feijões, no entanto a sintenia com a soja foi limitada a pequenos locais (Boutin *et al.*, 1995). Um estudo mais recente, utilizando a espécie *Arabidopsis thaliana* como modelo, revelou maior homeologia entre a soja e o feijão comum (Lee *et al.*, 2001). Uma análise mais profunda da sintenia entre leguminosas foi realizada por Choi *et al.* (2004a, 2004b), usando *M. truncatula* como ponto central de comparação. Os autores encontraram uma alta correlação entre a distância filogenética e o grau de sintenia. *M. truncatula* e alfafa mostraram grandes seqüências de nucleotídeos conservadas.

Embora o genoma da ervilha seja 10 vezes maior e possua um cromossomo a mais que o da espécie modelo utilizada, a colinearidade gênica mostrou regiões conservadas entre estes genomas. Isto sugere que rearranjos cromossômicos envolvendo o cromossomo 6 de espécies de *Medicago* podem ser responsáveis pela diferença no número cromossômico observada (Kaló *et al.*, 2004). As relações macrossintênicas observadas entre *M. truncatula* e

outras leguminosas foram mais complicadas e menos informativas. Observaram-se marcadores apresentando regiões conservadas e não sintênicas. No caso específico da soja, uma duplicação, seguida da perda de genes e posterior remanejamentos (diploidização) pode ter levado à dificuldade de identificação de segmentos entre as espécies avaliadas.

Em contraste com a macrosintenia, a microsintenia se refere muitas vezes à conservação gênica em conteúdo e ordem de seqüência (Zhu *et al.*, 2005). Estudos comparando regiões de *M. truncatula* e soja mostraram microsintenia em diversas regiões analisadas (Yan *et al.*, 2003; Cannon *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2004b). De um total de 29 genes distintos identificados em *M. truncatula* e soja dentro de uma região sintênica, 14 (cerca de 48%) foram conservados entre os dois genomas. Já a comparação de *M. truncatula* e *L. japonicus* mostrou que 82% dos genes identificados foram sintênicos, apresentando nove pares de genes microsintênicos (Choi *et al.*, 2004b).

O grau de conservação da estrutura do genoma entre as leguminosas e *Arabidopsis thaliana*, uma outra planta modelo, é menos direto (Grant *et al.*, 2000). Estes autores citam macrosintenia entre a soja e *Arabidopsis*, enquanto a comparação desta espécie com *M. truncatula* revela uma falta de continuidade macrosintênica entre estes genomas (Zhu *et al.*, 2005). Este caso de sintenia localizada é devido ao fato do genoma da *Arabidopsis* ter experimentado duplicações segmentares extensivas e posteriores rearranjos seguidos de perdas gênicas.

Com relação ao melhoramento visando tolerância ao AI, alguns trabalhos com espécies modelo podem ser citados. Diversos genes visando

tolerância ao Al têm sido identificados na planta modelo *Arabidopsis thaliana*, através do rastreamento de genes induzidos pelo Al. Estes genes são relacionados ao metabolismo do estresse oxidativo (espécies reativas de oxigênio), a transportadores de Al citosólico e transportadores de malato (Ezaki *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2004; Larsen *et al.*, 2005).

A comparação via genômica estrutural entre espécies modelo pode fornecer um melhor entendimento, bem como uma maior especificidade dos componentes gênicos. A genômica comparativa é um dos caminhos mais promissores para transferir conhecimento de plantas modelo para espécies cultivadas com objetivo de melhoramento genético para fins específicos.

## HIPÓTESES

1) *L. corniculatus* é uma espécie de boa performance agronômica para uso forrageiro, apresentando tolerância à acidez do solo.

2) Populações e cultivares de *L. corniculatus* apresentam comportamentos distintos em relação à tolerância ao Al tóxico.

3) Espécies diplóides de Lótus apresentam comportamentos distintos em relação tolerância ao Al tóxico.

4) A realização de caracterização agronômica, o uso de marcadores tipo microssatélites, a avaliação de mecanismos de tolerância ao Al, e o estudo de espécies diplóides relacionadas são ferramentas eficientes para observação da variabilidade existente entre os germoplasmas de *L. corniculatus*.

5) Existe variabilidade genética suficiente entre estes germoplasmas, que permitem sua seleção e melhoramento para a tolerância ao Al.

## OBJETIVOS

1) Caracterizar a tolerância ao Al de quatro cultivares e de uma população de *Lotus corniculatus*, através de avaliações em solo ácido e em solução nutritiva.

2) Caracterizar a tolerância ao Al de espécies diplóides de *Lotus*, inclusive na espécie modelo *L. japonicus*, através de avaliações em solo ácido e em solução nutritiva.

3) Identificar mecanismos de tolerância ao Al tóxico de duas cultivares e de uma população de *L. corniculatus*.

4) Construir e caracterizar genótipos F<sub>2</sub> de *L. corniculatus* contrastantes quanto à tolerância ao Al tóxico

5) Verificar a diversidade genética dos genótipos contrastantes, através do uso de marcadores tipo microssatélites (SSR).



## **CAPÍTULO II**

## **Caracterização agronômica de genótipos de cornichão em resposta à toxidez por alumínio<sup>1</sup>**

Armando Martins dos Santos<sup>(2)</sup>, Miguel Dall’Agnol<sup>(2)</sup>, Aline Janke<sup>(2)</sup>, Carlos Alberto Bissani<sup>(3)</sup>, Luciana Carvalho dos Santos<sup>(2)</sup> e Marcos Laux de Leão<sup>(2)</sup>

(1) Trabalho extraído de parte da Tese do primeiro autor. Financiado pelo projeto Lotassa.

(2) Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 7712 - Caixa Postal 15100 - CEP 91540-000 ([martinsarm@gmail.com](mailto:martinsarm@gmail.com), [migueld@ufrgs.br](mailto:migueld@ufrgs.br), [alinejanke@gmail.com](mailto:alinejanke@gmail.com), [luli\\_cs@ig.com.br](mailto:luli_cs@ig.com.br), [lauxleao@gmail.com](mailto:lauxleao@gmail.com)).

(3) Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 7712 - Caixa Postal 15100 - CEP 91540-000 ([carlos.bissani@ufrgs.br](mailto:carlos.bissani@ufrgs.br)).

Resumo – A utilização de leguminosas em áreas que apresentem toxidez por alumínio pode minimizar o uso de calcário e ainda possibilitar um aporte de nitrogênio ao sistema via fixação biológica. Este trabalho objetivou caracterizar genótipos de cornichão quanto à tolerância ao alumínio tóxico, utilizando solo ácido e solução nutritiva. Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação, sendo testadas as cultivares São Gabriel, Draco, Estanzuela e San Gabriel e a população UFRGS. Utilizou-se a alfafa como espécie sensível ao Al. Para os experimentos em solo, foram avaliadas características de parte aérea e raiz, e em solução nutritiva apenas parâmetros radiculares. De maneira geral, a população UFRGS e as cultivares San Gabriel e São Gabriel foram mais eficientes em situações de maior toxidez por Al, com destaque para

a população UFRGS, que apresentou ainda, uma grande superioridade em situações de toxidez por alumínio baixas e moderadas. Os resultados em solução nutritiva seguiram um padrão semelhante ao observado nas avaliações em solo ácido, observando-se superioridade do crescimento radicular dos genótipos de cornichão em relação à alfafa em todas as concentrações de alumínio. A população UFRGS também apresentou maior crescimento radicular, demonstrando potencial de utilização imediato em condições de solos com moderada concentração de Al.

Termos para indexação: *Lotus corniculatus*, crescimento radicular, acidez do solo, solução nutritiva.

#### **Characterization of birdsfoot trefoil genotypes in response to aluminum toxicity**

Abstract - The utilization of more adapted legumes to aluminum toxicity may minimize the use of limestone and also allow an input of nitrogen into the system through biological fixation. This research aimed to characterize birdsfoot trefoil genotypes regarding tolerance to toxic aluminum, utilizing acid soil and nutrient solution. The experiments were conducted in greenhouse, being tested four cultivars (São Gabriel, Draco, Estanzuela and San Gabriel) and one population (UFRGS) of birdsfoot trefoil. Alfalfa was used as a sensitive species. For the soil experiments, morphological characteristics of the aerial part and the root were analyzed, and for the experiments in nutrient solution only the root length and growth were analyzed. In general, the population UFRGS and San Gabriel and São Gabriel cultivars were more efficient in situations of higher soil acidity, with the main highlight being UFRGS population, which presented a great superiority in toxic situations by low and moderate aluminum. The results in nutrient solutions followed a pattern similar to the one observed in the

acid soil evaluations, taking note that the root growth of the birdsfoot trefoil was superior of that of the alfalfa in all of the aluminum concentrations. The UFRGS population too presented a bigger tolerance to Al in comparison to the other genotypes tested, demonstrating its potential to be used in regions where Al toxicity is a problem.

Index terms: *Lotus corniculatus*, root growth, soil acidity, nutrient solution.

### **Introdução**

Na pecuária da América do Sul, a alimentação do rebanho depende basicamente das pastagens, fazendo com que a produtividade vegetal determine a produção animal. O uso de leguminosas forrageiras aumenta o valor nutricional e a produtividade das pastagens, melhorando desta forma o desempenho animal. Somente na região do Cone Sul da América do Sul, 45 milhões de hectares de pastagens podem ser melhorados através do uso de leguminosas (Kirkbride, 1999).

O uso extensivo de áreas para o cultivo de grandes monoculturas (milho, soja, trigo e algodão) tem causado uma migração das áreas de pastagens para locais que apresentam limitações ao crescimento vegetal. A acidez do solo e a presença de Al tóxico se destacam neste cenário. Segundo Abreu Jr et al. (2003), 60% dos 26 solos brasileiros analisados apresentam pH menor que 5,5. Em levantamento realizado por Rheinheimer et al., (2001) para o estado do Rio Grande do Sul, 45% das amostras de solos analisados neste levantamento, apresentaram pH abaixo de 5,5, demonstrando ser uma característica abrangente em termos regionais e nacionais.

Sabe-se que a prática cultural mais utilizada para corrigir a acidez do solo é a aplicação de calcário, que visa elevar o pH do solo, evitando a formação de espécies

tóxicas de Al (Al) e disponibilizando outros nutrientes essenciais para o crescimento vegetal (Taiz & Zeiger, 2003; Ernani, 2008). No entanto, a calagem pode ser limitada pelo custo do calcário, pelo seu transporte, pela sua aplicação e pela dificuldade de se corrigir horizontes mais profundos, devido à baixa mobilidade do calcário no solo (Foy et al., 1978).

Espécies de plantas e genótipos, dentro de uma mesma espécie, diferem grandemente na tolerância a vários problemas de fertilidade do solo e na eficiência de utilização de nutrientes (Marschner, 1991). Desta forma, uma alternativa que a pesquisa dispõe para minimizar estes problemas é a seleção e o melhoramento de plantas mais tolerantes a solos ácidos e ao Al tóxico. Esta técnica, apesar de ser mais complexa e apresentar resultados em médio e longo prazo, pode baratear os custos de produção e ainda aumentar a persistência, no caso de espécies perenes. A utilização de leguminosas forrageiras com potencial de adaptação à acidez do solo, como algumas espécies do gênero *Lotus* (*L. corniculatus*, *L. uliginosus*), pode ser importante para sustentabilidade do sistema (Blumenthal & McGraw, 1999).

No caso da acidez do solo, a caracterização da variabilidade entre populações seria o primeiro passo num programa de seleção visando tolerância a esta característica. A realização desta etapa em vasos contendo solo ácido se torna muito trabalhosa e demorada (Menosso, 2000). O uso ou adaptação de técnicas com solução nutritiva que avaliem as plantas em seu estágio inicial permite caracterizar mais genótipos, de maneira mais simples, em um curto período de tempo (Menosso, 2000).

Os objetivos deste trabalho foram: (i) avaliar o efeito da correção da acidez do solo no desenvolvimento de quatro cultivares e de uma população de *Lotus corniculatus* e (ii) avaliar a eficiência de um método de curto prazo utilizando plântulas

em solução nutritiva para verificar a tolerância ao Al tóxico, comparando os resultados obtidos com os experimentos realizados em solo ácido.

### **Material e Métodos**

Foram realizados dois experimentos em casa-de-vegetação do Departamento de Pantas Forrageiras da Faculdade de Agronomia da UFRGS entre junho de 2005 e janeiro de 2007. Destes, um foi para a caracterização dos genótipos em solo ácido com diferentes valores de saturação por Al, e outro para a caracterização precoce em solução nutritiva com diferentes concentrações de Al.

Foram testadas quatro cultivares de *L. corniculatus* (Draco, Estanzuela e San Gabriel, utilizadas comercialmente no Uruguai, e São Gabriel, utilizada comercialmente no Brasil) e a população UFRGS, selecionada para tolerância ao pastejo a partir da população São Gabriel. Adicionalmente, utilizou-se a alfafa crioula como testemunha (sensível ao Al). No experimento conduzido em solução nutritiva, foram testadas apenas a população UFRGS e a cultivar Draco de *L. corniculatus*, além da alfafa como espécie testemunha.

#### *Caracterização em solo ácido*

O solo deste experimento foi coletado em junho de 2005 no município de André da Rocha - RS, em área de beira de estrada, vegetada por campo nativo que apresenta ocorrência de Latossolo Vermelho Distroférico típico. O solo foi seco ao ar, destorroado, peneirado e acondicionado em potes plásticos com capacidade para 1,5 kg. Foi realizada uma análise físico-química deste solo, cujos valores de pH, CTC pH 7,0,

saturação por bases e saturação por Al foram interpretados como muito baixo, médio, muito baixo e alto, respectivamente (COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC, 2004).

De posse da análise química, realizou-se em cinco repetições, a aplicação de seis níveis de calagem, em doses equivalentes a zero; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 vez a dose indicada pelo índice SMP para obter-se pH 6,0, com base nas recomendações da COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC (2004). O valor 1,0 SMP para este solo foi de 9,9 t ha<sup>-1</sup>. Para a correção do solo foi utilizada uma mistura de carbonato de cálcio e carbonato de magnésio (proporção 3:1).

Os seis níveis de correção implementados foram avaliados após um período de 80 dias de incubação, correspondendo aos valores de pH e saturação por Al indicados na Tabela 1. Após este período de incubação, em 05/01/2006, foram semeadas aproximadamente 20 sementes/vaso de cada um dos seis germoplasmas. Cada vaso recebeu um aporte de 100 mg de nitrogênio, 100 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 100 mg de K<sub>2</sub>O na ocasião da semeadura. Um desbaste de homogeneização foi realizado quando as plantas apresentaram em média de duas a três folhas trifolioladas, deixando apenas 10 plantas por vaso.

Após 60 dias (03/03/2006) de crescimento, avaliou-se a altura (H) das plantas com auxílio de uma régua graduada em mm, o número de ramificações (R) pela contagem dos mesmos, a área foliar (AF) com auxílio de um planímetro ótico (Licor, modelo LI-6200), e a matéria seca da parte aérea (MSPA) pela pesagem das hastes e folhas após a secagem por 72 h em estufa de circulação de ar com temperatura de 65° C.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições. Foram realizadas análises de variância em esquema fatorial 6 x 6 para

as características avaliadas, utilizando-se o Teste de Tukey a 5% de probabilidade para a comparação, sendo as análises realizadas pelo pacote estatístico SAS (SAS Institute, 2001). O teste de Tukey foi utilizado, pois o objetivo principal do trabalho foi identificar a variabilidade dos germoplasmas em cada nível isoladamente e não o comportamento isolado de cada germoplasma nos diferentes níveis.

#### *Caracterização em solução nutritiva*

A metodologia utilizada para a seleção de plantas em solução foi baseada no trabalho de Menosso et al. (2000). Sementes da cultivar Draco e da população UFRGS, além de alfafa crioula (espécie testemunha sensível) foram colocadas sobre papel germitest em caixas tipo gerbox, mantidas em condições de casa-de-vegetação visando garantir iluminação adequada, evitando assim o estiolamento das plantas. Seis plântulas por repetição utilizadas após sete dias, quando as radículas dos três genótipos já apresentavam pelo menos 10mm. Foram usadas lâminas de isopor para a sustentação das plantas na solução, sendo estas conduzidas em bandejas plásticas com capacidade para 5 L de solução durante um período de 13 dias, totalizando 20 dias de experimento.

As soluções utilizadas foram baseadas em Wenzl et al. (2001), cujas composições foram: 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $\mu\text{M}$ ) de Ca ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e quatro concentrações de Al (0, 50, 100 ou 200  $\mu\text{M}$  de Al,  $\text{AlCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Estas quatro soluções de cultivo foram utilizadas como tratamentos desde o momento da semeadura. O pH das soluções foi ajustado para 4,2 e as soluções eram trocadas a cada três dias, visando evitar a acumulação de exsudados e a alteração das concentrações de Al e  $\text{Ca}^{2+}$ . O volume de água era completado quando necessário. A solução foi aerada com compressores com capacidade de 40 L/hora.



O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições. Foram avaliados o comprimento radicular final (CF, 20 dias após a germinação), o crescimento radicular (CR, comprimento final – comprimento inicial) e o número de ramificações radiculares (RR) após 20 dias de cultivo. A partir destes resultados, calculou-se de acordo com Wenzl et al. (2001), o crescimento radicular relativo (CRR) e a concentração de Al requerida para decrescer o CRR para 50% ( $\{Al^{+3}\}_{50}$ ).

O CRR foi obtido através da fórmula  $CRR = 100 \cdot [(CR_{Al} - CR\partial)/(CR_0 - CR\partial)]$ , sendo  $CR_{Al}$  o crescimento radicular na presença de determinada concentração de Al,  $CR\partial$  o crescimento residual no nível de Al suficiente para saturar o crescimento radicular e  $CR_0$  é o crescimento médio das raízes na ausência de Al.

A  $\{Al^{+3}\}_{50}$  foi calculada a partir de valores dos parâmetros empíricos obtidos a partir das equações de regressão do CRR, através da equação  $\{Al^{+3}\}_{50} = 1/a \cdot \sqrt{\ln 2}$ .

Foram realizadas análises de variância em esquema fatorial 3 x 4 para as características CI, CF, CR, RR, CRR e para  $\{Al^{+3}\}_{50}$ . Utilizou-se o Teste de Tukey a 5% de probabilidade para a comparação das médias, sendo as análises realizadas pelo pacote estatístico SAS (SAS Institute, 2001).

## **Resultados e Discussão**

### *Caracterização em solo ácido*

A MSPA dos genótipos de *Lotus* testados variou entre os níveis de correção da acidez do solo (Figura 1). A análise dos dados mostrou interação significativa entre os genótipos testados e os níveis de correção aplicados. Avaliando-se os seis

germoplasmas (cinco de cornichão e a alfafa) em cada nível de correção, observou-se a ocorrência de uma severa limitação no tratamento 57,9% de saturação por Al (em função da extrema toxidez por Al), apresentando MSPA média de 0,0156 g, exceto para a cultivar uruguaia San Gabriel, que se destacou significativamente das demais, apresentando MSPA de 0,0375 g (240% superior).

Em concentrações elevadas de Al (34,4% de saturação por Al), a população UFRGS e a cultivar São Gabriel foram superiores às demais, com valores médios de MSPA da ordem de 0,070 g, enquanto a alfafa apresentou os menores valores de MSPA (0,0227 g). Entre estes extremos, encontrava-se a cultivar San Gabriel, com MSPA de 0,055 g, superior às cultivares Draco e Estanzuela, que apresentaram valores médios de 0,35 g, demonstrando serem, dentre as cultivares testadas, as que apresentaram menor tolerância a teores elevados de alumínio.

No tratamento 32,5% de saturação, ainda uma situação de alta toxidez para muitas espécies, todos os germoplasmas de *L. corniculatus* testados foram superiores à alfafa, demonstrando se tratar de uma espécie com alguma tolerância à acidez do solo. Destaque neste nível para a população UFRGS e para a cultivar San Gabriel, com MSPA de 0,075 g. As cultivares São Gabriel e Estanzuela apresentaram MSPA média próximas de 0,070 g, no entanto estes valores foram significativamente inferiores aos encontrados para a população UFRGS e para a cv. San Gabriel. Dentre as cultivares, Draco foi a menos produtiva neste tratamento, com MSPA média de 0,0625 g.

Já no nível 22,2% de saturação por Al, que configura uma situação de moderada toxidez, a população UFRGS foi superior a todas as cultivares de cornichão avaliadas, com MSPA de 0,1165 g, sendo a alfafa novamente o genótipo menos produtivo em relação a todos os germoplasmas de cornichão, com MSPA de 0,055g. As

cultivares uruguaias testadas (Draco, Estanzuela e San Gabriel) não diferiram entre si, apresentando MSPA média 0,088g, sendo superiores à cultivar brasileira São Gabriel, que apresentou média de 0,075g.

O nível 14,1% de Al (estresse pouco severo) promoveu de maneira geral as maiores produções em todos os germoplasmas, inclusive para alfafa. Esta última espécie, reconhecidamente sensível ao Al, não diferiu das cultivares uruguaias Draco, Estanzuela e San Gabriel, e da população UFRGS, apresentando MSPA média de 0,0832g, mostrando-se uma boa testemunha para este tipo de experimento. Novamente, a cultivar brasileira São Gabriel mostrou ser a menos produtiva em situações de baixa toxidez, apresentando MSPA de 0,069g.

No nível 0% de saturação por Al observou-se uma redução na MSPA em todos os germoplasmas. Sabendo-se que a alfafa é uma espécie exigente em calagem, pode-se concluir que houve alguma limitação nutricional neste tratamento. Entre as explicações para o efeito depressivo deste nível de calagem, está uma possível limitação nutricional decorrente baixa disponibilidade de nutrientes em função da elevação do pH e a inibição competitiva de alguns cátions causada pelo possível excesso de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ . Volkweiss et al. (1992) citaram que o uso de quantidades excessivas de corretivo no solo, pode provocar diminuição dos rendimentos devido ao aparecimento de deficiências de micronutrientes como zinco, boro e manganês. Por outro lado, Silva et al. (1995) observaram que a deficiência de K no algodoeiro foi mais severa em áreas calcariadas em relação às plantas de algodão cultivadas na ausência de calagem e sem aplicação de K. De acordo com Marschner (1995), a competição entre nutrientes por sítios de troca da membrana plasmática das células radiculares acontece particularmente entre íons com propriedades físico-químicas semelhantes como o  $\text{Ca}^{2+}$  e o  $\text{Mg}^{2+}$  que, em

algumas situações, inibe a absorção de K pelas raízes. Malavolta (1980) também relatou que há inibição competitiva entre o Mg, Ca e K, em termos de absorção. Assim, se os teores de um elemento forem alterados por uma prática de adubação ou calagem excessiva, poderão ocorrer problemas de deficiência desses elementos.

O comportamento geral dos germoplasmas de *Lotus corniculatus* mostrou maiores produções nos tratamentos com 14,1% e 22,2% de Al. À medida que se aumentou a saturação por Al, a MSPA reduziu em todos os genótipos. A cv. San Gabriel apresentou menor variação entre os níveis testados, com redução de 57%, comparando-se a maior e a menor produção deste (níveis 22,2% e 0% de Al, respectivamente). A cv. São Gabriel apresentou um nível de variação intermediário, com 80% de redução, enquanto as cv.s Draco e Estanzuela, e a população UFRGS, foram as mais sensíveis à variação do pH do solo, com reduções de cerca de 90% (redução similar à alfafa, espécie reconhecidamente sensível ao Al). Estes resultados demonstram que a MSPA e a tolerância ao Al são inversamente proporcionais quando analisados desta forma. Vários autores discutem este tema, sugerindo que existe um custo metabólico da tolerância, ou seja, genótipos mais tolerantes desenvolveram mecanismos diferenciados, que na ausência do estresse, deslocam recursos que poderiam ser dispensados ao crescimento (Foy et al., 1996; Ma et al., 2001). Se o objetivo é obter um genótipo para ser utilizado em regiões com moderada saturação de alumínio, não seria vantagem uma grande produção na ausência do Al e apresentar uma queda vertiginosa da produção em baixos níveis. Do mesmo modo, a manutenção de uma constante baixa na produção independente da saturação de Al não é desejável, devendo-se buscar, de acordo com a necessidade, materiais para situações específicas.

Os dados de MSPA foram decorrentes dos resultados obtidos de área foliar e altura, que foram superiores ( $p < 0,05$ ) nos germoplasmas de *L. corniculatus* testados em relação à alfafa até o nível 22,2%. Após este nível, a alfafa apresentou valores semelhantes aos genótipos de *Lotus*. O número de ramificações e o número de folhas trifolioladas vivas foram semelhantes entre os genótipos de *Lotus* e superior ao da alfafa em todos os níveis de correção aplicados (dados não apresentados).

Para esta caracterização, a população UFRGS foi o principal destaque, apresentando boas produções de MSPA em todos os tratamentos, exceto em situações muito drásticas, com mais de 55% de saturação por Al. A cv. San Gabriel se destacou principalmente numa situação de extrema toxidez por Al (acima de 55% de saturação por Al), porém a sua MSPA neste tratamento foi 50% inferior em relação aos melhores germoplasmas em condições de elevada toxidez (entre 30 e 35% de saturação por Al). Já a cv. São Gabriel se destacou em saturações entre 20% e 35% de saturação por Al, apresentando baixas produções em situações de extrema e baixa toxidez por Al.

Diversas espécies apresentam um controle poligênico da tolerância ao Al, uma vez que a esta pode ter alterado um considerável número de genes (Larsen et al., 1997, Schott & Gardner, 1997; Ezaki et al., 1999, 2000). As estratégias de tolerância ao Al identificadas até o momento podem ser divididas nas que envolvem a exclusão do Al do ápice radicular e nos mecanismos que levam a planta a tolerar o Al dentro da célula (Taylor, 1991). O mais provável é que as plantas utilizem uma série de mecanismos de tolerância ao Al atuando em conjunto, sendo alguns específicos para o Al e outros relacionados de maneira geral com a resposta a estresses (Samac & Tesfaye, 2003). Para *L. corniculatus*, fica a necessidade de um estudo de elucidação de qual(is) mecanismo(s) pode(m) estar envolvido(s) nesta maior tolerância.

### *Caracterização em solução nutritiva*

Para o crescimento radicular (CR), observou-se a significância dos efeitos principais: concentrações de Al ( $p < 0,0001$ ) e germoplasmas ( $p = 0,0002$ ). Com relação às concentrações de Al impostas, pôde-se constatar que o CR foi altamente influenciado pela concentração de Al da solução nutritiva. Quanto maior o teor de alumínio, menor foi o crescimento (Figura 2A). Observou-se que entre os níveis 100 e 200  $\mu\text{M}$  não houve redução significativa, demonstrando que o nível 200  $\mu\text{M}$  realmente deve apresentar um elevado nível de Al tóxico para cornichão, sendo suficiente para cessar o crescimento radicular nesta espécie.

Dentre os germoplasmas testados, a população UFRGS apresentou um CR superior ao da alfafa. Já a *cv. Draco* não se destacou de nenhuma dos demais, apresentando um crescimento 32% menor que da população UFRGS, e 40% superior à alfafa (Figura 2B).

Edmeades et al.(1991) citam a existência de uma amplitude de tolerância à acidez do solo e ao alumínio em plantas forrageiras. Espécies de *Medicago* mostram-se muito sensíveis, enquanto que *Lotus uliginosus* e *L. corniculatus* são mais tolerantes a moderadas concentrações de alumínio e baixo pH (Blamey et al., 1990; Wheeler & Dodd, 1995). Este mesmo comportamento foi observado na cultivar e na população de *L. corniculatus* avaliadas neste trabalho, com destaque para a população UFRGS.

Para o crescimento relativo da raiz (CRR) e para a atividade de alumínio requerida para decrescer o CRR para 50% ( $\{Al^{+3}\}_{50}$ ), os genótipos de *L. corniculatus* testados não diferiram entre si e mostraram-se significativamente superiores ( $P = 0,003$  para genótipos x nível de Al) à alfafa em todas as três concentrações de Al testadas. Para uma comparação quantitativa, a atividade de  $Al^{+3}$  que inibiu o alongamento

radicular em 50% ( $\{Al^{+3}\}_{50}$ ) computado para os genótipos de *Lotus* testados foi comparada com a  $\{Al^{+3}\}_{50}$  calculada para os genótipos Wassilewskija e Landsberg de *Arabidopsis* (Toda et al., 1999), para os genótipos ES3, ET3 (Ryan et al., 1995) e Atlas (Kinraide et al., 1991) de trigo, e para as espécies *Brachiaria ruziziensis* e *B. decumbens* (Wenzl et al., 2001). Os valores da  $\{Al^{+3}\}_{50}$  para a cv. Draco (50,5) e para a população UFRGS (52,7) encontrados neste trabalho foram muito superiores aos encontrados para *Arabidopsis* e Trigo, e semelhantes ao valor encontrado para *Brachiaria decumbens* (49,5), espécie que apresenta alta tolerância ao Al tóxico.

Meda & Furlani (2005) compararam o  $\{Al^{+3}\}_{50}$  em 17 espécies de leguminosas tropicais. Os valores encontrados variaram entre 39 e 334, mostrando uma ampla diversidade de resposta entre estes materiais. Os resultados dos genótipos de cornichão testados no presente trabalho os classificariam como moderadamente tolerantes, classificação semelhante ao milho cv. Taiuba, tolerante ao Al, e a algumas espécies de *Crotalaria*.

Para a avaliação do número de ramificações (RR), foram observados efeitos principais significativos para as concentrações de Al ( $p < 0,0001$ ) e para os genótipos avaliados ( $p = 0,0012$ ). O número de ramificações foi fortemente influenciado pela concentração de Al da solução nutritiva. Teores elevados de alumínio (100 e 200  $\mu M$ ) proporcionaram reduções significativas em todos os germoplasmas da ordem de 50% e 72%, respectivamente. Entre os genótipos avaliados, a população UFRGS foi a que apresentou maior número médio de ramificações (5,3), seguido da cultivar Draco (4,1) e da alfafa, espécie com menor RR (2,8). Segundo Samac & Tesfaye (2003), a concentração de alumínio tóxico inibe a formação de raízes secundárias. A população UFRGS e a cv. Draco destacaram-se da alfafa crioula, apresentando um maior número

de ramificações. A presença de mais ramificações radiculares, associado ao maior comprimento de raízes permite que as plantas explorem um volume maior de solo, podendo proporcionar um maior crescimento da parte aérea em situações de toxidez por Al.

A quantificação da tolerância ao Al através da avaliação do comprimento radicular em soluções nutritivas simples é muito utilizada devido à facilidade de predição da atividade do Al (Kinraide et al., 1985). Na avaliação do comprimento radicular após 20 dias de crescimento (CF), observou-se uma interação significativa entre as doses de Al e os genótipos testados para esta característica ( $p=0,0372$ ). Novamente, na ausência de Al, os três germoplasmas apresentaram comprimento radicular semelhante (Figura 6).

A alfafa demonstrou alta sensibilidade, sofrendo forte inibição do crescimento radicular (71% na média) a partir da concentração 50  $\mu\text{M}$  de Al, nesta avaliação. A cv. Draco e a população UFRGS apresentaram comprimentos radiculares semelhantes nas doses 0 e 50  $\mu\text{M}$ . Na dose 100  $\mu\text{M}$ , a população UFRGS apresentou maior tolerância ao Al, ou seja, um vigoroso desenvolvimento radicular, mesmo em condições de alto teor de Al.

Considerando os 20 dias de crescimento, observou-se uma redução significativa no comprimento radicular da população UFRGS e da cv. Draco na dose 200  $\mu\text{M}$ , sugerindo que este nível talvez seja muito severo para se comparar a tolerância destes genótipos, pois diferentemente do nível 100  $\mu\text{M}$ , não se observou uma diferenciação clara entre a cv. Draco e a população UFRGS. Neste nível, a população UFRGS foi superior à alfafa, enquanto a cv. Draco foi semelhante a ambos.



Assim como o comportamento obtido em solo ácido, os resultados obtidos na avaliação do crescimento radicular durante um período de 20 dias reforçam que a população UFRGS apresenta tolerância ao Al, destacando-se em condições de alto teor de Al. Sabe-se que o principal alvo da toxidez por alumínio em plântulas é o ápice radicular (Foy et al., 1978), e que a sensibilidade ao Al está intimamente ligada ao crescimento radicular (Samac & Tesfaye, 2003). Ryan et al. (1993), trabalhando com plântulas de milho, demonstraram que a inibição do crescimento radicular ocorria apenas quando a região apical (2-3mm) da raiz era exposta ao Al. O ápice radicular também acumula mais alumínio que outras porções da raiz (Kochian, 1995, 2002; Ciamporová, 2002). A parede celular da zona sensível ao Al acumula este metal mais rapidamente do que em outras células, devido à mais alta proporção de pectina (Ciamporová, 2002). A ligação do Al na parede celular das raízes desprende do cálcio da pectina, o qual inibe o crescimento radicular (Rengel & Reid, 1997; Ryan et al., 1997). Desta forma, espécies mais tolerantes apresentam maior crescimento radicular que as sensíveis na presença do Al. No caso deste estudo, a população UFRGS apresentou este comportamento, sugerindo uma maior tolerância ao Al em relação aos demais genótipos testados.

### **Conclusões**

1. Níveis próximos a 30% de saturação por Al na CTC do solo e concentrações de 100  $\mu\text{M}$  de Al em solução de cultivo permitiram maior distinção entre os genótipos de cornichão, sendo os mais adequados para a seleção de plantas visando tolerância a toxidez por alumínio.

2. Os resultados obtidos em solução nutritiva estão de acordo com os resultados obtidos utilizando solos ácidos, permitindo a validação desta metodologia.
3. A MSPA e o CF foram as características que mais contribuíram para a diferenciação dos germoplasmas em experimentos realizados em solo ácido e em solução nutritiva, respectivamente.
4. A população UFRGS, em solo e em solução nutritiva, apresentou de forma geral maior tolerância ao Al, com manutenção da MSPA e das raízes ramificadas e longas, mesmo em situações com moderado/médio teor de Al.
5. A *cv.*Draco, foi o genótipo de cornichão com maior sensibilidade a presença do Al em solo e solução nutritiva.

### Referências Bibliográficas

ABREU JR, C.H.; MURAOKA, T.; LAVORANTE, A.F. Relações entre acidez e propriedades químicas de solos brasileiros. **Scientia Agricola**, v.60, n.3, p. 543-548, 2003.

BLAMEY, F.P.C.; EDEMEADES, D.C.; WHEELER, D.M. Role of root cation-exchange capacity in differential aluminum tolerance of *Lotus* species **Journal of Plant Nutrition**, v.13, p.729-744, 1990.

BLUMENTHAL, M.J.; MCGRAW, R.L. *Lotus* adaptation, use and management. In: BEUSELINCK, P.R. (Ed.). **Trefoil: the science and technology of Lotus**. Madison: The American Society of Agronomy, 1999. p.1-20.

BOLAN, N.S.; HEDLEY, M.J.; WHITE, R.E. Processes of soil acidification during nitrogen cycling with emphasis on legume based pastures. **Plant and Soil**, v.134, p.53-63, 1991.

CIAMPOROVÁ, M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue and cellular levels. **Biologia Plantarum**, v.45, p.161-171, 2002.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre, SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400p.

EDMEADES, D.C.; BLAMEY, F.P.C.; ASHER, C.J.; EDWARD, D.G. Effects of pH and aluminium on the growth of temperate pastures espécies. I. Temperate grasses and legumes supplied with inorganic nitrogen. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.42, p.559-569, 1991.

ERNANI, P.R. **Química do solo e disponibilidade de nutrientes**. Lages, SC: O Autor, 2008. 230p.

EZAKI, B.; SIVAGURU, M.; EZAKI, Y.; MATSUMOTO, H.; GARDNER, R.C. Acquisition of aluminum tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by expression of the BCB or NtGD11 gene derived from plants. **FEMS Microbiological Letters**, v.171, p. 81-87, 1999.

EZAKI, B.; GARDNER, R.C.; EZAKI, Y.; MATSUMOTO, H. Expression of aluminum-induced genes in transgenic Arabidopsis plants can ameliorated aluminum stress and/or oxidative stress. **Plant Physiology**, v.122, p. 657-665, 2000.

FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Reviews Plant Physiology**, v.29, n.1, p.511 – 566, 1978.

FOY, C.D.; DUNCAN, R.R.; WASKON, R.M.; MILLER, D.R. Tolerance of sorghum genotypes to an acid, aluminum toxic tatum subsoil. **Journal of Plant Nutrition**, v.161, p.97–127, 1996.

KINRAIDE T.B.; ARNOLD, R.C.; BALIGAR, V.C. A rapid assay for aluminum phytotoxicity at submicromolar concentrations. **Physiologia Plantarum**, v.65, p. 245-250, 1985.

KINRAIDE, T.B. Identity of the rhizotoxic aluminium species. **Plant and Soil**, v.134, p.167–178, 1991.

KIRKBRIDE, J.H. *Lotus* systematics and distribution. In: BEUSELINCK, P.R. (Ed.). **Trefoil: the science and technology of Lotus**. Madison: The American Society of Agronomy, 1999. p.1-20.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review Plant Physiology**, v.46, p.237-260, 1995.

KOCHIAN, L.V.; PENCE, N.S.; LETHAM, L.D.; PINEROS, M.A.; MAGALHAES, J.V.; HOEKENGA, O.A.; GARVIN, D.F. Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. **Plant and Soil**, v.247, p.109–119, 2002.

LARSEN, P.B.; STENZLE, L.M.; TAI, C-Y.; DEGENHARDT, J.; HOWELL, S.H.; KOCHIAN, L. Molecular and physiological analysis of Arabidopsis mutants exhibiting altered sensitivities to aluminum. **Plant and Soil**, v.192, p.3–7, 1997.

MA, J.F.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, v.6, p.273–278, 2001.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Ceres, 1980. 215p.

MARSCHNER, H. Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. In: PLANT SOIL INTERACTIONS AT LOW pH, 1991, Beckley. **Anais...** Beckley: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.683-702.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press Inc., 1995. 446p.

MEDA, A.R.; FURLANI, P.R. Tolerance to aluminum toxicity by tropical leguminous plants used as cover crops. **Brazilian Archives of Biology. Technology**, v.48, n.2, p.309-317, 2005.

MENOSSO, O.G.; COSTA, J.A.; ANGHINONI, I. et al. Tolerância de genótipos de soja ao Al em solução. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.11, p.2157 – 2166, 2000.

RAO, I.M.; ZEIGER, R.S.; VERA, R.; SARKARUNG, S. Selection and breeding for acid-soil tolerance in crops. **Bioscience**, v.43, n.7, p.454-465, 1993.

RENGEL, Z.; REID, R.J. Uptake of Al across the plasma membrane of plant cells. **Plant and Soil**, v.192, p.31–35, 1997.

RHEINHEIMER, D.S.; GATIBONI, L.C.; KAMINSKI, J. et al. 2001. **Situação da fertilidade dos solos no Estado do Rio Grande do Sul**. Santa Maria: Departamento de Solos da UFSM, 2001. 41p. (Boletim técnico, 2).

RYAN, P.R.; DITOMASO, J.M.; KOCHIAN, L.V. Aluminum toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **Journal of Experimental Botany**, v.44, p.437–446, 1993.

RYAN, P.R.; Delhaize, E.; Randall, P.J. Characterization of Al-stimulated malate efflux from the root apices of Al-tolerant genotypes of wheat. **Planta**, v.196, p.103-110, 1995.

RYAN, P.R.; REID, R.J.; SMITH, F.A. Direct evaluation of the Ca<sup>2+</sup> - displacement hypothesis for Al toxicity. **Plant Physiology**, v.113, p.1351–1357, 1997.

SAMAC, D.A.; TESFAYE, M. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils – a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.75, p.189 – 207, 2003.

SAS Institute. **System for Information**. Versão 8.2. Cary, 2001. 392p.

SCHOTT, E.J.; GARDNER, R.C. Aluminum sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Genetics and Genomic**, v.254, p. 63-72. 1997.

SILVA, I.R.; SMYTH, T.J.; RAPER, C.D.; CARTER, T.E.; RUFTY, T.W. Differential aluminum tolerance in soybean: An evaluation of the role of organic acids. **Physiologia Plantarum**, v.112, n.2, p.200-210, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara. 2003. 457p.

TAYLOR, G.J. Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. **Current Topics in Plant Biochemistry Physiology**, v.10, p.57-93, 1991.

TODA, T.; KOYAMA, H.; HORI, T.; HARA, T. Aluminum tolerance of *Arabidopsis thaliana* under hydroponic and soil culture conditions. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 45, p. 419-425. 1999.

VOLKWEISS, S.J.; TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A. **A calagem dos solos ácidos: Prática e Benefícios**. 2 ed. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 1992.

WENZL, P.; ARANGO, A.; CHAVES, A.C. et al. A greenhouse method to screen brachiariagrass genotypes for aluminum resistance and root vigor. **Crop Science**, v. 46, p.968 - 973, 2006.

WHEELER, D.M.; DODD, M.B. Effect of aluminium on yield and plant chemical concentrations of some temperate legumes. **Plant and Soil**, v.173, n.1, p.133-145, 1995.

TABELA 1. Valores de pH do solo e de saturação por Al na CTC do solo, aos 80 dias após a incubação com carbonato de cálcio e magnésio (3:1), submetido a seis níveis de correção da acidez do solo. Porto Alegre, 2005.

Atributo	% de correção da acidez do solo					
	0	12,5	25	50	75	100
pH do solo	4,31	4,57	4,65	4,80	5,10	6,15
Sat. por Al (%)	57,9	34,4	32,5	22,2	14,1	0

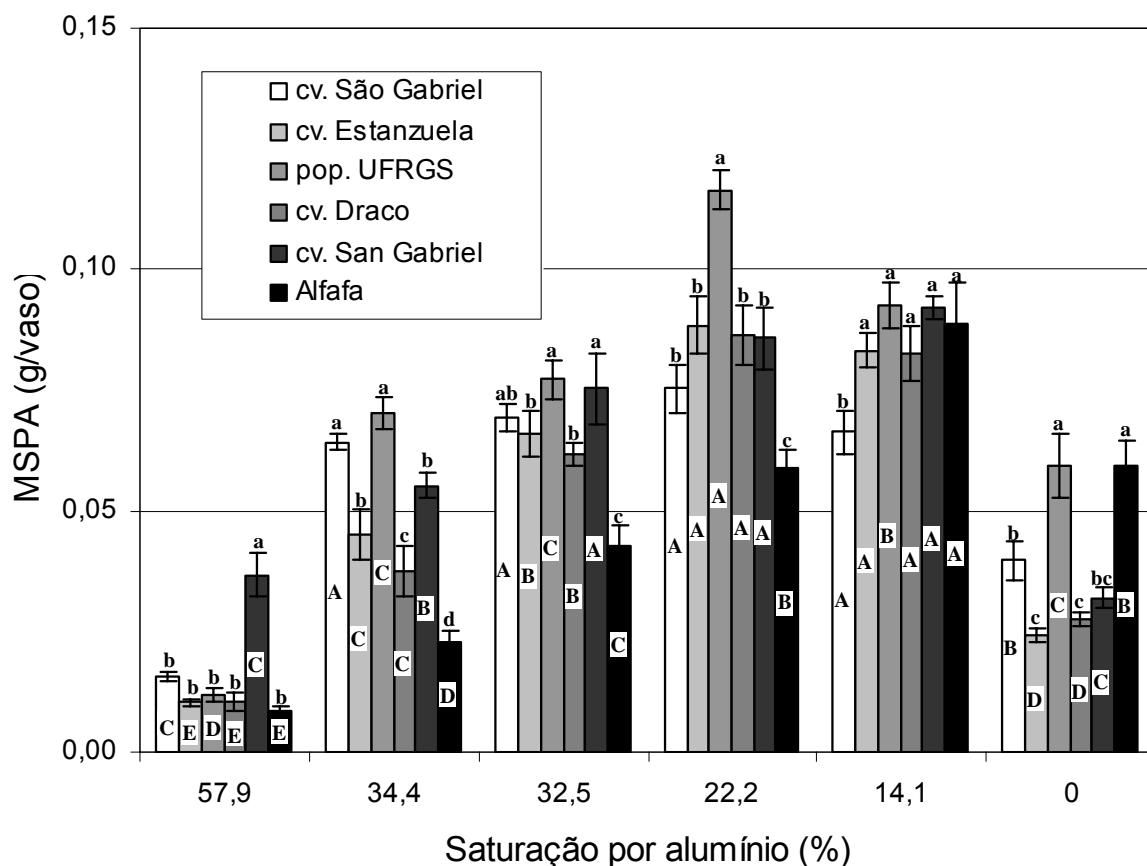


Figura 1. Matéria seca da parte aérea (MSPA) de cinco genótipos de cornichão e de alfafa crioula submetidos a seis níveis de saturação por Al. Letras maiúsculas e minúsculas indicam diferenças significativas pelo Teste a 5% de probabilidade entre os valores de saturação por Al e entre os genótipos em determinado valor de saturação por Al, respectivamente. Porto Alegre, 2005.

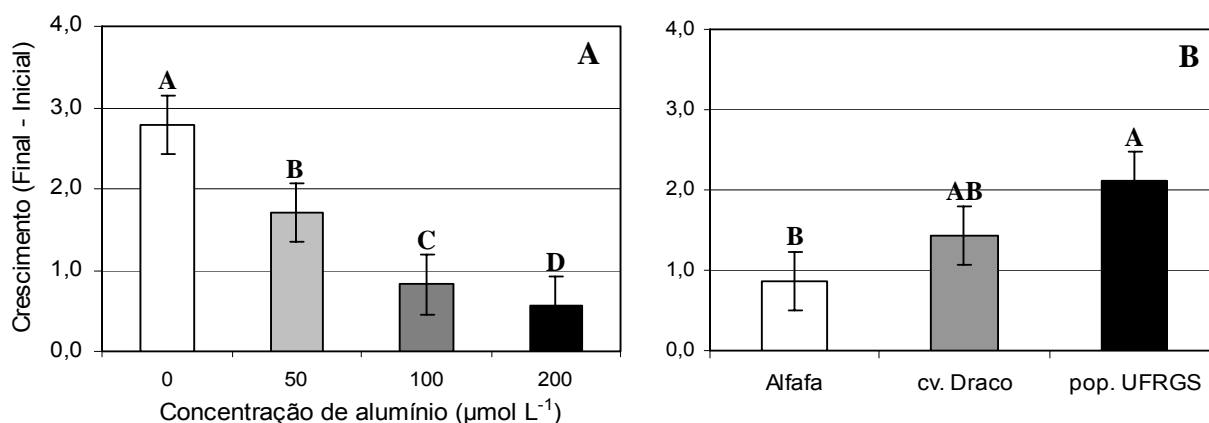


FIGURA 2. Crescimento radicular médio (avaliação final – avaliação inicial) em função da concentração de alumínio (A, médias dos genótipos) e em relação a dois genótipos de cornichão e de alfafa crioula (B, média das concentrações de Al) cultivadas durante 20 dias em solução nutritiva contendo  $200\mu\text{M}$  de Ca e diferentes concentrações de Alumínio. Letras

maiúsculas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Porto Alegre, 2006

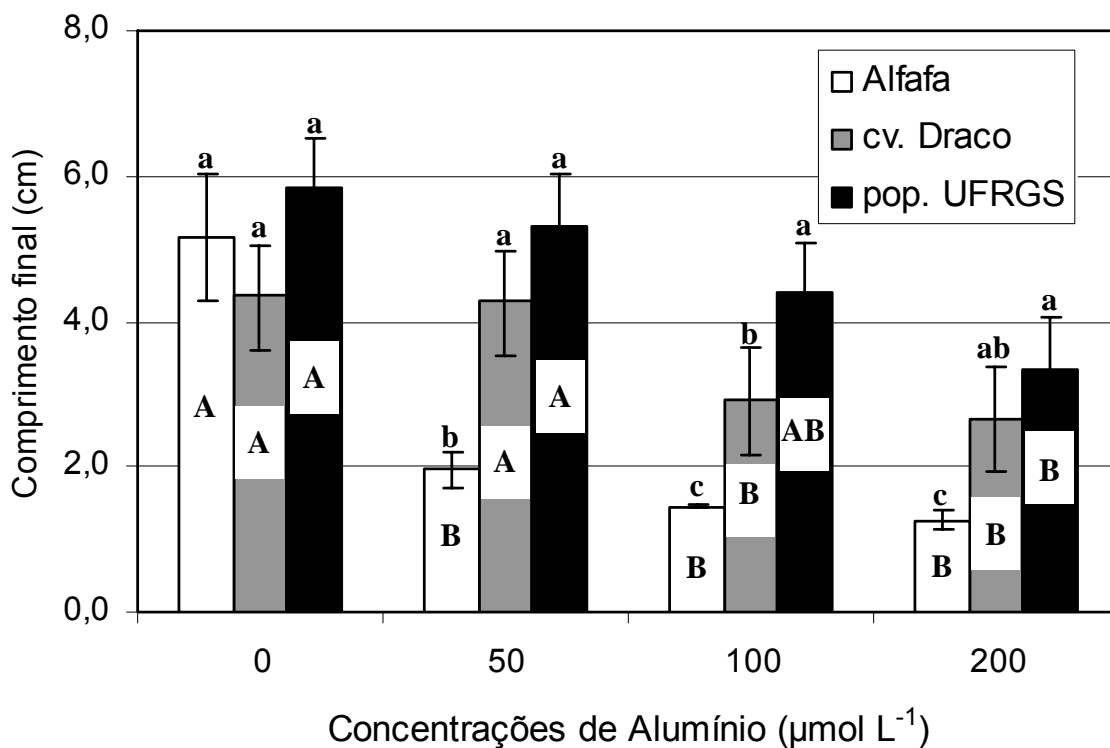


FIGURA 3. Comprimento da raiz principal (cm) de dois genótipos de cornichão e de alfafa crioula cultivadas durante 20 dias em solução de cultivo contendo 200  $\mu\text{M}$  de Ca e diferentes concentrações de alumínio. Letras maiúsculas diferem os genótipos dentro de cada dose pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas diferem os genótipos dentro de cada concentração de Al e letras maiúsculas diferem cada genótipo nas diferentes concentrações pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Porto Alegre, 2006.

## **CAPÍTULO III**



## Caracterização de espécies diplóides de *Lotus* em resposta à toxidez por alumínio<sup>1</sup>

**Armando Martins dos Santos<sup>2</sup>, Miguel Dall’Agnol<sup>2</sup>, Aline Janke<sup>2</sup>, Carlos Alberto Bissani<sup>3</sup>, Luciana Carvalho dos Santos<sup>2</sup>, Marcos Laux de Leão<sup>2</sup>**

RESUMO - O uso de espécies modelo pode auxiliar no melhoramento de plantas, uma vez que estas espécies possuem grande quantidade de informação genética que pode ser transferida para as espécies cultivadas relacionadas. Este trabalho objetivou caracterizar espécies diplóides, inclusive a espécie modelo *Lotus japonicus*, e linhas endogâmicas recombinantes (LER) do gênero *Lotus*, quanto à tolerância ao alumínio (Al) tóxico, utilizando solo ácido e solução nutritiva. Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação, sendo testados três espécies diplóides (*L. japonicus* MG-20 e GIFU, *L. filicaulis* e *L. burtii*), além de 180 LERs. Nos experimentos com espécies diplóides, utilizou-se a alfafa como testemunha sensível e nos experimentos com LERs, utilizou-se a espécie modelo GIFU. Para os experimentos em solo, foram avaliadas características morfológicas de parte aérea e raiz, e para os experimentos em solução nutritiva, apenas o comprimento e crescimento radicular. As espécies modelo MG-20 e GIFU foram os mais produtivos de maneira geral. Os resultados em solução nutritiva seguiram um padrão de resposta semelhante ao observado nas avaliações em solo ácido, sendo a espécie MG-20 superior às demais em todas as concentrações de Al testadas. Das 180 LERs testadas, 24 foram superiores e 39 foram inferiores a espécie GIFU. A grande diversidade observada nas espécies modelo e nas LERs poderá auxiliar na futura seleção de genótipos cultivados (tetraplóides), uma vez que estas espécies possuem um grupo de marcadores moleculares desenvolvidos que podem ser utilizados na tentativa de identificar regiões responsáveis pela maior ou menor tolerância à toxidez por alumínio.

Palavras-chave: alumínio tóxico, espécie modelo, linha endogâmica recombinante

---

<sup>1</sup> Artigo elaborado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Zootecnia

<sup>2</sup> Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 7712 - Caixa Postal 15100 - CEP 91540-000 (martinsarm@gmail.com)

<sup>3</sup> Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 7712 - Caixa Postal 15100 - CEP 91540-000

### **Characterization of diploid species of *Lotus* in response to aluminum toxicity**

ABSTRACT - The utilization of model species may facilitate the plant breeding process, since these species contain a great amount of genetic information that may be transferred to the related cultivated species. This research aimed at classifying model species (diploids) and recombinant inbred lines of the *Lotus* genus in regards to resistance to aluminum (Al) toxicity, using acid soil and nutrient solution. The experiments were conducted in greenhouse, being tested three diploid species (*L.japonicus* MG-20 and GIFU, *L. filicaulis* and *L. burtii*), and also 180 recombinant inbred lines. In the experiments with diploid species, alfalfa was used as check, and in the experiments with RILs, the GIFU ecotype was used. In the soil experiments, the morphological characteristics of the aerial part and the root were evaluated, and in the nutrient solution experiment, only the root length and growth were evaluated. For the soil experiments morphological characteristics of the aerial part and root were evaluated, and for the nutrient solution experiments only the root length and growth were evaluated. The MG-20 and GIFU ecotypes were the most productive in general. The results in nutrient solution followed the response pattern similar to the observed in acid soil evaluations. The MG-20 genotype was superior to the rest in all tested Al concentrations. Of the 180 RILs tested, 24 were superior and 39 inferior to the GIFU ecotype. The great diversity observed in the model species and in the RILs can help in future selection of cultivated genotypes (tetraploids), since they present a group of molecular markers developed that can be used in attempting to identify regions responsible for higher or lower tolerance to aluminum toxicity.

Key words: model specie, recombinant inbred line, toxic aluminum

## Introdução

A crescente pressão imposta pela exploração intensiva das grandes monoculturas tem levado as áreas de pastagens para regiões marginais, que geralmente apresentam baixa fertilidade do solo, destacando-se a acidez do solo associada à toxidez por Al, pois grande parte dos solos apresenta algum nível de acidez, principalmente nas áreas tropicais e subtropicais úmidas. Somente na América tropical cerca de 850 milhões de hectares apresentam este tipo de problema (Rao et al., 1993).

A seleção e o melhoramento visando tolerância a estresses abióticos em leguminosas forrageiras poderiam minimizar estes efeitos, incrementando a produção e qualidade de forragem também em áreas que apresentem toxidez por Al. No entanto, geralmente este procedimento é limitado pelo modo de reprodução destas espécies (alogamia) e pela complexidade das respostas fisiológicas e metabólicas aos estresses. Outro problema comum no melhoramento de muitas destas espécies forrageiras está na limitada quantidade de informação disponível a respeito destas espécies.

Sabendo que os genomas de algumas espécies forrageiras são altamente relacionados com o genoma de *Lotus japonicus*, uma espécie diplóide modelo que possui um mapa genético bem desenvolvido (Gueta-Dahan et al., 1997), a caracterização e identificação de indivíduos diplóides contrastantes quanto à tolerância ao Al poderia facilitar a identificação das regiões genômicas responsáveis por esta habilidade, pelo uso de marcadores desenvolvidos para estas espécies modelo.

No caso da acidez do solo, a caracterização em vasos contendo solo ácido serviria para embasar uma futura seleção de materiais cultivados, mais convenientes às necessidades locais. Esta metodologia se torna muito trabalhosa e demorada (Samac & Tesfaye, 2003). O uso ou adaptação de técnicas com solução nutritiva que avaliem as

plantas em seu estágio inicial permite caracterizar mais genótipos, de maneira mais simples, em um curto período de tempo (Menosso, 2000).

Os objetivos deste trabalho foram: (i) avaliar o efeito da correção da acidez do solo no desenvolvimento de quatro germoplasmas de três espécies diplóides do gênero *Lotus*; (ii) avaliar a eficiência de um método de curto prazo utilizando plântulas em solução nutritiva para verificar a tolerância ao Al tóxico, comparando os resultados obtidos com os experimentos realizados em solo ácido; e (iii) caracterizar em solução nutritiva a tolerância ao Al de 180 linhas endogâmicas recombinantes (LER) originadas a partir do cruzamento de *L. japonicus* com *L. japonicus*, *L. burtii* e *L. filicaulis*.

### **Material e Métodos**

Foram realizados oito experimentos, em casa-de-vegetação do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Faculdade de Agronomia da UFRGS, entre junho de 2005 e outubro de 2008. Destes, um foi para a caracterização das espécies diplóides em solo ácido com diferentes saturações de Al, um para a caracterização precoce destas mesmas espécies em solução nutritiva com diferentes concentrações de Al e seis experimentos para o teste das LERs na concentração 100  $\mu\text{mol/L}$  ( $\mu\text{M}$ ) de Al.

Foram testados quatro genótipos diplóides de três espécies do gênero *Lotus* (*L. japonicus* GIFU e MG-20, *L. burtii* e *L. filicaulis*) e 180 LERs (63 provenientes de *L. japonicus* (MG1 até MG128), 87 provenientes do cruzamento entre *L. burtii* x *L. japonicus* GIFU (GLB1 até GLB198) e 30 provenientes do cruzamento entre *L. japonicus* x *L. filicaulis* (NS)). Adicionalmente, utilizou-se a alfafa crioula, espécie sensível ao Al, como testemunha no experimento com espécies diplóides (solo ácido e solução nutritiva) e o ecótipo GIFU para os experimentos com as LERs.

### *Caracterização em solo ácido*

O solo deste experimento foi coletado em junho de 2005 no município de André da Rocha - RS, em área de beira de estrada, vegetada por campo nativo, que apresenta ocorrência de Latossolo Vermelho Distroférico típico. O solo foi seco ao ar, destorroado, peneirado e acondicionado em potes plásticos com capacidade para 1,5 kg. Foi realizada uma análise físico-química deste solo, cujos valores de pH, CTC pH 7,0, saturação por bases e saturação por Al foram interpretados como muito baixo, médio, muito baixo e alto, respectivamente (comissão de química e fertilidade do solo - RS/SC, 2004).

De posse da análise química, realizou-se em cinco repetições, a aplicação de seis níveis de calagem, em doses equivalentes a zero; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 vez a dose indicada pelo índice SMP para obter-se pH 6,0, com base nas recomendações da Comissão de Química e Fertilidade do Solo – RS/SC (2004). O valor 1,0 SMP para este solo foi de 9,9 t/ha. Para a correção do solo foi utilizada uma mistura de carbonato de cálcio e carbonato de magnésio (3:1), associado à reviragens semanais do solo dos vasos com intuito de acelerar o processo de reação do carbonato no solo.

Os seis níveis de correção implementados foram novamente avaliados após um período de 80 dias de incubação, correspondendo aos valores de saturação por Al (Tabela 1). Após este período de incubação, em 05/01/2006, foram semeadas aproximadamente 20 sementes/vaso de cada um das cinco populações tetraplóides. Cada vaso recebeu um aporte de 100 mg de nitrogênio, 100 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 100 mg de K<sub>2</sub>O na ocasião da semeadura.

Tabela 1. Valores de pH do solo e de saturação por Al na CTC do solo, aos 80 dias após a incubação com carbonato de cálcio e magnésio (3:1), submetido a seis níveis de correção da acidez do solo

Atributo	% de correção da acidez do solo					
	0	12,5	25	50	75	100
pH do solo	4,31	4,57	4,65	4,80	5,10	6,15
Saturação por Al (%)	57,9	34,4	32,5	22,2	14,1	0

Um desbaste de homogeneização foi realizado quando as plantas apresentaram em média de duas a três folhas trifolioladas, deixando apenas 10 plantas por vaso.

Após 60 dias (03/03/2006) de crescimento, avaliou-se a altura (H) das plantas com auxílio de uma régua graduada em mm, o número de ramificações (R) pela contagem dos mesmos, a área foliar (AF) com auxílio de um planímetro ótico (Licor, modelo LI-6200) e a matéria seca da parte aérea (MSPA) pela pesagem das hastes e folhas após a secagem por 72 horas em estufa de circulação de ar com temperatura de 65°C.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições. Foram realizadas análises de variância em esquema fatorial 4 x 6 para as características avaliadas, utilizando-se o Teste de Tukey a 5% de probabilidade para a comparação, sendo as análises realizadas pelo pacote estatístico SAS (SAS Institute, 2001). O teste de Tukey foi utilizado, pois o objetivo principal do trabalho foi identificar a variabilidade dos germoplasmas em cada nível isoladamente e não o comportamento isolado de cada germoplasma nos diferentes níveis.

### *Caracterização em solução nutritiva*

A seleção de plantas em solução nutritiva foi baseada na metodologia desenvolvida para soja, descrita por Menosso et al. (2000). As sementes foram colocadas sobre papel germinador em caixas tipo gerbox. As caixas foram mantidas em condições de casa-de-vegetação, visando garantir iluminação adequada, evitando assim o estiolamento das plantas. Foram utilizadas três repetições formadas por seis plântulas cada, utilizadas após sete dias, quando as radículas dos três genótipos já apresentavam pelo menos 10 mm. Foram utilizadas lâminas de poliestireno expandido (isopor<sup>®</sup>) para a sustentação das plantas na solução, sendo estas conduzidas em bandejas plásticas com capacidade para 5 L de solução durante um período de 23 dias, totalizando 30 dias de experimento.

As soluções utilizadas foram baseadas em Wenzl et al. (2001), cujas composições foram: 200  $\mu\text{mol/L}$  ( $\mu\text{M}$ ) de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e quatro doses de Al (0, 50, 100 ou 200  $\mu\text{M}$  de Al,  $\text{AlCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Estas quatro soluções foram utilizadas como tratamentos desde o momento da sementeira. O pH das soluções foi ajustado para 4,2 e as soluções eram trocadas a cada três dias, visando evitar a acumulação de exsudados e a alteração das concentrações de Al e  $\text{Ca}^{2+}$ . O volume de água era completado quando necessário. A solução foi aerada com compressores com capacidade de 40 L/hora.

Foram avaliados o comprimento radicular inicial (CI, aos sete dias após a germinação) e final (CF, 20 dias após a germinação), o crescimento radicular (CR, comprimento final – comprimento inicial) e o número de ramificações radiculares (RR) após 20 dias de cultivo. A partir destes resultados, calculou-se, de acordo com Wenzl et al. (2001), o crescimento radicular relativo (CRR) e a atividade de Al requerida para decrescer o CRR para 50% ( $\{\text{Al}^{+3}\}_{50}$ ).

O CRR foi obtido pela fórmula  $CRR = 100 \cdot [(CR_{Al} - CR_{\partial}) / (CR_0 - CR_{\partial})]$ , sendo  $CR_{Al}$  o crescimento radicular na presença de determinada concentração de Al;  $CR_{\partial}$  o crescimento residual em níveis de Al suficientes para saturar o crescimento radicular e  $CR_0$  é o crescimento médio das raízes na ausência de Al.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições. Foram realizadas análises de variância para CR, CRR, RR, CI e CF. Utilizou-se o Teste de Tukey a 5% de probabilidade para a comparação das médias, sendo as análises realizadas pelo pacote estatístico SAS (SAS Institute, 2001).

#### *Caracterização de LERs em solução nutritiva*

Estes experimentos seguiram a mesma metodologia dos experimentos de caracterização para espécies diplóides em solução nutritiva acima descrita. Foram utilizadas três repetições formadas por cinco plântulas cada, avaliadas 20 dias após a semeadura. Utilizou-se apenas a concentração 50  $\mu$ M de Al, que mostrou-se mais adequada na avaliação das espécies diplóides.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições. Foi avaliado apenas o comprimento final da raiz após 20 dias de crescimento nas bandejas, realizando-se uma análise de variância seguida de teste de Dunnet a 10% de probabilidade para a comparação de médias, utilizando-se o ecótipo GIFU como testemunha.



## Resultados e Discussão

### Caracterização em solo ácido

Para a MSPA, a magnitude da resposta dos genótipos ao Al foi diferenciada, ocorrendo interação significativa ( $P < 0,0001$ ) entre os níveis do metal e as espécies testadas (Figura 1).

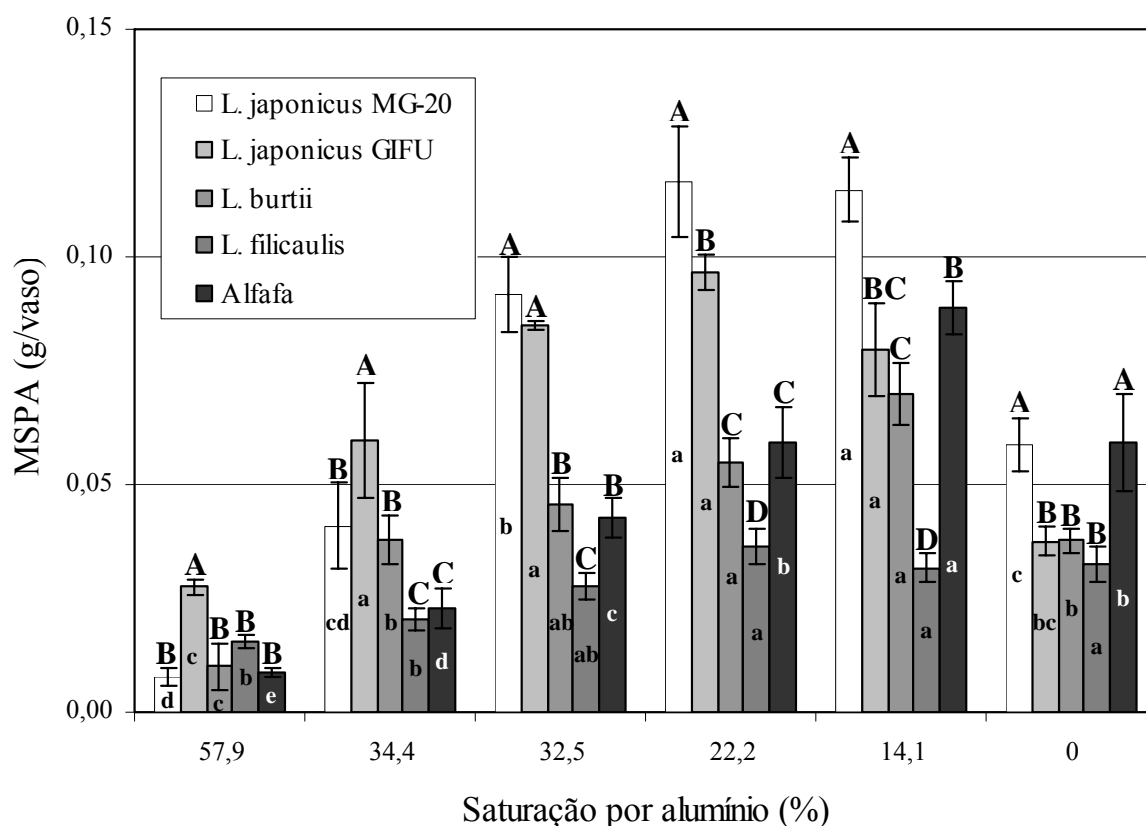


Figura 1. MSPA de quatro germoplasmas diplóides de *Lotus* e de alfafa submetidos a seis níveis de saturação por Al. Letras minúsculas e maiúsculas indicam diferenças significativas pelo Teste a 5% de probabilidade entre os valores de saturação por Al de um mesmo germoplasma e entre os germoplasmas em determinado valor de saturação por Al, respectivamente

Comparando-se as espécies em mesma saturação por Al, observou-se que em situações moderadas (14,1% e 22,2%), a espécie *L. japonicus* MG-20 se destacou das demais. Na saturação de 14,1%, aparecem ainda, com boas produções de MSPA, a

alfafa e as espécies *L. japonicus* GIFU e *L. burtii*. Como a alfafa é reconhecidamente uma espécie sensível ao Al (Wheeler & Dodd, 1995) e ainda mostrou MSPA elevada neste tratamento, sugere-se que o efeito do Al neste nível de saturação tenha sido baixo. A partir do tratamento 14,1% de saturação por Al, observou-se uma redução significativa da MSPA da alfafa, decaindo mais de 30% quando os valores da saturação aumentaram para 22,2%. Este comportamento também foi observado para a espécie *L. burtii*, que apresentou mais de 20% de redução. As demais espécies testadas (*L. japonicus* GIFU e MG-20 e *L. filicaulis*) não apresentaram redução na MSPA neste tratamento.

Níveis de 32,5% de saturação por Al reduziram a MSPA em todas as espécies avaliadas. As espécies apresentaram de forma geral cerca de 20% da MSPA máxima observada, exceto em *L. burtii* que a MSPA decresceu em 35%. Para a espécie testemunha (alfafa), a redução chegou a 50% neste nível.

No tratamento com elevada toxidez por Al (saturação por Al de 34,4%), a espécie *L. japonicus* GIFU foi superior às demais espécies, que apresentaram uma redução de mais de 50% da MSPA em relação às maiores produções obtidas.

Um comportamento semelhante foi observado no maior nível de Al (saturação por Al de 57,9%). Apesar da espécie *L. japonicus* GIFU ter sido superior, ocorreu limitação severa da produção de MSPA neste tratamento para todas as espécies.

De maneira geral, os resultados da MSPA encontrados neste trabalho apresentaram uma resposta similar à encontrada em caracterização prévia (Santos et al., 2006).

Outra forma de avaliação pode ser realizada através da comparação da MSPA de cada espécie nos diferentes níveis saturação por Al. Nesse caso, observou-se que *L.*

*japonicus* MG-20 e alfafa apresentaram as maiores variações entre os níveis de correção. Comparando-se as maiores e as menores produções destas espécies, observou-se uma redução na MSPA da ordem de 93,4% e 90,2%, respectivamente. As espécies *L. burtii* e *L. japonicus* GIFU apresentaram variação intermediária, observando-se uma redução na MSPA da ordem de 80,91% e 71,56%, respectivamente. Já a espécie *L. filicaulis* foi a que apresentou uma menor variação na MSPA em relação à correção do solo, com apenas 57% de redução. Estes resultados mostram que a MSPA e a tolerância ao Al são inversamente proporcionais quando avaliados desta forma. Esta característica é comumente observada em outros trabalhos desta natureza (Foy et al., 1996; Ma et al., 2001). Estes autores citam a existência de um custo metabólico da tolerância, onde genótipos mais tolerantes desenvolveram mecanismos diferenciados, que na ausência do estresse deslocam recursos que poderiam ser alocados para crescimento. Como as plantas geralmente são destinadas a áreas parcialmente corrigidas, com moderada saturação de alumínio, espécies com elevado decréscimo na produção, assim como espécies que mantenham uma baixa produção independente da saturação por Al, não são os materiais mais indicados. Deve-se buscar um equilíbrio entre a produção e saturação por alumínio. Para este estudo, as duas espécies modelo (*L. japonicus* MG-20 e GIFU) foram as mais produtivas nas condições de moderada saturação, com destaque para a espécie *L. japonicus* GIFU que também foi superior em situações elevadas de toxidez por Al.

A maior altura e a maior área foliar (devido ao maior tamanho de folha) foram as características que favoreceram este resultado para a espécie *L. japonicus* MG-20, enquanto o maior número de ramificações e o maior número de folhas por planta foram as características que favoreceram *L. japonicus* GIFU. Apesar de apresentar menor

variação na faixa de pH estudada, *L. filicaulis* apresentou a menor MSPA, em função da menor altura, do menor número de ramificações e da menor área foliar em relação aos outros genótipos (dados não apresentados).

No nível 0% de saturação por Al, observou-se uma redução na MSPA em todas as espécies, sendo esta menos acentuada em alfafa e *L. japonicus* MG-20. Entre as explicações para o efeito depressivo deste nível de calagem, poderia estar alguma limitação nutricional decorrente baixa disponibilidade de nutrientes em função da elevação do pH e a inibição competitiva de alguns cátions causada pelo possível excesso de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ .

Deficiências de micronutrientes, como zinco, boro e manganês podem ocorrer em situações de correção excessiva, causando redução do rendimento nestas situações (Volkweiss et al., 1992). Adicionalmente, diversos autores citam que deficiências de K e outros cátions podem ocorrer em áreas calcariadas devido a uma inibição competitiva com o  $\text{Ca}^{2+}$  e o  $\text{Mg}^{2+}$ , presentes em abundância nestas situações (Bear & Toth, 1948; Malavolta 1980; Silva et al., 1995; Marschner, 1995). Assim, se os teores de um elemento forem alterados por uma prática de adubação ou calagem excessiva, poderão ocorrer problemas de deficiência desses elementos.

#### *Caracterização em solução nutritiva*

A avaliação do comprimento radicular aos 20 dias (CF) mostrou interação entre as espécies avaliadas e os níveis de Al ( $P < 0,0001$ ). Na ausência de alumínio na solução nutritiva, a espécie alfafa apresentou comprimento radicular de 16,2 cm, cerca de três a quatro vezes superiores, em relação às espécies diplóides de *Lotus* avaliadas. Entre as espécies de *Lotus* avaliadas neste tratamento, *L. japonicus* MG-20 apresentou

comprimento radicular superior (5,6 cm) as demais, que não diferiram entre si e apresentaram média de 3,25cm (Figura 2).

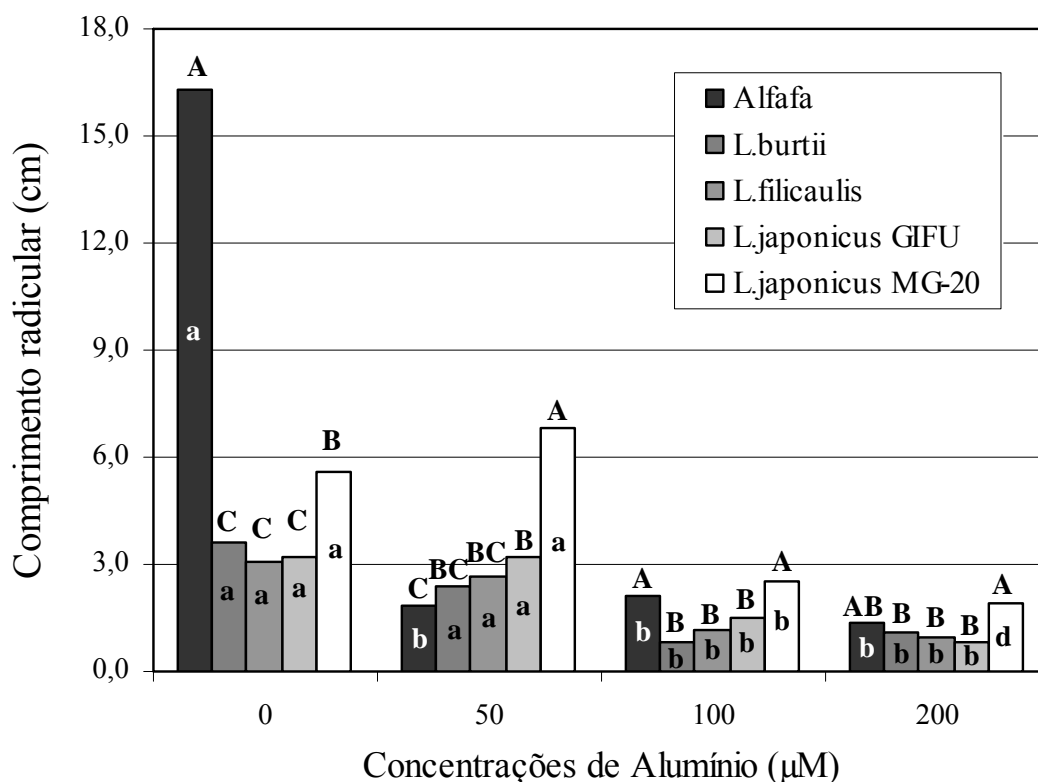


Figura 2. Comprimento da raiz principal (CF) de quatro germoplasmas diplóides de *Lotus* e alfafa crioula cultivadas durante 20 dias em solução nutritiva contendo 200 µM de Ca e diferentes níveis de alumínio. Letras maiúsculas diferem os genótipos dentro de cada dose e letras minúsculas diferem cada genótipo nas diferentes doses, ambos pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

A presença de 50 µM de Al reduziu drasticamente o crescimento radicular da alfafa (88%), confirmando a sensibilidade desta espécie ao alumínio tóxico. Nesta concentração de Al, todos os genótipos de *Lotus* avaliados mantiveram o CF semelhante ao tratamento sem alumínio. Destaca-se novamente a espécie modelo *L. japonicus* MG-20, sendo superiores a todas as demais espécies.

As concentrações de 100 e 200  $\mu\text{M}$  de Al reduziram significativamente o CF de todas as espécies de *Lotus* em relação à concentração de 50 $\mu\text{M}$  de Al ( $P<0,0001$ ), sendo que a espécie *L. japonicus* MG-20 continuou apresentando maior CF ( $P<0,0001$ ). Já a alfafa, apresentou CF semelhante entre os níveis entre 50 e 200  $\mu\text{M}$  de Al, resultado de uma ampla redução do CF já no nível 50  $\mu\text{M}$ .

O crescimento radicular (CR) também apresentou interação entre as espécies avaliadas e as concentrações de Al utilizadas ( $P<0001$ ). Na ausência do metal, a alfafa apresentou grande crescimento radicular (14,2 cm), superior a todas as espécies de *Lotus*. Entre estas espécies, destacou-se a espécie modelo *L. japonicus* MG-20 ( $P<0,001$ ), com média de 4,18 cm, contra 2,2 cm das demais espécies (Figura 3).

A concentração de 50  $\mu\text{M}$  de Al foi suficiente para estagnar o CR da alfafa, não afetando nenhuma das espécies de *Lotus* testadas. Um comportamento diferenciado foi observado na espécie modelo *L. japonicus* MG-20, que apresentou crescimento superior neste tratamento em relação à ausência do Al ( $P<0,001$ ). Isto pode estar relacionado a um fenômeno denominado hormese, que vem sendo descrito pela literatura (Rao et al., 1993). Este comportamento geralmente é observado nas concentrações mais amenas de alumínio e em experimentos de curta duração, como foi o caso deste.

A concentração 100  $\mu\text{M}$  de Al afetou o CR de todas as espécies de *Lotus*, com redução de mais de 70%. Mesmo nestas condições, a espécie modelo *L. japonicus* MG-20 novamente se destacou dos demais, com crescimento 150% superior à espécie modelo *L. japonicus* GIFU, e mais de 300% superior as espécies *L. filicaulis* e *L. burtii*. O comportamento observado neste tratamento indica que 50  $\mu\text{M}$  de Al seria a concentração limite para a manutenção do CR nas espécies diplóides. Comparando com os resultados obtidos em germoplasmas de cornichão (Capítulo II), observa-se que estes

apresentam maior tolerância ao Al, suportando níveis de até 100  $\mu\text{M}$  deste metal em solução.

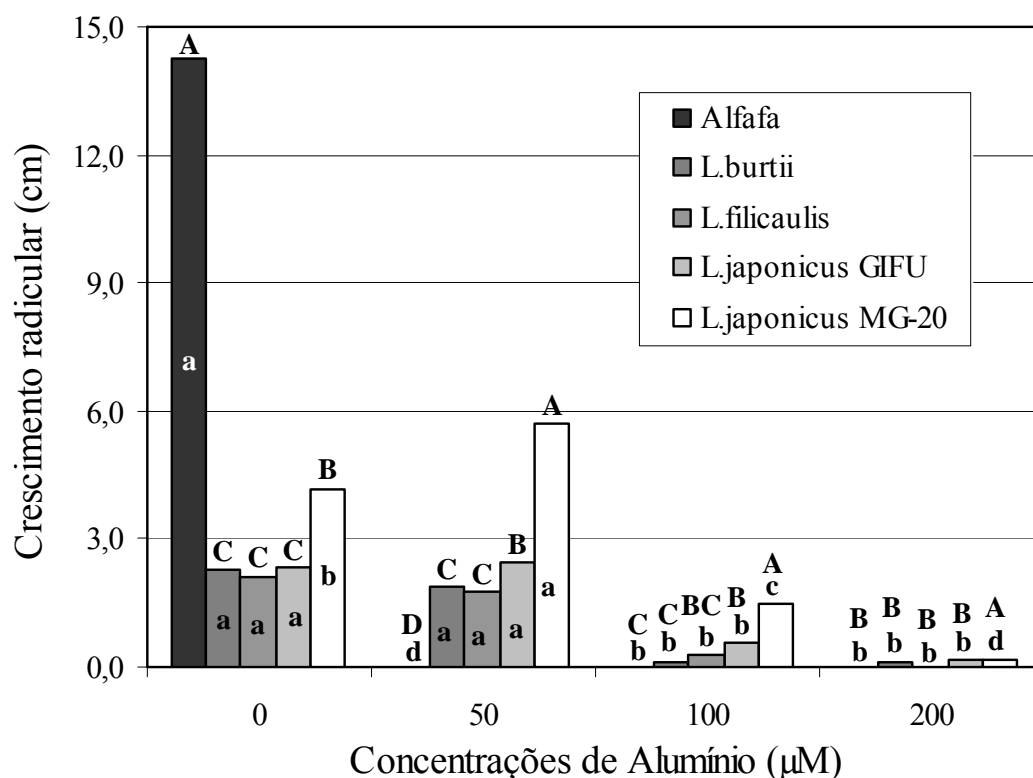


Figura 3. Crescimento radicular em função da concentração de alumínio (A) e de quatro germoplasmas diplóides de *Lotus* e alfafa crioula (B) cultivadas durante 20 dias em solução nutritiva contendo 200  $\mu\text{M}$  de Ca e diferentes concentrações de alumínio. Letras maiúsculas diferem os genótipos dentro de cada dose e letras minúsculas diferem cada genótipo nas diferentes doses, ambos pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

O nível 200  $\mu\text{M}$  de Al inibiu quase totalmente o CR de todas as espécies, demonstrando ter sido extremamente tóxico para os materiais diplóides.

Através da análise do crescimento radicular relativo (CRR), outra forma de avaliar o comportamento dos genótipos, observa-se um comportamento um pouco diferente do observado para CR (Figura 4). A padronização do crescimento na ausência de Al realizada pela análise do CRR permitiu uma equiparação percentual equilibrada, mesmo

em espécies com característica de crescimento distintas. No caso deste experimento, pôde-se equiparar o crescimento da alfafa (espécie mais precoce no desenvolvimento radicular) com as espécies diplóides de *Lotus*.

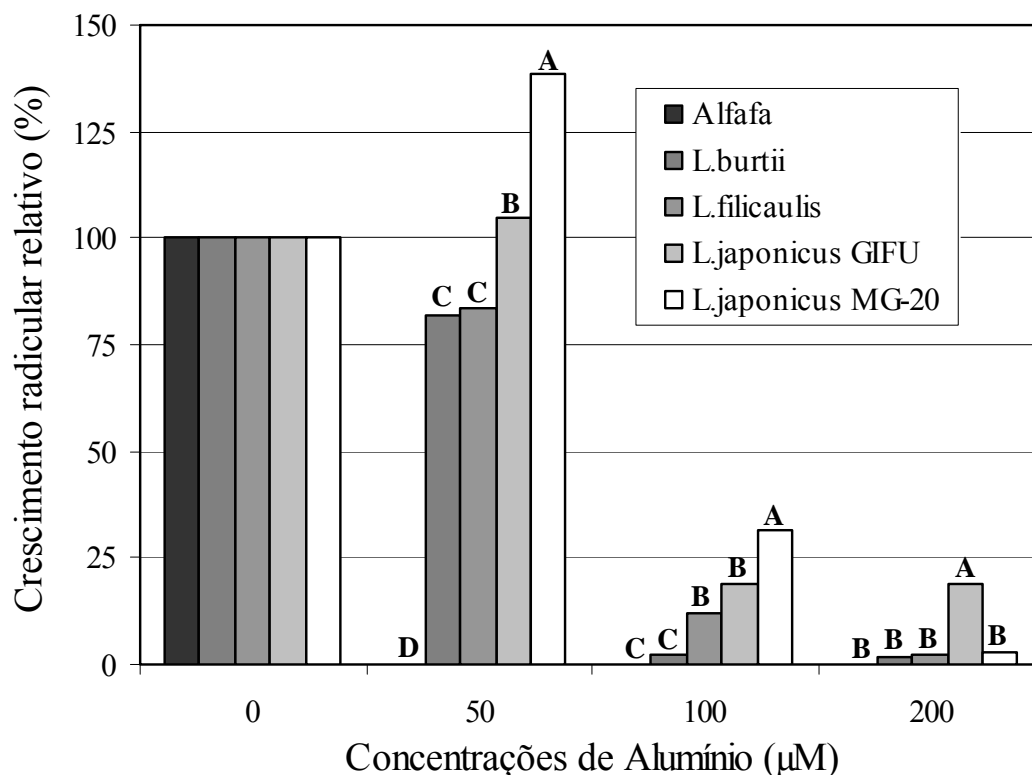


Figura 4. Crescimento radicular relativo (CRR) em quatro germoplasmas diplóides de *Lotus* e em alfafa cultivadas em solução nutritiva por um período de 30 dias. Letras minúsculas diferem os genótipos dentro de cada dose pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Desta forma, ao se avaliar a concentração 50 µM de Al, observou-se a formação de quatro grupos, distintos entre si ( $P < 0,01$ ). O maior CRR foi observado na espécie *L. japonicus* MG-20, seguido de *L. japonicus* GIFU, o terceiro grupo foi formado por *L. filicaulis* e *L. burtii* e, por ultimo, a alfafa com CRR zero, já na concentração de 50µM de Al. Assim como observado no CR, a concentração 100 µM de Al limitou



drasticamente o CRR em todos os genótipos avaliados, com destaque positivo para a espécie *L. japonicus* MG-20.

No tratamento 200  $\mu$ M de Al novamente observou-se diferentes comportamentos comparando o CR com o CRR. Neste último, a espécie *L. japonicus* GIFU se destacou das demais neste nível de Al. Por se tratar de uma equação que leva em conta uma proporção entre o CR em diferentes níveis, espécies com CR menor na ausência de Al, apresentarão CRR superior em níveis mais drásticos de Al, mesmo que os valores de CR nestes níveis sejam semelhantes, como foi o caso do CRR das espécies modelo *L. japonicus* MG-20 e GIFU na concentração de 200  $\mu$ M de Al.

#### *Solução nutritiva - LERs*

Dos quatro tratamentos utilizados na caracterização das espécies diplóides, o que continha 50  $\mu$ M de Al apresentou maior variabilidade entre os germoplasmas. Por este motivo, a comparação das LERs foi realizada nesta concentração de alumínio.

Das 63 LERs provenientes de *L. japonicus*, dez apresentaram comprimento radicular superior e onze inferior ( $P < 0,10$ ) em relação à testemunha (*L. japonicus* GIFU). Como destaque das tolerantes podemos citar os genótipos KOREA, CHURUI, MGs35, 46, 79, 82, 100, 109, 115 e 117, e como sensíveis, os genótipos MGs12, 29, 39, 49, 62, 71d, 74, 75, 101, 111 e 123. Uma ampla variabilidade de resposta pôde ser observada entre as LERs. Analisando os extremos, observou-se um comprimento radicular mais de 40% superior nas LERs Korea e MGs 79, 82, 100, 115 e 117 e mais de 50% inferior nas LERs MG-39 e 123, em relação ao ecótipo GIFU.

Com relação às 87 LERs provenientes do cruzamento entre *L. japonicus* GIFU x *L. burtii*, observaram-se nove genótipos tolerantes (GLB5, 8, 28,38, 61, 98, 99, 169 e

175) e vinte e três sensíveis em relação ao genótipo GIFU (GLB1, 4, 13, 27, 35, 37, 43, 44, 52, 63, 64, 67, 69, 73, 74, 89, 95, 107, 108, 184, 188, 190 e 198). Novamente, uma ampla diversidade de resposta também foi encontrada neste conjunto de LERs. As linhas GLB 5, 99 e 169 apresentaram-se mais de 50% superiores ao ecótipo GIFU, enquanto que as LERs GLB 4, 68 e 95 apresentaram mais de 50% de redução em relação a este mesmo ecótipo.

Já no teste dos 30 genótipos provenientes de *L. japonicus* x *L. filicaulis* foram observados seis genótipos superiores (NS53, 61, 92, 95, 141 e 177) e cinco inferiores (NS16,33, 81, 116 e 173). Neste grupo de plantas, a variabilidade encontrada foi superior aos demais. A linha NS 92 apresentou comprimento radicular 166% superior ao ecótipo GIFU. Adicionalmente, as LERs NS 141 e 177 apresentaram-se cerca de 50% superior a este ecótipo. Por outro lado, a LER NS 16 apresentou apenas 76% de redução do comprimento radicular, enquanto que as linhas NS 33 e 116 apresentaram uma redução de cerca de 40% em relação ao ecótipo GIFU.

Uma alta variabilidade para a tolerância ao alumínio vem sendo citada por diversos autores (Delhaize et al., 1995; Ma et al., 2001; Ermolayev et al., 2003). Isso indica que alguns genótipos ou espécies de plantas desenvolveram mecanismos de sobrevivência a este estresse. Estas estratégias de tolerância podem envolver exclusão do Al radicular e/ou neutralização do alumínio tóxico dentro da célula (Samac & Tesfaye, 2003) e podem estar se expressando de maneiras distintas nas diversas LERs avaliadas.

### Conclusões

Níveis entre 20 e 35% de saturação por Al no solo e 50  $\mu$ M de Al em solução de cultivo permitiram maior distinção entre as espécies diplóides, sendo adequados para a seleção de plantas visando tolerância à toxidez por Al. Os resultados obtidos em solução nutritiva estão de acordo com os resultados obtidos utilizando solos ácidos, permitindo a validação desta metodologia para a seleção de plantas tolerantes ao Al. Os ecótipos MG-20 e GIFU, da espécie modelo *L. japonicus*, apresentaram de forma geral maior tolerância ao Al em solo e em solução nutritiva, com manutenção da MSPA e do crescimento radicular, mesmo em situações com moderado teor de Al, enquanto que a espécie *L. filicaullis* foi a que apresentou menor produção, independente do teor de Al. Adicionalmente, uma grande variabilidade foi observada nas LERs avaliadas. Os indivíduos contrastantes podem ser utilizados em análises moleculares com objetivo de identificar regiões genômicas responsáveis pela tolerância ou sensibilidade ao Al.

### Literatura Citada

- BEAR, F.E.; TOTH, S.J. Influence of calcium on availability of others soils cations. **Soil Science**, v.65, n.1, p.69-74, 1948.
- COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre, SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400p.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, v.107, n.2, p.315 – 321, 1995.
- ERMOLAYEV, V.; WESCHKE, W.; MANTEUFFEL, R. Comparison of Al-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.393, p.2745-2756, 2003.
- FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Reviews Plant Physiology**, v.29, n.1, p.511 – 566, 1978.
- FOY, C.D.; DUNCAN, R.R.; WASKON, R.M.; MILLER, D.R. Tolerance of sorghum genotypes to an acid, aluminum toxic tatum subsoil. **Journal of Plant Nutrition**, v.161, p.97–127, 1996.
- GUETA-DAHAN, Y.; YANIV, Z.; ZILINSKAS, B.A.; BEN-HAYYIM, G. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus. **Planta**, v.203, n.4, p.460-469, 1997.
- MA, J.F.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, v.6, p.273–278, 2001.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Ceres, 1980. 215p.
- MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. London: Academic Press Inc., 1995. 446p.
- MENOSSO, O.G.; COSTA, J.A.; ANGHINONI, I. et al. Tolerância de genótipos de soja ao Al em solução. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.11, p.2157 – 2166, 2000.
- RAO, I.M.; ZEIGER, R.S.; VERA, R.; SARKARUNG, S. Selection and breeding for acid-soil tolerance in crops. **Bioscience**, v.43, n.7, p.454-465, 1993.
- SAMAC, D.A.; TEFAYE, M. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils – a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.75, p.189 – 207, 2003.
- SILVA, I.R.; SMYTH, T.J.; RAPER, C.D.; CARTER, T.E.; RUFTY, T.W. Differential aluminum tolerance in soybean: An evaluation of the role of organic acids. **Physiologia Plantarum**, v.112, n.2, p.200-210, 2001.
- VOLKWEISS, S.J.; TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A. **A calagem dos solos ácidos: prática e benefícios**. 2 ed. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 1992.
- WENZL, P.; ARANGO, A.; CHAVES, A.C. et al. A greenhouse method to screen brachiariagrass genotypes for aluminum resistance and root vigor. **Crop Science**, v. 46, p.968 - 973, 2006.
- WHEELER, D.M.; DODD, M.B. Effect of aluminium on yield and plant chemical concentrations of some temperate legumes. **Plant and Soil**, v.173, n.1, p.133-145, 1995.

## **CAPÍTULO IV**

## ALUMINUM ACCUMULATION AND ROOT EXUDATION OF OXALIC ACID IN *Lotus corniculatus* GERMOPLASMS IN RESPONSE TO ALUMINUM TOXICITY

Armando Martins dos Santos<sup>1</sup>, Miguel Dall'Agnol<sup>1,\*</sup>, Aline Janke<sup>1</sup>, Grazielle Pereira Ramos<sup>2</sup>, José Ângelo Zuanazzi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, CEP 90.610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

**ABSTRACT** - The accumulation of Al in roots quickly inhibits root growth and root exudation of organic acids (OAs) is one of the main mechanisms of Al detoxification identified. Two experiments in nutrient solution were performed to identify the accumulation of Al and the exudation of OAs in birdsfoot trefoil, using Draco and São Gabriel cultivars, UFRGS population and UF-T2 genotype (selected for Al tolerance). The plants were conducted in aluminum-free solution, which was applied on the forty-fifth day in half of the pots of each genotype. Samples of the solution were collected after 24, 72 and 120 hours of the application of Al for the evaluations of OAs in HPLC. The presence of Al during 120 hours significantly increased the accumulation of Al in all of germplasms. A higher accumulation was observed in the Draco cultivar, being superior in the accumulation in the UFRGS population. The results of root exudation were highly correlated with the accumulation of Al on tissue. In the presence of Al, the UF-T2 genotype presented a significant increase in the exudation of oxalic acid, in comparison to the other germplasms, and the UFRGS population was superior to the Draco cultivar in all of the evaluations. The exudation of oxalic acid may be a mechanism that allows the maintenance of birdsfoot trefoil growth in Al toxic conditions, where the selection of a more tolerant genotype provided significant increase in this defense mechanism. This is the first report of organic acid exudation in birdsfoot trefoil in response to Al.

**Key words:** birdsfoot trefoil, root aluminum, nutrient solution, oxalic acid exudation.

---

Trabalho nas normas da revista Plant and Soil

\* Corresponding author

FAX: 55-51-3379-4533

E-mail address: miguel@d@ufrgs.br

## INTRODUCTION

Aluminum (Al) is a metal that occupies 7% of the earth's atmosphere, being the third most abundant element, following oxygen and silicate. (Ma et al. 2001). The plants' roots are always exposed to some form of Al. Luckily, normally Al occurs in the form of silicate and oxides of Al, which are harmless to plants. However, when the soil becomes acid, which is a result of a natural process or of an anthropogenic activity, a solubilization of trivalent Al occurs ( $Al^{+3}$ ), which is highly toxic to plants (Rao et al. 1993).

Toxicity caused by Al has been recognized as the main factor of vegetable productivity limitation in acid soils (Ernani 2008), affecting about 30% to 40% of arable land in tropical and temperate regions, being that oxisols and alfisols are the most common in these regions, respectively (von Uexküll e Mutert 1995). The connection between Al of the pectates of the cell wall (Delhaize et al. 1993), the inhibition of the basipetal transport of auxin (Kollmeier et al. 2000), and the plasmatic membrane depolarization due to a lipid and protein peroxidation on the root tips (Pavlovkin et al. 2009) are the main effects responsible for the Al reactions that were described earlier. Therefore, a greater accumulation of Al in the root tissue makes it harder for the elongation and cellular division to occur, besides making it more difficult for the symplastic flow of solutes to happen in the plant. These actions inhibit the root growth and also reduce the absorption area of water and nutrients.

The use of species that present a potential to adapt to the acidity of the soil (toxic Al) would make the management easier in areas with these limitations, generally destined to the cultivation of pastures (Kirkbride 1999). In South America, the species of the *Lotus* genus stand out, recognizably with some tolerance to acid soils and soils with low natural fertility (Blumenthal and McGraw, 1999). Among them, is the *Lotus corniculatus*, a tetraploid leguminous utilized in the Southern Cone region that presents good tolerance to Al, which can be an alternative to improve the quality and quantity of pasture in regions that present this problem (Kirkbride 1999; Steiner 1999). Although they grow well in regions that have acid soils and toxicity by Al, little is known about the mechanisms that are favorable to this condition in these species. (Blumenthal and McGraw 1999).

Various are the artifices developed by the plants, aiming to increase the Al tolerance, being root exudation of organic biomolecules the response most studied and explored by researchers (Horst et al. 2007; Kang and Ishii 2006; Samac and Tesfaye 2003; Taylor 1991; Vieira et al. 2008).

Citrate, oxalate and malate are some examples of anions that can form robust complexes with Al, protecting the roots of the plants from the action of this metal. Some species already sustain a known exudation mechanism, as for example, malate on cultivars tolerant of wheat; citrate in beans, corn and soybeans; and oxalate in *Fagopyrum esculentum* and *Colocasia esculenta* (Ma et al. 2001). In most of the species that tolerate Al, the increase of root exudation of these acids depends on the presence of  $Al^{+3}$  (Delhaize et al. 1993; Zheng et al. 1998), occurring rapidly on the root tips. This liberation is mediated by anionic channels located in the plasmatic cell of the radicular cortex (Kollmeier et al 2001).

The objective of this research was to identify the accumulation of Al in the root tissue and the pattern of root exudation of organic acids in germplasms of *L. corniculatus* submitted to toxic Al.

## MATERIAL AND METHODS

The experiments were conducted in the Laboratory of Genetic Analyses of the “Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia” of the Agronomy College of UFRGS. Initially, in June of 2008, two cultivars (Draco, São Gabriel) and a population of *Lotus corniculatus*, (UFRGS) were used, besides *Medicago sativa* (a standard species, sensitive to Al). These species were put to germinate on germination moist paper and fifteen days after the germination, the plants were transplanted to pots containing 200ml of nutrient solution each, with the following composition:(mmol/L): 0,7  $NH_4NO_3$ ; 0,7  $K_2SO_4$ ; 0,1 KCl; 2,0  $Ca(NO_3)_2$ ; 0,5  $MgSO_4$ ; 0,1  $KH_2PO_4$ , and ( $\mu$ mol/L): 1,0  $H_3BO_3$ ; 0,5  $MnSO_4$ ; 1,0  $ZnSO_4$ ; 0,2  $CuSO_4$ , 0,1  $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ , and 0,2  $FeCl_3$ .

Six pots for each genotype were used, with seven plants in each one. The plants were maintained in these conditions for 45 days, being that the nutrient solution was replaced every three days and its pH was maintained around 4.2. The plants were artificially illuminated with lamps type HQI 150W and 4.500 lux. The photosynthetic active radiation was measured with the help of the photometer of the LI-6300, remaining around  $400\mu mol m^{-2} s^{-1}$ .

Starting at the forty-fifth day,  $200\mu M$  of Al was added in half of the pots (three) of each genotype, being that the other half was maintained without Al. The samplings of nutrient solution for the



evaluation of the exudation of organic acids occurred 24, 72 and 120 hours after the addition of Al. Two ml were collected from each pot, quickly cooled down at 4°C and immediately sent to the high pressure liquid chromatographic (HPLC Waters 2690, Milford, MA, USA).

The following acids were evaluated: oxalic, citric and malic. However, only the oxalic acid was exudated in concentrations capable of being measured. The identification of oxalic acid occurred by comparing the retention time of the samples to the times of the standard samples. The exudation was evaluated by comparing the areas of the root tips of these samples to the areas of calibration curve.

After the third sampling (120 h), the plants were harvested, evaluating the dry matter of the shoots (SDM) and roots (RDM), root volume (RV), root length (RL) e height of the plants (H).

In March of 2009, the experiment was repeated. However, besides the genotypes that were previously tested, the UF-T2 genotype was included (the F<sub>2</sub> generation selected for tolerance to Al). In this experiment, only the exudation of oxalic acid was evaluated, using the same periods and conditions of the previous experiment. After the evaluation, the plants from the original populations of birdsfoot trefoil were separated into two groups: shoots and roots, being later put to try in forced ventilation at 65°C, until their weight was stabilized. These samples were sent to the Laboratory of Vegetable Tissue Analysis of UFRGS, and the content of Al was determined in the root tissue, through digestion in nitric acid and later a reading in an optical emission spectrophotometer was performed.

The results were submitted to statistical analysis, with the help of SAS software, version 8.0, through the “Factorial ANOVA” procedure, which consists in a factorial analyses (germplasms x doses of Al x exposure period) for exudation of oxalic acid in both experiments and an analyses of factorial variance (germplasms x doses of Al) for the morphological parameters and for the accumulation of Al. The averages were compared by the Tukey test, at a 5% probability, when there was significance for the F test. An analysis of correlation was made between the accumulation of Al in the root tissue and the root exudation of oxalic acid during the three evaluated periods.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The results for accumulation of Al in the root tissue indicated a significant effect of the Al concentration ( $p < 0.0001$ ) and the germplasms that were evaluated ( $p < 0.05$ ). In the lack of metal, the accumulation of Al in the roots was inferior to 150 mg Kg<sup>-1</sup> of tissue (Figure 1). The presence of Al

during 120h significantly increased the accumulation in all genotypes. A greater accumulation was found in the cv. Draco (4533 mg Kg<sup>-1</sup> of tissue), being superior to the accumulation in UFRGS population (3303 mg Kg<sup>-1</sup> of tissue). The cv. São Gabriel presented an intermediate accumulation (3800 mg Kg<sup>-1</sup> de issue), not differing from the rest.

Larger concentrations of Al in the root tissue can indicate a greater sensibility to toxic Al, meaning the existence of less efficient mechanisms of detoxification and exclusion of this metal (Barceló and Poschenerieder 2002). The Al on roots may be connected to the cellular wall, plasmatic membrane, cytosol or cellular nucleus, which can cause an elongation and division inhibition, besides several other metabolic alterations in the cellular function (Hosrt et al. 2007).

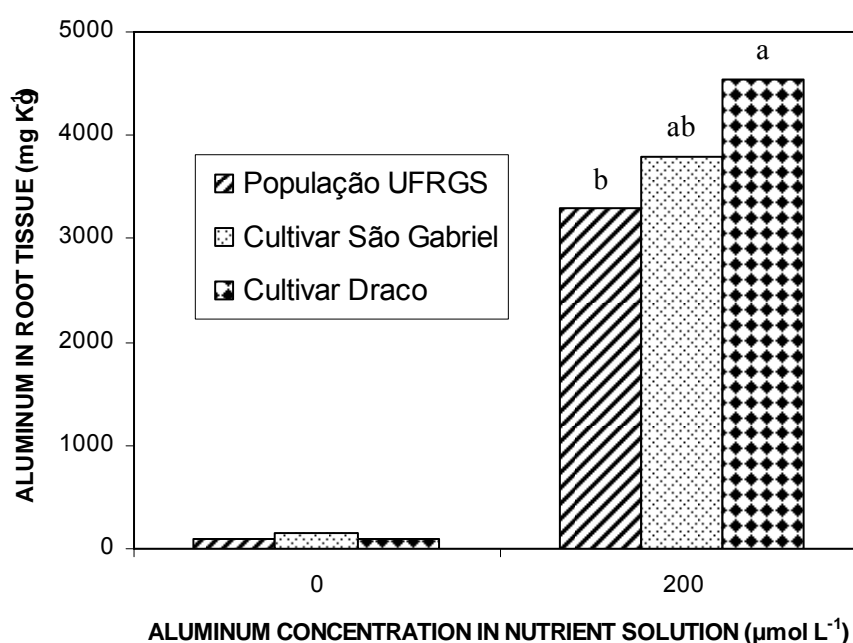


Figure 1 – Aluminum (Al) accumulation in roots tissue of three *L. corniculatus* germplasm cultivated in nutrient solution, in the presence and absence of 200 μM of Al during 120 hours. Lower case letters differentiate genotypes in each Al concentration by the Tukey test (5%).

In regard to the exudation of organic acids, of the three organic acids that were tested, the only one significantly quantified in the samples, through chromatography, was the oxalic acid. The exudation of this acid has not been identifiable in cultivated species, like soybeans and corn (Kollmeier et al. 2001; Silva et al. 2001). However, in species with an elevated tolerance to Al, such as *Fagopyrum esculentum* and *Hydrangea macrophila*, the exudation of oxalic acid is cited as the main factor associated with tolerance (Ma et al. 1997 e 1998; Zheng et al. 1998).

The statistical analysis for exudation patterns for this acid showed a significant effect in the evaluated germplasms ( $p < 0,01$ ), for the presence or absence of Al ( $p = 0,0010$ ) and for the exposure period to Al ( $p = 0,0002$ ). Generally, the exposure to an elevated level of Al significantly increased the root exudation in all the germplasms evaluated in both experiments, being that the two cultivars and the population of *L. corniculatus* evaluated presented a higher increment in comparison to alfalfa in all the exposure periods tested (Figures 2). In the second experiment, the genotype selected for Al tolerance (UF-T2) presented exudation superior to the rest (Figure 2B).

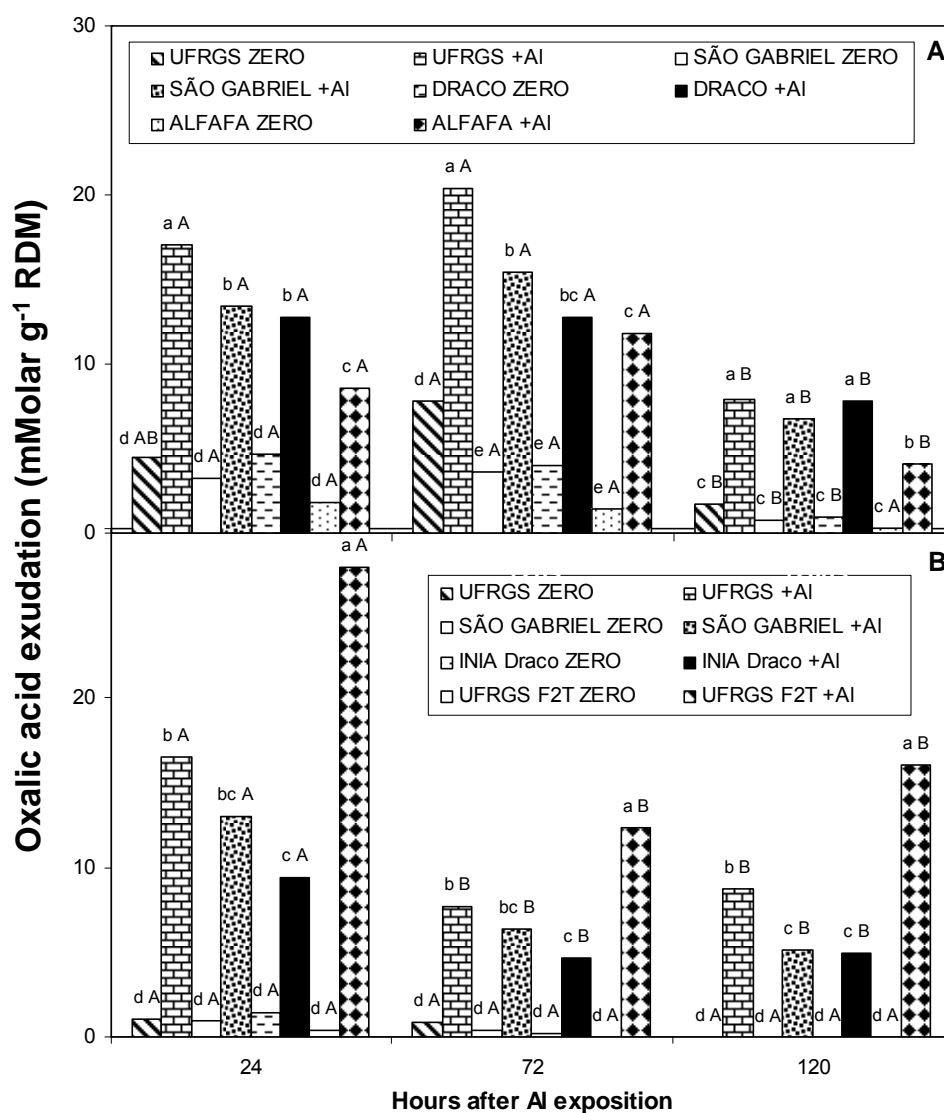


Figure 2 - Oxalic acid exudation pattern of *Lotus corniculatus* germplasms (A and B for Experiment I and II, respectively) and Crioula alfalfa (B), after exposition to 200  $\mu$ M to Al for 24, 72 and 120 hours. Lower case letters differentiate genotypes in each Al concentration level and capital letters differentiate the same germplasms in relation to exposition time, by the Tukey test (5%)

Evaluating the exudation of oxalic acid in the absence of Al, there was no difference between the germplasm, with low levels identified in the solution (exudation inferior to  $4 \text{ mM g}^{-1}$  of RDM) in both experiments, including the selected genotype for Al tolerance (UF-T2). This could indicate the presence of a tolerance mechanism in *L. corniculatus* that increased the oxalic acid exudation in the presence of an elevated level of Al solution. More than 12 species of plants tolerant to Al are known for exuding organic acids as an Al defense mechanism (Ma 2000, Ryan et al. 2001). Citric, malic and oxalic acid are the most commonly found acids, sometimes forming robust bonds with this metal (Ma et al. 2001). The selection for toxic Al in acid soils seems to have contributed to maximize this action mechanism in the UF-T2 genotype.

The presence of Al affected the root exudation of the genotypes differently in both experiments. Following the same pattern of *L. corniculatus* genotypes evaluated for Al accumulation in root tissue, the UFRGS population stood out, presenting average oxalic acid values of 15 and  $11 \text{ mM g}^{-1}$  of RDM for the first and second experiment, respectively (Figures 2A and 2B). With intermediate behavior, the São Gabriel cv. presented an average of 12 and  $7,5 \text{ mMolar/g}$  of RDM, while the Draco cv. presented the smallest average values of oxalic acid, 10,5 and  $6,0 \text{ mMolar/g}$  of RDM, for the first and second experiment, respectively. Although the alfalfa increased the exudation in the presence of Al, its level of average oxalic acid in the solution was not superior to  $7,5 \text{ mMolar/g}$  of RDM (species evaluated only in the first experiment). In the second experiment, the selected genotype for Al tolerance (UF-T2) presented exudation superior to all other germplasm (Figure 2). The exudation was twice as superior as the UFRGS population and the cv. São Gabriel, and three times superior to the cv Draco. This greater exudation may be related to a higher frequency and magnitude action of the anionic canal of the plasmatic membrane. Zhang et al. (2001) and Sasaki et al. (2004) identified this type of response for wheat cultivars with a higher Al tolerance.

These results corroborate a characterization made for these germplasm related to Al concentration in acid soil and nutrient solution containing toxic Al (Santos et al. submitted). The greater root growth and higher development of the aerial part in the UFRGS population compared to the cv. Draco may have been influenced by the greater root exudation of oxalic acid. This organic acid, in larger amount, can neutralize more Al molecules close to the rhizosphere, minimizing the effect of this metal on vegetable tissues.

Other functional differences between the cv. Draco and the UFRGS population can also be associated to this greater tolerance to toxic Al. Recently, Pavlovkin et al. (2009) presented differences in the depolarization of the plasmatic membrane in different populations of *L. corniculatus* when submitted to toxic Al. The results of these researchers showed that the most tolerant germplasm (UFRGS population) showed more resistant membranes to depolarization, compared to the most sensitive germplasm (cv. Draco). In other studies, the Al supply promoted a fast connection to the plasmatic membrane (Horst et al. 2007), especially in the root apical region, the most sensible region to Al (Sivaguru et al. 1999). This bond promotes a structural change of the plasmatic membrane, favoring the increase of cytosolic Ca<sup>2+</sup> for the induction of the calose synthesis (Kauss et al. 1990), and the formation of free radicals that lead to lipid peroxidation and protein oxidation, causing a rupture and depolarization of the plasmatic membrane (Boscolo et al. 2003; Yamamoto et al. 2002).

The roots exposure to Al during the first two evaluations (24 and 72h after Al exposure) in the first experiment, and in the first evaluation (24h) of the second experiment showed higher levels of oxalic acid compared to the last evaluation (120h after Al exposure) of both experiments. In this last evaluation a decrease of root exudation occurred in all germplasm, with the birdsfoot trefoil germplasms presenting an average of 6.87 mM g<sup>-1</sup> RDM, superior to those of the alfalfa (4.09 mM g<sup>-1</sup> RDM) in the Al treatment. In the second experiment, the UF-T2 genotype stood out from the rest, presenting RDM values of 16.01 mM g<sup>-1</sup>. In the absence of stress, all genotypes presented a similar exudation pattern (p>0.05).

The difference in the oxalic acid exudation between the initial (24h) and final period (120h) was of 200% for all evaluated genotypes. In this initial stage, the UF-T2 genotype presented a higher oxalic acid exudation (27.71 mM g<sup>-1</sup> RDM). The UFRGS population presented a higher exudation (18.20 mM g<sup>-1</sup> RDM) compared to the Draco and São Gabriel cvs. (13.08 mM g<sup>-1</sup> RDM), and to the alfalfa, that in this initial period did not exudate more than 9.50 mM g<sup>-1</sup> RDM.

Two organic acid exudation patterns have been classified based on their secretion pattern (Ma 2000). In the first pattern, observed in the first hours after Al exposure, a higher rate of exudation is observed, while in the second pattern, the exudation of organic acids increases during the hours. Different mechanisms are involved in these two distinct patterns. In pattern I, the response quickness suggests that the Al activates a pre-existing anionic canal in the plasmatic membrane, with protein induction not being necessary (Ma et al. 2001; Ryan et al. 1997; Zhang et al. 2001). On the other hand, the decrease observed

in the pattern II indicates that a protein induction may be necessary. These proteins may be associated to the metabolism or transport of the organic acids, but these mechanisms are not yet fully understood (Hayes and Ma, 2003). By the results obtained in this experiment, there are strong evidences that the birdsfoot trefoil presents the pattern I type, meaning that it has anionic canals rapidly activated by Al.

Regarding the morphological parameters evaluated after the last evaluation (120 h) on the experiment I, distinct behavior for the alfalfa and birdsfoot trefoil genotypes were observed (Table 1). In the absence of Al, the alfalfa showed to be superior ( $p < 0.01$ ) to the birdsfoot trefoil regarding all evaluated characteristics. The values found for this species were about 200% superior to the birdsfoot trefoil values, since it is a more productive and more vigorous species (Blumenthal and McGraw, 1999).

The presence of Al, even in a short period of time, reduced the SDM and RDM of the cv. Draco significantly, as well as the alfalfa's, being this response more accentuated in this last species. This behavior was not observed for the UFRGS population and in the cv. São Gabriel, which maintained stable for these characteristics. With alfalfa, a highly significant reduction in RV, RL and H was observed in plants treated with Al. Comparing the birdsfoot trefoil population in the absence of Al, Draco presented lower RDM, RV, RL and H compared to the UFRGS population and the cv. São Gabriel, demonstrating to be a less vigorous cultivar. In the presence of Al, the UFRGS population and the cv. São Gabriel were superior than the cv. Draco and alfalfa for the variables evaluated.

Table 1. Morphological characteristics evaluated after the last evaluation of oxalic acid (Experiment 1).

Genótipos	Evaluated characteristics									
	SDM		RDM		RV		H		RL	
UFRGS (-Al)	0,92	Ab	0,92	Ab	2,15	Ab	7,78	Ab	8,52	Ab
UFRGS (+Al)	0,95	Aa	0,83	Aa	2,13	Aa	7,22	Aa	8,37	Aa
São Gabriel (-Al)	0,88	Ab	0,86	Ab	1,87	Ac	7,28	Ab	9,11	Ab
São Gabriel (+Al)	0,83	Aa	0,76	Aa	1,73	Ab	6,81	Aa	7,32	Bb
Draco (-Al)	0,91	Ab	0,57	Ac	1,27	Ad	6,47	Ac	5,64	Ac
Draco (+Al)	0,58	Bb	0,37	Bb	1,17	Ac	5,89	Ab	5,23	Ac
Alfafa (-Al)	2,32	Aa	1,50	Aa	2,83	Aa	12,28	Aa	13,28	Aa
Alfafa (+Al)	0,84	Ba	0,44	Bb	1,21	Bc	6,56	Ba	5,86	Bc
<b>Mean</b>	<b>1,03</b>		<b>0,78</b>		<b>1,80</b>		<b>7,54</b>		<b>7,92</b>	

Lower case letters indicate significant differences in the same germplasm when submitted to the presence or absence of aluminum in nutrient solution by the Tukey test (5%). Capital letters indicate significant differences among different germplasms submitted to the presence or absence of aluminum in nutrient solution by the Tukey test (5%).

These results demonstrated a protective roll played by oxalic acid in vegetable growth under toxic Al conditions. The reduction of Al accumulation was highly related to higher root exudation of oxalic acid, suggesting that this mechanism acts inhibiting the accumulation of Al in vegetable tissue of *Lotus corniculatus*. It bonds to the Al in the rhizosphere (most sensitive region to this metal), blocking its toxic action in the plant in acidity conditions. In the present experiment, higher concentrations of oxalic acid were highly related to smaller accumulation of Al in the roots tissue ( $r^2=0.69$ ; 0.75 and 0.60 for 24h, 72h and 120h, respectively). This response was already demonstrated in experiments made with more tolerant genotypes to Al of wheat, corn, sunflower, soybeans and other species (Hayes et al. 2003; Liao et al. 2006; Ma et al. 2001; Vieira, et al. 2008). These studies demonstrated an Al exclusion via organic acids exudation in birdsfoot trefoil, inhibiting part of its phytotoxic action on the cell (Jones 1998; Kochian et al. 2002). The result of two soil selections containing elevated saturation from Al (UF-T2 genotype) caused a significant increase in oxalic acid exudation, corroboration with the hypothesis above, demonstrating that this mechanism contributed to a higher tolerance in this species. The selected genotype for Al tolerance (UF-T2) greatly incremented its roots exudation, indicating that this mechanism is involved with Al tolerance in this species This is the first report of organic acid exudation in birdsfoot trefoil in response to Al.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful for financial support from the Lotassa project from the European Union contract n° INCO-CT-2005-517617.

## REFERENCES

- Barceló J, Poschenrieder C (2002) Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany* 48 (1):75-92
- Blumenthal MJ, McGraw RL (1999) *Lotus* adaptation, use and management. In: Beuselinck, PR (ed) *Trefoil: the science and technology of Lotus*, The American Society of Agronomy, Madison, pp 1-20.
- Boscolo PRS, Menossib M, Jorge RA (2003) Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry* 62(2):181-189
- Delhaize E, Ryan PR (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiology* 107(2):315–321
- Ernani PR (2008) *Química do solo e disponibilidade de nutrientes*. The author, Lages
- Hayes JE, Ma JF (2003) Al-induced efflux of organic acid anions is poorly associated with internal organic acid metabolism in triticale roots. *Journal of Experimental Botany* 54(388):1753-1759
- Horst WJ, Kollmeier M, Schmohl N, Sivaguru M, Wang Y, Felle HH, Hedrich R, Schröder W, Stab DA (2007) Significance of the apoplast for the mineral nutrition of higher plants. In: Sattelmacher B and Horst WJ (eds) *The Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage*. Springer, Netherlands, pp 49-66
- Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil* 205(1):25–44
- Kang D, Ishii R (2006) Formation of acids organics in the root apices of rice plants grown in acid nutrient solution containing aluminum. *Plant. Prod Science* 9(3):228-231
- Kauss H, Jeblick H, Domard A (1990) The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta* 178(3):385-392
- Kirkbride JH (1999) *Lotus* systematics and distribution. In: Beuselinck PR (ed) *Trefoil: the science and technology of Lotus*, The American Society of Agronomy, Madison, pp 1-20.
- Kochian LV, Pence NS, Letham LD, Pineros MA, Magalhães JV, Hoekenga OA, Garvin, DF (2002) Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. *Plant and Soil* 247:109–119
- Kollmeier M, Felle HH, Horst WJ (2000) Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? *Plant Physiology* 122:945–956
- Kollmeier M, Dietrich P, Bauer CS, Horst WJ, Hedrich R (2001) Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. *Plant Physiology* 126:397–410
- Liao H, et al. (2006) Phosphorus and aluminum interactions in soybean in relation to aluminum tolerance. Exudation of specific organic acids from different regions of the intact root system. *Plant Physiology* 141:674–684
- Ma JF, Zheng SJ, Matsumoto H, Hiradate S (1997) Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature* 390:569-570
- Ma JF, Hiradate S, Matsumoto H (1998) High aluminum resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiology* 117:753–759



- Ma, JF (2000) Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell Physiol* 41:383–390
- Ma JF, Ryan PR, Delhaize E (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science* 6:273–278
- Pavlovkin J, Pal'ove-balang P, Kolarovic L, Zelinová V (2009) Growth and functional responses of different cultivars of *Lotus corniculatus* to aluminum and low pH stress. *Journal of Plant Physiology*, doi:10.1016/j.jplph.2009.03.005
- Rao IM, Zeiger RS, Vera R, Sarkarung S (1993) Selection and breeding for acid-soil tolerance in crops. *Bioscience* 43(7):454-465
- Ryan PR, Reid RJ, Smith FA (1997) Direct evaluation of the  $\text{Ca}^{2+}$  - displacement hypothesis for Al toxicity. *Plant Physiology* 113:351–1357
- Ryan PR, Delhaize E, Jones DL (2001) Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 52:527–560
- Samac DA, Tesfaye M (2003) Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils – a review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75:189–207
- Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, et al. (2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *The Plant Journal* 37:645–653
- Silva IR, Smyth TJ, Raper CD, Carter TE, Rufty TW (2001) Differential aluminum tolerance in soybean: an evaluation of the role of organic acids. *Physiologia Plantarum* 112(2):200-210
- Sivaguru M, Baluska F, Volkmann D, Felle HH, Horst WJ (2000) Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiology* 119:1073–1082
- Steiner JJ (1999) Birdsfoot trefoil origins and germoplasm diversity. In: Beuseulink PR (ed). *Trefoil: The Science and Technology of the Lotus*, The American Society of Agronomy, Madison, pp 81-96.
- Taylor GJ (1991) Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. *Curr. Topics Plant Biochem. Physiol.* 10:57–93
- Vieira FCB, et al. (2008) Response of representative cover crops to aluminum toxicity, phosphorus deprivation, and organic amendment. *Australian Journal of Agricultural Research* 59:52–61
- von Uexkull HR, Mutert E (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil* 171:1-15
- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi SR, Rikiishi S, Matsumoto H (2002) Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol.* 128:63-72
- Zhang, WH, Ryan PR, Tyerman SD (2001) Malate-Permeable Channels and Cation Channels Activated by Aluminum in the Apical Cells of Wheat Roots. *Plant Physiology* 125:1459-1472
- Zheng SJ, Ma JF, Matsumoto H (1998) High aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiology* 117:745-751

## **CAPÍTULO V**

**Construção e avaliação agronômica de genótipos de cornichão com respostas contrastantes a toxidez por alumínio<sup>1</sup>**

Armando Martins dos Santos<sup>(2)</sup>, Miguel Dall’Agnol<sup>(2)</sup>, Aline Janke<sup>(2)</sup>, Carlos Alberto Bissani<sup>(3)</sup>, Luciana Carvalho dos Santos<sup>(2)</sup> e Marcos Laux de Leão<sup>(2)</sup>

(1) Trabalho extraído de parte da Tese do primeiro autor. Financiado pelo projeto Lotassa.

(2) Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 7712 - Caixa Postal 15100 - CEP 91540-000 ([martinsarm@gmail.com](mailto:martinsarm@gmail.com), [migueld@ufrgs.br](mailto:migueld@ufrgs.br), [luli\\_cs@ig.com.br](mailto:luli_cs@ig.com.br), [lauxleao@gmail.com](mailto:lauxleao@gmail.com)).

(3) Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 7712 - Caixa Postal 15100 - CEP 91540-000 ([carlos.bissani@ufrgs.br](mailto:carlos.bissani@ufrgs.br)).

Resumo – A acidez do solo destaca-se como um importante fator limitante da produtividade das pastagens. Neste sentido, desenvolveu-se um trabalho com objetivo de selecionar e caracterizar genótipos de cornichão com respostas contrastantes à toxidez por Al. Quatro cultivares (São Gabriel, San Gabriel, Draco, Estanzuela) e uma população (UFRGS) foram submetidas a duas seleções consecutivas em solos apresentando 30-35% de saturação por alumínio. As seleções consistiam na separação de 1% dos indivíduos mais e também os menos vigorosos para a obtenção de genótipos tolerantes e sensíveis, respectivamente. Estes foram comparados com os germoplasmas de origem através de avaliação agronômica. Os resultados mostraram que os genótipos selecionados para tolerância ao Al tóxico foram de forma geral superiores aos

germoplasmas originais. Já os materiais obtidos visando sensibilidade parecem ter sido selecionados para menor vigor, uma vez que estes genótipos foram inferiores aos germoplasmas originais mesmo em situações com ausência de Al tóxico. Dentre os genótipos selecionados, destacou-se o UFRGS selecionado para tolerância, que apresentou elevada produção de matéria seca, sendo superior a todos os demais genótipos. A realização de testes a campo e a multiplicação de sementes destes genótipos para posterior uso em áreas que apresentem esta limitação se faz necessária, particularmente para a população UFRGS selecionada para tolerância ao Al.

Termos para indexação: *Lotus corniculatus*, melhoramento genético, tolerância ao alumínio, acidez do solo

### **Construction and agronomic evaluation of birdsfoot trefoil genotypes contrastant to aluminum toxicity**

Abstract - The soil acidity is important particularly in Brazil for being an important limiting factor to pasture productivity. Therefore, a work aiming the selection and characterization of *Lotus corniculatus* genotypes with contrasting responses to toxic Al was created. Four cultivars (São Gabriel, San Gabriel, Draco, Estanzuela) and one population (UFRGS) were submitted to two consecutive selections in soils that presented an Al saturation of 30-35%. The selection consisted in separating 1% of the most and less vigorous individuals in order to obtain tolerant and sensitive genotypes, respectively. After obtaining F2 genotypes, they were compared with the original populations, through agronomical evaluation. The results showed that the genotypes selected for toxic Al tolerance were overall superior to the original populations. However, the materials obtained seeking sensibility were inferior to the original populations even in situations where toxic Al was absent. Among the selected

genotypes, the UFRGS selected for tolerance stood out, presenting an elevated shoot dry matter level, being superior to all other genotypes. Field testing and seed multiplication of these genotypes for further use in areas that present this limitation is necessary, particularly the UFRGS population selected for Al tolerance.

Index terms: *Lotus corniculatus*, breeding, aluminum tolerance, soil acidity

### **Introdução**

Os estresses ambientais estão entre os fatores limitantes à produção mais importantes na Região do Cone Sul da América do Sul. A acidez do solo destaca-se neste cenário, principalmente no Brasil, Chile e Uruguai, sendo um importante fator limitante da produtividade das pastagens nesta região (Foy, 1978; Rao et al., 1993; Kochian et al., 2005).

Os solos ácidos constituem aproximadamente 30%-40% das terras aráveis em regiões tropicais e temperadas, sendo os oxissolos e os alfissolos os mais comuns nestas regiões, respectivamente (von Uexküll e Mutert, 1995). A toxidez por Al é o primeiro fator limitante da produção vegetal nestas situações. Em condições de pH do solo abaixo de 5,5, formas tóxicas de Al são solubilizadas na solução do solo, inibindo o crescimento radicular e, conseqüentemente, reduzindo a capacidade de absorção de nutrientes e água (Samac e Tesfaye, 2003). Adicionalmente, devido ao alto conteúdo de óxidos de Fe e Al dos oxissolos, uma grande fração do fósforo é adsorvido, ficando indisponível para as plantas (fósforo insolúvel).

Das espécies que desempenham um importante papel na produtividade de pastagens cultivadas da América do Sul, destacam-se algumas do gênero *Lotus* (principalmente no Uruguai e Argentina), como *L. glaber*, *L. subbiflorus*, *L.*

corniculatus e *L. uliginosus* (Pavlovkin et al., 2009). Estas possuem bom valor forrageiro, capacidade de fixar nitrogênio no solo e apresentam produções superiores a outras leguminosas cultivadas em locais com moderada fertilidade do solo (teores baixos de P e K) (Blumenthal e McGraw, 1999).

Dentre estas espécies, *L. corniculatus* é, sem dúvida, a espécie com maior importância agrônômica e ampla distribuição de utilização (Díaz et al., 2005). Uma grande variabilidade tem sido observada para diversas características de interesse agrônômico e para uso desta espécie em condições adversas (Papadopoulos & Kelman, 1999). Tal variação fornece aos melhoristas a oportunidade de selecionar genótipos superiores e desenvolver cultivares mais adaptadas a condições adversas, como, por exemplo, para tolerância ao Al tóxico.

Por se tratar de uma espécie alógama e tetraplóide, o progresso obtido no melhoramento tradicional apresenta-se mais difícil e demorado (Kirkbride, 1999; Steiner, 1999). Adicionalmente, diversos mecanismos que levam a planta a sobreviver e produzir sob estresses ambientais envolvem características complexas e de difícil avaliação, tornando esta tarefa ainda mais desafiadora. No entanto, resultados positivos vêm sendo obtidos nesta espécie pelo uso da seleção massal (Papadopoulos & Kelman, 1999).

Esse trabalho teve como objetivo selecionar genótipos de *Lotus corniculatus* com respostas contrastantes ao Al tóxico. Este estudo também objetivou a realização de caracterização agrônômica destes genótipos selecionados e das populações que lhes deram origem.

## Material e Métodos

### *Seleção de genótipos F2 contrastantes ao Al tóxico*

Este trabalho foi realizado entre junho de 2006 e janeiro de 2009, nas casas-de-vegetação e no Laboratório de Análise Genética, localizados no Departamento de Plantas Forageiras da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

Em 24 de abril de 2006 foram semeadas 2.000 sementes para cada uma de quatro cultivares (São Gabriel, San Gabriel, Draco, La Estanzuela) e para uma população (UFRGS) de *L. corniculatus*, em bandejas com capacidade para oito quilos de solo com saturação por Al na CTC do solo em níveis de 34,4% e 32,5% de saturação por Al. Após um período de 60 dias (24 de junho de 2006), foi realizada a seleção dos germoplasmas originais, baseando-se no vigor e desenvolvimento da parte aérea, sendo imposta uma pressão de seleção de 1%. Foram selecionadas as 20 melhores e as 20 piores plantas de cada bandeja. As plantas selecionadas foram identificadas como tolerantes e sensíveis (as cinco populações originais geraram 10 populações – cinco denominadas tolerantes e cinco sensíveis). Estas foram transplantadas para vasos com capacidade para cinco quilos de substrato comercial, sendo cultivadas sob condições de casa-de-vegetação. Estas casas foram completamente vedadas com tela antiafídeo e, visando maximizar o florescimento, um sistema de iluminação foi montado utilizando lâmpadas do tipo HQI-TS, na densidade de uma lâmpada para cada dois metros quadrados ( $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e 16 horas de fotoperíodo). O início do florescimento ocorreu setembro de 2007.

Os cruzamentos foram realizados de forma manual, retirando-se as alas e a quilha com auxílio de uma pinça. O pólen foi coletado em uma placa de Petri e utilizou-se um pincel de cerdas bem macias para a realização da polinização dos estigmas expostos.

Os legumes produzidos foram colhidos e levados à estufa de ventilação forçada, com temperatura entre 28 e 30°C, por um período de 96 horas. Após a secagem, os legumes foram trilhados e as sementes foram submetidas a um processo de limpeza em peneiras manuais e passadas por soprador visando à eliminação de sementes chochas. As sementes foram então mantidas em refrigerador (4°C) até a sua utilização. Após a coleta, processamento e obtenção de três gramas de sementes de cada um dos 10 genótipos (genótipos tolerantes e sensíveis), em janeiro de 2008, suspenderam-se os cruzamentos do primeiro ciclo de seleção.

As sementes obtidas através dos cruzamentos realizados nos genótipos originais constituíram os genótipos Draco F1 (DR-T1 e DR-S1, genótipo tolerante e sensível, respectivamente), Estanzuela F1 (ES-T1 e ES-S1), San Gabriel F1 (SA-T1 e SA-S1), São Gabriel F1 (SG-T1 e SG-S1) e UFRGS F1 (UF-T1 e UF-S1), os quais passaram pelo segundo ciclo de seleção entre setembro de 2008 e janeiro de 2009, através da mesma metodologia utilizada anteriormente, visando aumentar a tolerância ou sensibilidade ao Al.

As sementes obtidas do novo ciclo formaram os genótipos Draco F2 (DR-T2 e DR-S2, genótipo tolerante e sensível, respectivamente), Estanzuela F2 (ES-T2 e ES-S2), São Gabriel F2 (SG-T2 e SG-S2) e UFRGS F2 (UF-T2 e UF-S2) e San Gabriel F2 (SA-S2, genótipo sensível). O genótipo SA-T2 não foi utilizado, pois não se obteve sementes suficientes no segundo ciclo de seleção.

Eventualmente, as plantas mantidas nos vasos receberam tratamento contra fungos e insetos, com Difenconazol (25% m/v) e Deltametrina (25% m/v), respectivamente.



### *Caracterização agrônômica da tolerância ao Al*

Após a coleta das sementes dos genótipos F<sub>2</sub>, estes foram testados em relação ao progresso alcançado, sendo comparados com os germoplasmas originais em solo ácido contendo diferentes concentrações de Al.

O solo deste experimento foi coletado em janeiro de 2009 no município de André da Rocha (RS), seco ao ar, destorroado, peneirado e acondicionados em potes plásticos com capacidade para 1,5 kg.

Realizou-se em cinco repetições, de acordo com a análise físico-química do solo, a aplicação de cinco níveis de calagem, em doses equivalentes a zero; 0,10; 0,20; 0,40 e 0,80 vezes a dose indicada pelo índice SMP para obter-se pH 6,0, com base nas recomendações da COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC (2004). O valor 1,0 SMP para este solo foi de 7,5 t ha<sup>-1</sup>. Para a correção do solo foi utilizada uma mistura de carbonato de cálcio e carbonato de magnésio (3:1).

Após 80 dias de incubação (05/04/2009) foram semeadas, aproximadamente 10 sementes/vaso de cada um dos nove genótipos F<sub>2</sub> selecionados e dos cinco germoplasmas originais (quatro cultivares e uma população). Utilizou-se a alfafa crioula como espécie testemunha, pela sua reconhecida sensibilidade ao Al em relação ao cornichão (Blumenthal e McGraw, 1999).

Cada vaso recebeu um aporte de 100 mg de nitrogênio, 100 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 100 mg de K<sub>2</sub>O na ocasião da semeadura. Foi realizado um desbaste de homogeneização quando as plantas apresentaram em média de duas a três folhas trifolioladas, deixando-se apenas cinco plantas por vaso.

Após 80 dias de crescimento (25/06/2009), estas plantas foram avaliadas para produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) após secagem por 72 h em estufa de

circulação de ar forçada a 65° C, área foliar (AF) com auxílio de um planímetro ótico (Licor, LI-6200), altura (H) com auxílio de uma régua graduada em mm, número de folhas (NF) e de ramificações (R) pela contagem direta destas características.

O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado, com três repetições formadas pela média de cinco plantas cada. Os dados foram submetidos à análise estatística com o auxílio do software SAS, v. 8.0 (SAS Institute, 2001) pelos procedimentos “Factorial ANOVA”, constituindo-se em uma análise de variância fatorial (genótipos x saturações por Al) para as variáveis: MSPA, AF, H, NF e R. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade, quando houve significância para o teste F.

A partir dos resultados fornecidos por esta análise, foi realizada uma análise de regressão para a variável MSPA. Os demais resultados foram agrupados em uma matriz de distância através do software NTSYS, sendo expressos em dendogramas. Adicionalmente, a matriz de correlação entre todas as variáveis foi gerada.

### **Resultados e Discussão**

A análise para acúmulo de MSPA mostrou interação significativa ( $p=0,0004$ ) entre os genótipos contrastantes (selecionados para tolerância e sensibilidade e germoplasmas originais) e o efeito da saturação por Al do solo (Tabela 1).

Os maiores acúmulos de MSPA ocorreram no tratamento com 0% de Al para todos os 15 genótipos avaliados. A alfafa apresentou maior MSPA neste tratamento, acumulando 143,48 mg/planta. Dentre os materiais de *L. corniculatus*, o acúmulo de MSPA foi superior para os genótipos UF-T2, SA-S2, DR-T2 e para as cvs.

San Gabriel e Draco, variando entre 59 e 69 mg/planta. Os demais germoplasmas originais e genótipos selecionados de cornichão não diferiram significativamente, apresentando valores entre 45 e 55 mg/planta, exceto os genótipos UF-S2, SG-S2 e DR-S2, e a cv. Estanzuela, que apresentaram menor acúmulo de MSPA nesta concentração de Al (valores entre 25 e 37 mg/planta).

Em saturação por Al de 4,8%, destacaram-se os genótipos UF-T2, DR-T2 e a cv. Draco, com MSPA variando entre 66,80 e 71,07 mg/planta. Por outro lado, os genótipos SG-S2, DR-S2 e UF-S2 foram os menos produtivos neste tratamento, com MSPA variando entre 13,27 e 20,27 mg/planta.

De forma geral, em saturações moderadas de Al (20,1%), destacaram-se os quatro genótipos selecionados para tolerância (UF-T2, SG-T2, ES-T2 e DR-T2), assim como a população UFRGS e as cvs. Draco e San Gabriel (MSPA entre 29,93 e 49,47 mg/planta). Repetindo a tendência observada nos tratamentos anteriores, os genótipos DR-S2, SA-S2 e UF-S2 foram os que apresentaram menor MSPA (valores entre 13,57 e 18,93 mg/planta).

Nos níveis mais elevados de Al (25,1% e 41,9% de saturação) destacaram-se os genótipos tolerantes UF-T2, SG-T2, EST-T2 e DR-T2, e a cv. San Gabriel. Na saturação de 41,9%, todos os genótipos selecionados para sensibilidade ao Al apresentaram baixo acúmulo de MSPA, com valores abaixo de 10 mg/planta, exceto UF-S2 com 15,07 mg/planta. Apesar do efeito inibitório do Al ser inicialmente o ápice radicular, em médio prazo, o efeito deste metal causa redução da área e volume de solo explorado pelo sistema radicular, causando redução no desenvolvimento também da parte aérea da planta (Marshner, 1995).

A confirmação da alta sensibilidade da alfafa pode ser observada através da comparação entre os tratamentos com baixa saturação por Al (4,8%) e sem a presença de Al tóxico (0%). Observa-se nesta análise, uma redução altamente significativa da MSPA em alfafa (mais de 60%), enquanto que para todos os germoplasmas originais e para os genótipos tolerantes de cornichão, a MSPA se manteve inalterada ( $p>0,05$ ). Os genótipos de cornichão selecionados para sensibilidade ao Al também apresentaram redução ( $p<0,05$ ) na MSPA nesta comparação, exceto o genótipo ES-S2 que manteve níveis de MSPA semelhantes nestes tratamentos.

Já a comparação da MSPA entre a ausência de Al e um nível moderado de Al (20,1% de saturação), observa-se que o genótipo ES-T2 apresentou apenas 4% de redução da MSPA em relação ao nível 0%. Os genótipos SG-T2 e ES-T2 mantiveram reduções de cerca de 20%, seguidos pelo genótipo UF-T2 com 35% de redução da MSPA. Os demais materiais de cornichão apresentaram reduções entre 40 e 50% da MSPA para esta comparação. Já a alfafa apresentou redução de 71,6% da MSPA em relação a ausência de toxidez por Al, sendo a espécie mais sensível nesta comparação.

Na comparação entre os níveis 25,1% e 0,0% de saturação por Al, observou-se a maior diversidade de resposta entre os germoplasmas e seus genótipos contrastantes ao Al. Como mais tolerantes neste nível, figuraram a cv. San Gabriel, a população UFRGS e o genótipo UF-T2, que apresentaram cerca de 30-35% de redução da MSPA para esta comparação. Já a população Estanzuela e seu genótipo selecionado para a tolerância (ES-T2) apresentaram 40% de redução da MSPA. Por outro lado, as cultivares São Gabriel e Draco foram as que mais sofreram efeito do Al tóxico nesta concentração, apresentando reduções de 73% e 83%, respectivamente, no entanto, seus genótipos selecionados para tolerância, SG-T2 e DR-T2 foram superiores aos seus

parentais nesta comparação, apresentaram redução da MSPA de aproximadamente 53%. Estes resultados indicam que dois ciclos de seleção visando tolerância ao Al permitiram aumento do acúmulo de MSPA em situações de moderada saturação por Al (25,1%) para os genótipos selecionados a partir das cultivares Draco (DR-T2) e São Gabriel (SG-T2).

Ao se realizar esta mesma comparação, entre a ausência de Al e o nível mais drástico (41,9% de Al), observa-se que os genótipos UF-T2 e SG-T2 apresentaram redução de 48% e 54% da MSPA produzida na ausência de Al, respectivamente. Todos os demais genótipos de cornichão apresentaram entre 60% e 70% de redução na MSPA, exceto a cv. Draco com 81,1% da redução relativa ao tratamento zero de Al, demonstrando ser o germoplasma de cornichão mais sensível ao Al. A alfafa por sua vez apresentou redução de 97,4% em relação ao tratamento sem alumínio tóxico, confirmando ser uma espécie extremamente sensível ao Al.

A realização destas comparações permitiu a identificação do nível de Al que apresentou maior variação entre os germoplasmas (25,1% de Al). Este nível é semelhante ao observado em trabalhos anteriores (CAPÍTULO II), que mostram valores próximos a 30% de Al como mais adequado na observação da variabilidade de resposta de germoplasmas de cornichão. Adicionalmente, pode-se observar que nestes níveis destacaram-se a cv. San Gabriel, a população UFRGS, bem como seu genótipo selecionado para tolerância ao Al (UF-T2).

As análises de regressão para a comparação dos genótipos originais e seu(s) respectivo(s) genótipos contrastantes ao Al tóxico são apresentadas na Figura 1. Observando-se o comportamento da MSPA individual de cada população e de suas seleções, verifica-se que a população UFRGS (Figura 1A) decresce linearmente sua

produção à medida que aumenta a saturação por Al até cerca de 20 mg/planta no tratamento 41,9%. Uma resposta linear também é observada para o genótipo UF-S2. No entanto, a MSPA neste caso se mantém em níveis reduzidos, praticamente inalterados ao longo das diferentes saturações de Al. Já o genótipo UF-T2 apresentou maiores produções de MSPA, com um comportamento quadrático, ou seja, redução até 20% de Al e manutenção da MSPA após esta saturação.

A Figura 1B mostra o comportamento da cv. Draco e de seus genótipos contrastantes. Assim como para a população UFRGS, um decréscimo linear na MSPA foi observado. No entanto, o coeficiente angular para a cv. Draco foi superior, ou seja, à medida que aumentava a saturação por Al, a MSPA decrescia em níveis mais rápidos. Observa-se nesta cultivar, cerca de 70 mg/planta de MSPA na ausência de Al, enquanto a regressão da população UFRGS estima uma MSPA de menos de 50 mg/planta. Já na saturação 42%, a estimativa para a população UFRGS fica próxima a 20 mg/planta, enquanto que para a cv. Draco ficou abaixo de 10 mg/planta. O comportamento do genótipo DR-T2 foi quadrático, sendo semelhante ao germoplasma original até níveis próximos a 25% de Al. A partir deste nível, manteve uma tendência de estabilidade, com MSPA estimada de 20 mg/planta em condições de 42% de saturação por Al. O genótipo DR-S2 manteve teores de MSPA baixos e semelhantes entre níveis de Al, resposta semelhante ao genótipo UF-S2.

Para as cvs. São Gabriel, San Gabriel e Estanzuela, o comportamento linear observado para a evolução da MSPA em diferentes concentrações de Al foi semelhante ao descrito para a população UFRGS e para a cv. Draco (Figura 1C, 1D e 1E). Para os genótipos SG-T2 e ES-T2, observou-se também um comportamento linear, com estimativas de acúmulo de MSPA superiores aos germoplasmas originais em todas as

saturações por Al. Já nos genótipos sensíveis, SG-S2 e SA-S2, observou-se redução da MSPA em situações de baixa e moderada saturação por Al. O genótipo ES-S2 apresentou comportamento similar ao seu germoplasma de origem, sendo ligeiramente superior em níveis de baixa saturação por Al e inferior a partir de 25% de Al no solo.

Para as demais características (AF, NF, R, H), foram realizadas análises conjuntas para cada concentração de Al, com cálculo da similaridade média entre os materiais. Serão apresentados os resultados na ausência de Al (0% saturação), bem como das concentrações de Al moderada (25,1%) e alta (41,9%). Os agrupamentos segregaram as cultivares e população UFRGS dos genótipos contrastantes em um padrão semelhante ao observado para MSPA. Desta forma, estes grupos formados serão tratados como: de alta produção; de baixa produção; ou de produção intermediária.

A similaridade média na ausência do Al foi de 17,37 (Figura 2). Foram formados três grupos distintos que seguiram um comportamento semelhante ao observado para a MSPA.

O primeiro grupo foi formado pela população UFRGS, e pelas cvs. São Gabriel e Estanzuela, além dos genótipos contrastantes para esta última cultivar (ES-T2 e ES-S2). Neste grupo, encontram-se plantas com comportamento intermediário, ou seja, plantas medianamente produtivas na ausência de Al. Já o segundo grupo, foi formado pelas cvs. Draco e San Gabriel, além dos genótipos UF-T2, DR-T2, SG-T2 e SA-S2. Este grupo representa genótipos com maior número de folhas, área foliar e altura, fatores determinantes para um maior acúmulo de MSPA. O terceiro grupo, formado por três genótipos selecionados para sensibilidade ao Al (UF-S2, SG-S2 e DR-S2), foi coincidente com os genótipos menos produtivos. Por se tratar de um nível isento de Al tóxico, pode-se ponderar que a seleção destes genótipos sensíveis tenha

resultado em plantas com um baixo vigor, e não para uma menor tolerância ao Al tóxico.

No tratamento com moderada toxidez por Al (25,1% de saturação), também foi observada a formação de três grupos (Figura 3), com uma similaridade média de 11,40 para este tratamento. Baseando-se na análise conjunta da AF, NF, A e R, observou-se que os genótipos UF-T2 e a cv. San Gabriel apresentaram as maiores produções, formando o primeiro grupo. Um segundo grupo formado pela população UFRGS, pela cv. Estanzuela, e pelos genótipos DR-T2, ES-T2, SG-T2, ES-S2 e SA-S2 apresentaram comportamento intermediário, enquanto o terceiro grupo, formado pelas cvs. Draco e São Gabriel, e pelos genótipos DR-S2, SG-S2 e UF-S2 se destacaram pela sensibilidade nesta concentração de Al.

No tratamento com elevada saturação por Al (41,9%), também se observou formação de três grupos, novamente apresentando comportamento bem distinto dos demais (Figura 4). O genótipo UF-T2 foi superior a todos demais neste tratamento, isolando-se de todos os demais genótipos. O segundo grupo foi formado pela população UFRGS e pela cv. San Gabriel, além dos genótipos SG-T2, DR-T2 e ES-T2. Neste grupo encontram-se as plantas com moderada produção neste nível de Al. O último grupo, formado pelos demais genótipos, apresentou severa limitação neste tratamento.

A comparação das similaridades médias dá idéia da variabilidade observada em cada nível analisado. Na ausência do estresse (0% de Al) observou-se maior similaridade média, ou seja, os germoplasmas apresentaram alta variabilidade nesta situação. À medida que aumentou-se a saturação por Al do solo a variabilidade tendeu a diminuir, chegando a valores de 7,78 em situações de alta toxidez por Al (41,9%), enquanto que em condições de moderada/alta toxidez (25,1% de Al) a



similaridade média foi de 11,4. Estes resultados confirmam a observação realizada na análise da MSPA, onde observou-se que o nível de 25,1% de saturação por Al foi o que melhor expressou a variabilidade dos germoplasmas de cornichão estudados.

Os resultados da análise de correlação mostraram valores elevados e significativos entre algumas das características de interesse. Os principais destaques desta análise foram uma elevada correlação entre: H e AF ( $r=0,71415$ ); H e MSPA ( $r=0,70237$ ); e AF e MSPA ( $r=0,98556$ ). Estas relações mostram que a seleção de plantas de cornichão mais altas, ou com maior área foliar condizem com plantas que apresentam maior MSPA em situações com presença de Al tóxico.

A análise crítica geral dos resultados mostrou que as quatro cultivares avaliadas, a população UFRGS e os genótipos selecionados variaram amplamente seu comportamento em função do teor de Al tóxico no solo. Na ausência de Al tóxico, foram observadas maiores produções tanto em alguns germoplasmas originais, quanto em genótipos contrastantes ao Al. Este comportamento já era esperado neste nível, visto que não havia interferência do Al, oportunizando as plantas a maximizarem seu potencial genético. Em situações de moderada toxidez, destacaram-se a cv. uruguaia San Gabriel e o genótipo UF-T2, enquanto que as cvs. Draco e São Gabriel apresentaram redução já nesta concentração de Al. Em níveis elevados de Al, o genótipo UF-T2 foi superior a todos os demais, demonstrando que a seleção realizada neste genótipo favoreceu a manutenção dos componentes de rendimento da MSPA. Este comportamento pode ser função de um mecanismo de tolerância mais desenvolvido neste genótipo selecionado para tolerância ao Al. Em experimentos avaliando a exsudação de ácidos orgânicos, observou-se um incremento significativo neste genótipo

(Capítulo IV). Neste nível drástico, a população UFRGS e a cv. San Gabriel demonstraram ser materiais com algum nível de tolerância ao Al tóxico.

### Conclusões

1. A seleção visando tolerância ao Al aumentou a tolerância de todos os genótipos utilizados neste processo, indicando alta variabilidade desta característica em todos os genótipos.
2. A seleção visando sensibilidade ao Al resultou em plantas com baixo vigor.
3. A seleção para tolerância ao Al aumentou a produção de MSPA na ausência de alumínio em três dos quatro genótipos selecionados para esta finalidade. Apenas a cultivar DR-T2 não apresentou este comportamento.
4. A saturação de 25,1% por Al foi a que promoveu a maior variabilidade entre os genótipos testados, mostrando-se adequada para a seleção de plantas visando tolerância à toxidez por Al.
5. Os genótipos tolerantes UF-T2, SG-T2 e DR-T2 são os recomendados para a continuidade do trabalho de melhoramento, uma vez que estes apresentaram os comportamentos esperados para tolerância ao Al.

### Referências Bibliográficas

BLUMENTHAL, M.J.; MCGRAW, R.L. *Lotus* adaptation, use and management. In: BEUSELINCK, P.R. (Ed.). **Trefoil**: the science and technology of *Lotus*. Madison: The American Society of Agronomy, 1999. p.1-20.

DÍAZ P.; MONZA, J.; MÁRQUEZ, A. Drought and saline stress in *Lotus japonicus*. In: MÁRQUEZ, A. (Ed.). **Lotus japonicus Handbook**. Oxford: Springer, 2005. 108p.

FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Reviews Plant Physiology**, v.29, n.1, p.511 – 566, 1978.

KIRKBRIDE, J.H. *Lotus* systematics and distribution. In: BEUSELINCK, P.R. (Ed.). **Trefoil: the science and technology of *Lotus***. Madison: The American Society of Agronomy, 1999. p.1-20.

KOCHIAN, L.V.; PIÑEROS, M.; HOEKENGA, O.A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, v.274, p.175 – 195, 2005.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press Inc., 1995. 446p.

PAPADOPOULOS, A.; KELMAN, W.M. Traditional Breeding of *Lotus* Species. In: BEUSEULINK, P.R. (Ed.). **Trefoil: The Science and Technology of the *Lotus***. Madison: The American Society of Agronomy, 1999. p.187-198.

PAVLOVKIN, J.; PAL'OVE-BALANG, P.; KOLAROVIC, L.; ZELINOVA, V. Growth and functional responses of different cultivars of *Lotus corniculatus* to aluminum and low pH stress. **Journal of Plant Physiology**, doi:10.1016/j.jplph.2009.03.005

RAO, I.M.; ZEIGER, R.S.; VERA, R.; SARKARUNG, S. Selection and breeding for acid-soil tolerance in crops. **Bioscience**, v.43, n.7, p.454-465, 1993.

SAMAC, D.A.; TESFAYE, M. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils – a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.75, p.189 – 207, 2003.

SAS Institute. **System for Information**. Versão 8.2. Cary, 2001. 392p.

STEINER, J.J. Birdsfoot trefoil origins and germoplasm diversity. In: BEUSEULINK, P.R. (Ed.). **Trefoil: The Science and Technology of the *Lotus***. Madison: The American Society of Agronomy, 1999. p.81-96.

VON UEXKULL, H.R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant and Soil**, v.171, p.1 - 15, 1995.

Tabela 1. Matéria seca da parte aérea (MSPA) de cinco germplasmas originais de *L. corniculatus*, de nove populações de *L. corniculatus* contrastantes em relação a tolerância ao Al e de alfafa crioula. Porto Alegre, 2009.

Genótipos	Saturação por alumínio (%)					MÉDIA
	41,9	25,1	20,1	4,8	0	
----- MSPA mg/planta-----						
UFRGS	18,07 BC c	32,92 B b	30,67 BC b	45,80 C a	45,25 C a	<b>34,54</b>
UF-T2	32,33 A b	39,27 A b	36,93 B b	66,80 A a	61,35 B a	<b>47,34</b>
UF-S2	15,07 BC b	18,00 CD ab	13,57 D b	13,27 E b	25,20 D a	<b>17,02</b>
SG	14,87 C c	12,53 D c	27,73 C b	43,73 C a	46,23 C a	<b>29,02</b>
SG-T2	25,78 AB b	26,72 BC b	46,53 A a	44,73 C a	55,67 B a	<b>39,89</b>
SG-S2	9,20 CD b	12,32 D b	22,80 CD a	16,93 E ab	24,07 D a	<b>17,06</b>
SAN	22,73 BC c	41,67 A b	29,93 BC c	59,87 B a	59,25 B a	<b>42,69</b>
SA-S2	11,17 C c	24,30 BC b	18,93 D bc	24,53 D b	61,27 B a	<b>28,04</b>
EST	13,57 C c	22,53 C b	32,97 B a	38,07 CD a	37,80 CD a	<b>28,99</b>
ES-T2	19,00 BC c	31,67 B b	49,47 A a	58,73 B a	51,64 B a	<b>42,10</b>
ES-S2	9,29 CD c	26,05 BC b	24,20 C b	48,13 C a	50,25 B a	<b>31,58</b>
DRACO	13,47 C c	12,42 D c	37,07 B b	68,00 A a	69,25 B a	<b>40,04</b>
DR-T2	20,80 BC c	30,60 B b	37,00 B b	71,07 A a	67,93 B a	<b>45,48</b>
DR-S2	9,92 CD c	11,00 D b	14,47 D bc	20,27 DE ab	25,40 D a	<b>16,21</b>
ALFAFA	3,70 D e	16,27 CD d	41,73 A c	52,13 C b	143,48 A a	<b>51,46</b>
<b>MÉDIA</b>	<b>15,93</b>	<b>23,88</b>	<b>30,93</b>	<b>44,80</b>	<b>54,94</b>	<b>34,10</b>

Letras minúsculas indicam diferença nas linhas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Letras maiúsculas indicam diferença nas colunas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

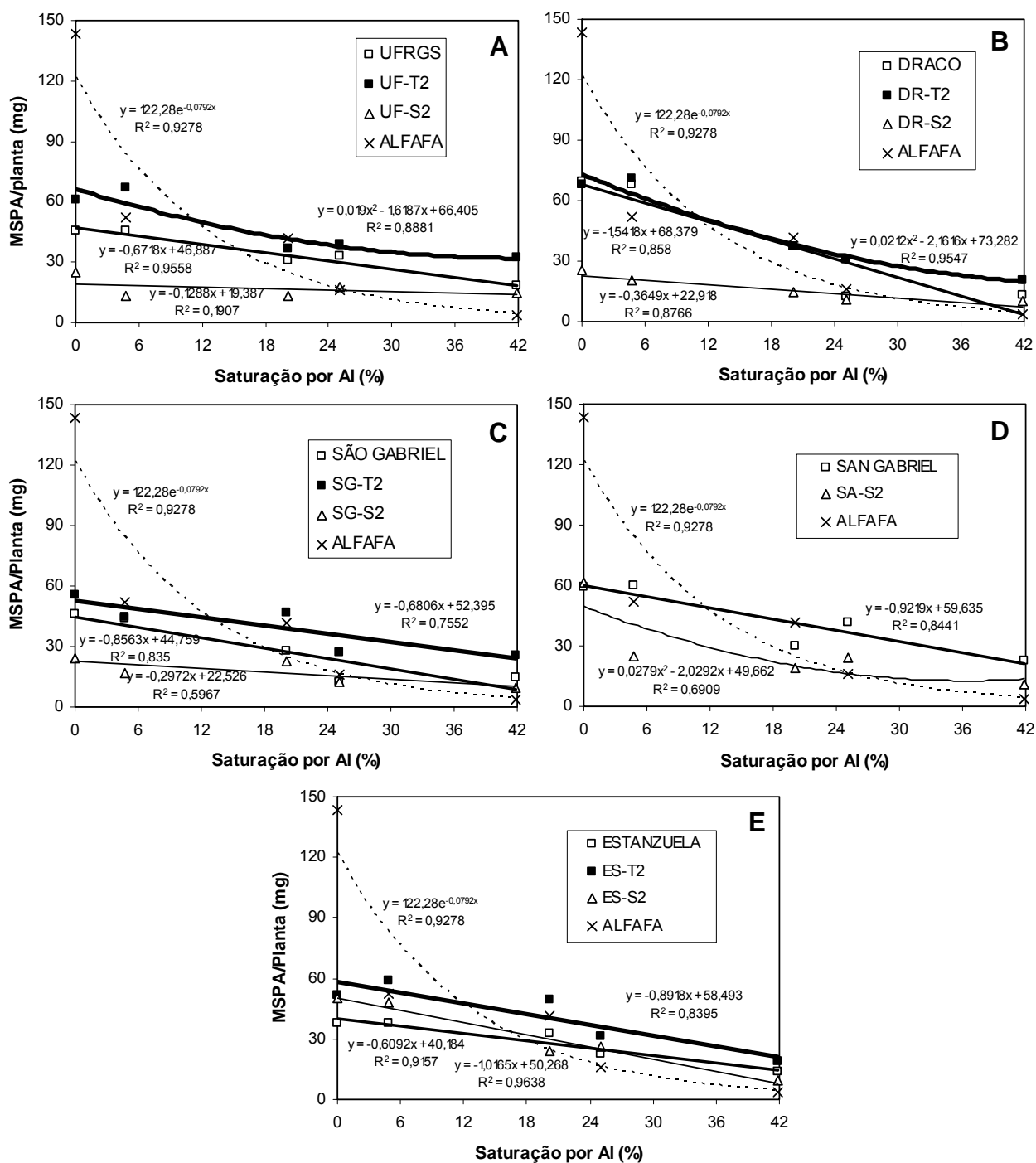


Figura 1. Análise de regressão para MSPA de germoplasmas de *L. corniculatus* e de suas respectivas populações contrastantes ao Al tóxico. (A) UFRGS, (B) Draco, (C) São Gabriel, (D) San Gabriel e (E) Estanzuela. Porto Alegre, 2009.

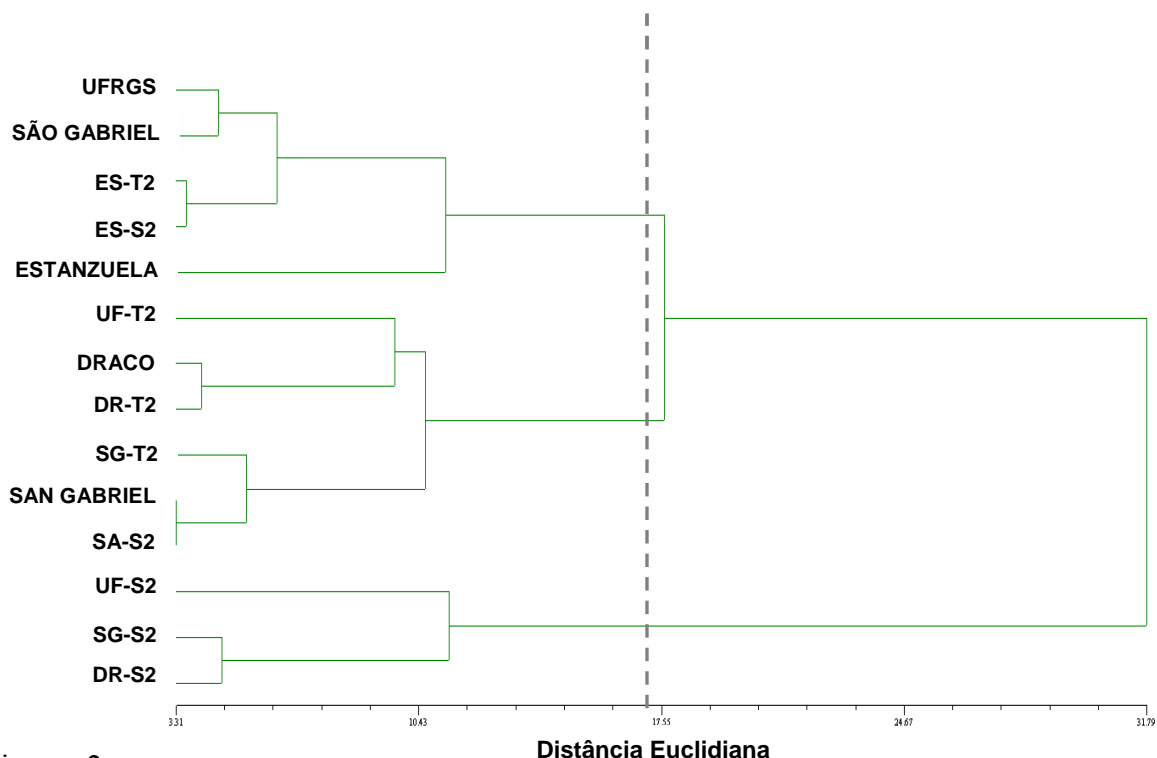


Figura 2. Distância Euclidiana (dissimilaridade) em quatorze materiais de *Lotus corniculatus* submetidos a 0% de saturação por Al no solo. Média=17,37. Porto Alegre, 2009.

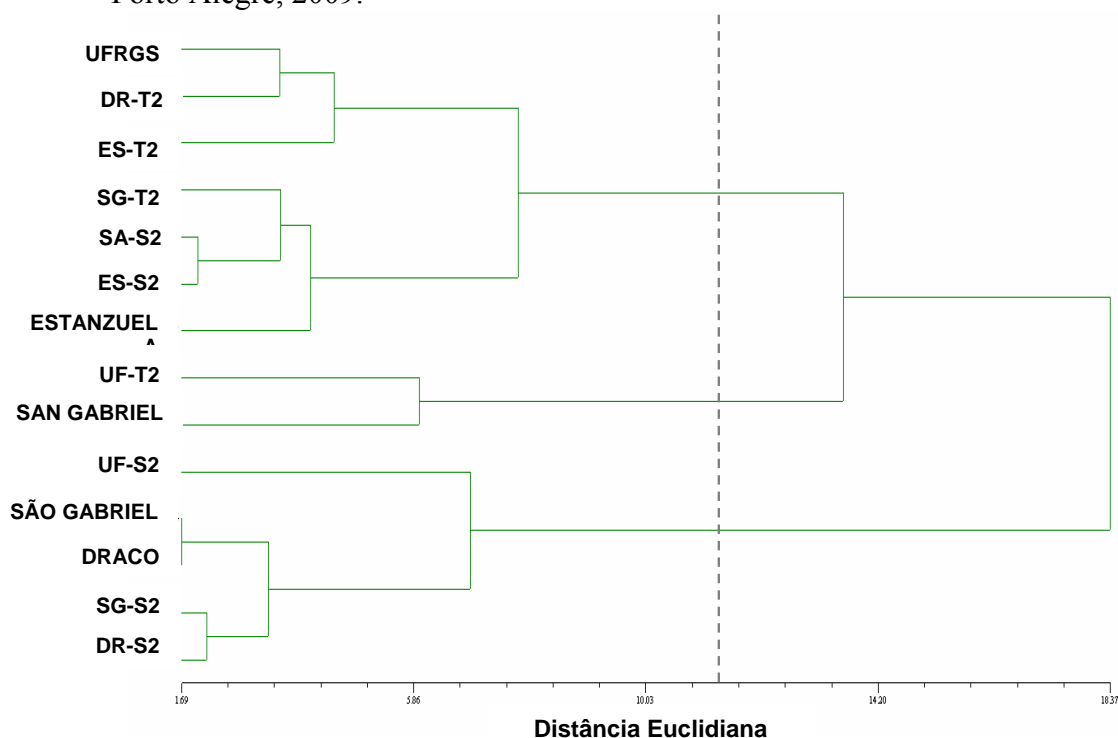


Figura 3. Distância Euclidiana (dissimilaridade) em quatorze materiais de *Lotus corniculatus* submetidos a 25,1% de saturação por Al no solo. Média=11,40. Porto Alegre, 2009.

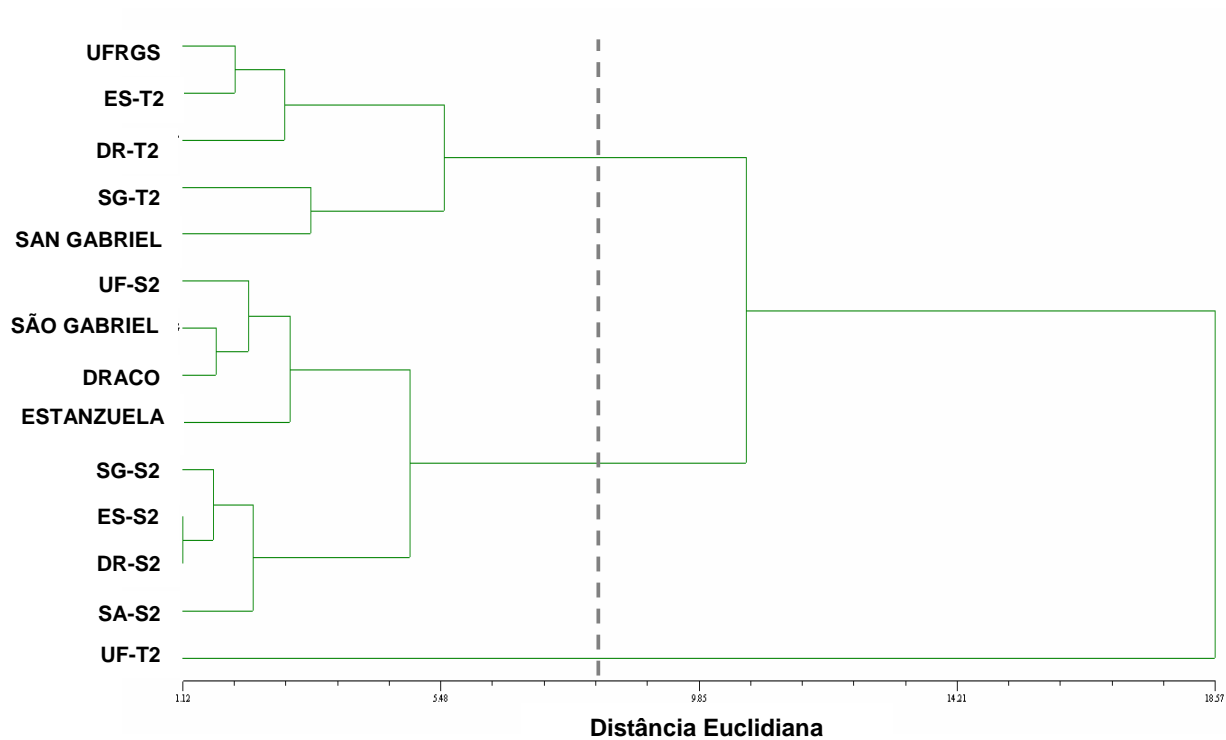


Figura 4. Distância Euclidiana (dissimilaridade) em quatorze materiais de *Lotus corniculatus* submetidos a 41,9% de saturação por Al no solo. Média=7.78. Porto Alegre, 2009.

## **CAPÍTULO VI**



**Análise da diversidade genética de *Lotus corniculatus* pelo uso de marcadores microssatélites<sup>1</sup>**

**Armando Martins dos Santos<sup>2</sup>, Miguel Dall’Agnol<sup>2</sup>, Aline Janke<sup>2</sup>, Fernanda Bortolini<sup>2</sup>, Kátia Graziela da Costa Huber<sup>2</sup>**

RESUMO - A seleção e o melhoramento de germoplasmas para situações de elevada toxidez por alumínio pode promover a melhor utilização em solos ácidos. O uso de técnicas moleculares concomitantes ao programa de melhoramento permite uma melhor elucidação do comportamento genético dos materiais selecionados, não estando restrito apenas a características morfológicas e/ou agronômicas. O objetivo desse trabalho foi analisar a diversidade genética de 14 materiais de *Lotus corniculatus* através de marcadores microssatélites. Para a análise de microssatélites, foram analisados quatro cultivares e uma população de *L. corniculatus*, e seus respectivos genótipos selecionados visando tolerância e sensibilidade ao Al. Os 17 marcadores utilizados detectaram 36 alelos ao todo, com média de 2,25 alelos por loco. O resultado da análise de similaridade mostrou a formação de três grupos, sendo um englobando germoplasmas e genótipos selecionados para sensibilidade ao Al, enquanto os outros dois grupos foram formados por genótipos selecionados visando tolerância ao Al tóxico. A análise molecular foi eficiente para detectar e quantificar a variabilidade existente entre os genótipos, acrescentando informações adicionais ao programa de melhoramento. O uso de marcadores microssatélites permitiu a distinção de genótipos oriundos de um programa de seleção visando tolerância à toxidez por Al. As seleções realizadas com esta finalidade originaram genótipos polimórficos em relação às populações originais.

Palavras-chave: alumínio tóxico, cornichão, marcador molecular, variabilidade genética

---

<sup>1</sup> Trabalho financiado pelo projeto Lotassa. Elaborado nas normas da Revista Brasileira de Zootecnia

<sup>2</sup> Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 7712 - Caixa Postal 15100 - CEP 91540-000 (martinsarm@gmail.com)

### **Analysis of *Lotus corniculatus* genetic diversity through microsatellite markers**

ABSTRACT - The selection and breeding of germoplasma for situations of elevated Al toxicity can promote a better utilization in acid soils. The use of molecular techniques concomitants with the breeding program allows a better understanding of the genetic behavior of the selected materials, not being restricted only to morphological and/or agronomical characteristics. The aim of this work was to analyze the genetic diversity of 14 *Lotus corniculatus* materials through microsatellite markers. For the microsatellite analyses, four cultivars and one population of *L. corniculatus* were analyzed, and their respective genotypes selected aiming Al tolerance and sensibility. The 17 markers used detected a total of 36 alleles, with an average of 2,25 alleles per locus. The result of the similarity analyses showed the formation of three groups, one enclosing germplasm and selected genotypes por Al sensibility, while the other two groups were formed by selected genotypes for Al tolerance. The molecular analysis was efficient in detecting and quantifying the existing variability aiming the genotypes, adding information to the breeding program. The utilization of microsatellite markers permitted the distinction of genotypes originated from a selection program aiming Al tolerance. The selections made with this goal originated polymorphic genotypes compared to the original populations.

Key words: birdsfoot trefoil, genetic variability, molecular marker, toxic aluminum

## Introdução

As áreas não recomendadas para o cultivo vegetal estão, cada vez mais, sendo destinadas para o cultivo de pastagens. Estes locais normalmente apresentam alguma limitação ao crescimento vegetal, prejudicando desta forma o desempenho das espécies utilizadas em tais áreas. Estresses ambientais estão entre os fatores mais limitantes à produção na Região do Cone Sul (Blumenthal & McGraw, 1999). Dentre estes, a acidez do solo e a concomitante toxidez por alumínio (Al) se destacam no Brasil e Chile, podendo ser observada a existência de uma ampla variabilidade com relação à capacidade de tolerar este estresse em plantas forrageiras (Edmeades et al., 1991).

*L. corniculatus* destaca-se como uma das principais espécies forrageiras utilizadas em áreas marginais, devido principalmente ao seu valor adaptativo (Sokoloff & Lock, 2005). Grande parte da facilidade de adaptação está relacionada com a elevada variabilidade genética desta espécie. É uma espécie considerada polimórfica em função do ambiente para diversas características morfológicas, para constituintes bioquímicos e também moleculares (Beuselinck & Steiner, 1992; Garcia de Los Santos, 1997; Steiner, 1999).

A seleção e o melhoramento de genótipos para situações de elevada toxidez por Al pode promover a melhor utilização de áreas que apresentem esta característica. O uso de técnicas moleculares concomitantes ao programa de melhoramento permite uma melhor elucidação do comportamento genético dos materiais analisados, não estando restrito apenas a características morfológicas e/ou agronômicas.

O conhecimento da distância genética entre diferentes genótipos é muito utilizado nestes programas, pois permite uma eficiente amostragem e utilização dos recursos genéticos (Kongkiatngam et al., 1996). Os SSR são marcadores que possuem expressão

co-dominante, somaticamente estáveis, multialélicos e altamente reprodutíveis. Esses marcadores possuem um elevado conteúdo de informação de polimorfismo, sendo ideais para serem utilizados na identificação e discriminação de genótipos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Neste sentido, desenvolveu-se um trabalho com objetivo de realizar a caracterização molecular de cinco germoplasmas de *L. corniculatus*, assim como de genótipos selecionados a partir destes materiais, para tolerância e sensibilidade ao AI.

### **Material e Métodos**

A extração do DNA genômico e a análise molecular foram realizadas no Laboratório de Análise Genética do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Faculdade de Agronomia da UFRGS, no período de 15 de janeiro a 20 de fevereiro de 2009. A caracterização molecular foi realizada nas cultivares Draco (DR), Estanzuela (ES), San Gabriel (SA) e São Gabriel (SG) e na população UFRGS (UF) de *L. corniculatus*, bem como nos genótipos selecionados para tolerância (DR-T2, ES-T2, SA-T2, SG-T2 e UF-T2) e sensibilidade ao AI (DR-S2, ES-S2, SA-S2, SG-S2 e UF-S2), com o auxílio de marcadores microssatélites (SSR).

A extração do DNA foi realizada segundo a metodologia descrita por Ferreira & Grattapaglia (1998), com modificações. Cada amostra foi constituída pela mistura (*bulk*) de 20 plântulas de cada população. Logo após a coleta do material, o mesmo foi depositado em tubos eppendorf de 1,5 mL e macerado em nitrogênio líquido. Ao material macerado, foi adicionado 650 µL de tampão de extração CTAB (2% de CTAB, 1,4 mol de NaCl, 20 mmol EDTA e 10 mmol de Tris base pH 8,0) previamente aquecido a 65°C, 14 µL de β-mercaptoetanol, 10 µL de proteinase K e 1% de PVP. O

material macerado foi suspenso no tampão de extração com o auxílio do aparelho vortex. As amostras permaneceram em banho-maria a 65°C por 30 minutos, sendo levemente agitadas a cada 10 minutos. Após a retirada do banho, as amostras foram resfriadas no agitador por 30 minutos. Logo depois, foram adicionados 650 µL de CIA (24 clorofórmio : 1 álcool isoamílico), sendo as amostras agitadas por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 13.000 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante foi retirado e transferido para um novo eppendorf, sendo adicionado ao mesmo volume de DNA o volume de isopropanol gelado. Os tubos foram invertidos gentilmente a fim de observar a precipitação do DNA. A solução foi mantida a 4°C durante uma noite. No dia seguinte, os tubos foram retirados da geladeira e centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos, sendo descartado o sobrenadante. Feito isso, foram acrescentados 500 µL da solução de lavagem (76% de etanol e 10 mmol/L de acetato de amônio) por 10 minutos, sendo posteriormente centrifugado por cinco minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos invertidos até a secagem do pellet. Os pellets de DNA foram re-suspenso em 100 µL de TE pH 7,4 (10 mmol/L de Tris base pH 8,0 e 1 mmol/L de EDTA), sendo as amostras mantidas em banho-maria a 65°C por cinco minutos. Após a retirada do banho, o DNA foi reprecipitado com 50 µL de 7,5 mol de acetato de amônio e 375 µL de etanol absoluto. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos invertidos até a completa secagem do pellet. Posteriormente o DNA foi ressuspenso em 50 µL de TE pH 7,4. Os tubos foram mantidos por 24 horas a 4°C e depois armazenados a -18°C.

O DNA das amostras foi quantificado através de eletroforese (100 V por uma hora) em gel de agarose 1% corado com 0,04 µL/mL de brometo de etídio (10 mg/mL)

para visualização das bandas e comparação com os padrões de concentração conhecida (100, 500 e 1000 ng de DNA).

As reações da polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas em um volume final de 10  $\mu\text{L}$  por reação, compostos por 3  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho de DNA (20 ng/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de tampão PCR 10X, 0,3  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mmol/L), 0,2  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (mmol/L) contendo 2,5 mmol de cada um dos quatro nucleotídeos, 0,6  $\mu\text{L}$  do primer forward (10 nmol), 0,6  $\mu\text{L}$  do primer reverse (10 nmol), 0,1  $\mu\text{L}$  de Taq DNA Polimerase Qiagen (5 U/ $\mu\text{L}$ ) e água MiliQ esterilizada para completar o volume. Utilizaram-se 14 primers de microssatélites desenvolvidos para *Lotus japonicus* (Regel) Larsen e cinco primers de microssatélites desenvolvidos para *Trifolium repens* L. (Tabela 1).

As condições de amplificação de SSR foram baseadas em Bortolini (2008), com modificações, as quais consistiam de uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos por sete ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 61°C, 1 minuto a 72°C, com uma redução na temperatura de anelamento de 1°C por ciclo, seguido de 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C e, seis ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 54°C e 45 segundos a 72°C, e por fim, extensão a 72°C por 8 minutos e estoque a 7°C.

Após a amplificação foram acrescentados 4  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (4g/mL de sacarose, 2,5 mg/mL de azul de bromofenol e TE pH 7,4) em cada amostra, sendo os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose de alta resolução (Agarose 1000) 4% corado com 0,08  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de brometo de etídio (10 mg/mL), submerso em tampão TBE 1X, a uma corrente de 100 V por duas horas. Após a eletroforese, o gel era visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta (comprimento de onda de 260 nm) e fotografado, para que os fragmentos das amostras

fossem determinados por comparação a um padrão de 100 pares de bases (pb), através do programa Kodak EDAS 290 (Electrophoresis Documentation and Analysis System).

Tabela 1. Primers de microssatélites utilizados na amplificação de cinco germoplasmas e nove genótipos contrastantes ao AI de *Lotus corniculatus*

PRIMER	SEQUÊNCIA F (5' – 3') SEQUÊNCIA R (3' – 5')	MOTIVO/ CLASSE
*TM0021	GGTCATCTTTGTGATAGTAAGTAA CTGTTGTATCAAGCCACAAG	(CT) <sub>16</sub> PERFEITO
*TM0029	CCTATATAACCTTATTCAAATTGG ACGAAAACAAAACCCTGCTG	(CT) <sub>15</sub> PERFEITO
*TM0046	ATCTAACCAAAACGTGCTTC TTCTTGCCCTTTCTCTGTGG	(CT) <sub>16</sub> PERFEITO
*TM0072	TTATGGTGCTGTATGAGTATG CTTATGAAACTTAAGCCCTG	(AT) <sub>9</sub> PERFEITO
*TM0080	AACAAAATACTAAACTATAGCAAAG CGTCCCACAACCTCTCTTTAC	(AT) <sub>14</sub> PERFEITO
*TM0133	CTTTGAAATAACTCATCAAAC TACTGACACATTCCCCTTGC	(CT) <sub>24</sub> PERFEITO
*TM0151	CTATCTAATCAAATATGGTGGC ACGCTTAAACTTGTAAGGC	(AT) <sub>25</sub> PERFEITO
*TM0208	TGGCTAGGAATGATGTTGTG TACAATCATGTTTATAAATGTGG	(AAT) <sub>15</sub> PERFEITO
*TM0212	CTTCCTTCCTCACCCTTAG TAAACGAAAATGAAGCAGAG	(CT) <sub>13</sub> PERFEITO
*TM0256	GAAATTCTTCCATTCATTG AGAGAGATAGGGTTGCTCAC	(AAAT) <sub>7</sub> PERFEITO
*TM0314	TGTGATTAGTGATTAGAAAGTGAG TTTGACCAAACCTTCCTTCAC	(CT) <sub>14</sub> PERFEITO
*TM0756	GCACCTACCAAATAAACAGC CTCCCATTGAACGCCTTGAC	(AAG) <sub>6</sub> PERFEITO
*TM0817	TTGCTCATGTGAGAAAGAAC GCTTTAAAATGACGTCCTAATC	(AAT) <sub>19</sub> PERFEITO
*TM1491	TCAAAAGTCTGATTTGGAGG TTGTAAAGTGAAAGCAATGG	(AAG) <sub>6</sub> PERFEITO
**ats070	GTCATTGGTGATGGTGTCT TTTCGTCAGTGGCGGTGCTC	(CA) <sub>n</sub> PERFEITO
**ats226	CATCTACTCACCACCACCTA CAGCAGCAGCAGCAGCGATA	(ATG) <sub>n</sub> PERFEITO
**prs582	CCGGTTTCGATTCAACAAGTT CTGCAGATCCAGTAATGATTTCC	(TTC) <sub>n</sub> PERFEITO
**prs612	TTGAACTAGTCGTTGGATGGG GAGAGGGTTTCAGGAACATACG	(ATG) <sub>n</sub> PERFEITO
**TRSSRAXX31	TCTGTTTTGTTGGCCATGC TTGCAAAGTGTTTGAAGGA	(GT) <sub>7</sub> PERFEITO

\* Primer desenvolvido para *Lotus japonicus* (Regel) Larsen.;

\*\* Primer desenvolvido para *Trifolium repens* L.

Por fim, foi construída uma matriz binária dos dados, onde foi atribuído o valor um para a presença e zero para a ausência de bandas. A partir dessa matriz, com o auxílio do programa “Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System” NTSYSpc versão 2.1 (Rohlf, 2000) e utilizando o coeficiente de Jaccard, foi gerada uma matriz de similaridade comparando todos os genótipos.

A análise de agrupamento foi realizada utilizando o módulo SAHN do NTSYS e o método da média das distâncias (UPGMA, Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average) e, assim, construído um dendrograma de similaridade genética entre os genótipos. Foi calculado o número total de alelos por loco (A), e as frequências genotípicas e alélicas.

### **Resultados e Discussão**

Na análise molecular, testaram-se 19 pares de primers de SSR, dos quais 14 foram desenvolvidos para *L. japonicus*, e cinco, para *T. repens*. Todos os primers testados foram utilizados nas análises, com exceção de dois desenvolvidos para *T. repens* (prs582 e trssrxx31), por não terem produzido bandas evidentes na amplificação dos fragmentos.

Os 17 marcadores analisados detectaram ao todo 36 alelos nas quatro cultivares (populações Draco, Estanzuela, San Gabriel e São Gabriel), na população UFRGS e nos nove genótipos contrastantes (DR-S2, ES-S2, SA-S2, SG-S2, UF-S2, DR-T2, ES-T2, SG-T2 e UF-T2) de *L. corniculatus* avaliados. O número de alelos por loco variou de um (TM0029, TM0133, TM0151, TM0212, TM0256 e TM1491) a cinco (ATS070, ATS226 e PRS612), com uma média de 2,25 alelos por loco. Os tamanhos alélicos variaram de 60 a 530 pares de bases (pb) (Tabela 2). Todos os locos foram capazes de



detectar pelo menos um alelo em cada um dos genótipos de cornichão analisados. Esse fato pode estar relacionado à heterozigose dos materiais, visto que a alogamia é o modo de reprodução preponderante dos mesmos.

Sardaro et al. (2008), analisando onze populações selvagens de cornichão, com o auxílio de cinco marcadores SSR, detectaram a presença, em média, de 13,6 alelos por loco. A grande variação observada entre o número de alelos existentes em populações selvagens e cultivares deve-se principalmente à estreita base genética utilizada em programas de melhoramento (Tanksley & McCouch, 1997).

Tabela 2. Tamanho alélico (pb) e número de alelos (A) de cada um dos dezessete marcadores de microssatélites analisados na caracterização de cinco germoplasmas e nove genótipos contrastantes ao Al de cornichão (*Lotus corniculatus*)

PRIMER	TAMANHO ALÉLICO (PB)	A
*TM0021	160-430	2
*TM0029	135	1
*TM0046	160-410	3
*TM0072	125-160	2
*TM0080	127-241	2
*TM0133	168	1
*TM0151	165	1
*TM0208	60-115	3
*TM0212	143	1
*TM0256	135	1
*TM0314	149	1
*TM0756	164	1
*TM0817	127-167	1
*TM1491	149	1
**ATS070	105-530	5
**ATS226	130-370	5
**PRS612	132-350	5
TOTAL		36
MÉDIA		2,25
MIN – MAX	60-530	1-5

\* Primer desenvolvido para *Lotus japonicus* (Regel) Larsen;

\*\* Primer desenvolvido para *Trifolium repens* L.

A partir da matriz de similaridade genética (Tabela 3), obtida pelo índice de Jaccard, foi gerado um dendrograma (Figura 1), o qual apresentou um coeficiente de correlação cofenético elevado ( $r = 0,78$ ), indicando a representatividade do mesmo em relação à matriz de similaridade genética. A similaridade média entre os genótipos foi de 0,60, variando de 0,40 a 0,81. A utilização da similaridade média como ponto de corte permitiu a formação de três grupos.

Tabela 3. Matriz de similaridade genética de cinco germoplasmas e nove genótipos contrastantes ao AI de *Lotus corniculatus* analisados pela técnica de microssatélites

	Draco	São Gab	SA-S2	Estanz	UFRGS	DR-S2	SG-S2	ES-T2	UF-T2	DR-T2	San Gab	SG-T2	ES-S2	UF-S2
<b>Draco</b>	1,00													
<b>São Gabriel</b>	0,72	1,00												
<b>SA-S2</b>	0,76	0,76	1,00											
<b>Estanzuela</b>	0,74	0,74	0,77	1,00										
<b>UFRGS</b>	0,69	0,81	0,67	0,71	1,00									
<b>DR-S2</b>	0,60	0,71	0,81	0,68	0,62	1,00								
<b>SG-S2</b>	0,60	0,55	0,69	0,58	0,47	0,70	1,00							
<b>ES-T2</b>	0,69	0,57	0,67	0,60	0,54	0,62	0,62	1,00						
<b>UF-T2</b>	0,55	0,61	0,70	0,58	0,52	0,65	0,65	0,56	1,00					
<b>DR-T2</b>	0,54	0,48	0,52	0,47	0,45	0,52	0,52	0,61	0,58	1,00				
<b>San Gabriel</b>	0,63	0,57	0,61	0,60	0,54	0,56	0,50	0,73	0,63	0,61	1,00			
<b>SG-T2</b>	0,46	0,41	0,50	0,45	0,42	0,44	0,44	0,52	0,65	0,48	0,68	1,00		
<b>ES-S2</b>	0,61	0,67	0,70	0,63	0,63	0,72	0,65	0,70	0,67	0,52	0,70	0,57	1,00	
<b>UF-S2</b>	0,47	0,62	0,66	0,59	0,53	0,73	0,61	0,52	0,56	0,54	0,52	0,40	0,75	1,00

O primeiro grupo formado envolve o maior número de materiais, sendo composto por três cultivares (DR, ES e SG), pela população UF e pelos cinco genótipos selecionados para sensibilidade ao AI. O segundo grupo foi formado pela cv. San Gabriel e pelos genótipos ES-T e DR-T. O último grupo foi formado por apenas dois genótipos selecionados para tolerância ao AI (UF-T2 e SG-T2).

Esta organização permite concluir que, em nível molecular, não houve diferenciação entre genótipos selecionados para sensibilidade e germoplasmas originais, exceto para a cv. San Gabriel, que se enquadrou num grupo à parte dos demais mencionados acima.

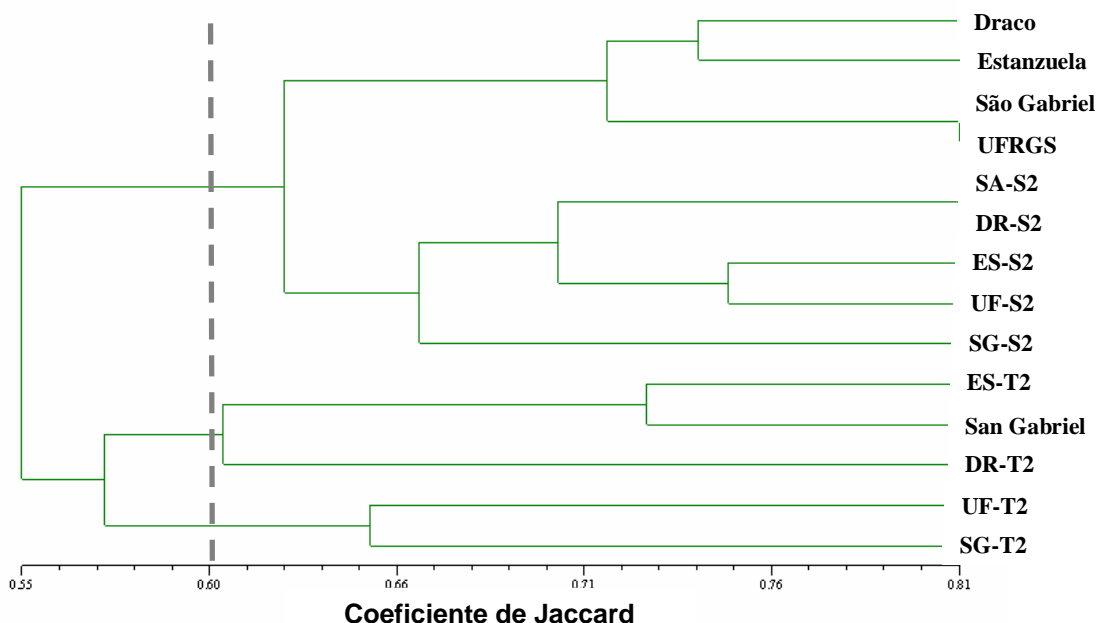


Figura 1. Dendrograma obtido com base na similaridade genética de cinco materiais e nove genótipos contrastantes ao Al de cornichão (*Lotus corniculatus* L.), utilizando-se dezessete marcadores microssatélites. A linha tracejada indica a distância média e o ponto de corte no dendrograma.

Os genótipos selecionados para tolerância se organizaram separadamente dos demais, com formação de dois grupos. Ao associar-se estes grupos com os resultados da caracterização agrônômica (Santos et al., submetido), pode-se inferir que o grupo II, formado pela cv. San Gabriel e pelos genótipos ES-T2 e DR-T2, compreende de forma geral materiais que se destacaram em situações de moderada toxidez por Al (25,1%), enquanto no grupo III, formado por SG-T2 e UF-T2, tem-se genótipos que se destacaram em toxidez mais elevada (41,9% de Al). A tolerância ao Al é uma característica herdável, apresentando diferenças entre as espécies em relação ao seu controle, podendo a mesma ser regulada por um ou mais genes dominantes ou por vários genes de efeitos aditivos atuantes em diferentes rotas bioquímicas (Kochian, 1995). A utilização de cultivares capazes de se desenvolverem e se manterem em solos

ácidos, com um mínimo necessário de calcário, é uma alternativa ambientalmente e economicamente sustentável. O menor custo com correção da acidez e o maior desenvolvimento radicular manifestado nas plantas tolerantes ao Al pode viabilizar a utilização de áreas que apresentem solos ácidos. Entretanto, os materiais selecionados no presente trabalho ainda necessitam de testes sob condições de campo, visando um conhecimento mais aprofundado do comportamento das populações tolerantes em condições reais de utilização.

As espécies de *Lotus* apresentam uma grande variabilidade genética, tanto intra quanto interespecífica, que necessita ser melhor compreendida e utilizada em programas de melhoramento, na tentativa de evitar os gargalos genéticos (Steiner, 1999). A elevada similaridade existente entre a maioria dos materiais estudados pode ser o resultado da utilização de uma base genética semelhante no desenvolvimento de novas cultivares, principalmente quando o programa de melhoramento é desenvolvido a partir de cultivares previamente lançadas por seleção massal ou recorrente (Blumenthal & McGraw, 1999).

O maior índice de similaridade observado em relação aos materiais analisados foi de 0,81 entre a população UFRGS e a cv. São Gabriel e entre os genótipos SA-S2 e DR-S2. Os menores índices foram de 0,40 entre os genótipos SG-T2 e UF-S2. A maior similaridade encontrada entre a população UFRGS e a cv. São Gabriel pode ter ocorrido em decorrência da primeira ter sido originada a partir de um programa de seleção que utilizou a cv. São Gabriel como germoplasma base (Perez, 2003).

Após terem sofrido dois ciclos de seleção para tolerância ao Al (UF-T2 e SG-T2), ocorreu um distanciamento destes em relação aos germoplasmas de origem. No entanto,

mantiveram entre si uma maior similaridade. Apesar disso, foram percebidas alterações discretas na similaridade entre os genótipos após o melhoramento.

O acompanhamento do número e da frequência alélica dos indivíduos que fazem parte de um programa de melhoramento, pode ser realizado com o auxílio de marcadores moleculares, pela comparação genética com os seus progenitores. Dessa maneira, pode-se determinar se houve alguma alteração na frequência alélica da população. Através da análise desses dados, o melhorista pode decidir o momento mais adequado para a introdução de novas fontes de variabilidade à população (Brondani et al., 2004).

Os marcadores utilizados neste trabalho foram desenhados para outras espécies e, apesar disso, mostraram-se eficientes na diferenciação dos genótipos de *L. corniculatus* analisados, corroborando os demais trabalhos que também utilizaram primers heterólogos. Sawasato et al. (2008) analisaram a diversidade genética entre 64 acessos de *Paspalum urvillei* Steudel utilizando marcadores desenvolvidos para *Lolium multiflorum* L. e *Trifolium repens* L. Sardaro et al. (2008) acessaram a variabilidade genética existente entre 11 populações selvagens de *L. corniculatus* com o auxílio de cinco pares de primers desenvolvidos para *L. japonicus*.

A maior limitação na utilização dos SSR está no elevado custo requerido para o desenvolvimento de primers específicos, quando os mesmos não estão disponíveis para a espécie a ser estudada. Entretanto, nas situações onde ocorre a conservação de sítios de microssatélites entre as espécies relacionadas, a transferência dos marcadores é possível utilizando-se primers heterólogos (Faleiro, 2007).

Diversos trabalhos relacionados ao estudo da diversidade genética em populações naturais já foram realizados com a técnica de microssatélites. Contudo, existem poucos

trabalhos referentes a diferenças genéticas entre cultivares ou populações. Em alfafa, Flajoulout et al. (2005) investigaram satisfatoriamente o nível de diferenciação entre sete cultivares originadas de um programa de melhoramento, e entre estas cultivares e o material que lhes originaram, com oito marcadores SSR desenvolvidos para *Medicago truncatula*. Sete cultivares de *Lolium perenne* apresentaram diferenças inter e intraespecíficas através de 22 marcadores SSR (Kubik et al., 2001).

O sucesso no desenvolvimento de novas cultivares depende da escolha dos progenitores e do planejamento dos cruzamentos que devem ser realizados ao longo do programa (Borém & Miranda, 2005). Os marcadores moleculares atuam como uma ferramenta eficiente na análise da variabilidade genética dos potenciais genitores, identificando diferenças entre os materiais em nível de DNA. As técnicas moleculares fornecem aos pesquisadores uma nova fonte de informações, que utilizadas em conjunto com os dados morfológicos e agrônômicos acabam contribuindo para o aumento da eficácia do programa (Faleiro, 2007).

### **Conclusões**

Os marcadores microssatélites foram eficientes para detectar e quantificar a variabilidade existente, mostrando-se capazes de separar os genótipos de cornichão tolerantes ao Al. Não foi possível verificar clara separação entre os genótipos de cornichão selecionados para sensibilidade ao Al e as populações de origem. O uso de mais primers neste tipo de análise poderia favorecer uma melhor distinção entre estes, favorecendo a formação de um agrupamento diferenciado.

### Literatura Citada

- BEUSELINCK, P.R., AND J.J. STEINER. A proposed framework for identifying, quantifying, and utilizing plant germplasm resources. **Field Crops Research**, v.29, p.261–272, 1992.
- BLUMENTHAL, M.J.; MCGRAW, R.L. *Lotus* adaptation, use and management. In: BEUSELINCK, P.R. (Ed.). **Trefoil: the science and technology of Lotus**. Madison: The American Society of Agronomy, 1999. p.1-20.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 4.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 525p.
- BORTOLINI, F. **Análise da diversidade genética e avaliação de características morfofisiológicas associadas à tolerância à seca em diferentes genótipos de trevo branco (*Trifolium repens* L.)**. 2008. 198f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- BRONDANI, C.; BRONDANI, R.P.V.; BORBA, T.C.O. et al. **Utilização de marcadores microssatélites no melhoramento populacional do arroz**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2004. 32p. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos 169)
- EDMEADES, D.C.; BLAMEY, F.P.C.; ASHER, C.J.; EDWARD, D.G. Effects of pH and aluminium on the growth of temperate pastures espécies. I. Temperate grasses and legumes supplied with inorganic nitrogen. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.42, p.559-569, 1991.
- FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102p.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília, DF: Embrapa Cenargem, 1998. 220p.
- FLAJOULOT, S.; RONFORT, J.; BAUDOUIN, P. et al. Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.111, p.1420 – 1429, 2005.
- GARCÍA-DE LOS SANTOS, A.; BROM, S. Characterization of Two Plasmid-borne *lpsβ* Loci of *Rhizobium etli* Required for Lipopolysaccharide Synthesis and for Optimal Interaction with Plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.10, n.7, p.891-902, 1997.
- KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review Plant Physiology**, v.46, p.237-260, 1995.
- KONGKIATNGAM, P.; WATERWAY, M.J.; COULMAN, B.E.; FORTIN, M.G. Genetic variation among cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA. **Euphytica**, v.89, p. 355-361, 1996.
- KUBIK, C.; SAWKINS, M.; MEYER, W.A. et al. Genetic diversity in seven perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars based on SSR markers. **Crop Science**, v.41, p.1565 – 1572, 2001.
- PEREZ, N.B. **Melhoramento genético de leguminosas de clima temperado – alfafa (*Medicago sativa* L) e cornichão (*Lotus corniculatus* L.) – para aptidão ao pastejo**. 2003. 175f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia,

- Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- ROHLF, F.J. **NT-SYS** **pc**. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. New York : Exter Software, 2000.
- SARDARO, M.L.S.; ATALLAH, M.; TAKAVOL, E. et al. Diversity for AFLP and SSR in natural populations of *Lotus corniculatus* L. from Italy. **Crop Science**, v. 48, p.1080 - 1089, 2008.
- SAWASATO, J.T.; DALL'AGNOL, M.; CONCEIÇÃO, D.P. et al. Utilização de microssatélites e RAPD na caracterização molecular de acessos de *Paspalum urvillei* Steudel. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.8, p.1366 – 1374, 2008.
- SOKOLOFF, D.D.; LOCK, J.M. Loteae. In: LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (Ed.) **Legumes of the world**. United Kingdom: BATH Press, 2005. p.455 – 466.
- STEINER, J.J. Birdsfoot trefoil origins and germoplasm diversity. In: BEUSELINK, P.R. (Ed.) **Trefoil: The Science and Technology of the Lotus**. Madison: The American Society of Agronomy, 1999. p.81-96.
- TANKSLEY, S.D.; MCCOUCH, S.R. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. **Science**, v.277, p. 1063 – 1066, 1997.



## **CAPÍTULO VII**

## CONCLUSÕES GERAIS

As caracterizações em solo ácido e em solução nutritiva confirmaram a moderada tolerância dos germoplasmas de cornichão avaliados;

As espécies diplóides também mostraram alguma tolerância ao Al, no entanto, esta foi menor que a observada em cornichão;

Observou-se uma grande variabilidade dos germoplasmas (diplóides e tetraplóides) em relação ao Al;

A caracterização em solução nutritiva em curto prazo mostrou-se uma técnica eficiente na caracterização dos germoplasmas;

A população UFRGS se destacou das demais em situações com Al tóxico, tanto em produção de MSPA quanto em exsudação radicular de ácido oxálico;

A maior exsudação radicular de ácidos orgânicos com conseqüente menor acúmulo de Al no tecido pode ter sido a razão do maior desenvolvimento radicular em cornichão, destacando-se as respostas da população UFRGS e do genótipo UF-T2.

O resultado de duas seleções visando tolerância favoreceu o maior desenvolvimento em situações com saturações por Al no solo mais elevadas.

A seleção visando sensibilidade ao Al resultou em plantas com menor vigor, com baixo acúmulo de matéria seca mesmo em situações nula toxidez por Al (exceto em SA-S2 e ES-S2).

A análise molecular foi eficiente para distinguir os genótipos selecionados para tolerância das populações originais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABREU JR, C.H.; MURAOKA, T.; LAVORANTE, A.F. Relações entre acidez e propriedades químicas de solos brasileiros. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.60, n.3, p. 543-548, 2003.
- AHN, S.J.; RENGEL, Z.; MATSUMOTO, H. Aluminum-induced plasma membrane surface potential and h<sup>+</sup>-atpase activity in near-isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminum. **New Phytologist**, New York, v.162, p.71-79, 2004.
- BAKER, R.J. Breeding methods and selection indices for improved tolerance to biotic and abiotic stresses in cool season food legumes. **Euphytica**, Wageningen, v.73, n.1, p.67-72, 1994.
- BALUSKA, F.; AMAJ, J.; WOJTASZEK, P.;VOLKMANN, D.; MENZEL, D. Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. emerging links revisited. **Plant Physiology**, Rockville, v.133, p.482-491, 2003.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v.48, n.1 p.75-92, 2002.
- BASU, U.; GOOD, A.G.; AUNG, T.; SLASKI, J.; BASU, A.; BRIGGS, K.G.; TAYLOR, G.J. A 23-kDa root exudate polypeptide co-segregates with aluminum resistance in *Triticum aestivum*. **Physiologia Plantarum**, Oxford v.106, p.53–61, 1999.
- BEUSELINCK, P.R.; STEINER, J.J. A proposed framework for identifying, quantifying, and utilizing plant germplasm resources. **Field Crops Research**, Madison, v.29, p.261–272, 1992.
- BLAMEY, F.P.C.; EDEMEADES, D.C.; WHEELER, D.M. Role of root cation-exchange capacity in differential aluminum tolerance of *Lotus* species **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.13, p.729-744, 1990.
- BLUMENTHAL, M.J.; MCGRAW, R.L. *Lotus* adaptation, use and management. In: BEUSELINCK, P.R. (Ed.). **Trefoil: the science and technology of Lotus**. Madison: American Society of Agronomy, 1999. p.1-20.
- BOLAN, N.S.; HEDLEY, M.J.; WHITE, R.E. Processes of soil acidification during nitrogen cycling with emphasis on legume based pastures. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.134, p.53-63, 1991.
- BOUTIN, S.R.; YOUNG, N.D.; OLSON, T.C.; YU, Z.H.; VALLEJOS, C.E.; SHOEMAKER, R.C. Genome conservation among three legume genera detected with DNA markers. **Genome**, Toronto, v.38, n.5, p.928–937, 1995.

BOUTON, J.H. Screening the alfalfa core collection for acid soil tolerance. **Crop Science**, Madison, v.36, p.198–2000, 1996.

BROCKWELL, J.; PILKA, A.; HOLLIDAY, R.A. Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally-occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soil of New South Wales. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Victoria, v.31, n.2, p.211 – 219, 1991.

BROSE, E. Avaliação de rizóbio em cornichão em solo ácido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.9, p.1237–1242, 1992.

BROSE, E. Seleção de rizóbio para trevo-branco em solo ácido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.2, p.281-285, 1994.

CAMARGO, C.E.O.; NETO, A.T.; FILHO, W.P.F.; FELICIO, J.C. Genetic control of aluminum tolerance in mutant lines of the of the wheat cultivar Anahuac. **Euphytica**, Wageningen, v.114, p.47–53, 2000.

CAETANO, J.H.S. **Seleção de alfafa para solos ácidos**. 1998. 119f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

CANNON, S.B.; MCCOMBIE, W.R.; SATO, S.; TABATA, S.; DENNY, R.; PALMER, L.; KATARI, M.; YOUNG, N.D.; STACEY, G. Evolution and microsynteny of the apyrase gene family in three legume genomes. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.270, n.4, p.347-361, 2003.

CHOI, H.K.; KIM, D.; UHM, T.; LIMPENS, E.; LIM, H.; MUN, J.H.; KALOD, P.; PENMETSA, R.V.; SERES, A.; KULIKOVA, O.; ROE, B.A.; BISSELING, T.; KISS, G.B.; COOK, D.R. A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. **Genetics**, Rockville, v.166, p.1463-1502, 2004a.

CHOI, H.K.; MUN, J.H.; KIM, D.J.; ZHU, H.; BAEK, J.M.; MUDGE, J.; ROE, B.; ELLIS, N.; DOYLE, J.; KISS, G.B.; YOUNG, N.D.; COOK, D.R. Estimating genome conservation between crop and model legume species. **Procedure Academic Science of USA**, New York, v.101, p.15289-15294, 2004b.

CIAMPOROVA, M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue and cellular levels. **Biologia Plantarum**, Czech Republic, v.45, p.161–171, 2002.

CYRANOSKI, D.; TOKIO, T. Japanese legume project may help to fix nitrogen problem. **Nature**, New York, v.409, p.272, 2001.

DALL'AGNOL, M.; BOUTON, J.H.; PARROT, W.A. Screening methods to develop alfalfa germoplasms tolerant of acid, aluminum toxic soils. **Crop Science**, Madison, v.36, n.1, p.64-70, 1996.

DECREUX, A.; MESSIAEN, J. Wall-associated kinase WAK1 Interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.46, n.2, p.268-278, 2005.

DEGENHARDT, J.; LARSEN, P.B.; HOWELL, S.H.; et al. Aluminum resistance in the arabidopsis mutant *alr-104* is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. **Plant Physiology**, Rockville, v.117, n.1, p.19 – 27, 1998.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.107, n.2, p.315 – 321, 1995.

DIAS, P.M.B.; JULIER, B.; SAMPOUX, J.P. et al. Genetic diversity in red clover (*Trifolium pretense* L.) revealed by morphological and microsatellite (SSR) markers. **Euphytica**, Wageningen, v.160, pg.189 – 205, 2008.

DOLANSKÁ, L.; ČURN, V. Identification of white clover (*Trifolium repens* L.) cultivars using molecular markers. **Plant, Soil and Environmental**, Dordrecht, v.50, n.3, p.95–100, 2004.

EDMEADES, D.C.; BLAMEY, F.P.C.; ASHER, C.J.; EDWARD, D.G. Effects of pH and aluminium on the growth of temperate pastures espécies. I. Temperate grasses and legumes supplied with inorganic nitrogen. **Australian Journal of Agricultural Research**, Sydney, v.42, p.559-569, 1991.

ERNANI, P.R. **Química do solo e disponibilidade de nutrientes**. Lages, SC: Ed. do Autor, 2008. 230p.

ESWARAN, H.; ALMARAZ, R.; VAN DEN BERG, E.; REICH, P. An assessment of the soil resources of Africa in relation to productivity. **Geoderma**, Amsterdam, v.77, n.1, p.1-18, 1997.

EZAKI, B.; GARDNER, R.C.; EZAKI, Y.; MATSUMOTO, H. Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. **Plant Physiology**, Rockville, v.122, p. 657-666, 2000.

FAO. **Production Year Book 47**. Roma: FAO, 1993. 247p.

FLIS, S.E.; GLENN, A.R.; DILWORTH, M.J. The interaction between aluminium and root nodule bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.25, n.4, p.403-417, 1993.

FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Reviews Plant Physiology**, Rockville, v.29, n.1, p.511 – 566, 1978.

FOY, C.D.; DUKE, J.A.; DEVINE, T.E. Tolerance of soybean germplasm to an acid tatum subsoil. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.15, p.527–547, 1992.

FOY, C.D.; DUNCAN, R.R.; WASKON, R.M.; MILLER, D.R. Tolerance of sorghum genotypes to an acid, aluminum toxic tatum subsoil. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.161, p.97–127, 1993.

FRAME, J.; CHARLTON, J.F.L.; LAIDLAW, A.S. **Temperate forage legumes**. Wallington, UK : CAB International, 1998. 327p.

GARCÍA-DE LOS SANTOS, A.; BROM, S. Characterization of Two Plasmid-borne  $Ips\beta$  Loci of *Rhizobium etli* Required for Lipopolysaccharide Synthesis and for Optimal Interaction with Plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.10, n.7, p.891-902, 1997.

GIANFRANCESCHI, L.; SEGLIAS, N.; TARCHINI, R.; KOMJANC, M.; GESSLER C. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.96, n.8, p.1069-1076, 1998.

GILBERT, J.E.; LEWIS, R.E.; WILKINSON, M.J.; CALIGARI, PDS. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.98 p.1125-1131, 1999.

GLENN, A.R.; DILWORTH, M.J. Soil acidity and the microbial population: Survival and growth of bacteria in low pH. In: PLANT SOIL INTERACTIONS AT LOW PH, 1991, Beckley. **Anais...** Beckley, 1991. p.567-579.

GRANT, D.; CREGAN, P.; SHOEMAKER, R.C. Genome organization in dicots: Genome duplication in *Arabidopsis* and synteny between soybean and *Arabidopsis*. **Procedures Academic Science of USA**, New York, v.97, p.4168-4173, 2000.

GUETA-DAHAN, Y.; YANIV, Z.; ZILINSKAS, B.A.; BEN-HAYYIM, G. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus. **Planta**, Berlin, v.203, n.4, p.460-469, 1997.

HAMEL, F.; BRETON, C.; HOUDE, M. Isolation and characterization of wheat aluminum-regulated genes: possible involvement of aluminum as a pathogenesis response elicitor. **Planta**, Berlin, v.205, p.531–538, 1998.

HANDBERG, K.; STOUGAARD, J. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploide legume species for classical and molecular genetics. **Plant Journal**, Southampton, v.2, n.4, p. 487-496, 1992.

HARTEL, P.G.; BOUTON, J.H. *Rhizobium meliloti* inoculation of alfalfa selected for tolerance to acid, aluminum-rich soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.116, p.283–285, 1989.

HAYASHI, M.; MIYAHARA, A.; SATO, S. et al. Construction of a genetic linkage map of the model legume *Lotus japonicus* using an intraspecific F2 population. **DNA Research**, Kazusa, v.8, n.6, p.301-310, 2001.

HAYNES, R.J.; MOKOLOBATE, M.S. Amelioration of Al toxicity and P deficiency in acid soils by additions of organic residues: a critical review of the phenomenon and the mechanisms involved. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Berlin, v.59, n.1, p.47-63, 2001.

HORST, W.J.; KOLLMEIER, M.; SCHMOHL, N.; SIVAGURU, M.; WANG, Y.; FELLE, H.H.; HEDRICH, R.; SCHRÖDER, W.; STAB, D.A. Significance of the apoplast for the mineral nutrition of higher plants. In: SATTELMACHER, B.; HORST, W.J. (Eds.). **The Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage**. Netherlands: Springer, 2007. p.49-66.

HUE, N.V.; CRADDOCK, G.R.; ADAMS, F. Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoil. **Soil Science Society American Journal**, Stanford, v.50, p.28–34, 1986.

IZAGUIRRE, P.; BEYHAUT, R. **Las Leguminosas em Uruguay**. Montevideo, Uruguay: Agropecuaria Hemisferio Sur S. R. L., 1998. 549p. (Parte 1 Papilionoideae).

JACOB-NETO, J. **The interactions of H<sup>+</sup> / OH<sup>-</sup> exchanges between roots and rhizosphere with plant nutrition and aluminium effects**. 1993. 217f. Thesis (PhD) - University of Dundee, Scotland, UK, 1993.

JENSEN, S.; BROADLEY, M.R.; ROBBRECHT, W.; SMETS, E. Aluminum hyperaccumulation in angiosperms: a review of its phylogenetic significance. **The Botanical Review**, New York, v.68, p.235–269, 2002.

JO, J.; YOSHIDA, S.; KAYAMA, R. Growth and nitrogen fixation of some leguminous forage grown under the acidic soil conditions. **Journal Japan Grassland Science**, Tokio, v.25, n.4, p.326 – 334, 1980.

JOHNSON, A.C.; WOOD, M. DNA, a possible site of action of aluminum in *Rhizobium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n.12, p.3629 – 3633, 1990.

JONES, D.A.; TURKINGTON, R. Biological flora of the British isles. **The Journal of Ecology**, London, v.74, n.4, p.1185 – 1212, 1986.

JONES, D.L. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.205, n.1, p.25–44, 1998.

JOHNSON, J.P.; CARVER, B.F.; BALIGAR, V.C. Productivity in Great Plains acid soils of wheat genotypes selected for aluminium tolerance. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.188, n.1, p.101–106, 1997.

KALÓ, P.; SERES, A.; TAYLOR, S.A.; JAKAB, J.; KEVEI, Z.; KERESZT, A.; ENDRE, G.; ELLIS, T.H.N.; KISS, G.B. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.272, n.3, p.235-246, 2004.

KAMPRATH, E.J.; FOY, C.D. Lime-fertilizer-plant interactions in acid soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.32, p. 91-151, 1985.

KINRAIDE, T.B. Identity of the rhizotoxic aluminium species. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.134, p.167–178, 1991.

KINRAIDE, T.B.; RYAN, P.R.; KOCHIAN, L.V. Al<sup>3+</sup>-Ca<sup>2+</sup> interactions in aluminum rhizotoxicity. **Planta**, Heidelberg, v.192, n.1, p.104-109, 1993.

KINRAIDE, T.B. Computation of surface electrical potentials of plant cell membranes. **Plant Physiology**, Rockville, v.118, p.505-512, 1998a.

KINRAIDE, T.B. Three Mechanisms for the Calcium Alleviation of Mineral Toxicities. **Plant Physiology**, Rockville, v.118, p.513-520, 1998b.

KINRAIDE, T.B.; SWEENEY, B.K. Buffered, phosphate-containing media suitable for aluminum toxicity studies. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.235, p.75–83, 2001.

KIRKBRIDE, J.H. *Lotus* systematics and distribution. In: BEUSELINCK, P.R. (Ed.). **Trefoil: the science and technology of Lotus**. Madison: The American Society of Agronomy, 1999. p.1-20.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, New York, v.46, p.237-260, 1995.

KOCHIAN, L.V.; PENCE, N.S.; LETHAM, L.D.; PINEROS, M.A.; MAGALHAES, J.V.; HOEKENGA, O.A.; GARVIN, D.F. Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.247, p.109–119, 2002.

KOCHIAN, L.V.; PIÑEROS, M.A.; HOEKENGA, O.A. The Physiology, Genetics and Molecular Biology of Plant Aluminum Resistance and Toxicity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.287, n.1-2, p.175-195, 2005.



KOLLMEIER, M.; FELLE, H.H.; HORST, W.J. Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? **Plant Physiology**, Rockville., v.122, p.945–956, 2000.

KOLLMEIER, M.; DIETRICH, P.; BAUER, C.S.; HORST, W.J.; HEDRICH, R. Aluminum Activates a Citrate-Permeable Anion Channel in the Aluminum-Sensitive Zone of the Maize Root Apex. A Comparison Between an Aluminum-Sensitive and an Aluminum-Resistant Cultivar. **Plant Physiology**, Rockville., v.126. p.397–410, 2001.

KÖLLIKER, R.; ENKERLI, J.; WIDMER, F. Characterization of novel microsatellite loci for red clover (*Trifolium pratense* L.) from enriched genomic libraries. **Molecular Ecology Notes**, Malden, MA, v.6, n.1, p.50-53, 2006.

KONGKIATNGAM, P.; WATERWAY, M.J.; COULMAN, B.E.; FORTIN, M.G. Genetic variation among cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA. **Euphytica**, Wageningen, v.89, n.3,p355-361, 1996.

KOYAMA, H.; TODA, T.; HARA, T. Brief exposure to low-pH stress causes irreversible damage to the growing root in *Arabidopsis thaliana*: pectin–Ca interaction may play an important role in proton rhizotoxicity. **Journal of Experimental Botany**, London, v.52, n.355, p.361-368, 2001.

LARSEN, P.B.; STENZLE, L.M.; TAI, C-Y.; DEGENHARDT, J.; HOWELL, S.H.; KOCHIAN, L. Molecular and physiological analysis of *Arabidopsis* mutants exhibiting altered sensitivities to aluminum. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.192, p.3–7, 1997.

LARSEN, P.B.; GEISLER, M.J.B.; JONES, C.A.; WILLIAMS, K.M.; CANCEL, J.D. ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, Oxford, v.41, n.3, p.353-363, 2005.

LEE, J.M.; GRANT, D.; VALLEJOS, C.E.; SHOEMAKER, R.C. Genome organization in dicots. II. *Arabidopsis* as a 'bridging species' to resolve genome evolution events among legumes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.103, n.5, p.765-773, 2001.

LI, X.F.; MA, J.F.; HIRADATE, S.; MATSUMOTO, H. Mucilage strongly binds aluminum but does not prevent roots from aluminum injury in *Zea mays*. **Physiologia Plantarum**, Cambridge, v.108, p.152–160, 2000.

LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, p.2453-2465, 2002.

MA, J.F.; HIRADATE, S.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. **Plant Physiology**, Rockville, v.117, p.753–759, 1998.

MA, J.F. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v.41, p.383–390, 2000.

MA, J.F.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, London, v.6, p.273–278, 2001.

MA, H.X.; BAI, G.H.; CARVER, B.F. et al. Molecular mapping of a quantitative trait locus for aluminum tolerance in wheat cultivar Atlas 66. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.112, p.51 – 57, 2005.

MAGALHÃES, J.V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C.T. et al. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v.39, n.9, p.1156 – 1161, 2007.

MARSCHNER, H. Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. In: PLANT SOIL INTERACTIONS AT LOW pH, 1991, Beckley. **Anais...** Beckley, 1991. p.683-702.

MENOSSO, O.G.; COSTA, J.A.; ANGHINONI, I. et al. Tolerância de genótipos de soja ao Al em solução. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.11, p.2157 – 2166, 2000.

MILAN, P.A., RITTER, W., DALL' AGNOL, M. Seleção de leguminosas forrageiras tolerantes a Al e eficientes na utilização de fósforo. I. leguminosas nativas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, n.1, p.119-124, 1991.

MILLA, M.A.R.; GUSTAFSON, J.P. Genetic and physical characterization of chromosome 4DL in wheat. **Genome**, Toronto, v.44, n.5, p.883–892, 2001.

MIYAZAWA, M.; CHIERICE, G.O.; PAVAN, M.A. Amelioration of aluminum toxicity to wheat roots through organic complexations. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.16, n.2, p.209-215, 1992.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, New York, v.30, p.194 – 200, 2002.

NARASIMHAMOORTHY, B.; BOUTON, J.H. Quantitative trait loci and candidate gene mapping of aluminum tolerance in diploid alfafa. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v.114, p.901-913, 2007.

NGUYEN, V.T.; BUROW, M.D.; NGUYEN, H. T.; LE, B. T.; LE, T. D.; PATERSON, A. H. Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v.102, n.6-7, p.1002-1010, 2001.

PAIM, N.R. Research on *Lotus* spp. in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Lotus Newsletter**, Columbia, v.19, p. 37 – 43, 1988.

PAVLOVKIN, J.; PAL´OVE-BALANG, P.; KOLAROVIC, L.; ZELINOVÁ, V. Growth and functional responses of different cultivars of *Lotus corniculatus* to aluminum and low pH stress. **Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v.166, n.14, p.1479-87, 2009.

PIÑEROS, M.A.; MAGALHAES, J.V.; CARVALHO ALVES, V.M.; KOCHIAN, L.V. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.129, p.1194–1206, 2002.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, M.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, Netherlands, v.2, n.3, 1996.

RAMAN, H.; MORONI, J.S.; SATO, K. et al. Identification of AFLP and microsatellite markers linked with an aluminium tolerance gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.105, p.458 – 464, 2002.

RAO, I.M.; ZEIGER, R.S.; VERA, R.; SARKARUNG, S. Selection and breeding for acid-soil tolerance in crops. **Bioscience**, Washington, v.43, n.7, p.454-465, 1993.

RENGEL, Z. The role of calcium in salt toxicity. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.15, n.6, p.625–632, 1992.

RENGEL, Z.; REID, R.J. Uptake of Al across the plasma membrane of plant cells. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.192, p.31–35, 1997.

RENGEL, Z.; ZHANG, W.H. Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. **New Phytologist**, New York, v.159, p.295-314, 2003.

RHEINHEIMER, D.S.; GATIBONI, L.C.; KAMINSKI, J. et al. **Situação da fertilidade dos solos no Estado do Rio Grande do Sul**. Santa Maria: Departamento de Solos da UFSM, 2001. 41p. (Boletim técnico, 2).

RHUE, R.D. Differential aluminum tolerance in crop plants. In: MUSSEL, H.; STAPLES, R. (Eds.) **Stress Physiology in Crop Plants**. USA, Flórida: J. Wiley & Sons, 1979. p. 62-80.

RIEDE, C.R.; ANDERSON, J.A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. **Crop Science**, Madison, v.36, p.905–909, 1996.

RISSO, D.; CARÁMBULA, M. **Lótus El Rincón. Producción, y utilización de los mejoramientos**. Boletín de Divulgación, n.65. INIA. 32 p. 1998.

ROBSON, A.D.; LONERAGAN, J.F. Nodulation and growth of *Medicago truncatula* on acid soils. I. Effect of calcium carbonate and inoculation level on the nodulation of *Medicago truncatula* on moderately acid soil. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v.21, n.3, p.427-434, 1970.

ROUT, G.R.; SAMANTARAYB, S.; DASB, P. Aluminium toxicity in plants: a review. **Agronomie**, Les Ulis Cedex, v.21, p.3-21, 2001.

RYAN, P.R.; DITOMASO, J.M.; KOCHIAN, L.V. Aluminum toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.44, p.437–446, 1994.

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P.J. Characterization of Al-stimulated malate efflux from the root apices of Al-tolerant genotypes of wheat. **Planta**, Berlin, v.196, p.103-110, 1995.

RYAN, P.R.; REID, R.J.; SMITH, F.A. Direct evaluation of the  $\text{Ca}^{2+}$  - displacement hypothesis for Al toxicity. **Plant Physiology**, Rockville, v.113, p.1351–1357, 1997.

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; JONES, D.L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annual Review of Plant Molecular Biology**, New York, v.52, p.527–560, 2001.

RYAN, P.R.; RAMAN, H.; GUPTA, S.; HORST, W.J.; DELHAIZE, E. A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. **Plant Physiology**, Rockville, v.149, n.2, p.340-351, 2009.

SAMAC, D.A.; TESFAYE, M. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils – a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.75, p.189 – 207, 2003.

SAMUELS, T.T; KUCUKAKYUZ, K.; RINCON-ZACHARY, M. Al partitioning patterns and root growth as related to al sensitivity and al tolerance in wheat. **Plant Physiology**, Rockville v.113,n.2, p.527-534, 1997.

SANDAL, N.; KRUSELL, L.; RADUTOIU, S. et al. A genetic linkage map of the model legume *Lotus japonicus* and strategies for fast mapping of new loci. **Genetics**, Rockville, v.161, p. 1673-1683, 2002.

SARDARO, M.L.S.; ATALLAH, M.; TAKAVOL, E. et al. Diversity for AFLP and SSR in natural populations of *Lotus corniculatus* L. from Italy. **Crop Science**, Madison, v. 48, p.1080 - 1089, 2008.

SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; EZAKI, B. et al. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **The Plant Journal**, Heslington, v.37, p.645 – 653, 2004.

SATO, S.; KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; ASAMIZU, E.; KATO, T.; TABATA, S. Structural analysis of a *L. japonicus* genome. I. Sequence features and mapping of fifty-six TAC clones which cover the 5.4 Mb regions of the genome. **DNA Research**, Oxford, v.8, n.6, p.311-318, 2001.

SAWASATO, J.T.; DALL'AGNOL, M.; CONCEIÇÃO, D.P. et al. Utilização de microssatélites e RAPD na caracterização molecular de acessos de *Paspalum urvillei* Steudel. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.37, n.8, p.1366 – 1374, 2008.

SCHÖTTELNDREIER, M.; NORDDAHL, M.N.; STRÖM, L.; FALKENGREN-GRERUP, U. Organic acid exudation by wild herbs in response to elevated Al concentrations. **Annals of Botany**, Oxford, v.87, p.769-775, 2001.

SIVAGURU, M.; HORST, W.J. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.116, p.155 – 163, 1998.

SIVAGURU, M.; BALUSKA, F.; VOLKMANN, D.; FELLE, H.H.; HORST, W.J. Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. **Plant Physiology**, Rockville, v.119, p.1073–1082, 2000.

SIVAGURU, M.; FUJIWARA, T.; SAMAJ, J.; BALUSKA, F.; YANG, Z.; OSAWA, H.; MAEDA, T.; MORI, T.; VOLKMAN, D.; MATSUMOTO, H. Aluminum-induced 1-3-B-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant Physiol.* **Plant Physiology**, Rockville, v.124, p.991–1005, 2001.

SIVAGURU, M.; PIKE, S.; GASSMANN, W.; BASKIN, T.I. Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto v. 44, n.7, p.667-675, 2003.

SIVAGURU, M.; YAMAMOTO, Y.; RENGEL, Z.; AHN, S.J.; MATSUMOTO, H. Early events responsible for aluminum toxicity symptoms in suspension-cultured tobacco cells. **New Phytologist**, New York, v.165, n.1, p. 99-109, 2005.

SLEDGE, M.K.; BOUTON, J.H.; DALL'AGNOLL, M.; PARROTT, W.A.; KOCHER, G. Identification and confirmation of aluminum tolerance QTL in diploid *Medicago sativa* subsp. *coerulea*. **Crop Science**, Madison, v.42, p.1121–1128, 2002.

SLEDGE, M.K.; PECHTERA, P.; PAYTONB, M.E. aluminum tolerance in *Medicago truncatula* germplasm. **Crop Science**, Madison, v.45, n.7, p.2001-2004, 2005.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, New York, v.125, n.1, p.27-58, 1993.

SOKOLOFF, D.D.; LOCK, J.M. Loteae. In: LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (Ed.) **Legumes of the world**. United Kingdom: BATH Press, 2005. p.455 – 466.

STEINER, J.J. Birdsfoot trefoil origins and germoplasm diversity. In: BEUSEULINK, P.R. (Ed.). **Trefoil: The science and technology of the Lotus**. Madison: The American Society of Agronomy, 1999. p.81-96.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2003. 457p.

TAYLOR, G.J. Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. **Current Topics Plant Biochemical Physiology**, Orlando, v.10, p.57–93, 1991.

TAYLOR, G.J.; MCDONALD-STEPHENS, J.L.; HUNTER, D.B.; BERTSCH, P.M.; ELMORE, D.; RENGEL, Z.; REID, R.J. Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of chara coralline. **Plant Physiology**, Rockville, v.123, p.987-996, 2000.

TOLRÁ, T.; KANEK, M.; MORI, S.; YOSHIMURA, E. Aluminum rapidly inhibits cellulose synthesis in roots of barley and wheat seedlings. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.159, p.17–23, 2005.

VASQUEZ, M.D.; POSCHENRIEDER, C.; CORRALES, I.; BARCELO, J. Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. **Plant Physiology**, Rockville, v.119, p.435–444, 1999.

VILLAGARCIA, M.R.; CARTER, T.E.; RUFTY, T.W.; NIEWOEHNER, A.S.; JENNETTE, M.W.; ARRELLANO, C. Genotypic rankings for aluminum

tolerance of soybean roots grown in hydroponics and sand culture. **Crop Science**, Madison, v.41, p.1499–1507, 2001.

VON UEXKULL, H.R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant and Soil**, Netherlands, v.171, p.1 - 15, 1995.

WATKIN, E.L.J.; O'HARA, G.W.; HOWIESON, J.G. et al. Identification of tolerance to soil acidity in inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.32, p.1393 – 1403, 2000.

WENZL. P.; ARANGO, A.; CHAVES, A.C. et al. A greenhouse method to screen brachiariagrass genotypes for aluminum resistance and root vigor. **Crop Science**, Madison, v. 46, p.968 - 973, 2003.

WISSEMEIER, A.H.; DIENING, A.; HERGENRÖDER, A.; HORST, W.J.; MIX-WAGNER, G. Callose formation as parameter for assessing genotypical plant tolerance of aluminium and manganese. **Plant and Soil**, Netherlands, v.146, n.1-2, 1992.

WU, P.; LIAO, C.Y.; HU, B.; YI, K.K.; JIN, W.Z.; NI, J.J.; HE, C. QTLs and epistasis for aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) at different seedling stages. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v.100, p.1295–1303, 2000.

YAN, H.H.; MUDGE, J.; KIM, D-J.; SHOEMAKER, R.C.; COOK, D.R.; YOUNG, N.D. Estimates of conserved microsynteny among the genomes of *Glycine max*, *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.106, n.7, p.1256-1265, 2003.

ZHANG, W.H.; RYAN, P.R.; TYERMAN, S.D. Malate-Permeable Channels and Cation Channels Activated by Aluminum in the Apical Cells of Wheat Roots. **Plant Physiology**, Rockville, v.125, p.1459-1472, 2001.

ZHIVOTOVSKY, L.A.; FELDMAN, M.W. Microsatellite variability and genetic distances. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.92, p.8064-8068, 1995.

ZHU, H.; CHOI, H-K.; COOK, D.R.; SHOEMAKER, R.C. Bridging model and crop legumes through comparative genomics. **Plant Physiology**, Rockville, v.137, p.1189-1196, 2005.

## **CAPÍTULO VIII**



APÊNDICE 1. Análise de variância para MSPA, AF, H, NFV e NR de cinco germoplasmas tetraplóides de *Lotus corniculatus*, e de alfafa crioula, cultivados em solo ácido (Porto Alegre, 2005).

The GLM Procedure

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Tratamento	6	0 1 2 3 4 5
Gen_tipo	6	ALF DRACO EST SAN SÃO UFRGS
Repeti__o	5	1 2 3 4 5

Number of observations 180

Dependent Variables With Equivalent Missing Value Patterns		
Pattern	Obs	Dependent Variables
1	144	AF MSPA
2	180	Al tura NRami fi ca__es Nfol has_vivas

Dependent Variable: MSPA MSPA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	35	0.10696041	0.00305601	7.20	<.0001
Error	108	0.04581225	0.00042419		
Corrected Total	143	0.15277266			

	R-Square	Coeff Var	Root MSE	MSPA Mean
	0.700128	38.26341	0.020596	0.053826

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Gen_tipo	5	0.00488553	0.00097711	2.30	0.0496
Tratamento	5	0.07955603	0.01591121	37.51	<.0001
Tratamento*Gen_tipo	25	0.02251884	0.00090075	2.12	0.0042

Dependent Variable: AF AF

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	35	3631.506039	103.757315	14.14	<.0001
Error	108	792.505750	7.338016		
Corrected Total	143	4424.011789			

	R-Square	Coeff Var	Root MSE	AF Mean
	0.820863	35.04495	2.708877	7.729722

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Gen_tipo	5	289.604889	57.920978	7.89	<.0001
Tratamento	5	2657.622697	531.524539	72.43	<.0001
Tratamento*Gen_tipo	25	684.278453	27.371138	3.73	<.0001

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	35	444.5133400	12.7003811	14.56	<.0001
Error	144	125.6510400	0.8725767		
Corrected Total	179	570.1643800			

R-Square      Coeff Var      Root MSE      Altura Mean  
0.779623      23.97429      0.934118      3.896333

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Gen_tipo	5	19.8567933	3.9713587	4.55	0.0007
Tratamento	5	329.2488200	65.8497640	75.47	<.0001
Tratamento*Gen_tipo	25	95.4077267	3.8163091	4.37	<.0001

Dependent Variable: Nfol has\_vivas      Nfol has\_vivas

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	35	2530.984000	72.313829	26.94	<.0001
Error	144	386.576000	2.684556		
Corrected Total	179	2917.560000			

R-Square      Coeff Var      Root MSE      Nfol has\_vivas Mean  
0.867500      23.29566      1.638461      7.033333

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Gen_tipo	5	642.085333	128.417067	47.84	<.0001
Tratamento	5	1534.792000	306.958400	114.34	<.0001
Tratamento*Gen_tipo	25	354.106667	14.164267	5.28	<.0001

Dependent Variable: NRami fi ca\_\_es      NRami fi cações

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	35	89.2880000	2.5510857	20.93	<.0001
Error	144	17.5520000	0.1218889		
Corrected Total	179	106.8400000			

R-Square      Coeff Var      Root MSE      NRami fi ca\_\_es Mean  
0.835717      38.79177      0.349126      0.900000

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Gen_tipo	5	32.17066667	6.43413333	52.79	<.0001
Tratamento	5	43.26400000	8.65280000	70.99	<.0001
Tratamento*Gen_tipo	25	13.85333333	0.55413333	4.55	<.0001

APÊNDICE 2. Análise de variância para MSPA, AF, H, NFV e NR de dois germoplasmas tetraplóides de *Lotus corniculatus*, e de alfafa crioula, cultivados em solução nutritiva contendo 4 níveis de Al por 20 dias (Porto Alegre, 2006).

The GLM Procedure  
Class Level Information

Class	Levels	Values
Especie	3	Al fafa Draco ufrgs
trat	4	0 50 100 200
rep	3	1 2 3

Dependent Variable: CI CI      Number of observations      52

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	15.61993333	1.41999394	9.81	<.0001
Error	24	3.47406667	0.14475278		
Corrected Total	35	19.09400000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CI Mean
0.818055	18.37990	0.380464	2.070000

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Especie	2	7.53635000	3.76817500	26.03	<.0001
trat	3	1.63808889	0.54602963	3.77	0.0238
Especie*trat	6	6.44549444	1.07424907	7.42	0.0001

Dependent Variable: CF CF

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	84.59836389	7.69076035	11.99	<.0001
Error	24	15.39300000	0.64137500		
Corrected Total	35	99.99136389			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CF Mean
0.846057	22.60362	0.800859	3.543056

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Especie	2	33.32702222	16.66351111	25.98	<.0001
trat	3	40.82860833	13.60953611	21.22	<.0001
Especie*trat	6	10.44273333	1.74045556	2.71	0.0372

Dependent Variable: R R

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	164.1924333	14.9265848	9.44	<.0001
Error	24	37.9662667	1.5819278		
Corrected Total	35	202.1587000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	R Mean
0.812196	30.66429	1.257747	4.101667

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
--------	----	-------------	-------------	---------	--------

Especie	2	38.1933500	19.0966750	12.07	0.0002
trat	3	108.6245889	36.2081963	22.89	<.0001
Especie*trat	6	17.3744944	2.8957491	1.83	0.1354

Dependent Variable: CRESC CRESC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	38.76333333	3.52393939	6.89	<.0001
Error	24	12.28286667	0.51178611		
Corrected Total	35	51.04620000			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	CRESC Mean	
	0.759377	48.66614	0.715392	1.470000	

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Especie	2	9.30481667	4.65240833	9.09	0.0012
trat	3	27.39602222	9.13200741	17.84	<.0001
Especie*trat	6	2.06249444	0.34374907	0.67	0.6735

### APÊNDICE 3. Análise de variância para MSPA, AF, H, NFV e NR de três espécies diplóide de *Lotus* e de alfafa crioula, cultivados em solo ácido (Porto Alegre, 2005).

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
Tratamento	6	0 1 2 3 4 5
Gen_tipo	5	ALF BURTII FILI GIFU MG20
Repeti__o	5	1 2 3 4 5

Number of observations 150

Dependent Variables With Equivalent Missing Value Patterns

Pattern	Obs	Dependent Variables
1	120	AF
2	150	Altura Nfol has_Vi vas
3	149	Nrami fi ca__es
4	118	MSPA

Dependent Variable: MSPA MSPA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	29	0.10432645	0.00359746	18.24	<.0001
Error	88	0.01736083	0.00019728		
Corrected Total	117	0.12168729			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	MSPA Mean	
	0.857332	27.29570	0.014046	0.051458	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F

Gen_tipo	4	0.02787218	0.00696804	35.32	<.0001
Tratamento	5	0.05284498	0.01056900	53.57	<.0001
Tratamento*Gen_tipo	20	0.02278225	0.00113911	5.77	<.0001

Dependent Variable: AF AF

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	29	5194.646854	179.125754	27.86	<.0001
Error	90	578.744225	6.430491		
Corrected Total	119	5773.391079			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	AF Mean
0.899757	31.92582	2.535841	7.942917

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Gen_tipo	4	2256.102875	564.025719	87.71	<.0001
Tratamento	5	1789.171074	357.834215	55.65	<.0001
Tratamento*Gen_tipo	20	1149.372905	57.468645	8.94	<.0001

Dependent Variable: Al tura Al tura

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	29	704.4144560	24.2901537	18.28	<.0001
Error	120	159.4350400	1.3286253		
Corrected Total	149	863.8494960			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Al tura Mean
0.815437	26.22304	1.152660	4.395600

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Gen_tipo	4	103.9903627	25.9975907	19.57	<.0001
Tratamento	5	447.1837040	89.4367408	67.32	<.0001
Tratamento*Gen_tipo	20	153.2403893	7.6620195	5.77	<.0001

Dependent Variable: Nfol has\_Vi vas Nfol has Vi vas

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	29	1621.882933	55.926998	29.94	<.0001
Error	120	224.160000	1.868000		
Corrected Total	149	1846.042933			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Nfol has_Vi vas Mean
0.878573	23.20718	1.366748	5.889333

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
--------	----	-------------	-------------	---------	--------

Gen_tipo	4	1046.806933	261.701733	140.10	<.0001
Tratamento	5	409.066933	81.813387	43.80	<.0001
Tratamento*Gen_tipo	20	166.009067	8.300453	4.44	<.0001

Dependent Variable: Nramificacoes Nramificações

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	29	61.50159732	2.12074474	32.87	<.0001
Error	119	7.67800000	0.06452101		
Corrected Total	148	69.17959732			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Nramificacoes Mean
0.889014	60.45922	0.254010	0.420134

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Gen_tipo	4	47.72329032	11.93082258	184.91	<.0001
Tratamento	5	6.63273280	1.32654656	20.56	<.0001
Tratamento*Gen_tipo	20	7.14961143	0.35748057	5.54	<.0001

#### APÊNDICE 4. Análise de variância para CI, CF e CRESC de três espécies diplóide de *Lotus* e de alfafa crioula, cultivados em solução nutritiva contendo quatro níveis de Al por 20 dias (Porto Alegre, 2007).

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
Gen_tipo	5	alfafa burtii filicaulis gifumg20
Tratamento	4	0 50 100 200
Repeticao	3	1 2 3

Number of observations 60

Dependent Variable: CI CI

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	16.47799259	0.86726277	15.03	<.0001
Error	40	2.30756852	0.05768921		
Corrected Total	59	18.78556111			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CI R Mean
0.877163	20.01548	0.240186	1.200000

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Gen_tipo	4	14.36143519	3.59035880	62.24	<.0001
Tratamento	3	0.64371704	0.21457235	3.72	0.0189
Gen_tipo*Tratamento	12	1.47284037	0.12273670	2.13	0.0370

Dependent Variable: CF CF

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	767.6232887	40.4012257	11.58	<.0001
Error	40	139.5540926	3.4888523		
Corrected Total	59	907.1773813			

R-Square      Coeff Var      Root MSE      CFR Mean  
0.846167      62.30483      1.867847      2.997917

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Gen_tipo	4	135.2741898	33.8185475	9.69	<.0001
Tratamento	3	392.3194772	130.7731591	37.48	<.0001
Gen_tipo*Tratamento	12	240.0296217	20.0024685	5.73	<.0001

Dependent Variable: CRESC      CRESC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	712.9991961	37.5262735	11.14	<.0001
Error	40	134.7874019	3.3696850		
Corrected Total	59	847.7865979			

R-Square      Coeff Var      Root MSE      CR Mean  
0.841013      101.3483      1.835670      1.811250

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Gen_tipo	4	67.4238472	16.8559618	5.00	0.0023
Tratamento	3	397.0851661	132.3617220	39.28	<.0001
Gen_tipo*Tratamento	12	248.4901828	20.7075152	6.15	<.0001

**APÊNDICE 5. Análise de variância para comprimento radicular de linhas endogâmicas recombinantes diplóides de *L. japonicus* cultivadas durante 20 dias em solução nutritiva contendo 100µM de Al. Foi realizado um teste de Dunnett considerando o genótipo GIFU como testemunha (Porto Alegre, 2008). EXPERIMENTO 1**

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
Genotipo	36	agi fu ash chu fuwa kor mg1 mg12 mg15 mg19a mg20 mg23d mg29 mg31 mg34 mg35 mg38 mg39 mg40 mg44 mg46 mg49 mg51d mg52 mg53 mg55 mg57 mg58 mg62 mg71d mg72c mg73 mg74 mg75 mg76 mg77c mg8

Number of observations      360

NOTE: Due to missing values, only 282 observations can be used in this analysis.

15:01 Wednesday, July 11, 2001      2

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: Comp\_rad      Comp rad





Genoti pos 35 8.01737800 0.22906794 3.90 <.0001  
15:01 Wednesday, July 11, 2001 3

The ANOVA Procedure

Dunnett's t Tests for comp\_rad

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error for comparisons of all treatments against a control.

Alpha 0.1  
Error Degrees of Freedom 246  
Error Mean Square 0.058784  
Critical Value of Dunnett's t 2.82417

**APÊNDICE 7. Análise de variância para comprimento radicular de linhas endogâmicas recombinantes diplóides oriundas do cruzamento de *L. japonicus* GIFU e *L. burtii* cultivadas durante 20 dias em solução nutritiva contendo 100µM de Al. Foi realizado um teste de Dunnet considerando o genótipo GIFU como testemunha (Porto Alegre, 2008). EXPERIMENTO 1**

Class Level Information

Class	Levels	Values
Genoti po	36	agi f b m ns1 ns13 ns15 ns18 ns21 ns23 ns24 ns25 ns26 ns27 ns28 ns29 ns3 ns32 ns35 ns37 ns38 ns4 ns42 ns43 ns44 ns45 ns46 ns47 ns5 ns52 ns55 ns56 ns57 ns59 ns6 ns8 ns9

Number of observations 360

NOTE: Due to missing values, only 336 observations can be used in this analysis.  
15:01 Wednesday, July 11, 2001 2

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: Comp\_radicular Comp radicular

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	35	24.81720635	0.70906304	8.62	<.0001
Error	300	24.68946032	0.08229820		
Corrected Total	335	49.50666667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Comp_radicular Mean
0.501290	39.11954	0.286877	0.733333

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Genoti po	35	24.81720635	0.70906304	8.62	<.0001

15:01 Wednesday, July 11, 2001 3

The ANOVA Procedure

Dunnett's t Tests for Comp\_radicular

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error for comparisons of all treatments against a control.

Alpha 0.1  
Error Degrees of Freedom 300  
Error Mean Square 0.082298

Critical Value of Dunnett's t 2.82332

**APÊNDICE 8. Análise de variância para comprimento radicular de linhas endogâmicas recombinantes diplóides oriundas do cruzamento de *L. japonicus* GIFU e *L. burtii* cultivadas durante 20 dias em solução nutritiva contendo 100µM de Al. Foi realizado um teste de Dunnett considerando o genótipo GIFU como testemunha (Porto Alegre, 2008). EXPERIMENTO 2**

The ANOVA Procedure  
Class Level Information

Class	Levels	Values
Genotipo	37	agi f b m ns100 ns101 ns104 ns105 ns106 ns107 ns108 ns110 ns111 ns60 ns61 ns62 ns63 ns64 ns65 ns66 ns67 ns68 ns69 ns70 ns71 ns73 ns74 ns77 ns78 ns80 ns86 ns88 ns89 ns91 ns95 ns97 ns98 ns99

Number of observations 370

NOTE: Due to missing values, only 308 observations can be used in this analysis.

15:01 Wednesday, July 11, 2001 2

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: comp\_rad comp rad

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	36	15.20362013	0.42232278	4.96	<.0001
Error	271	23.08767857	0.08519439		
Corrected Total	307	38.29129870			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	comp_rad Mean
0.397052	40.82619	0.291881	0.714935

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Genotipo	36	15.20362013	0.42232278	4.96	<.0001

15:01 Wednesday, July 11, 2001 3

The ANOVA Procedure

Dunnett's t Tests for comp\_rad

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error for comparisons of all treatments against a control.

Alpha	0.1
Error Degrees of Freedom	271
Error Mean Square	0.085194
Critical Value of Dunnett's t	2.83670

APÊNDICE 9. Análise de variância para comprimento radicular de linhas endogâmicas recombinantes diplóides oriundas do cruzamento de *L. japonicus* GIFU e *L. burtii* cultivadas durante 20 dias em solução nutritiva contendo 100µM de Al. Foi realizado um teste de Dunnet considerando o genótipo GIFU como testemunha (Porto Alegre, 2008). EXPERIMENTO 3

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
Genotipo	23	agi f b m m167 m169 m170 m171 m174 m175 m176 m184 m185 m186 m188 m189 m190 m191 m193 m194 m195 m196 m197 m198

Number of observations 588

NOTE: Due to missing values, only 187 observations can be used in this analysis.

15:01 Wednesday, July 11, 2001 2

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: compr\_rad compr rad

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	21	9.97825106	0.47515481	5.49	<.0001
Error	165	14.28559921	0.08657939		
Corrected Total	186	24.26385027			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	compr_rad Mean
0.411239	37.43101	0.294244	0.786096

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Genotipo	21	9.97825106	0.47515481	5.49	<.0001

15:01 Wednesday, July 11, 2001 3

The ANOVA Procedure

Dunnett's t Tests for compr\_rad

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error for comparisons of all treatments against a control.

Alpha	0.1
Error Degrees of Freedom	165
Error Mean Square	0.086579
Critical Value of Dunnett's t	2.69710

APÊNDICE 10. Análise de variância para comprimento radicular de linhas endogâmicas recombinantes diplóides oriundas do cruzamento de *L. japonicus* GIFU e *L. filicaulis* cultivadas durante 20 dias em solução nutritiva contendo 100µM de Al. Foi realizado um teste de Dunnet considerando o genótipo GIFU como testemunha (Porto Alegre, 2008). EXPERIMENTO 1

12:49 Thursday, July 12, 2001 1

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
-------	--------	--------



Error	15	6292722.4	419514.8		
Corrected Total	24	103950004.6			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Acumul o_AI	Mean
	0.939464	26.27158	647.6996	2465.400	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Gen_tipo	4	1492872.33	314288.91	4.75	0.0437
Tratamento	1	94160893.50	94160893.50	224.45	<.0001
Gen_tipo*Tratamento	4	1549550.83	387387.71	0.92	0.4762

APÊNDICE 12 Análise de variância para medidas repetidas no tempo para exsudação de ácido oxálico 24, 72 e 120hs após a exposição de 200µM de Al dois germoplasmas tetraplóides de *Lotus corniculatus* e de alfafa crioula, cultivados em solução nutritiva. Experimento I (Porto Alegre, 2008).

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Amostra	24	A 0 1 A 0 2 A 0 3 A 200 1 A 200 2 A 200 3 D 0 1 D 0 2 D 0 3 D 200 1 D 200 2 D 200 3 S 0 1 S 0 2 S 0 3 S 200 1 S 200 2 S 200 3 U 0 1 U 0 2 U 0 3 U 200 1 U 200 2 U 200 3
Genotipo	4	A D S U
Tratamento	2	0 200
Repeti__o	3	1 2 3
Data	3	1 2 3

Dimensions	
Covariance Parameters	2
Columns in X	60
Columns in Z	0
Subjects	6
Max Obs Per Subject	12
Observations Used	72
Observations Not Used	0
Total Observations	72

Iteration History			
Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	309.78870434	
1	1	309.74148191	0.00000000

Convergence criteria met.

17:46 Monday, September 3, 2001 2

The Mixed Procedure

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
CS Residual	Repeti__o(Tratament)	-0.2744 21.7463

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	309.7
-----------------------	-------

AIC (smaller is better) 313.7  
 AICC (smaller is better) 314.0  
 BIC (smaller is better) 313.3

Null Model Likelihood Ratio Test

DF	Chi-Square	Pr > Chi Sq
1	0.05	0.8280

## Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Data	2	44	10.36	0.0002
Genotipo	3	44	3.78	0.0170
Tratamento	1	4	73.38	0.0010
Genotipo*Data	6	44	0.44	0.8499
Tratamento*Data	2	44	1.94	0.1562
Genotipo*Tratamento	3	44	0.48	0.6983
Genotipo*Tratame*Data	6	44	0.14	0.9909

APÊNDICE 13. Análise de variância para medidas repetidas no tempo para exsudação de ácido oxálico 24, 72 e 120hs após a exposição de 200µM de Al três germoplasmas tetraplóides de *Lotus corniculatus* e de alfafa crioula, cultivados em solução nutritiva. Experimento II (Porto Alegre, 2009).

12:49 Thursday, July 12, 2001 1

## The Mixed Procedure

## Model Information

Data Set	_PROJ_.IMPORTED18
Dependent Variable	_c_Ox_Iico
Covariance Structure	Compound Symmetry
Subject Effect	Tratament(Repeti__o)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Satterthwaite

## Class Level Information

Class	Level s	Val ues
Gen_tipo	5	D SG SGA U UA
Tratamento	2	0 200
Repeti__o	3	1 2 3
DATA	3	1 2 3

## Dimensions

Covariance Parameters	2
Columns in X	72
Columns in Z	0
Subjects	5
Max Obs Per Subject	15
Observations Used	75
Observations Not Used	5
Total Observations	80

## Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
-----------	-------------	-----------------	-----------

0	1	309.58381226	
1	1	309.57429067	0.0000000

Convergence criteria met.

#### Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
CS	Tratament(Repeti __o)	0.1763
Residual		31.1516

12:49 Thursday, July 12, 2001 2

#### The Mixed Procedure

##### Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	309.6
AIC (smaller is better)	313.6
AICC (smaller is better)	313.9
BIC (smaller is better)	312.8

##### Null Model Likelihood Ratio Test

DF	Chi-Square	Pr > Chi Sq
1	0.01	0.9223

##### Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
DATA	2	42	11.04	0.0001
Gen_tipo	4	42	5.47	0.0012
Tratamento	1	3	80.77	0.0029
Gen_tipo*DATA	8	42	1.04	0.4218
Tratamento*DATA	2	42	7.51	0.0016
Gen_tipo*Tratamento	4	42	6.12	0.0006
Gen_tipo*Tratame*DATA	8	42	0.97	0.4708

APÊNDICE 14. Análise de correlação para exsudação de ácido oxálico 24hs e o acúmulo de alumínio de Al três genótipos tetraplóides de *Lotus corniculatus* e de alfafa crioula, cultivados em solução nutritiva. Experimento II (Porto Alegre, 2009).

09:58 Sunday, July 15, 2001 185

#### The CORR Procedure

2 Variables: AO\_RMV ACUM\_AL

##### Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum	Label
AO_RMV	25	9.58320	9.69298	239.58005	0.20325	38.53491	AO/RMV
ACUM_AL	25	2465	2081	61635	0.10000	6100	ACUM_AL

Pearson Correlation Coefficients, N = 25  
Prob > |r| under H0: Rho=0

	AO_RMV	ACUM_AL
AO_RMV	1.00000	0.68518
AO/RMV		0.0002
ACUM_AL	0.68518	1.00000

ACUM AL 0.0002

APÊNDICE 15. Análise de correlação para exsudação de ácido oxálico 72hs e o acúmulo de alumínio de Al três genótipos tetraplóides de *Lotus corniculatus* e de alfafa crioula, cultivados em solução nutritiva. Experimento II (Porto Alegre, 2009).

09:58 Sunday, July 15, 2001 186

The CORR Procedure

2 Variables: AO\_RMV ACUM\_AL

Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum	Label
AO_RMV	25	3.55864	3.27354	88.96594	0	10.42220	AO/RMV
ACUM_AL	25	2465	2081	61635	0.10000	6100	ACUM AL

Pearson Correlation Coefficients, N = 25  
Prob > |r| under H0: Rho=0

	AO_RMV	ACUM_AL
AO_RMV	1.00000	0.75466
AO/RMV		<.0001
ACUM_AL	0.75466	1.00000
ACUM AL		<.0001

APÊNDICE 16. Análise de correlação para exsudação de ácido oxálico 72hs e o acúmulo de alumínio de Al três genótipos tetraplóides de *Lotus corniculatus* e de alfafa crioula, cultivados em solução nutritiva. Experimento II (Porto Alegre, 2009).

09:58 Sunday, July 15, 2001 187

The CORR Procedure

2 Variables: AO\_RMV ACUM\_AL

Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum	Label
AO_RMV	25	4.85195	6.07609	121.29882	0	20.58204	AO/RMV
ACUM_AL	25	2465	2081	61635	0.10000	6100	ACUM AL

Pearson Correlation Coefficients, N = 25  
Prob > |r| under H0: Rho=0

	AO_RMV	ACUM_AL
AO_RMV	1.00000	0.59445
AO/RMV		0.0017
ACUM_AL	0.59445	1.00000
ACUM AL		0.0017



APÊNDICE 17. Análise de variância para caracterização agronômica de populações F2 contrastantes em relação a toxidez por Al, cultivados em solo ácido contendo cinco níveis de saturação por Al (Porto Alegre, 2009).

12: 49 Thursday, July 12, 2001 1

## The GLM Procedure

## Class Level Information

Class	Levels	Values
Gen_tipo	15	ALFAFA DRACO DRACO S DRACO T EST EST S EST T SAN SAN S SG SG S SG T UFRGS UFRGS S UFRGS T
Alum_nio	5	0 0.1 0.2 0.4 0.8
Repeti__o	3	1 2 3

Number of observations 1962

## Dependent Variables With Equivalent Missing Value Patterns

Pattern	Obs	Dependent Variables
1	224	Alt_m_dia Hastes_m_dia N_m_fol has_m_dio AF_PLANTA MSPA_PLANTA
2	225	MSR

NOTE: Variables in each group are consistent with respect to the presence or absence of missing values.

12: 49 Thursday, July 12, 2001 2

## The GLM Procedure

Dependent Variable: Alt\_m\_dia Alt média

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	74	2935.608137	39.670380	10.14	<.0001
Error	149	583.094656	3.913387		
Corrected Total	223	3518.702793			

R-Square Coeff Var Root MSE Alt\_m\_dia Mean  
0.834287 20.66735 1.978228 9.571756

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Gen_tipo	14	767.808421	54.843459	14.01	<.0001
Alum_nio	4	1440.336368	360.084092	92.01	<.0001
Gen_tipo*Alum_nio	56	723.159265	12.913558	3.30	<.0001

12: 49 Thursday, July 12, 2001 3

## The GLM Procedure

Dependent Variable: Hastes\_m\_dia Hastes média

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	74	143.2823962	1.9362486	5.94	<.0001
Error	149	48.6075926	0.3262255		
Corrected Total	223	191.8899888			

R-Square Coeff Var Root MSE Hastes\_m\_dia Mean  
0.746690 18.24806 0.571161 3.129985

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
--------	----	-------------	-------------	---------	--------

Gen_tipo	14	87.25904968	6.23278926	19.11	<.0001
Alum_nio	4	30.71518723	7.67879681	23.54	<.0001
Gen_tipo*Alum_nio	56	25.30054621	0.45179547	1.38	0.0627

12:49 Thursday, July 12, 2001 4

## The GLM Procedure

Dependent Variable: N\_m\_fol has\_m\_dio Núm fol has médio

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	74	4381.019906	59.202972	5.49	<.0001
Error	149	1606.385370	10.781110		
Corrected Total	223	5987.405277			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	N_m_fol has_m_dio Mean
0.731706	24.35212	3.283460	13.48326

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Gen_tipo	14	1931.002431	137.928745	12.79	<.0001
Alum_nio	4	1215.716567	303.929142	28.19	<.0001
Gen_tipo*Alum_nio	56	1231.692029	21.994501	2.04	0.0003

12:49 Thursday, July 12, 2001 5

## The GLM Procedure

Dependent Variable: AF\_PLANTA AF/PLANTA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	74	2072.138019	28.001865	4.17	<.0001
Error	149	1000.008971	6.711470		
Corrected Total	223	3072.146990			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	AF_PLANTA Mean
0.674492	56.54296	2.590650	4.581738

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Gen_tipo	14	568.4696071	40.6049719	6.05	<.0001
Alum_nio	4	698.3575304	174.5893826	26.01	<.0001
Gen_tipo*Alum_nio	56	803.4982423	14.3481829	2.14	0.0001

12:49 Thursday, July 12, 2001 6

## The GLM Procedure

Dependent Variable: MSPA\_PLANTA MSPA/PLANTA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	74	99079.4617	1338.9116	3.90	<.0001
Error	149	51104.6020	342.9839		
Corrected Total	223	150184.0637			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MSPA_PLANTA Mean
0.659720	56.01308	18.51982	33.06339

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Gen_tipo	14	24549.40956	1753.52925	5.11	<.0001
Alum_nio	4	35548.89135	8887.22284	25.91	<.0001
Gen_tipo*Alum_nio	56	38869.58388	694.09971	2.02	0.0004

APÊNDICE 18. Análise de regressão para MSPA/planta de quatro cultivares e uma população de *L. corniculatus* e seus respectivos genótipos selecionados para tolerância e sensibilidade ao AI, além de alfafa crioula, cultivados em solução nutritiva. (Porto Alegre, 2009).

2001 1

12: 45 Friday, July 20,

----- Genótipo=ALFAFA -----

The REG Procedure  
Model: MODEL1  
Dependent Variable: MSPA\_PLANTA MSPA/PLANTA

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	11702	11702	92.33	0.0024
Error	3	380.20053	126.73351		
Corrected Total	4	12082			

Root MSE	11.25760	R-Square	0.9685
Dependent Mean	51.46222	Adj R-Sq	0.9580
Coeff Var	21.87546		

## Parameter Estimates

Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	Intercept	1	0.15056	7.33906	0.02	0.9849
Alumínio	Alumínio	1	171.03889	17.79983	9.61	0.0024

12: 45 Friday, July 20, 2001 2

----- Genótipo=DRACO -----

The REG Procedure  
Model: MODEL1  
Dependent Variable: MSPA\_PLANTA MSPA/PLANTA

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	2432.82006	2432.82006	10.73	0.0466
Error	3	680.19694	226.73231		
Corrected Total	4	3113.01700			

Root MSE	15.05763	R-Square	0.7815
Dependent Mean	40.04000	Adj R-Sq	0.7087
Coeff Var	37.60648		

## Parameter Estimates

Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	Intercept	1	16.64375	9.81638	1.70	0.0485
Alumínio	Alumínio	1	77.98750	23.80821	3.28	0.0466

12: 45 Friday, July 20, 2001 4

----- Genótipo=DRACO S -----

The REG Procedure  
Model: MODEL1  
Dependent Variable: MSPA\_PLANTA MSPA/PLANTA

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	164.22756	164.22756	76.10	0.0032
Error	3	6.47444	2.15815		
Corrected Total	4	170.70200			

Root MSE	1.46906	R-Square	0.9621
Dependent Mean	16.21000	Adj R-Sq	0.9494
Coeff Var	9.06270		

## Parameter Estimates

Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	Intercept	1	10.13125	0.95771	10.58	0.0018
Alum_nio	Alumí nio	1	20.26250	2.32279	8.72	0.0032

12:45 Friday, July 20, 2001 6

----- Genótipo=DRACON T -----

The REG Procedure  
 Model: MODEL1  
 Dependent Variable: MSPA\_PLANTA MSPA/PLANTA

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	1564.16711	1564.16711	9.44	0.0545
Error	3	497.08978	165.69659		
Corrected Total	4	2061.25689			

Root MSE	12.87232	R-Square	0.7588
Dependent Mean	45.48000	Adj R-Sq	0.6785
Coeff Var	28.30325		

## Parameter Estimates

Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	Intercept	1	26.72000	8.39173	3.18	0.0499
Alum_nio	Alumí nio	1	62.53333	20.35292	3.07	0.0545

12:45 Friday, July 20, 2001 8

----- Genótipo=EST -----

The REG Procedure  
 Model: MODEL1  
 Dependent Variable: MSPA\_PLANTA MSPA/PLANTA

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	293.40278	293.40278	5.43	0.1020
Error	3	161.98078	53.99359		
Corrected Total	4	455.38356			

Root MSE	7.34803	R-Square	0.6443
Dependent Mean	28.98667	Adj R-Sq	0.5257
Coeff Var	25.34970		

## Parameter Estimates

Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	Intercept	1	20.86167	4.79033	4.35	0.0224
Alum_nio	Alumí nio	1	27.08333	11.61826	2.33	0.1020

12:45 Friday, July 20, 2001 10

## ----- Genótipo=EST S -----

The REG Procedure  
 Model : MODEL1  
 Dependent Variable: MSPA\_PLANTA MSPA/PLANTA

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	952.73867	952.73867	11.35	0.0434
Error	3	251.78191	83.92730		
Corrected Total	4	1204.52058			

Root MSE	9.16118	R-Square	0.7910
Dependent Mean	31.58444	Adj R-Sq	0.7213
Coeff Var	29.00537		

## Parameter Estimates

Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	Intercept	1	16.94319	5.97236	2.84	0.0658
Alum_nio	Alumínio	1	48.80417	14.48510	3.37	0.0434

12: 45 Friday, July 20, 2001 12

## ----- Genótipo=EST T -----

The REG Procedure  
 Model : MODEL1  
 Dependent Variable: MSPA\_PLANTA MSPA/PLANTA

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	541.20544	541.20544	3.10	0.1764
Error	3	523.20615	174.40205		
Corrected Total	4	1064.41159			

Root MSE	13.20614	R-Square	0.5085
Dependent Mean	42.10133	Adj R-Sq	0.3446
Coeff Var	31.36750		

## Parameter Estimates

Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	Intercept	1	31.06633	8.60935	3.61	0.0365
Alum_nio	Alumínio	1	36.78333	20.88074	1.76	0.1764

12: 45 Friday, July 20, 2001 14

## ----- Genótipo=SAN -----

The REG Procedure  
 Model : MODEL1  
 Dependent Variable: MSPA\_PLANTA MSPA/PLANTA

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	762.56556	762.56556	6.20	0.0884
Error	3	368.75422	122.91807		
Corrected Total	4	1131.31978			

Root MSE	11.08684	R-Square	0.6740
Dependent Mean	42.69000	Adj R-Sq	0.5654
Coeff Var	25.97058		

## Parameter Estimates

Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	Intercept	1	29.59125	7.22774	4.09	0.0263
Al um_ni o	Al umí ni o	1	43.66250	17.52984	2.49	0.0884

12: 45 Friday, July 20, 2001 16

## ----- Genótipo=SAN S -----

The REG Procedure  
Model: MODEL1  
Dependent Variable: MSPA\_PLANTA MSPA/PLANTA

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	1320.58403	1320.58403	22.34	0.0179
Error	3	177.35242	59.11747		
Corrected Total	4	1497.93644			

Root MSE	7.68879	R-Square	0.8816
Dependent Mean	28.04000	Adj R-Sq	0.8421
Coeff Var	27.42079		

## Parameter Estimates

Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	Intercept	1	10.80250	5.01248	2.16	0.1201
Al um_ni o	Al umí ni o	1	57.45833	12.15704	4.73	0.0179

12: 45 Friday, July 20, 2001 18

## ----- Genótipo=SG -----

The REG Procedure  
Model: MODEL1  
Dependent Variable: MSPA\_PLANTA MSPA/PLANTA

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	787.65625	787.65625	11.88	0.0410
Error	3	198.90731	66.30244		
Corrected Total	4	986.56356			

Root MSE	8.14263	R-Square	0.7984
Dependent Mean	29.02000	Adj R-Sq	0.7312
Coeff Var	28.05869		

## Parameter Estimates

Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	Intercept	1	15.70750	5.30835	2.96	0.0596
Al um_ni o	Al umí ni o	1	44.37500	12.87463	3.45	0.0410

12: 45 Friday, July 20, 2001 20

## ----- Genótipo=SG S -----

The REG Procedure  
Model: MODEL1  
Dependent Variable: MSPA\_PLANTA MSPA/PLANTA

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	96.82469	96.82469	4.18	0.1335
Error	3	69.51108	23.17036		
Corrected Total	4	166.33578			

Root MSE 4.81356 R-Square 0.5821  
 Dependent Mean 17.06333 Adj R-Sq 0.4428  
 Coeff Var 28.20996

## Parameter Estimates

Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	Intercept	1	12.39583	3.13806	3.95	0.0289
Alum_nio	Alumí nio	1	15.55833	7.61091	2.04	0.1335

12: 45 Friday, July 20, 2001 22

## ----- Genóti po=SG T -----

The REG Procedure  
 Model: MODEL1  
 Dependent Variable: MSPA\_PLANTA MSPA/PLANTA

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	531.07656	531.07656	10.09	0.0502
Error	3	157.95310	52.65103		
Corrected Total	4	689.02967			

Root MSE 7.25610 R-Square 0.7708  
 Dependent Mean 39.88667 Adj R-Sq 0.6943  
 Coeff Var 18.19180

## Parameter Estimates

Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	Intercept	1	28.95542	4.73040	6.12	0.0088
Alum_nio	Alumí nio	1	36.43750	11.47291	3.18	0.0502

12: 45 Friday, July 20, 2001 24

## ----- Genóti po=UFRGS -----

The REG Procedure  
 Model: MODEL1  
 Dependent Variable: MSPA\_PLANTA MSPA/PLANTA

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	368.14556	368.14556	6.80	0.0798
Error	3	162.35477	54.11826		
Corrected Total	4	530.50033			

Root MSE 7.35651 R-Square 0.6940  
 Dependent Mean 34.54000 Adj R-Sq 0.5919  
 Coeff Var 21.29853

## Parameter Estimates

Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	Intercept	1	25.43875	4.79586	5.30	0.0131
Alum_nio	Alumí nio	1	30.33750	11.63167	2.61	0.0798

12: 45 Friday, July 20, 2001 26

## ----- Genóti po=UFRGS S -----

The REG Procedure  
 Model: MODEL1  
 Dependent Variable: MSPA\_PLANTA MSPA/PLANTA

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	49.50625	49.50625	3.08	0.1774
Error	3	48.19508	16.06503		
Corrected Total	4	97.70133			

Root MSE	4.00812	R-Square	0.5067
Dependent Mean	17.02000	Adj R-Sq	0.3423
Coeff Var	23.54947		

## Parameter Estimates

Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	Intercept	1	13.68250	2.61297	5.24	0.0136
Alumínio	Alumínio	1	11.12500	6.33739	1.76	0.1774

12:45 Friday, July 20, 2001 28

----- Genótipo=UFRGS T -----

The REG Procedure  
 Model: MODEL1  
 Dependent Variable: MSPA\_PLANTA MSPA/PLANTA

## Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	648.69601	648.69601	5.99	0.0919
Error	3	324.95310	108.31770		
Corrected Total	4	973.64911			

Root MSE	10.40758	R-Square	0.6663
Dependent Mean	47.33667	Adj R-Sq	0.5550
Coeff Var	21.98629		

## Parameter Estimates

Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	Intercept	1	35.25542	6.78491	5.20	0.0138
Alumínio	Alumínio	1	40.27083	16.45583	2.45	0.0919

## APÊNDICE 19. Análise de correlação para caracterização agronômica de germoplasmas em relação a toxidez por Al, cultivados em solo ácido contendo cinco níveis de saturação por Al (Porto Alegre, 2009).

09:58 Sunday, July 15, 2001 152

## The CORR Procedure

6 Variables: Al\_t\_m\_dia Hastes\_m\_dia N\_m\_folhas\_m\_dio AF\_PLANTA  
 MSPA\_PLANTA MSR

## Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum
Al_t_m_dia	224	9.57176	3.97227	2144	1.02500	27.48000
Hastes_m_dia	224	3.12999	0.92763	701.11667	1.00000	6.20000
N_m_folhas_m_dio	224	13.48326	5.18164	3020	2.20000	33.80000
AF_PLANTA	224	4.58174	3.71166	1026	0.32500	35.55000
MSPA_PLANTA	224	33.06339	25.95132	7406	2.40000	259.33333
MSR	225	152.91111	76.13863	34405	22.00000	535.00000



## Simple Statistics

Variable	Label
Alt_m_dia	Alt média
Hastes_m_dia	Hastes média
N_m_folhas_m_dio	Núm folhas médio
AF_PLANTA	AF/PLANTA
MSPA_PLANTA	MSPA/PLANTA
MSR	MSR

## Pearson Correlation Coefficients

Prob &gt; |r| under H0: Rho=0

Number of Observations

	Alt_m_dia	Hastes_m_dia	N_m_folhas_m_dio	AF_PLANTA	MSPA_PLANTA	MSR
Alt_m_dia Alt média	1.00000 224	0.40564 <.0001 224	0.40719 <.0001 224	<b>0.71415</b> <.0001 224	<b>0.70237</b> <.0001 224	0.40441 <.0001 224
Hastes_m_dia Hastes média	0.40564 <.0001 224	1.00000 224	0.62810 <.0001 224	0.30861 <.0001 224	0.32920 <.0001 224	0.39395 <.0001 224
N_m_folhas_m_dio Núm folhas médio	0.40719 <.0001 224	0.62810 <.0001 224	1.00000 224	0.45925 <.0001 224	0.47001 <.0001 224	0.48544 <.0001 224
AF_PLANTA AF/PLANTA	0.71415 <.0001 224	0.30861 <.0001 224	0.45925 <.0001 224	1.00000 224	0.98656 <.0001 224	0.46630 <.0001 224

09:58 Sunday, July 15, 2001 153

## The CORR Procedure

## Pearson Correlation Coefficients

Prob &gt; |r| under H0: Rho=0

Number of Observations

	Alt_m_dia	Hastes_m_dia	N_m_folhas_m_dio	AF_PLANTA	MSPA_PLANTA	MSR
MSPA_PLANTA MSPA/PLANTA	0.70237 <.0001 224	0.32920 <.0001 224	0.47001 <.0001 224	0.98656 <.0001 224	1.00000 224	0.47083 <.0001 224
MSR MSR	0.40441 <.0001 224	0.39395 <.0001 224	0.48544 <.0001 224	0.46630 <.0001 224	0.47083 <.0001 224	1.00000 225