

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**SELEÇÃO DE TREVO-BRANCO PARA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO E  
RESISTÊNCIA À DOENÇA FOLIAR CAUSADA POR *Curvularia trifolii* (Kauff.)  
Boedijn**

RAQUEL SCHNEIDER

Tecnóloga em Agropecuária/UERGS

Mestre em Zootecnia/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de Doutor em  
Zootecnia

Área de Concentração Plantas Forrageiras

Porto Alegre (RS), Brasil

Fevereiro, 2014.

## CIP - Catalogação na Publicação

Schneider, Raquel

SELEÇÃO DE TREVO-BRANCO PARA TOLERÂNCIA AO  
ALUMÍNIO E RESISTÊNCIA À DOENÇA FOLIAR CAUSADA POR  
*Curvularia trifolii* (Kauff.) Boedijn / Raquel  
Schneider. -- 2014.

105 f.

Orientador: Miguel Dall'Agnol.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. trevo-branco. 2. alumínio. 3. doença. 4. seleção.  
5. populações. I. Dall'Agnol, Miguel, orient. II.  
Título.

RAQUEL SCHNEIDER  
Tecnóloga em Agropecuária  
Mestre em Zootecnia

## TESE

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### **DOCTOR EM ZOOTECCNIA**

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 27.02.2014  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 25.07.2014  
Por

MIGUEL DALL'AGNOL  
PPG Zootecnia/UFRGS  
Orientador

JÚLIO OTÁVIO JARDIM BARCELLOS  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia

DANIEL PORTELLA MONTARDO  
EMBRAPA - CPPSUL

CARLOS ALBERTO BISSANI  
UFRGS

JOSÉ ANTONIO MARTINELLI  
UFRGS

PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade de Agronomia

*“Choose a job you love, and you will never have to work a day in your life.”*

— Confucius

*Ao meu esposo Danny, e a nossa amada Theresa que ainda não nasceu, mas tem sido minha companheira e maior motivação nos últimos sete meses e meio.*

*Vocês são os maiores presentes da minha vida.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Hoje, mais uma vez, eu agradeço a Deus que na sua infinita sabedoria e amor me fez passar por diferentes lugares, mas nunca permitiu que eu sáísse do caminho que Ele designou pra mim. Entre muitos momentos felizes e períodos de dificuldades eu nunca deixei de perceber sua luz. Para conseguir chegar até aqui colocou pessoas especiais em cada momento da minha vida.

Meus pais e irmãos, cunhados e sobrinhos por todo amor e por sempre me orientarem e incentivarem nas decisões que tive que tomar. A infância na Trigolândia que me ajudou a gostar de forrageiras e compreender as dificuldades diárias do campo. Por todos meus familiares que mesmo de longe me apoiaram. A família é a maior benção que recebi!

Meu primeiro orientador, Daniel Montardo, que acreditou em mim e me incentivou a continuar. Ao meu grande amigo, Seu Eli Lemos, pelas horas de conversa durante o trabalho nas casas-de-vegetação. As sempre colegas e amigas, Karla e Mari, desde os tempos de estágio na Embrapa até agora como doutorandas.

Ao meu orientador, Miguel Dall'Agnol, pela ajuda e incentivo, por passar seus conhecimentos e experiências, e pela compreensão, principalmente, nos últimos meses. A todos os funcionários e professores da UFRGS que pude conviver. Aos professores Carlos Bissani, Valmir Duarte, José Martinelli pela ajuda e conhecimentos transmitidos.

A todos os amigos e colegas que passaram e estão no Grupo de Melhoramento de Forrageiras. Pelo trabalho em grupo a qualquer hora, amizade, companheirismo e incentivo. Nosso grupo continua melhorando! Aos amigos na hora do trabalho e lazer que pude fazer durante estes seis anos em POA, em especial ao Ismail e Daniela, Grupo de oração do Bonfim e Opus Dei.

Aos meus orientadores no exterior, Charles Brummer e Maria Monteros, e seus grupos de pesquisa, pelo acolhimento, ajuda e confiança depositada em mim. A todos os funcionários e amigos da *Noble Foundation*, pela grande hospitalidade.

À família Canny, minha nova família, que me acolheu de braços abertos. Para a minha maior descoberta e resultado do doutorado, meu marido Danny, por todo amor, companheirismo, ajuda e incentivo.

À mãe Maria, exemplo de amor, que tem me ajudado a ser mãe e compreender os momentos mais difíceis.

A Capes pela concessão da bolsa e a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

## SELEÇÃO DE TREVO-BRANCO PARA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO E RESISTÊNCIA À DOENÇA FOLIAR CAUSADA POR *Curvularia trifolii* (Kauff.) Boedijn<sup>1</sup>

Autor: Raquel Schneider

Orientador: Miguel Dall’Agnol

**RESUMO** – Estudos de melhoramento genético de trevo-branco vêm sendo desenvolvidos no DPFA (Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia) da UFRGS desde a década de 70. O principal objetivo destes trabalhos têm sido aumentar a produtividade e persistência do trevo-branco focando, principalmente, na tolerância à deficiência hídrica. Sabe-se, no entanto, que outros fatores como solos ácidos e toxidez por alumínio (Al), assim como doenças, também podem afetar a persistência desta espécie. Neste trabalho, teve-se como um dos objetivos dar início ao processo de seleção de populações de trevo-branco visando tolerância ao Al. Outro objetivo foi identificar algumas doenças foliares do trevo-branco causadas por fungos que ocorrem no Rio Grande do sul e verificar a variabilidade genética existente para resistência a doenças na cultivar Jacuí e na linhagem experimental UFRGS-2004-2. Duas doenças fúngicas foliares foram identificadas em plantas de trevo-branco, sendo causadas por *Cymadothea trifolii* e *Curvularia trifolii*. *Curvularia trifolii* foi utilizado na inoculação das populações para verificar a variabilidade genética. A cv. Jacuí mostrou maior resistência à doença e populações selecionadas puderam ser distinguidas, indicando variabilidade genética. Na seleção para tolerância ao Al, foram utilizadas 24 populações, que apresentaram alto desempenho agrônomo em trabalhos realizados anteriormente no DPFA, em solução nutritiva contendo 50 µM de Al. Três populações, sendo duas originárias do Brasil apresentaram maior tolerância ao Al, podendo ser utilizadas nos próximos trabalhos. Outra metodologia de seleção utilizando meio gel foi adaptada ao trevo-branco e avaliada em duas populações. O método em meio gel utilizou 1200 µM de Al, e possibilitou separar populações selecionadas para tolerância e sensibilidade após um ciclo de seleção. Por meio do trabalho desenvolvido, foi possível verificar variabilidade genética do trevo-branco para tolerância ao Al e resistência à doença causada por *Curvularia trifolii*, nas populações estudadas. Mais trabalhos em ambas as áreas devem ser desenvolvidos com o objetivo de obter cultivares mais adaptadas as condições do Rio Grande do Sul.

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Zootecnia – Plantas forrageiras, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (104p.) Fevereiro de 2014.

**SELECTION OF WHITE CLOVER POPULATIONS FOR ALUMINUM  
TOLERANCE AND RESISTANCE TO FUNGAL DISEASE CAUSED BY  
*Curvularia trifolii* (Kauff.) Boedijn**

Author: Raquel Schneider

Adviser: Miguel Dall'Agnol

**ABSTRACT** – Studies of genetic improvement in white clover have been developed at “Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia” (DPFA), UFRGS since the 70s. The main objective of that work has been to increase the productivity and persistence of white clover focusing mainly on drought tolerance. It is known, however, that other factors such as acidic soils and toxic aluminum (Al) as well as diseases, may also affect the persistence of this species. This work had as an objective to initiate the process of selection of white clover populations aiming at tolerance to Al toxicity. Another objective was to identify some foliar diseases of white clover caused by fungi that occur in Rio Grande do Sul and verify genetic variability for disease resistance. Two foliar diseases caused by *Curvularia trifolii* and *Cymadothea trifolii* were identified in white clover. *Curvularia trifolii* was used to inoculate the populations in order to verify that there was genetic variability. Jacuí showed greater resistance to disease and selected populations could be differentiated, indicating genetic variability. In selection for Al tolerance 24 populations that showed high agronomic performance in work done previously at DPFA were selected in nutrient solution containing 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ . The three populations that had the highest Al tolerance should be used in future studies. Another selection methodology using gel media was adapted to white clover and used to evaluate two populations. The method in gel media used 1200  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ , and allowed differentiation of the populations selected for tolerance and sensitivity after one cycle of selection. Through this work we observed genetic variability of white clover for Al tolerance and resistance to disease caused by *Curvularia trifolii* in the populations studied. More work in both areas should be done with the goal of developing cultivars more adapted to the conditions of Rio Grande do Sul.

---

<sup>1</sup> Doctoral thesis in Forage Science. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (105p.) February, 2014.

## SUMÁRIO

<b>1. CAPÍTULO I</b>	
1.1 Introdução .....	14
1.2 <i>Trifolium repens</i> L.: Taxonomia, origem e importância.....	16
1.3 Características da espécie.....	16
1.4 Solos ácidos.....	18
1.5 Toxidez por alumínio e mecanismos de tolerância.....	20
1.5.1 Controle genético e métodos de seleção.....	22
1.6 Doenças no trevo-branco.....	24
1.6.1 <i>Cymadothea trifolii</i> .....	27
1.6.2 <i>Curvularia trifolii</i> (Kauff.) Boedijn.....	28
1.7 Hipóteses e Objetivos .....	30
<b>2. CAPÍTULO II – Identification of foliar disease caused by <i>Curvularia trifolii</i> (Kauff.) Boedijn and selection for resistance in two white clover cultivars</b>	
Abstract.....	34
Introduction .....	35
Material and methods.....	36
Results and discussion.....	39
Resumo.....	43
References.....	44
<b>3. CAPÍTULO III – Selection in white clover populations for aluminum tolerance using gel media</b>	
Abstract.....	50
Introduction .....	51
Material and methods.....	53
Results and discussion.....	56
Resumo.....	61
References.....	62
<b>4. CAPÍTULO IV – Seleção de populações de trevo-branco tolerantes ao alumínio em solução nutritiva</b>	
Abstract.....	70
Introdução .....	71
Material e Métodos.....	73
Resultados e Discussão.....	76
Resumo.....	81
Referências.....	82
<b>5. CAPÍTULO V</b>	
5.1. Considerações Gerais.....	90
5.2. Referências Bibliográficas .....	91
5.3 Apêndices .....	100
5.4. Vita.....	104

## RELAÇÃO DE TABELAS

### 2. CAPÍTULO II

1. Average severity of lesions on leaves with and without injury of Jacuí and UFRGS-2004-2 inoculated with *Curvularia trifolii* (Kauff.) Boedijn..... 46

### 3. CAPÍTULO III

1. Root length (cm) in media containing different concentrations of Al and pH during the first 15 days of growth and evaluation day..... 65

### 4. CAPÍTULO IV

1. Identificação e origem dos acessos de trevo-branco..... 85
2. Populações de trevo-branco avaliadas para tolerância ao Al..... 85
3. Número de plantas por população, pressão de seleção, média do comprimento da raiz principal (CRP) das populações originais e selecionadas e porcentagem de acréscimo no CRP..... 86
4. Médias de comprimento total de raiz (CTR) de populações de trevo-branco avaliadas em meio de cultura contendo 1200  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ ..... 87
5. Coeficiente de correlação entre as variáveis de comprimento de raiz principal (CRP), comprimento total de raiz (CTR) e comprimento de ramificações (CR)..... 87

## RELAÇÃO DE FIGURAS

### 2. CAPÍTULO II

1. Average percentage of leaf-area damaged by disease in white clover populations selected for resistance (Jacuí-R and UFRGS-R), susceptibility (Jacuí-S and UFRGS-S) and the original populations (Jacuí and UFRGS-2004-2) inoculated with *Curvularia trifolii* (Kauff.) Boedijn, after one cycle of selection. .... 46
2. Average percentage of leaf-area damaged by disease in white clover populations Jacuí-S, Jacuí-R, UFRGS-S, UFRGS-R, Jacuí and UFRGS-2004-2 inoculated with *Curvularia trifolii* ( Kauff. ) Boedijn , after one cycle of selection..... 47
3. White clover leaf inoculated with *Curvularia trifolii* (Kauff.) Boedijn.,  
a) The first symptoms of the disease, b) symptoms after one day..... 47

### 3. CAPÍTULO III

1. White clover seedlings after 16 days of growth in media at pH7 without Al, pH 4 with 400µM of AlCl<sub>3</sub>, pH 4 with 800µM of AlCl<sub>3</sub>, and pH 4 with 1200µM of AlCl<sub>3</sub>..... 66
2. Average root length of white clover populations selected for tolerance (6-Bagé-T and 33-Ireland-T) and sensitivity (6-Bagé-S and 33-Ireland-S) to Al and the original populations (6-Bagé and 33-Ireland) after 10 days of growth in 1200 Al media..... 67
3. Average root length of white clover populations 6-Bage-S, 6-Bage-T, 6-Bage, 33-Ireland-S, 33-Ireland-T and 33-Ireland after 10 days of growth in 1200 Al media..... 67

**LISTA DE ABREVIATURAS**

Al	Alumínio
Al <sup>3+</sup>	Alumínio trivalente
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CR	Comprimento de ramificações
CRP	Comprimento da raiz principal
CTR	Comprimento total de raiz
cv	Cultivar
DPFA	Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia
Fe	Ferro
H <sup>+</sup>	Íon hidrogênio
K	Potássio
M	Mol L <sup>-1</sup>
Mg <sup>2+</sup>	Íon magnésio
Mn	Manganês
P	Fósforo
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
RS	Rio Grande do Sul
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>

## **CAPÍTULO I**



## 1.1 Introdução

No Rio Grande do Sul, a atividade pecuária é desenvolvida basicamente de forma extensiva, tendo como principal fonte alimentar a forragem dos campos naturais. O campo nativo é composto, predominantemente, de espécies estivais e em função disso ocorre à paralisação do crescimento da pastagem durante períodos de baixas temperaturas, como no outono e inverno (Nabinger et al., 2000). Para preencher esta lacuna e manter a produção durante esse período, uma alternativa é a introdução de espécies hibernais ao sistema, sendo as leguminosas uma boa opção para o melhoramento de pastagens naturais. Na pecuária leiteira, a utilização de pastagens cultivadas de leguminosas é indispensável para manter uma produção rentável, pois a atividade está baseada principalmente no pastejo direto e necessita de pastagens com boa produção e ótima qualidade de forragem.

O trevo-branco (*Trifolium repens* L.) é uma leguminosa forrageira de inverno utilizada no Rio Grande do Sul no melhoramento de campo nativo e em pastagens, principalmente consorciadas com gramíneas. Devido à sua alta produção de forragem de qualidade, persistência ao manejo intensivo e habilidade para competir com gramíneas perenes, esta espécie contribui na formação das melhores pastagens do mundo, principalmente em regiões temperadas (Carámbula, 1977).

Apesar de ser utilizada, é conhecida por apresentar baixa persistência durante os meses de verão (Paim & Riboldi 1994), pode perenizar-se por meio do desenvolvimento contínuo de seus estolões, no entanto, em condições ambientais não favoráveis, a permanência na pastagem é devida à produção de sementes e capacidade de ressemeadura natural (Reis et al., 1980). Plantas que sobrevivem ao verão por meio de seus estolões apresentam maior precocidade e produtividade no ano seguinte do que plantas originadas da ressemeadura natural (Schneider et al., 2011). Devido a isso, procurar promover a persistência do trevo-branco nas pastagens por meio da reprodução vegetativa tem sido objetivo de trabalhos em todo o mundo (Jones, 1980; Brink et al., 1999; Seker et al., 2003; Bortolini et al., 2006).

O trevo-branco não se desenvolve bem em solos pobres, ácidos ou arenosos. Adapta-se melhor em locais úmidos, com solos férteis, não tolerando períodos de déficits hídricos (Carámbula, 1977, Gibson & Cope, 1985). No Rio Grande do Sul, acredita-se que o problema da persistência do trevo-branco seja devido, principalmente, às altas temperaturas do verão e à baixa disponibilidade de água neste período (Paim, 1988). No entanto, pode ser agravado pelos níveis tóxicos de alumínio e manganês e, pela deficiência de

fósforo, que caracterizam os solos de grande parte do Rio Grande do Sul (Nabinger, 1980). A presença de doenças também é um problema que afeta a persistência, podendo reduzir drasticamente o estande da pastagem (Latch & Skipp, 1987).

Em um levantamento realizado por Drescher et al. (1995), utilizando cerca de 60.000 amostras de solos do Rio Grande do Sul, cerca de 70% das amostras apresentaram pH em água menor que 5,5. O trevo-branco, apesar de ser relativamente tolerante a estresses de acidez dos solos, é raramente encontrado em solos fortemente ácidos. Nestes solos com baixo pH, o estabelecimento inicial das plântulas de trevo-branco é especialmente crítico, afetando também o estabelecimento, a dispersão e a persistência vegetativa, sendo um fator limitante para a espécie (Voigt et al., 1997).

Trabalhos de melhoramento genético com trevo-branco vêm sendo conduzidos pelo Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia (DPFA) da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul há vários anos. O principal objetivo de grande parte destes trabalhos foi o de aumentar a produção e persistência do trevo-branco em função de uma maior adaptabilidade a estresses hídricos, onde grande progresso foi obtido (Paim & Riboldi, 1994; Viecelli, 2000; Bortolini et al., 2011; Schneider et al., 2011).

Dentre as cultivares desenvolvidas no DPFA estão a Guaíba S<sub>1</sub> e Jacuí S<sub>2</sub>, que foram obtidas no Rio Grande do Sul no início dos anos 1980, selecionadas por suas características de persistência, produção de forragem e de sementes. Estas cultivares tiveram origem a partir de estolhos que sobreviveram à grande estiagem ocorrida no verão de 1977/78 e a partir de material introduzido da Flórida (EUA), de áreas experimentais e de áreas antigas com trevo-branco (Paim & Riboldi, 1994). Viecelli (2000) avaliou a produção de matéria seca de 39 progênies de trevo-branco, comparando ao cultivar Jacuí na EEA em Eldorado do Sul. Neste trabalho foram selecionados os acessos que deram origem à população UFRGS-2004-2. Schneider et al. (2011) avaliaram progênies de acessos da coleção nuclear de trevo-branco e de plantas coletadas após um período de estiagem, em duas regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul. As progênies que apresentaram maior produção de MS e persistência em ambos locais foram selecionadas para compor uma nova cultivar sintética de trevo-branco.

Atualmente, diante da contínua demanda de genótipos mais adaptados às condições climáticas do Rio Grande do Sul, procura-se começar a investigar e agregar características de tolerância ao alumínio e resistência a doenças às populações estudadas e selecionadas anteriormente no DPFA.

### 1.1 *Trifolium repens* L.: Taxonomia, origem e importância

*Trifolium repens* L. (trevo-branco) é uma das espécies mais importantes agronomicamente dentre as cerca de 250 espécies do gênero *Trifolium*. Este gênero pertence à tribo Trifolieae da subfamília Papilionoideae (também conhecida como Faboideae) da família Fabaceae (Lewis et al., 2005).

O trevo-branco é uma espécie alotetraplóide ( $2n = 4x = 32$ ) de natureza alógama obrigatória (Pederson, 1995). Ellison et al. (2006), através de análises filogenéticas, identificaram *T. occidentale* (Schreb.) e *T. pallescens* (Schreb.) como os dois progenitores diplóides do trevo-branco.

Originária dos países do Leste do Mediterrâneo, atualmente faz parte da flora de todos os continentes (Ball et al., 1991). O cultivo de trevo-branco por meio do uso da semente aparentemente começou nos Países Baixos por volta da segunda metade do século XVI. A distribuição geográfica do trevo-branco parece ser limitada apenas pelo frio do Ártico, a seca dos desertos e ao calor e competição de plantas das florestas tropicais (Leffel & Gibson, 1973). Algumas características como o pequeno tamanho da semente, dureza do tegumento que prolonga a vida da semente, o longo período de florescimento e produção de sementes e a alta palatabilidade da planta são fatores que favorecem a ampla disseminação (Hollowell, 1966).

Devido a sua alta produção de forragem de excelente qualidade, sua persistência com manejos intensivos e a habilidade para competir com gramíneas perenes, esta espécie contribui na formação das melhores pastagens do mundo, principalmente em regiões temperadas (Carámbula 1977). Geralmente é usada em associações com gramíneas, fornecendo nitrogênio (N) a partir da fixação biológica. Esta transferência de N é um movimento direto de compostos nitrogenados dos nódulos às raízes das gramíneas; uma transferência de produtos da decomposição dos nódulos, raízes e parte aérea do trevo-branco; e uma transferência de compostos de N através dos animais em pastejo (Leffel & Gibson, 1973).

Desenvolve-se principalmente em áreas de solos férteis, com boa umidade e quantidades adequadas de fósforo, não sendo tolerante a solos ácidos, salinos ou muito alcalinos (Ball et al., 1991).

Esta espécie assume um papel importante no Estado, pois sua produção de forragem ocorre na época do ano que o crescimento do campo nativo está reduzido, tendo como consequência uma queda na produção de forragem, tornando-se assim um importante suprimento alimentar aos animais durante este período (Oliveira & Moraes, 1995).

### 1.2 Características da espécie

A plântula de trevo-branco desenvolve inicialmente uma raiz pivotante e um ramo principal. Passado certo período, começa a produzir

estolões que se desenvolvem radialmente produzindo raízes adventícias em seus nós (Garcia, 1995). Posteriormente, os nós destes estolões atuam como coroas e de cada um destes podem se desenvolver, de acordo com as condições climáticas, uma folha, raízes adventícias e/ou uma gema axilar (Carámbula 1977). Nódulos estão presentes nas raízes do trevo-branco como resultado da simbiose entre a planta hospedeira e *Rhizobium trifolii* Dangeard (Leffel & Gibson, 1973).

As folhas desenvolvem-se da coroa e dos nós do estolão e geralmente são compostas por três folíolos. Estes variam muito em forma e tamanho, podendo ser elípticos a obovais ou quase obcordados, pontiagudos ou entalhados no ápice, apresentando ou não uma marca branca em “V” na face superior (Hollowell, 1966). A vida da folha, da gema até a senescência, é cerca de 40 dias, sob condições favoráveis. Na axila da folha, há uma gema axilar, que se mantém dormente, desenvolve um estolão ou uma inflorescência (Leffel & Gibson, 1973).

O florescimento depende de muitos fatores dentro de cada genótipo, idade e grau de desenvolvimento da planta; temperatura e fotoperíodo são proeminentes. O florescimento é muito reforçado por dias longos e temperaturas ótimas para crescimento após dias curtos e temperaturas baixas (Leffel & Gibson, 1973). As inflorescências nascem nas axilas das folhas nos nós dos ramos, compostas de 40 a 100 flores individuais. A vagem de uma única flor pode conter de uma a sete sementes. As flores são principalmente auto-incompatíveis e para a produção de sementes deve haver polinização cruzada (Hollowell, 1966). A maturação da semente é de 22-30 dias após a polinização cruzada. As sementes são pequenas e duras, podendo passar intactas pelo trato digestivo dos animais, permitindo assim, a ressemeadura e dispersão da espécie (Leffel & Gibson, 1973).

Uma vez que as condições ambientais favorecem o processo de floração, as gemas axilares deixam de produzir estolões para produzir inflorescências. Desta forma, a produção de inflorescências se faz em detrimento da formação de novos estolões e, conseqüentemente, o crescimento da planta é detido (Carámbula 1977). O aparecimento de estolões secundários provoca, em geral, um enfraquecimento muito intenso nos estolões primários devido à passagem unidirecional de substâncias de reservas para estes estolões jovens até o ponto que finalmente os estolões e a raiz primária morrem entre o primeiro e segundo ano. A partir desse momento, a sobrevivência da planta depende das raízes adventícias dos estolões, que normalmente se concentram nos primeiros 15 cm do solo (Garcia, 1995). Este comportamento facilita, em ambientes favoráveis, a sobrevivência das plantas por multiplicação vegetativa, ao assegurar o desenvolvimento e crescimento sucessivo de novos estolões (Carámbula, 1977).

Devido ao seu hábito estolonífero, o que é aproveitado pelo animal é fundamentalmente folhas e pedúnculos florais. As desfolhações não afetam os seus pontos de crescimento e a qualidade de forragem apresenta um valor

nutritivo muito alto ao longo do ciclo de produção (Carámbula, 1977). O valor nutritivo, como é expresso pela composição, difere extensamente em diferentes estágios de maturação, com diferentes práticas culturais e diferentes locais. No entanto, o trevo-branco varia menos em valores nutricionais do que outras leguminosas, nas quais as hastes são colhidas como parte da forragem (Hollowell, 1966).

As plantas de trevo-branco recuperam-se rapidamente após uma desfolhação devido a uma boa capacidade fotossintética dos estolões e à alta eficiência da área foliar à medida que se desenvolve. Sem dúvida, um modelo ideal de planta forrageira adaptada a pastoreios contínuos deveria possuir grande parte das características do trevo-branco. Porte rasteiro, índice de área foliar ótimo baixo e presença de folhas maduras no extrato superior, são caracteres que favorecem um manejo intenso (Carámbula, 1977).

O trevo-branco é uma leguminosa de ciclo hiberno-primaveril, sendo mais adaptada a regiões com temperaturas amenas e boa umidade (Ball et al., 1991). De acordo com Paim (1988), a temperatura ótima para o crescimento do trevo-branco está compreendida entre uma faixa de 16 a 24°C durante o dia e em torno de 12 a 18°C durante a noite. Quando a temperatura baixa de 7–8°C, ocorre uma acentuada redução na taxa de crescimento. As temperaturas durante o verão, acima de 30°C, são altamente prejudiciais à persistência desta espécie.

A persistência é um dos principais problemas desta espécie e este fator pode ser considerado como o mais determinante para a produção ao longo dos anos. A época de plantio, florescimento, incidência de infecções por doença e a infestação por insetos que se alimentam das raízes podem levar à morte das raízes e das plantas durante o primeiro ano de produção (Hollowell, 1966). A formação constante de ramos e o enraizamento dos novos nós é o que garante a persistência desta espécie (Jones, 1980).

### **1.3 Solos ácidos**

A presença de solos ácidos é frequente nas regiões tropicais e subtropicais. Estima-se que cerca de 30-40% dos solos aráveis do mundo tem pH abaixo de 5,5 (von Uexkull and Mutert, 1995). No Rio Grande do Sul 70%, das amostras de solo apresentaram pH em água menor que 5,5, em levantamento que utilizou cerca de 60.000 amostras (Drescher et al., 1995), atualmente, muitos pontos já tiveram a acidez parcialmente corrigida, principalmente, em áreas de lavoura. A formação dos solos ácidos é o resultado da combinação de muitos fatores, tais como tempo, clima, relevo, material de origem e organismos. Dentre os fatores citados, os que apresentam maior relevância são a presença de altas temperaturas e a intensidade das chuvas associadas ao material de origem do solo (Meurer et al., 2010).

O processo de acidificação do solo inicia com a solubilização da rocha. Em decorrência da elevada precipitação pluviométrica ocorre uma lixiviação de cátions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) e ânions (cloreto, nitrato e sulfato) de menor valência, associada à retenção de cátions de maior valência ( $\text{Al}^{3+}$ ), nos sítios de troca da argila e da matéria orgânica (Tedesco & Bissani, 2004). Por meio de reações de hidrólise, o alumínio em solução aquosa precipita sob a forma de  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , produzindo íons  $\text{H}^+$ . À medida que os íons de alumínio são solubilizados da rocha, íons  $\text{H}^+$  vão sendo liberados favorecendo ainda mais a dissolução da rocha. Por um lado, esse processo acelera a formação do solo. No entanto, o alumínio solubilizado desloca cátions importantes para a nutrição das plantas dos sítios de troca para a solução do solo, favorecendo a sua percolação (Bohnen et al., 2000).

Os solos ácidos determinam fortes limitações à produção agrícola. Pois, possuem baixa disponibilidade de alguns nutrientes essenciais para as plantas e favorecem o surgimento de teores tóxicos de Al e Mn na solução do solo. O Al em altas concentrações destaca-se como o principal fator limitante em solos com pH inferior a 5,5 (Delhaize & Ryan, 1995), afetando muitos processos fisiológicos, bioquímicos e metabólicos nas plantas.

O trevo-branco é raramente encontrado em solos fortemente ácidos. Nestes solos com baixo pH, o estabelecimento inicial das plântulas de trevo-branco é especialmente crítico e afeta também a dispersão e a persistência vegetativa, sendo um fator limitante para a espécie (Voigt et al. 1997). O crescimento das raízes e estolões e a fixação de nitrogênio aumentam quando o pH é maior que 6,0 (Andrew, 1976), sendo estes fatores indispensáveis para a persistência do trevo-branco.

O problema da acidez pode ser contornado por meio da correção dos solos ácidos, feita pela prática da calagem. Substâncias que geram íons (oxidrilas e bicarbonato) capazes de neutralizar os íons  $\text{H}^+$  são aplicadas ao solo (Meurer et al., 2010). A prática da calagem é frequentemente utilizada com o intuito de reduzir a acidez do solo, aumentando o pH, cálcio (Ca) e magnésio (Mg) trocáveis, além de diminuir o teor de Al tóxico, ferro (Fe) e Mn, proporcionando ainda maior capacidade de troca catiônica (CTC). Aumenta a disponibilidade de nitrogênio, enxofre e boro que resultam da mineralização da matéria orgânica, melhora o aproveitamento de adubos, fornece Ca e Mg e estimula a atividade microbiana (Miguel et al., 2010). Os calcários agrícolas mais utilizados são os compostos por carbonato de cálcio e magnésio, que apresentam baixa solubilidade (Meurer et al., 2010). Ao se aumentar o pH em água do solo para valores superiores a 5,5, o Al começa a ser neutralizado diminuindo a toxidez por esse elemento (Bohnen et al., 2000).

O uso de corretivos representa um acréscimo nos custos de produção, podendo ser, em determinadas situações, economicamente inviável. Além disso, a redução na saturação de Al ao longo do perfil do solo, com a calagem, necessita de muito tempo, devido à baixa solubilidade do calcário. A capacidade corretiva, em geral, não ultrapassa as camadas superficiais. Isto impossibilita o crescimento normal do sistema radicular das plantas, que precisam de um maior volume de solo para explorar, principalmente em profundidade, a fim de garantir a absorção de nutrientes e água. Devido a isso, o sistema radicular irá se desenvolver, principalmente, na camada superficial ficando mais vulnerável a estresses hídricos e deficiência de nutrientes (Malavolta et al., 1994; Mascarenhas & Tanaka, 1995; Amaral et al., 2004).

A opção que tem sido considerada mais promissora para contornar este problema é a exploração do potencial genético das plantas, uma vez que espécies, cultivares e variedades diferem amplamente quanto à tolerância ao excesso de alumínio no solo (Singh et al., 2011). A identificação e a seleção de genótipos tolerantes resultam em vantagens, independentemente do grau de tecnologia utilizado (Ferreira et al., 2006). Essa estratégia é considerada indispensável em programas de melhoramento genético, que visam à identificação de plantas mais produtivas que apresentem maior adaptabilidade em condições de estresse (Freitas et al., 2006).

#### **1.4 Toxidez por alumínio e mecanismos de tolerância**

O principal sintoma de toxidez por Al em plantas é a inibição do crescimento da raiz, resultando em redução e danos ao sistema radicular, podendo levar a deficiência mineral e estresse hídrico (Degenhardt et al., 1998). A formação de raízes capilares em trevo-branco é reduzida drasticamente em concentrações maiores que 20  $\mu\text{M}$  de Al (Care, 1995). A redução no crescimento da parte aérea é um sintoma secundário, onde as plantas apresentam sinais de deficiência de fósforo, devido à falha na sua translocação (Tedesco & Bissani, 2004).

O Al afeta as funções celulares através de alterações na membrana das células da raiz, inibição da síntese de DNA e da divisão celular, inibição do alongamento celular, causando alterações na absorção de nutrientes e no balanço nutricional (Machado, 1997).

As membranas celulares da raiz são tidas como os locais onde ocorrem as lesões primárias de toxicidade por Al. Segundo Zhao et al. (1987), o Al pode alterar as propriedades da membrana plasmática e vacuolar,

resultando, assim, numa diminuição da permeabilidade para a água. Outros sintomas da ação tóxica do Al são a perda de camadas celulares periféricas e degeneração do citoplasma (McQuattie & Schier, 1990).

A inibição direta da divisão celular ocorre pela captura de secções da dupla hélice de DNA por polímeros de Al, através da forte ligação entre fosfato, com carga negativa, e a carga positiva do polímero (Naidoo et al., 1978; Wallace & Anderson, 1984).

Alterações são consequências do alto acúmulo de Al no núcleo das células (Naidoo et al., 1978). Há casos em que a redução no comprimento das raízes parece ser acompanhada por um aumento no diâmetro. Este fenômeno, entretanto, não compensa a diminuição da área superficial das raízes, que é funcionalmente mais importante que a massa radicular (Machado, 2007).

No rizóbio, a combinação acidez e Al produz uma variedade de efeitos. A redução da taxa de multiplicação é o efeito mais importante para a colonização de solos e raízes, sendo inibida em diferentes graus, dependendo da estirpe do rizóbio (Munns & Keyser, 1980). Paudyal et al. (2007) observaram que o Al, mesmo em pequenas concentrações, tem efeito negativo sobre a cinética de crescimento de rizóbio em condições culturais. A nodulação é mais sensível às condições de acidez do solo do que o alongamento da raiz, estando mais relacionada ao pH do que à concentração de Ca (Brauer et al., 2002).

Algumas espécies dispõem de mecanismos que capacitam as plantas a tolerarem os efeitos tóxicos deste íon (Conceição et al., 2008). Os mecanismos de tolerância ao Al podem ser divididos naqueles que atuam no sentido de impedir a entrada do Al pela raiz (mecanismos de exclusão) e nos que permitem a planta acumular o Al em locais específicos, tolerando-o dentro da célula (Hartwig et al., 2007).

A exclusão do Al no ápice das raízes é o mecanismo mais comum de tolerância ao Al. O mecanismo é baseado na exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes, liberados na rizosfera, atuando como quelantes do Al (Hoekenga et al., 2003). A secreção de ácidos orgânicos é altamente específica ao Al, ocorrendo no ápice da raiz. Esse processo é classificado em dois padrões: no padrão I, não existe um atraso perceptível entre a adição de Al e o começo da liberação dos ácidos orgânicos; no padrão II, ocorre uma marcada fase de espera entre a adição de Al e o começo da secreção dos ácidos orgânicos (Ma, 2000).

O tipo de ácido orgânico secretado, assim como o tipo de secreção, varia entre as espécies de plantas (Ma, 2000). Em cultivares tolerantes de trigo,

a exclusão ocorre pela exsudação de malato; nas cultivares tolerantes de feijão, milho e soja, através do citrato. Algumas espécies como triticale, centeio, canola e aveia liberam malato e citrato (Ma et al., 2001). Santos (2009) verificou a exsudação de ácido oxálico em populações de cornichão.

Algumas espécies apresentam a capacidade de acumular elevadas quantidades de Al em seus tecidos, como meio de desintoxicação interna do Al nas plantas (Hartwig et al., 2007). A hortênsia (*Hydrangea macophylla*) é um bom exemplo de mecanismo de desintoxicação interna. Nesta espécie foi observado o acúmulo de até 15,7 mmol kg<sup>-1</sup> de Al nas pétalas de coloração azul, complexado com citrato no citosol (Ma et al., 1997). Outras espécies que apresentam o mecanismo de desintoxicação interna são o trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) (Zheng et al., 1998) e brachiária-peluda (*Bracchiaria ruzizensis*) (Wenzl et al., 2001).

### 1.5.1 Controle genético e métodos de seleção

A tolerância ao Al é uma característica herdável, que vem sendo estudada em diversas culturas de importante valor comercial (Jansen et al., 2002). Este conhecimento tem permitido o desenvolvimento de novas cultivares, capazes de se desenvolverem bem em solos ácidos. A característica pode ser controlada por um ou diversos genes. Na cevada, a tolerância é controlada por um gene dominante, enquanto que no trigo, no centeio e na soja o controle é realizado por diversos genes (Foy et al., 1978; Tang et al., 2000). No arroz, a herança da tolerância ao Al é oligogênica, determinada por alelos dominantes (Ferreira et al., 1995). Em milho, a tolerância é controlada por um único loco, com uma série de alelos múltiplos (Ferreira et al., 2006). Um estudo realizado em mutantes de *Arabidopsis thaliana* resistentes ao Al demonstrou que esta característica é controlada por dois genes distintos. Cada gene controla um mecanismo de exclusão do Al: um deles atua liberando ácidos orgânicos e o outro, aumenta o pH da rizosfera, diminuindo assim a concentração de Al tóxico (Larsen et al., 1998).

Estudos genéticos sugerem que a resistência do trevo-branco ao Al é um caractere poligênico e pode ser recessivo (Caradus and Mackay, 1995). Desta forma, um grande progresso genético pode ser possível a partir de seleção recorrente (Voigt et al., 1997).

Três abordagens genéticas básicas são comumente usadas no melhoramento para tolerância ao Al. Estas são: (I) exploração da variação genética natural por meio da seleção direta em ambientes estressados com Al,

(II) mapeamento de locus de características quantitativas (QTLs) e subsequente seleção assistida por marcadores, e (III) desenvolvimento de plantas transgênicas para introduzir novos genes ou para mudar os níveis de tolerância dos genes existentes e melhorar o grau de tolerância ao Al (Singh et al., 2011).

Dentre os métodos que consistem na seleção direta em ambientes estressados com o Al podem ser destacados os que utilizam solo (em ambientes controlados ou não), solução nutritiva e meio de cultura. Estes são baseados, principalmente, nas características das raízes, podendo ser demorados, trabalhosos e sujeitos a variação do ambiente (Khu et al., 2012).

A principal vantagem da seleção em solo a campo está na condição natural de solo e clima em que a planta será selecionada. Entretanto, este método apresenta custos mais elevados e despende um maior período de tempo. Quando a seleção em solo for realizada em ambientes controlados, o principal problema é a obtenção de solos adequados, pois a toxicidade do Al não é o único fator limitante. Além disso, dificulta a observação das raízes, onde ocorrem os primeiros efeitos do Al (Echart & Cavalli-Molina, 2001). A maioria dos experimentos com trevo-branco para tolerância ao Al realizados em solo são conduzidos durante maiores períodos de tempo, variando de 45 (Caradus et al., 1987) a 84 dias (Dodd et al., 1992).

Voight & Staley (2004) selecionaram plantas de trevo-branco para solos ácidos, utilizando uma pequena camada de solo ácido, com toxidez de Al, sobre ágar. No entanto, os autores consideraram essa técnica pouco efetiva comparada com a seleção convencional de trevo-branco em vasos com substrato ácido.

A seleção em solução nutritiva é um método que vem sendo muito utilizado na obtenção de plantas tolerantes ao Al, devido às várias vantagens que o método oferece, pois é rápido e possibilita uma melhor análise do sistema radicular, além de permitir um controle rigoroso sobre a disponibilidade dos nutrientes e do pH (Hede et al, 2001). Por outro lado, muitos métodos com solução nutritiva são difíceis de manter e inadequados para uma grande fenotipagem (Khu et al., 2012). Adicionalmente, não se recomenda o método em plantas que expressem a tolerância ao Al apenas na fase adulta ou naquelas que apresentam propagação vegetativa (Samac & Tesfaye, 2003).

Khu et al. (2012) compararam métodos de seleção em solo e em meios de cultura em alfafa. O melhor meio de cultura foi o que utilizava apenas 50  $\mu\text{M}$  de Al e 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ . Ambos os métodos possibilitaram quantificar o crescimento da parte aérea e raízes, discriminando a população tolerante das sensíveis. No caso do meio de cultura, é possível visualizar diferenças na

arquitetura das raízes. Segundo os autores, o método em solo complementa o método do meio de cultura, possibilitando avaliar o crescimento das plantas nas condições de solo.

Atualmente, grande parte dos trabalhos desenvolvidos para tolerância ao alumínio visam identificar genes e QTLs ligados a esta característica. Conforme Singh et al. 2011, muitos avanços têm sido obtidos na área da genética molecular nos últimos 15 anos. Estes avanços são ferramentas funcionais que ajudam a entender questões fundamentais associadas ao estresse. No entanto, na maioria das culturas e espécies forrageiras ainda não substituem os métodos de seleção baseados no fenótipo.

### **1.6 Doenças no trevo-branco**

O trevo-branco pode ser afetado por insetos, nematóides, fungos e vírus (Jahufer 1991). Sessenta e duas espécies de fungos, a bactéria *Pseudomonas syringae* e 14 tipos de vírus têm sido registrados atacando trevo-branco, de acordo com Duke (1981). No entanto, há um conhecimento limitado sobre as influências destes patógenos e seus efeitos relativos na produtividade de pastagens contendo trevo-branco (Jahufer 1991). Coletivamente, as pragas e doenças que afetam o trevo-branco têm demonstrado um grande efeito no crescimento e na fixação de N, no entanto, como os efeitos são em grande parte subclínicos, difíceis de detectar e quantificar, na maioria das vezes não são reconhecidos (Brock et al, 1989). No Brasil, não existem informações sobre o quanto que as pastagens são afetadas pela incidência de doenças, insetos ou nematóides e nem quais doenças ocorrem no trevo-branco. De acordo com Marchi et al. (2011), o conhecimento sobre os agentes etiológicos, sobretudo com respeito à influência dos mesmos na capacidade de suporte e na produtividade das pastagens, ainda é limitado no Brasil. Isto tem dificultado o estabelecimento de medidas específicas para o manejo de doenças em plantas forrageiras.

As pastagens de trevo-branco possuem várias características que dificultam a quantificação e mensuração do crescimento das epidemias de manchas foliares. Entre elas estão, a origem de polinização cruzada das populações que confere ao trevo-branco alta variabilidade; ocorrência espacial das plantas de trevo-branco em manchas e temporalmente variáveis nas pastagens; e as epidemias foliares compreendem muitas doenças simultâneas (Nelson & Campbell, 1993a). Conforme os mesmos autores, as duas forças competitivas: (1) desfolha causada pela doença e, (2) rebrote do hospedeiro,

são mecanismos que resultam na manutenção de níveis de severidade de doenças relativamente baixos durante a incidência de epidemias de doenças foliares.

Nelson & Campbell (1992) afirmam que a ecologia do sistema patológico das manchas foliares no trevo-branco em pastagens consorciadas com gramíneas é extremamente diversa. Segundo os autores, uma típica pastagem de verão, geralmente, hospeda de cinco a seis patógenos de manchas foliares, podendo ocorrer de um a dois patógenos por folha. Estes patógenos variam muito no que se refere ao modo de reprodução e dispersão, e pouca quantidade de informação está disponível na ecologia individual ou em grupo destes patógenos (Nelson & Campbell, 1993b).

De acordo com Miller (1984), o trevo-branco está sujeito a danos de raiz pelo fungo *Sclerotium rolfisii* e *Sclerotinia trifoliorum*. Danos às raízes, estolões e folhas causados pelos fungos *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Leptodiscus*, *Curvularia* e *Colletotrichum* também foram relatados por este autor. Segundo Woodfield & Caradus (1996), na Nova Zelândia, a persistência do trevo-branco é mais afetada por insetos, nematóides e vírus, enquanto que doenças fúngicas não teriam um efeito significativo.

As limitações no crescimento de trevo-branco provavelmente sejam resultado de uma interação complexa de uma ou mais doenças com outras restrições, tais como estresse hídrico, fertilidade do solo, pressão de pastejo e competição (Latach & Skipp 1987). Um manejo efetivo deste complicado sistema patológico consiste em um melhor entendimento das inter-relações entre organismos, espécies ocorrentes e diversidade no complexo de manchas foliares (Nelson & Campbell, 1992).

Nelson & Campbell (1992) observaram a incidência de espécies patogênicas e padrões de associação de um complexo de doenças foliares no trevo-branco em áreas de pastagens na Carolina do Norte-EUA. As doenças mais prevalentes e destrutivas foram as causadas por *Pseudomonas andropogonis* e *Rhizoctonia solani*. Doenças causadas por *Curvularia trifolii*, *Cercospora zebrina* e *Colletotrichum* mantiveram uma incidência mais baixa e relativamente constante. Apesar da menor média de incidência de *Curvularia trifolii*, ocorreu uma severa infestação em uma das regiões durante o verão (Nelson & Campbell, 1992). O microclima dentro de pastagens ou regiões pode afetar a disseminação de manchas foliares. Nelson & Campbell (1993b) indicam quatro fatores – resistência do hospedeiro, ecologia do patógeno, desfolha e ambiente – como importantes forças que dirigem o padrão espacial neste ecossistema complexo.

Mudanças na ocorrência e diversidade de espécies também podem

ser atribuídas aos efeitos da atividade dos bovinos (Nelson & Campbell, 1992). Patógenos foliares de forrageiras geralmente são suprimidos pelo pastejo (Pratt, 1991), o qual destrói o denso dossel favorável para a infecção e reprodução do patógeno (Nelson & Campbell, 1993b). Gibson e Cope (1985) observaram que o acúmulo excessivo de vegetação é prejudicial ao trevo-branco, porque a luz reduzida, a umidade do solo e o microclima predispõem para problemas de doenças e insetos. Conforme Skipp & Lampert (1984), a maior incidência de doenças foliares em pastagens de trevo-branco pouco pastejadas são reflexo dos seguintes fatores: (1) aumento no nível de inóculo do fungo, devido à menor frequência de remoção de folhas infectadas; (2) maior tempo de desenvolvimento do sintoma entre desfolhações; (3) condições mais favoráveis para doenças foliares em dosséis mais densos e úmidos; e (4) reduzida produção de folhas novas em condições sombreadas.

Nelson & Campbell (1993a) observaram maior desfolha e severidade de doenças durante o verão, provavelmente, devido à atividade associada dos patógenos que se propagam em altas temperaturas, como por exemplo, *R. solani*, *P. andropogonis* e *C. trifolii*. Efeitos cumulativos da contínua desfolha causada por doenças em períodos de clima desfavorável para o crescimento do trevo-branco (quente e seco) contribuem para a diminuição da produção, debilidade e morte da planta (Nelson & Campbell, 1993a). As pontas terminais dos estolões precisam crescer o mais rápido possível durante condições favoráveis para permanecer à frente das necroses que se propagam da parte basal do estolão. Se a necrose alcança a ponta do estolão antes do final do verão, aquela porção da planta morre. Por outro lado, se a necrose alcança a ponta de todos os estolões, o estande de trevo-branco é eliminado (Pederson et al, 2000).

Pederson & Pratt (1995) testaram o uso de fungicida durante o verão em três cultivares de trevo-branco, sendo uma delas tolerante à seca. O uso de fungicida aumentou a densidade de estolões, densidade de pontos de crescimento e comprimento de estolões em todas as cultivares. A cultivar tolerante apresentou maior cobertura de solo, densidade de estolões e comprimento de estolão, no entanto, o uso do fungicida lhe conferiu um menor aumento do comprimento relativo de estolão em relação às outras duas cultivares. Segundo os autores, os resultados sugerem que fungos patogênicos podem reduzir a sobrevivência de estolões durante a dormência no verão e que uma maior resistência a doenças fúngicas pode ser parte do mecanismo de sobrevivência da cultivar tolerante à seca. Pederson et al. (2000) também verificaram maior resistência de uma cultivar tolerante à seca, entre 20 outros genótipos, quando estas foram inoculadas com *Macrophomina phaseolina*, um importante patógeno que limita a sobrevivência dos estolões do trevo-branco.

Estratégias de controle são precárias em pastagens/forageiras comparadas com as empregadas em outras culturas. Incidência e severidade de doenças são afetadas pelo clima e práticas de manejo da cultura, sendo o clima um fator primário (Leath et al., 1996). Práticas de manejo têm um pequeno impacto na maioria das pragas e doenças que afetam a persistência do trevo-branco e os custos com controle químico geralmente não são econômicos (Woodfield & Caradus, 1996). A solução de controle mais prática a longo prazo para as doenças em forrageiras é através do aumento dos níveis de resistência genética, podendo melhorar a qualidade e a produtividade de forragem do trevo-branco durante alguns períodos do ano (Skipp & Lampert, 1984, Leath et al., 1996).

### 1.6.1 *Cymadothea trifolii*

O ascomiceto biotrófico obrigatório *Cymadothea trifolii* (Dothideomycetes, Ascomycota) é o agente causal da fuligem ou mancha preta do trevo-branco (Simon et al., 2009). Esta doença pode ser frequentemente observada em plantas de trevo-branco nos meses seguintes ao inverno no Estado do Rio Grande do Sul. Embora o fungo não seja considerado como um patógeno agrícola sério, tem um impacto significativo em pastagens de trevo-branco e é frequentemente encontrado em locais naturais (Simon et al. 2009). O fungo afeta o rendimento pela detenção do crescimento e desfolhação e a qualidade por aumentar o nível de estrógeno na planta (France & Guerreiro, 1988).

*Cymadothea trifolii* é generalizado sobre as espécies do gênero *Trifolium* (Fabaceae), mas também tem sido relatado em alfafa (*Medicago sativa*) (Puschner, 2005).

Caracteriza-se por pequenas pústulas negras, o estroma, na parte inferior dos folíolos do trevo. Dentro da folha, o fungo prolifera intercelularmente, formando um aparelho de interação complexo para obter os nutrientes de seu hospedeiro (Simon et al., 2004). Manchas verde escuras a pretas, com textura, e cerca de 1 mm de diâmetro, ocorrem na parte inferior das folhas. Se a infecção for grave, podem cobrir quase toda a superfície das folhas, que vêm a secar.

Esta doença é mais prevalente em áreas baixas e molhadas, especialmente no outono e inverno (Clarke, 1999). O fungo permanece em restos de folhas afetadas durante o inverno, época que ocorre o ciclo sexual, gerando-se os ascósporos durante a primavera, constituindo o inóculo primário.

Estes afetam a folhagem, produzindo as massas de conidióforos e conídios característicos da doença, que produzem o inóculo secundário e disseminam a enfermidade durante a primavera e verão. No outono, se desenvolvem os peritécios que durante o inverno geram o ciclo sexuado, repetindo-se o ciclo (France & Guerreiro, 1988).

### **1.6.2 *Curvularia trifolii* (Kauff.) Boedijn.**

Doenças em leguminosas causadas por *Curvularia trifolii* foram identificadas em trevo-branco (*Trifolium repens* L.), trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.), *Trifolium hybridum* L., *Trifolium incarnatum* L. e *Trifolium subterraneum* (Nishihara, 1966). Este patógeno também foi encontrado causando severos danos em *Agrostis tenuis* Sibth. (Falloon, 1976). A doença causada por este agente têm sido observada em diferentes municípios do Rio Grande do Sul, sendo facilmente encontrada após períodos de chuvas seguidos por altas temperaturas.

Quanto às características morfológicas, *Curvularia trifolii* apresenta conidióforos macronematosos, mononematosos, isolados ou em grupos, terminais ou laterais em hifas, simples ou raramente ramificados, comprimento até 550 µm; conídios solitários, 3-septados, elipsóides a fusiformes, base afunilada, hilo protuberante, frequentemente curvos e com a terceira célula ou a segunda e a terceira por vezes desproporcionalmente intumescidas, células uniformemente castanhas a castanho-claras, células 24-37 x 14-16,5 µm, parede por vezes verrugosa; colônias efusas, feltrosas a cotonosas, densidade média a forte, cinzento-oliváceas, frente de crescimento lobado, ausência de zonagem (Lima e Furtado, 2007).

lida & Takahashi (1967) descreveram os principais aspectos do fungo *C. trifolii* quanto aos fatores ambientais favoráveis para o desenvolvimento. Segundo os autores, a germinação do esporo ocorre entre 15°C e 37,5°C, sendo 30°C a temperatura ótima. A temperatura ideal para crescimento do micélio em meio de cultura é de 27,5°C. A germinação do esporo e crescimento do micélio são pouco afetados pela luz. A doença ocorre em uma ampla escala de temperatura (15°C a 38°C), sendo mais severa entre 25°C e 30°C. A infecção é acelerada em uma condição escura. A severidade da doença foi aumentada mantendo as plantas em alta umidade dois dias antes da inoculação, sendo mais severa em folhas jovens.

*Curvularia trifolii* é disseminado pelo ar e causa morte rápida das folhas (7-10 dias) no trevo-branco (Nelson & Campbell, 1993b). Sintomas

foliares no trevo-branco estendem-se de manchas amarelas a grandes áreas em forma de V nas extremidades dos folíolos, e ocasionalmente, causa a morte de todo o folíolo. Quando o pecíolo é afetado, toda a folha morre. O maior desenvolvimento desta doença ocorre com as altas temperaturas após períodos de chuva, ou seja, em clima quente e úmido. O pastejo ou cortes na pastagem, geralmente, diminuem a severidade desta doença (Leath, 1985).

## 1.7 Hipóteses e objetivos

### Hipóteses:

- Existe variabilidade genética dentro e entre populações de trevo-branco para resistência a doenças fúngicas foliares.
- É possível realizar seleção de plantas de trevo-branco tolerantes ao alumínio em solução nutritiva e meio gel durante a fase de plântula.
- O comprimento da raiz principal está correlacionado com o comprimento total de raiz, podendo ser utilizado na seleção de plantas tolerantes ao alumínio.

### Objetivos gerais:

Um dos objetivos do trabalho foi dar início ao processo de seleção de plantas e populações de trevo-branco visando tolerância ao alumínio. Neste estudo, foram utilizadas populações que apresentaram alto desempenho agrônômico em trabalhos realizados anteriormente no DPFA (Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia) (Bortolini et al., 2006, Schneider et al., 2011).

Outro objetivo foi o de identificar algumas doenças foliares do trevo-branco causadas por fungos, que ocorrem no Rio Grande do Sul e verificar a variabilidade genética existente para resistência a doença na cultivar Jacuí e na linhagem experimental UFRGS-2004-2.

### Objetivos específicos:

- Verificar a existência de variabilidade genética em populações de trevo-branco quanto à severidade de doenças foliares e selecionar plantas resistentes.
- Aprimorar o protocolo de seleção de plântulas de trevo-branco tolerantes ao alumínio em meio de cultura, determinando a melhor concentração de  $AlCl_3$ .
- Selecionar plântulas de trevo-branco tolerantes ao alumínio com base no crescimento da raiz em solução nutritiva e meio de cultura gel.
- Comparar populações selecionadas quanto à tolerância ao alumínio e verificar o progresso genético após cada ciclo de seleção.



## **CAPÍTULO II**

**IDENTIFICATION OF FOLIAR DISEASE CAUSED BY *Curvularia trifolii* (Kauff.)  
Boedijn AND SELECTION FOR RESISTANCE IN TWO WHITE CLOVER  
CULTIVARS**



**Identification of foliar disease caused by *Curvularia trifolii* (Kauff.) Boedijn and selection for resistance in two white clover cultivars<sup>1</sup>**

ABSTRACT - In Southern Brazil, there is no information about diseases in white clover. However, symptoms of fungal diseases can be observed in the field. Due to the importance of the subject and the limited information available, the objective of this study was to identify some foliar diseases that occur in white clover in Rio Grande do Sul and verify genetic variability for resistance in two cultivars. *Curvularia trifolii* and *Cymadothea trifolli* were identified, *Curvularia trifolii* was used to verify the variability of white clover for resistance. Plants from the cultivars Jacuí and UFRGS-2004-2 were inoculated and susceptible and resistant plants were selected. The F<sub>1</sub> populations and the originals were inoculated and compared. The susceptible populations were distinguished from the original and resistant populations. This study was capable to identify the disease caused by *Curvularia trifolii* and after one cycle of selection genetic variability for resistance was shown in Jacuí and UFRGS 2004-2.

Key words: *Trifolium repens*, leaf spot, fungi

---

<sup>1</sup> Artigo redigido pelas normas da revista Crop Breeding and Applied Biotechnology-CBAB.

## Introduction

More than 400 diseases caused by fungi, bacteria, viruses, mycoplasmas and nematodes are known to affect pasture productivity (Haggar et al., 1984) and 62 species of fungus have been documented in white clover (Duke, 1981). Nevertheless, there is a limited knowledge about the effects of pathogens on the productivity of pastures containing white clover (Jahufer, 1991) and relatively little attempt has been made to investigate variation within or among populations in their response to these pathogens (Burdon, 1980). Such studies are crucial to understanding the role of fungal and insect parasites in plant community dynamics and to a rational consideration of the causes of differences in the incidence of parasite epidemics in artificial and natural ecosystems (Burdon, 1980).

The limitations on white clover growth are probably the result of a complex interaction of one or more diseases with other constraints, such as water stress, soil fertility, grazing pressure, and competition (Latch & Skipp, 1987). Nelson & Campbell (1993) observed greater disease severity and defoliation during the summer, associated with pathogens that propagate at high temperatures. The cumulative effects of continuous defoliation caused by diseases in periods of unfavorable climate for the growth of white clover (hot and dry) contribute to the decrease in production, decline and death of the plant (Nelson & Campbell, 1993).

Forage crop disease control strategies are inadequate compared with those used in other crops (Leath et al., 1996). Management practices have little impact on most pests and diseases that affect the persistence of white clover, and the cost of chemical controls are usually expensive (Woodfield & Caradus, 1996). The most practical

solution for long-term disease control in forage is increasing the levels of genetic resistance. Developing white clover populations more resistant to disease may increase persistence through unfavorable conditions as well as the quality of pastures. Increased persistence may enhance the productivity of pastures by promoting vegetative propagation.

In the state of Rio Grande do Sul in Southern Brazil, there is no information about the diseases that affect white clover. However, in the field, some foliar diseases are observed, such as "sooty blotch" and "Curvularia leaf blight" caused by the fungi *Cymadothea trifolii* and *Curvularia trifolii*, respectively. Due to the importance of the subject and the limited knowledge available, the goal was to identify foliar diseases that occur in white clover in Rio Grande do Sul, and verify genetic variability for resistance in white clover cultivars developed by the "Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia (DPFA)" at "Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)".

## **Material and Methods**

### **Identification, isolation of the pathogen, and pathogenicity test**

White clover leaves containing leaf spots were collected in the field and brought to the DPFA, Porto Alegre – RS. The leaves contained lesions corresponding to symptoms caused by the fungi *Cymadothea trifolii* and *Curvularia trifolii*. The structures and spores on the leaves were observed under a microscope, and spores related to each of pathogens were found.

*Cymadothea trifolii* is an obligate biotrophic ascomycete, which cannot be propagated on artificial media. The fungus *Curvularia trifolii* was used in order to

verify the variability of white clover for resistance to disease because it was more feasible to isolate and multiply the inoculum. The leaflets containing lesions caused by *Curvularia trifolii* were disinfected by placing them for 30 seconds in 70% alcohol, 1 minute in 1% hypochlorite and two washes in autoclaved distilled water. The leaflets were placed in a moist chamber for about 48 h. When the presence of cottony white mycelium was observed a direct isolation of the fungus was performed by passing small portions of mycelium to Petri dishes containing Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco, Michigan, USA).

Twelve white clover plants, including two controls, planted in plastic cups, were used for the pathogenicity test. In five plants the inoculated leaflets were injured using sandpaper. Small pieces of mycelium from pure colonies were placed on the leaflets with the aid of a needle. All plants were maintained in a greenhouse in plastic bags to maintain a moist environment until the appearance of the disease symptoms. Two weeks after inoculation disease symptoms were observed on inoculated leaflets, confirming the pathogenicity of the fungus.

#### **Inoculation and selection for resistance and sensitivity**

The inoculation was performed on November 23, 2011. Plates containing colonies that caused the disease in the pathogenicity test were picked and maintained at 25°C. The inoculation suspension was composed of autoclaved distilled water and Tween. Nineteen Petri dishes were washed twice with 6 mL (total 12 mL) of inoculation suspension. The suspension was strained through cheesecloth to remove excess mycelium and kept refrigerated.

About 120 plants each cultivar (Jacuí and UFRGS-2004-2) in the vegetative phase, arranged in a completely randomized design, were used for inoculation. Two young leaflets were inoculated per plant. An injury was made on one of the leaflets, which consisted of needle punctures. The injury was included in case the occurrence of this disease is mainly related to insect damage, since little information about this disease is available. Inoculation was performed with a manual plastic sprayer. The plants were kept in a plastic structure with humidifier for 24h. Fifteen days after inoculation, disease severity was evaluated. The percentage of leaf area damaged in the inoculated leaflets was visually estimated, varying from 0 to 100%. Twenty-five plants showing no symptoms of the disease were selected from each population, forming the disease-resistant populations. Susceptible populations were composed of 25 plants with the greatest severity in inoculated leaves, when more than 25 plants had 100% damage on leaves that were not directly inoculated were compared.

The percentage of leaf damage values from leaves with and without injury were subjected to an analysis of variance and compared by T-test.

The selected populations were maintained in the greenhouse until flowering. The 25 plants of each population were all randomly crossed by hand to obtain the F<sub>1</sub> resistant and susceptible populations. The F<sub>1</sub> seeds obtained were germinated, transplanted to pots and maintained in the greenhouse.

### **Evaluation of selected populations**

Selected F<sub>1</sub> populations were compared with the original cultivars, these being: Jacuí-S and UFRGS-S as susceptible, Jacuí-R and UFRGS-R as resistant, and the

original cultivars, Jacuí and UFRGS-2004-2. Fifty plants of each population were used in a completely randomized design. All plants were cut, leaving only a few leaves that were not yet expanded, 10 days before inoculation to ensure the presence of only young leaves.

*Curvularia trifolii* was again isolated from leaves of white clover and multiplied on PDA. The inoculum suspension was made as described above at a concentration of  $1.6 \times 10^5$  spores/ml. Inoculation was performed on November 13, 2013. All the leaves were inoculated and plants were kept in a plastic structure with high humidity for 24 hours.

The plants were evaluated for disease severity 14 days after inoculation. The percentage of leaf area damaged was visually estimated for each leaflet. The three leaflets were averaged to determine the damage percentage for the leaf. All leaves of all inoculated plants were evaluated. The values for the percentage of leaf damaged were subjected to analysis of variance and means of all populations were compared to each other by orthogonal contrasts at 5% probability. Then the means of the two susceptible, two original and two resistant populations were also compared by orthogonal contrasts at 5% probability. Statistical analyzes were performed with the aid of R statistical software (R Core Team, 2013).

## **Results and Discussion**

### **Selection for resistance and susceptibility**

In the first assessment of lesion severity caused by *Curvularia trifolii* Jacuí was less susceptible to disease than UFRGS-2004-2 in leaves with injury ( $P < 0.001$ ) and in unwounded leaves ( $P < 0.001$ ) (Table 1). It was observed that few leaves of Jacuí

showed 100% damage in comparison to UFRGS-2004-2. While UFRGS-2004-2 had large lesions Jacuí had minor lesions as if the disease stabilized after infection. Furthermore, Jacuí had more leaves without symptoms.

As expected, the disease occurred with less intensity on leaves without injury, however, it is not necessary to cause injury to leaves to obtain sufficient symptom severity to observe variability in the population. Moreover, this practice can indicate a possible susceptibility in resistant plants that may cause confounding factors in selection.

### **Evaluation of selected populations**

The populations selected for susceptibility could be distinguished from the populations selected for resistance after one cycle of selection by orthogonal contrasts ( $P < 0.05$ ), (Figure 1). These results confirm the effectiveness of the methodology. The original populations and the resistant populations averaged 34% and 28% damage, respectively, without differentiating.

Out of all populations evaluated Jacuí-S showed the highest susceptibility to disease with 46.8% diseased leaf area, differentiating from Jacuí-R and Jacuí (Figure 2). The populations UFRGS-R, Jacuí-R, and Jacuí did not differentiate among themselves, all averaging about 28%. The increased susceptibility of UFRGS-2004-2 in relation to Jacuí corroborates the results obtained in the previous inoculation.

After one cycle of selection, it was verified that there is genetic variability for this trait in both cultivars. Genetic variability has also been observed in populations of white clover for resistance to *Cymadothea trifolii*, *Pseudopeziza trifolii* (Burdon, 1980) and *Macrophomina phaseolina* (Pederson et al. , 2000) .

Pederson & Pratt (1995) and Pedersen et al. (2000) found that drought tolerant cultivars showed higher resistance to diseases compared with other genotypes. According to Pederson & Pratt (1995), pathogenic fungi may reduce the survival of stolons during dormancy in summer, and increased resistance to fungal diseases may be part of the survival mechanism of drought tolerant plants. Jacuí was evaluated for two years along with UFRGS-2004-2 and 22 progenies of white clover selected for drought tolerance (Schneider et al., 2011) and showed greater persistence and productivity in relation to UFRGS-2004-2 after the summer, greatly increasing its production during the second year of assessment. The results for disease resistance corroborate with the findings of Pederson & Pratt (1995), since Jacuí had greater resistance. This link between persistence through drought and disease resistance highlights the importance of studying white clover diseases in Southern Brazil, since persistence is a major obstacle for the species.

The first symptoms were observed about six days after inoculation. These appeared as discolored, yellowish spots, passing after a short time to brown spots with tissue death (Figure 3). Two weeks after inoculation many leaves were already completely killed. Although the severity of disease in white clover may be diminished due to the frequent emergence of new leaves in favorable conditions (Nelson & Campbell 1993), the occurrence of the disease was severe in the inoculated plants.

In Brazil, there is no information about the occurrence or effects of *C. trifolii* in pastures. Nelson & Campbell (1992) described a severe infestation of *C. trifolii* in pastures in a region of North Carolina, USA, during the summer. The present study reports that the pathogen is found infecting white clover in Rio Grande do Sul. In Southern Brazil, the favorable climate for the spread of this pathogen (hot and humid)

occurs mainly in late spring and early summer, the period preceding the critical stage for the persistence of white clover. According to Nelson & Campbell (1993) defoliation caused by diseases in periods of unfavorable climate for the growth of white clover contributes to decrease in production, debility, and death of the plant. Therefore, it is possible that this disease, associated with others, causes harm to the productivity and persistence of white clover in the pastures of Rio Grande do Sul.

This work represents the first selection for disease resistance in white clover in Brazil. The results were encouraging, after one cycle of selection resistant populations differentiated from susceptible populations, showing the high degree of variability that can be exploited in this species to develop resistant cultivars.

More studies are needed to identify pathogens and to quantify damage caused by them, not only in white clover, but in all major forage species used. Once this damage is quantified it is likely that more efforts will be made to mitigate the negative effects through disease control, pasture management and, most importantly, selection of cultivars with greater resistance. This measure is important to maintain and improve the quality and productivity of pastures used in Rio Grande do Sul.

### **Acknowledgements**

Capes, Forage Department and Phytopathology Department of UFRGS supported this work.

**Identificação da doença foliar causada por *Curvularia trifolii* (Kauff.) Boedijn e seleção para resistência em duas cultivares de trevo-branco**

RESUMO - No Sul do Brasil, não existem informações sobre doenças em trevo-branco. No entanto, sintomas de doenças fúngicas podem ser observados a campo. Devido à importância do assunto e à limitação de informação disponível, o objetivo do trabalho foi identificar algumas doenças foliares que ocorrem no trevo-branco no Rio Grande do Sul e verificar a variabilidade genética para resistência em duas cultivares. *Curvularia trifolii* e *Cymadothea trifolli* foram identificadas e *Curvularia trifolii* foi utilizada para verificar a variabilidade do trevo-branco para resistência. Plantas das cultivares Jacuí e UFRGS-2004-2 foram inoculadas e plantas suscetíveis e resistentes foram selecionadas. As populações F<sub>1</sub> e as originais foram inoculadas e comparadas. As populações suscetíveis puderam ser distinguidas das populações resistentes e originais. Neste estudo foi possível identificar a doença causada por *Curvularia trifolii* e após um ciclo de seleção variabilidade genética para resistência foi observada em Jacuí e UFRGS 2004-2.

Palavras-chave: *Trifolium repens*, mancha foliar, fungo

## References

- Burdon JJ (1980) Variation in disease-resistance within a population of *Trifolium Repens*. **Journal of Ecology** **68**: 737-744 .
- Duke JA (1981) **Handbook of legumes of world economic importance**. Editora Plenum Press, New York, 345p.
- Haggar RJ, Clements RO, Carr AKH and Peel S (1984). In: Williams RD (Ed.). **Crop protection handbook—grass and clover swards**. The Lavenham Press Ltd, Lavenham, UK.
- Jahufer MZZ (1991) National white clover improvement programme Newsletter 5. **NSW Agriculture. Sydney, 1991**.
- Latch GCM and Skipp RA (1987) Diseases. In: MJ Baker and WM Williams (eds.) **White clover**. CAB Wallingford. p. 421-460.
- Leath KT (1985) Clover Science and Technology. **Agronomy Monograph No. 25**. Editora American Society of Agronomy, Madison, p. 205-233.
- Leath KT, Welty RE, Pratt RG, Sonoda RM (1996) Pasture/forage crops and diseases in the United States. **Pasture and Forage Crop Pathology**, Miscellaneous Publication: 33-58.
- Nelson SC and Campbell CL (1992) Incidence and patterns of association of pathogens in a leaf spot complex on white clover in the Piedmont region of North Carolina. **Phytopathology** **82**: 1013-1021.
- Nelson SC and Campbell CL (1993) Disease progress, defoliation, and spatial pattern in a multiple-pathogen disease complex on white clover. **Phytopathology** **83**: 419-429.
- Pederson GA, Pratt RG and Brink GE (2000) Response to Leaf Inoculations with *Macrophomina phaseolina* in White Clover. **Crop Sci.** **40**: 687–692.
- Pederson GA and Pratt RG (1995) Differential Summer Survival of White Clover Stolons: Germplasm and Fungicide Effects. **Crop Sci.** **35**: 1282-1287.
- Schneider R, Dall’Agnol M, Montardo DP, Pereira EA, Martins JJ, Saraiva KM and Tafernaberrri Júnior V (2011) Avaliação agrônômica de progênies de policruzamento de trevo-branco (*Trifolium repens* L.) em dois locais do Rio Grande do Sul. **Rev. Brasileira de Zootecnia**: 1879-1885.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Skipp RA and Lampert MG (1984) Damage to white clover foliage in grazed pastures caused by fungi and other Organisms. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, **27**: 313-320.

Woodfield DR and Caradus JR (1994) Genetic improvement in white clover representing six decades of plant breeding. **Crop Science** **34**: 1205-1212.

Table 1. Average severity of lesions on white clover leaves with and without injury of Jacuí and UFRGS-2004-2 inoculated with *Curvularia trifolii* (Kauff.) Boedijn.

	Leaf lesion (%)	
	With injury	Without injury
UFRGS-2004-2	45,2 a	17,4 A
Jacuí	24,6 b	4 B

\*Means within columns with different letters are significantly different ( $P < 0.01$ ) based on T-test.

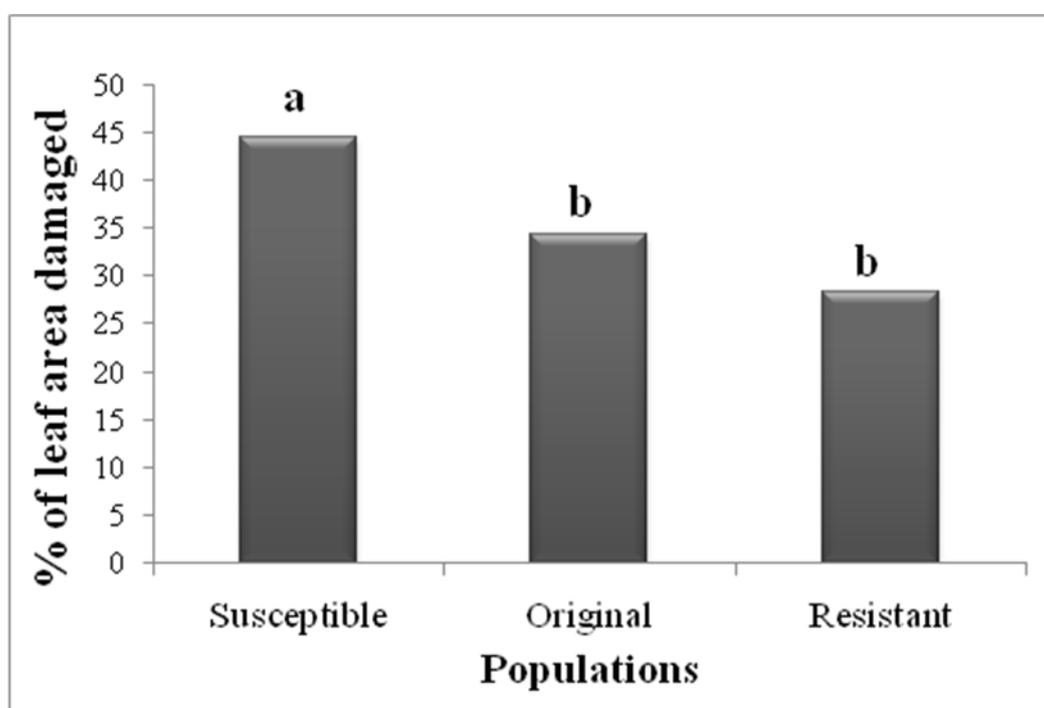


Figure 1. Average percentage of leaf-area damaged by disease in white clover populations selected for resistance (Jacuí-R and UFRGS-R), susceptibility (Jacuí-S and UFRGS-S) and the original populations (Jacuí and UFRGS-2004-2) inoculated with *Curvularia trifolii* (Kauff.) Boedijn, after one cycle of selection.

\* Letters indicate differences by orthogonal contrasts ( $P < 0,05$ ).

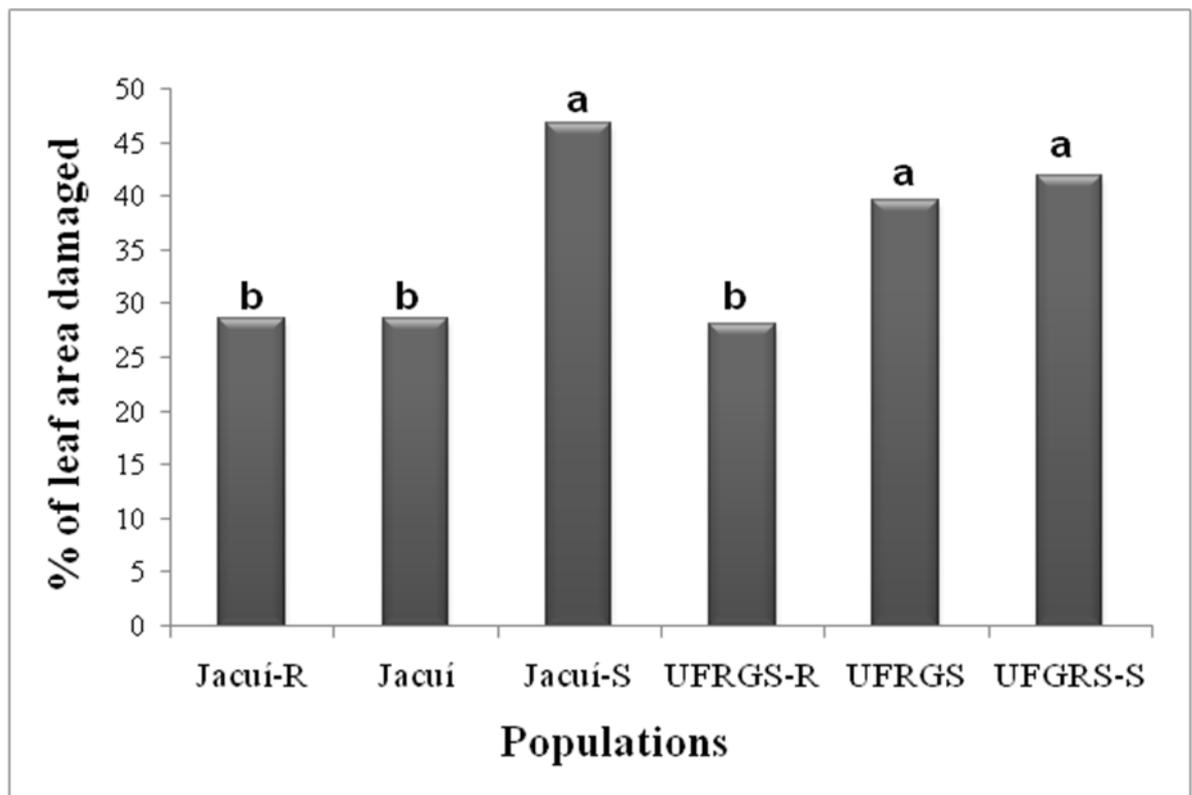


Figure 2. Average percentage of leaf-area damaged by disease in white clover populations Jacuí-S, Jacuí-R, UFRGS-S, UFRGS-R, Jacuí and UFRGS-2004-2 inoculated with *Curvularia trifolii* (Kauff.) Boedijn, after one cycle of selection.

\* Letters indicate differences by orthogonal contrasts ( $P < 0,05$ ).

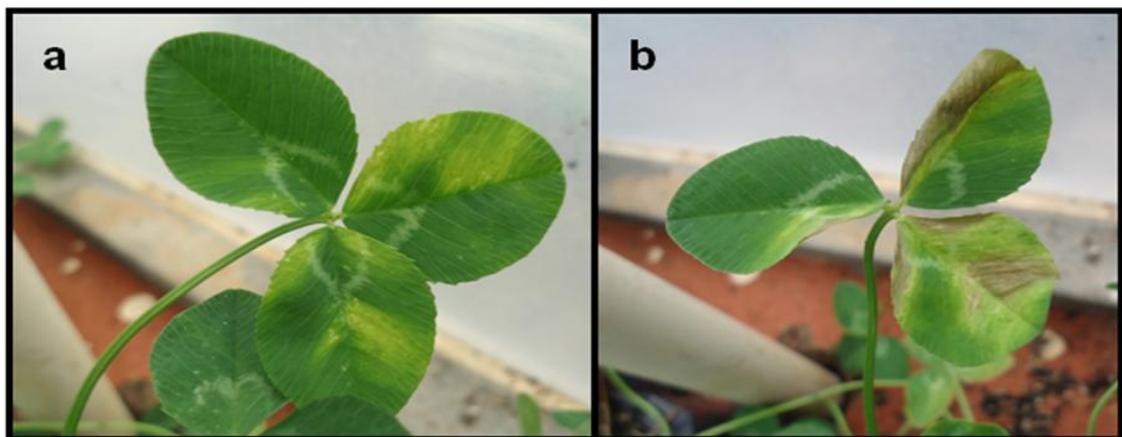


Figure 3. White clover leaf inoculated with *Curvularia trifolii* (Kauff.) Boedijn. a) The first symptoms of the disease; b) symptoms after one day.

## **CAPÍTULO III**

### **SELECTION IN WHITE CLOVER POPULATIONS FOR ALUMINUM TOLERANCE USING GEL MEDIA**



### **Selection in white clover populations for aluminum tolerance using gel media<sup>1</sup>**

ABSTRACT - The objective of this study was to adapt a recently developed method of selection for Al tolerance in gel media to white clover and use it to select for Al tolerance in white clover populations that have been evaluated for agronomic characteristics in Southern Brazil. In order to determine the most appropriate Al concentration five different combinations of pH and Al were tested. Pre-germinated seeds were placed in the media, and root growth was monitored daily. The media containing 1200  $\mu\text{M}$  of Al made it possible to discriminate seedlings with symptoms of sensitivity and tolerance more easily. Seedlings of populations 6-Bage and 33-Ireland were selected for tolerance and sensitivity to Al. The original populations were compared with the  $F_{1s}$  under the same experimental conditions used in selection. After one cycle of selection, it was possible to distinguish the different populations. The method used was effective in selecting for Al tolerance.

Key words: *Trifolium repens*, Al, root length

-----  
<sup>1</sup> Artigo redigido pelas normas da revista Crop Breeding and Applied Biotechnology-CBAB.

## Introduction

Aluminium (Al) toxicity is one of the major constraints on crop productivity in acid soils, which occur in up to 40% of the arable lands of the world (Kochian, 1995). Al is the third most abundant element in the earth's crust and is toxic to plants when solubilised into soil solution at acidic pH values (Kochian, 1995). Most Al is chelated by ligands or is present in non-toxic forms, such as aluminosilicates or precipitates. Al-induced toxicity can occur through solubilization of Al in soils under highly acidic conditions (pH below 5.0) (Famoso et al., 2010). Al toxicity is considered a primary limiting factor in regard to agricultural productivity (Matsumoto, 2000) because it inhibits root growth and mineral absorption (Liu & Luan, 2001), leading to a stunted root system that negatively impacts the uptake of water and nutrients. Al toxicity primarily affects the division and elongation of the root apex. When Al penetrates into the roots, it binds to the negatively charged phospholipids in the plasma membrane leading to rigidification, disruption of membrane function and intensification of oxidative stress (Jones et al., 2006).

Acid precipitation and intensive agricultural practices such as overuse of ammonia fertilizers accelerate the natural process of soil acidification, especially in tropical and subtropical regions (Rao et al., 1993). This acid soil problem includes toxic levels of Al, manganese (Mn), and iron (Fe), as well as deficiencies of several essential mineral elements, with phosphorus (P) being the major limiting nutrient in acid soils (Kochian et al., 2004). Although liming of acid soils can ameliorate soil acidity, this is neither an economic option for poor farmers nor an effective strategy for alleviating subsoil acidity (Kochian et al., 2004). Fortunately, genetic variation for Al tolerance can

be exploited in breeding programs to improve sustainable production on acid soils (Caniato et al., 2011).

White clover (*Trifolium repens* L.) is used in Southern Brazil mainly in mixtures with grasses. Despite its use, this species is known to have low persistence during the summer months in regions where high temperatures and low water availability occur (Paim & Riboldi 1994). Most of the soils in the Rio Grande do Sul (Southern Brazil) have low pH (Drescher et al., 1995), toxic levels of Al and Mn, and P deficiency, which can further diminish the persistence of white clover (Nabinger, 1980). Initial establishment is especially critical for white clover in these soils with low pH (Caradus et al., 1987). Al toxicity also restricts the distribution, growth and vegetative persistence of white clover making pH a limiting factor for the species (Voigt et al., 1997).

Tolerant plants can be identified by physiological tests (Ma et al., 2004; Ma et al., 1997). This approach is inexpensive and generally provides a reliable measure of tolerance (Wang et al., 2006). White clover has been selected for Al tolerance in soil (Caradus, et al. 1987; Dodd et al., 1992; Voight & Staley, 2004) and solution (Caradus, et al., 1987). The selection in soil, usually, takes more time and the main problem is obtaining adequate soils, because Al toxicity is not the only limiting factor.

Recently, Khu et al. (2012) developed two rapid whole-plant assays, one in culture media and one in soil, to evaluate acid and Al tolerance in alfalfa. Both methods produced similar results, consistently distinguishing between Al-sensitive and Al-tolerant alfalfa genotypes. According to the authors, some advantages of the assay in media are that it allows visualization of root growth for the duration of the assay and

because plants are grown in growth chambers, this method permits careful control over growing conditions, facilitating comparison of phenotypic evaluations. The objective in this study was to adapt the assay in media developed by Khu et al. (2012) to white clover and after that, to carry out a screening for Al tolerance in two white clover populations that have been evaluated for agronomic traits in Southern Brazil.

## **Materials and methods**

### **Plant material**

Seeds from the UFRGS-2004-2 white clover cultivar were used for the determination of Al concentration appropriate for the tests. This germplasm was selected by the Department of Forage and Agrometeorology of the “Universidade Federal do Rio Grande do Sul”, RS – Brazil, and it is adapted to the climate conditions of Southern Brazil.

The selection for Al tolerance was performed in two accessions, one obtained from the USDA collection, named 33-Ireland and the other from Brazil, named 6-Bagé. The 33-Ireland population is from the USDA white clover core collection while the 6-Bagé population was collected in a pasture that has been used for many years at EMBRAPA-CPPSUL, RS – Brazil. Both populations have been evaluated in Southern Brazil showing good agronomic traits (Bortolini et al., 2006, Schneider et al., 2011).

### **Determination of Al concentration**

The CaCl<sub>2</sub> media used in this work was used to evaluate Al tolerance in alfalfa as described by Khu et al. (2012). To make the media 200 µM (µmol L<sup>-1</sup>) of CaCl<sub>2</sub>

(CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) was added to 'ultrapure' water "Type 1"(Milli Q). Then the pH was adjusted using HCl and/or KOH to obtain finished media with pH 4.0 and 7.0 as described by Khu et al. (2012). Gelzan (product number G3254, PhytoTecnology Laboratories, Shawnee Mission, KS) was added for solidification before the media was autoclaved at 120°C for 15 min. Stock AlCl<sub>3</sub> (AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) solution with different concentrations was prepared by filter sterilization and added to the CaCl<sub>2</sub> media before solidification. The media was manually dispensed into 500 mL plastic containers, around 250 mL in each container. The media pH and Al concentrations were: pH 7.0 without Al (pH 7), pH 4.0 without Al (pH 4), pH 4.0 and 400 µM of AlCl<sub>3</sub> (400 Al), pH 4.0 and 800 µM of AlCl<sub>3</sub> (800 Al), pH 4.0 and 1200 µM of AlCl<sub>3</sub> (1200 Al).

The UFRGS-2004-2 seeds were scarified with 180 grit sand paper and sterilized using 70% ethanol for 3 min, washed three times for 3 min with sterile double-distilled water followed by a 30% Clorox bleach solution for 1 min and then washed three times for 3 min with sterile double-distilled water. After sterilization the seeds were spread in Petri dishes on moistened paper towel and kept refrigerated for 48 h and then left to germinate during 24 h in a growth chamber at 25°C. The germinated seeds, having around 1-3 mm of root, were placed in the CaCl<sub>2</sub> media for 16 days.

The experiment consisted in five treatments with three replications, containing 16 plants in each replication. The statistical design was completely randomized. All the plants were labeled and pictures of each plant were taken during the first 15d of the experiment. After 16d of growth plants were removed from the media, rinsed with water and gently blotted on paper towels to remove remaining media and moisture. The plants were scanned using an image scanner (Epson) at 300 dots per inch (DPI). All the plants from the same replication were labeled and scanned together and images were saved as

tagged image file format (TIFF) files. The total root length of each plant was determined using the WinRhizo software (Regent Instruments Incorporation, 1997). Analysis of variance was performed using SAS software V. 9.1 (SAS Institute, 2007). Treatment means were separated using Fischer's protected LSD, with significance assessed at the 5% probability level.

### **Selection for Al tolerance**

Seeds from both white clover populations (33-Ireland and 6-Bagé) were scarified and sterilized as described before. Around 425-450 germinated seeds each population were placed to grow in 1200 Al media. There were 25 plants per container and after 12d of growth two or three plants with the longest roots were visually selected as tolerant and the plants apparently more sensitive were also selected. Each population was composed of 36 plants (around 8% selection pressure). The selected plants were transferred to MS media (Murashige & Skoog, 1962) and later transferred to pots in the greenhouse.

In another procedure, thirty-six plants of each original population were germinated and transferred to pots in the greenhouse to increase the amount of seed.

The populations with one cycle of selection for tolerance (6-Bagé-T and 33-Ireland-T), sensitivity (6-Bagé-S and 33-Ireland-S) and the original populations (6-Bagé and 33-Ireland) were maintained in the greenhouse until flowering. Each population was crossed by bees inside of bee-cages for two weeks. The F<sub>1</sub> seeds were manually harvested, cleaned and kept for further experiments.

### **Evaluating of the selected populations**

The six white clover populations (6-Bagé-T, 33-Ireland-T, 6-Bagé-S, 33-Ireland-S, 6-Bagé and 33-Ireland) were compared for Al tolerance in the same conditions used for selection.

Germinated seeds from the six populations were placed to grow in the 1200 Al media. Each treatment (populations) had five replications with 25 plants per replication in a completely randomized design. The plants were scanned after 10d of growth as described before. The total root length of each plant was measured using the WinRhizo software and the values of each population were submitted to analysis of variance. To verify the efficiency of the method the average values from the tolerant (6-Bagé-T and 33-Ireland-T), sensitive (6-Bagé-S and 33-Ireland-S), and original populations (6-Bagé and 33-Ireland) were also submitted to analysis of variance and compared. Treatment means were separated using Fischer's protected LSD, with significance assessed at the 5% probability level. The statistical analyses were performed using SAS software V. 9.1 (SAS Institute, 2007).

## **Results and Discussion**

### **Determination of Al concentration**

The statistical analysis indicated differences in white clover root length ( $P < 0.01$ ) from the second day of growth in media containing different concentrations of Al and pH (Table 1). Differences between treatments remained throughout the growing period, where the biggest root growth was observed in pH 7. The intermediate treatments (400 Al and 800 Al) did not differentiate. The smallest root development

occurred in media with the highest concentration of Al (1200 Al) and did not differentiate from at least one of the intermediate treatments on most days.

On the evaluation day (16th day) the treatment with pH 7 still had the largest root growth with 11.9 cm. The 1200 Al had the lowest root growth (4.7 cm) without differentiating from pH 4 and 400 Al (Table 1).

The development of the roots after 16 days of growth in four of the tested treatments can be seen in Figure 1. In the pH 7 treatment almost all seedlings showed good root development. In the 400 Al and 800 Al treatments the development was similar, and the root growth of several seedlings appeared to not have been affected by Al. Finally, in the 1200 Al treatment only four seedlings had above average growth (4.7 cm). Out of these four, three plants had a root length of about 6 cm, the most pronounced having 15.4 cm, more than twice as large as the other three.

It is known that the primary symptom of toxic Al is the inhibition of root growth. The faster responses to Al toxicity are cell expansion and elongation, also inhibition of cell division in periods over 24h (Matsumoto, 2000). In limed acidic soils the roots of white clover seedlings grew 55 % faster during the first 15 days of growth than in untreated acidic soils (Brauer et al., 2002). This effect of low pH and Al on root growth was visible in the white clover seedlings grown in media from the second day. Caradus et al. (1987) found that white clover germination was relatively insensitive to Al concentration. However, higher Al concentrations significantly reduced root elongation on day 4, around 80%. In this study the reduction in root growth after 4 days was 70% and on evaluation day, 60%, in the 1200 Al treatment.

After inhibition of root growth is perceived by the plant the formation of new lateral roots is promoted by a change in cell pattern in the distal elongation zone (Poschenrieder et al., 2008). This symptom was shown by further branching with lower seedling root growth. Other typical symptoms of Al toxicity such as swelling and brownish roots were also observed, particularly in 1200 Al media. The 1200 Al treatment had the most restricted root growth, making it possible to discriminate between seedlings with symptoms of sensitivity and tolerance more easily. Root growth inhibition has become a widely accepted measure of Al toxicity in plants (Alvim et al., 2013). Because of this, the 1200 Al treatment was selected to perform the selection for tolerance and sensitivity in the two populations.

### **Evaluation of selected populations**

The statistical analysis showed differences ( $P < 0.05$ ) between the populations and differentiated populations selected for sensitivity and Al tolerance (Figure 2). Tolerant populations had an average root length of 5.5 cm, 22% higher than the sensitive. The original populations did not differ from sensitive and tolerant with an average root growth of 4.91 cm. The coefficient of variation was 16.84%.

After one cycle of selection it was possible to separate the population 33-Ireland-T and 33-Ireland from the population 33-Ireland-S ( $P < 0.01$ ) (Figure 3). The average root length of 33-Ireland-T (5.0 cm) was comparable to 6-Bage and 6-Bage-S. There were no differences among the populations selected from population 6-Bage. These populations are apparently more tolerant than 33-Ireland.

The population 6-Bage originates from a collection aimed to select more persistent plants during the summer. It was taken from a field in Rio Grande do Sul,

Southern Brazil, after a period of drought. The area where it was collected was being grazed and white clover had been present for many years. It is likely that this population was going through a natural selection process for Al tolerance, since much of this state's soils are acidic (Drescher et al.,1995).

The population 33-Ireland belongs to the USDA core collection and its state of improvement is considered uncertain (Bortolini et al., 2006). This population is apparently more sensitive to Al, and showed greater variability when selected for this feature. Both populations have good agronomic characteristics in the climatic conditions of the State of Rio Grande do Sul (Bortolini et al., 2006, Schneider et al., 2011) and would be good choices for use in developing new cultivars with increased tolerance to Al.

This study aimed to find an effective method of selection for Al tolerance in white clover during the seedling stage. According to Voigt & Morris (1997) it is important to assess young plants for Al tolerance because : (1) establishment is a critical stage in the persistence of plants, (2) seedlings can be evaluated quickly and many individuals can be evaluated, and (3) less soil or no soil is used, as in the case of laboratory tests. According to Caradus et al. (1987), there would be little advantage in the selection and release of white clover cultivars tolerant to Al, if the plants were not able to establish in an environment with unfavorable conditions.

The other methods used to select and evaluate white clover for Al tolerance are time consuming, laborious ( Caradus et al., 1987; Dodd et al., 1992; Caradus et al., 2001) or produce unsatisfactory results (Voight & Staley, 2004)

The media assay methodology was effective in distinguishing alfalfa genotypes tolerant and sensitive to Al and it showed the same results as an experiment using soil (Khu et al., 2012). According to the authors the advantages of this method are that the root architecture can be observed during growth, it allows for methods of nondestructive evaluation and it enables strict control of the growth conditions. The advantage over hydroponics systems would be that the roots grow in a non-liquid media that holds exudates around the root zone.

The assay was fast (15 days), enabled the evaluation of a large number of seedlings (400-500) and allowed visualization and maintained the integrity of the roots. In using this method with white clover it was possible to reach satisfactory results after one cycle of selection, separating populations selected for tolerance and sensitivity and presenting variability among populations. This methodology should be used in the identification and selection of other populations already adapted to conditions in Southern Brazil, seeking to increase Al tolerance. The ultimate goal being the creation of cultivars with high yield potential and adaptation to unfavorable environments, including acid soils.

### **Acknowledgements**

Capes, UFRGS and the Samuel Roberts Noble Foundation supported this work.

### **Seleção em populações de trevo-branco para tolerância ao alumínio em meio gel**

RESUMO - O objetivo do trabalho foi adaptar para o trevo-branco um método de seleção para tolerância ao Al em meio gel, recentemente desenvolvido. Em seguida, realizar uma seleção para tolerância ao Al em populações de trevo-branco que têm sido avaliadas para características agronômicas no sul do Brasil. Para determinar a concentração de Al mais adequada cinco combinações de Al e pH foram testadas. Sementes pré-germinadas foram postas nos diferentes meios e o crescimento radicular foi monitorado diariamente. O meio contendo 1200  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  possibilitou discriminar plântulas com sintomas de sensibilidade e tolerância mais facilmente. Plântulas das populações 6-Bagé e 33-Irlanda foram selecionadas para tolerância e sensibilidade ao Al. As populações originais foram comparadas com as selecionadas  $F_{1s}$  para tolerância ao Al nas mesmas condições experimentais utilizadas na seleção. Após um ciclo de seleção, foi possível distinguir as populações divergentes. O método utilizado foi eficaz na seleção para tolerância ao Al.

Palavras-chave: *Trifolium repens*, Al, comprimento de raiz

## References

- Alvim MN, Ramos FT, Oliveira DC, Isaias RMS and França MGC (2012) Aluminium localization and toxicity symptoms related to root growth inhibition in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **J. Biosci.** **37**: 1079–1088.
- Bortolini F, Dall' Agnol M, Schifino-Wittman MT, Trevisan M, Vieira VM, Scheffer-Basso SM and Montardo DP (2006) Caracterização morfológica e agronômica e divergência genética em germoplasma de trevo-branco. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia** **35**: 1601-1610.
- Brauer D, Ritchey D and Belesky D (2002) Effects of lime and calcium on root development and nodulation of clovers. **Crop Sci.** **42**: 1640-1646.
- Caniato FF, Guimarães CT, Hamblin M, Billot C, Rami J-F, et al. (2011) The relationship between population structure and aluminum tolerance in cultivated sorghum. **Theor Appl Genet** **114**: 863–876.
- Caradus JR, Crush JR, Ouyange L, Fraser W (2001) Evaluation of aluminium-tolerant white clover (*Trifolium repens*) selections on East Otago upland soils. **New Zealand Journal of Agricultural Research** **44**: 141-150.
- Caradus JR, Mackay AD and Pritchard MW (1987) Towards improving the aluminium tolerance of white clover. **Proc. N. Z. Grassl. Assoc** **48**: 163-169.
- Dodd MB, Orr SJ and Jackson BLJ (1992) Soil aluminium, phosphate, and moisture interactions affecting the growth of four white clover (*Trifolium repens* L.) lines. **N.Z.J. Agric. Res** **35**: 411-422.
- Drescher M, Bissiani CA, Giasson E, Tedesco MJ and Gianello (1995) Avaliação da fertilidade dos solos do estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. DS/UFRGS. 24p **Boletim Técnico de Solos** **7**
- Famoso AN, Clark RT, Shaff JE, Craft E, McCouch SR, Kochian LV (2010) Development of a novel aluminum tolerance phenotyping platform used for comparisons of cereal aluminum tolerance and investigations into rice aluminum tolerance mechanisms. **Plant Physiol** **153**: 1678-1691.
- Jones DL, Blancaflor EB, Kochian LV and Gilroy S (2006) Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. **Plant, Cell & Environment** **29**: 1309–1318.
- Khu D, Reyno R, Brummer EC and Monteros MJ (2012) Screening methods for aluminum tolerance in alfalfa. **Crop Science** **52**: 161-167.
- Kochian LV (1995) Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants.

**Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** **46** : 237-260.

Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A. (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annu. Rev. Plant Biol.** **55**: 459–93.

Liu K & Luan S (2001) Internal Al Block of plant inward K<sup>+</sup> channels. **The Plant Cell** **13**: 1453–1466.

Ma JF, Hiradate S, Nomoto K, Iwashita T and Matsumoto H (1997) Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea. **Plant Physiol.** **113**: 1033-1039.

Ma JF, Nagao S, Sato K, Ito H, Furukawa J, Tekeda K (2004) Molecular mapping of a gene responsible for Al-activated secretion of citrate in barley. **J Exp Bot** **55**: 1335-1341.

Matsumoto H. (2000) Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **International Review of Cytology** **200**: 1–46.

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant** **15**: 473–797.

Nabinger, C. (1980) Técnicas de melhoramento de pastagens naturais do Rio Grande do Sul. In: **Seminário Sobre Pastagens**: “De que pastagens necessitamos” Porto Alegre: FARSUL, 1980. p. 28-58.

Paim NR and Riboldi J (1994) Duas novas cultivares de trevo-branco comparadas com outras disponíveis no Rio Grande do Sul, em associação com gramíneas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **29**: 43-53.

Poschenrieder C, Gunsé B, Corrales I and Barceló J (2008) A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. **Science of the Total Environment** **400**: 356–368.

Rao IM, Zeigler RS, Vera R, and Sarkarung S (1993) Selection and breeding for acid-soil tolerance in crops. **BioScience** **43**: 454–465.

Regent Instruments Incorporation. (1997) WinRhizo version 2009a: Root morphology and architecture measurement. **Regent Instruments**, Québec, QC, Canada.

SAS Institute. 2007. Version 9.1. SAS Inst., Cary, NC.

Schneider R, Dall’Agnol M, Montardo DP, Pereira EA, Martins JJ, Saraiva KM and Tafernaberrri Júnior V (2011) Avaliação agrônômica de progênies de policruzamento de trevo-branco (*Trifolium repens* L.) em dois locais do Rio Grande do Sul. **Rev. Brasileira de Zootecnia**: 1879-1885.

Voigt PW, Morris DR and Godwin HW (1997) A soil-on-agar method to evaluate acid-soil resistance in white clover. **Crop Science** **37**: 1493-1496.

Voigt PW and Staley TE (2004) Selection for aluminum and acid-soil resistance in white-clover. **Crop Science** **44**: 38-48.

Wang JP, Raman H, Read B, Zhou MX, Mendham NJ and Venkatanagappa, S (2006) Validation of an Alt locus for aluminium tolerance scored with eriochrome cyanine R staining method in barley cultivar Honen (*Hordeum vulgare L.*). **Aust. J. Agric. Res** **57**: 113-118.

Table 1. White clover root length (cm) in media containing different concentrations of Al and pH during the first 15 days of growth and evaluation day.

	pH 7	pH 4	pH 4	pH 4	pH 4
	0 Al	0 Al	400 Al	800 Al	1200 Al
Day 1 <sup>NS</sup>	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3
Day 2 <sup>**</sup>	0,6 a	0,4 b	0,4 b	0,4 bc	0,3 c
Day 3 <sup>**</sup>	0,9 a	0,5 b	0,5 b	0,5 b	0,3 c
Day 4 <sup>**</sup>	1,3 a	0,7 b	0,6 bc	0,6 c	0,4 d
Day 5 <sup>**</sup>	1,8 a	0,9 b	0,9 b	0,8 bc	0,6 c
Day 6 <sup>**</sup>	2,3 a	1,2 b	1,1 b	1,1 b	0,8 c
Day 7 <sup>**</sup>	2,9 a	1,4 b	1,2 bc	1,4 b	0,9 c
Day 9 <sup>**</sup>	4,2 a	2,1 b	1,9 bc	2,2 b	1,3 c
Day 10 <sup>**</sup>	5,0 a	2,6 b	2,2 bc	2,7 b	1,5 c
Day 11 <sup>**</sup>	5,7 a	3,0 b	2,7 bc	3,3 b	1,8 c
Day 12 <sup>**</sup>	6,5 a	3,8 b	3,3 bc	4,0 b	1,9 c
Day 13 <sup>**</sup>	7,2 a	4,5 b	3,9 bc	4,6 b	2,5 c
Day 14 <sup>**</sup>	8,0 a	5,4 b	4,7 bc	5,7 b	2,8 c
Day 15 <sup>*</sup>	8,7 a	5,9 b	5,3 bc	6,3 ab	3,3 c
Evaluation Day <sup>**</sup>	11,9 a	8,3 bc	7,9 bc	10,2 b	4,7 c

NS = No significant. \*Significant  $P < 0.05$ . \*\*Significant  $P < 0.01$ . Means within rows with different letters are significantly different at  $P < 0.05$  based on LSD.

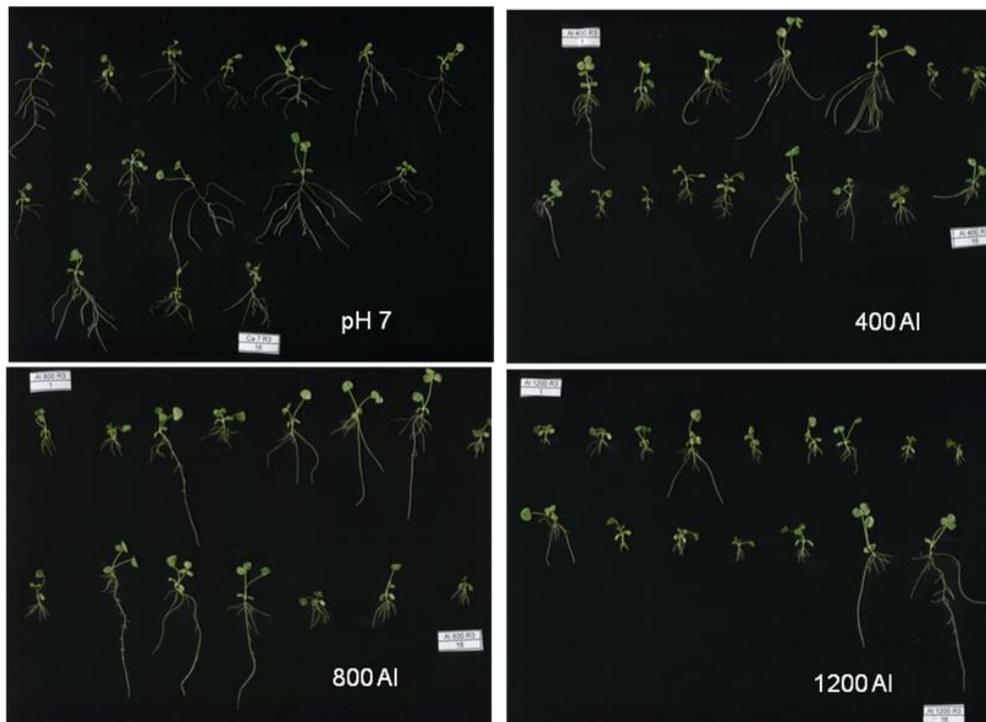


Figure 1. White clover seedlings after 16 days of growth in media at pH7 without Al, pH 4 with 400 $\mu$ M of AlCl<sub>3</sub>, pH 4 with 800 $\mu$ M of AlCl<sub>3</sub>, and pH 4 with 1200 $\mu$ M of AlCl<sub>3</sub>. \*These plants are from the third replication.

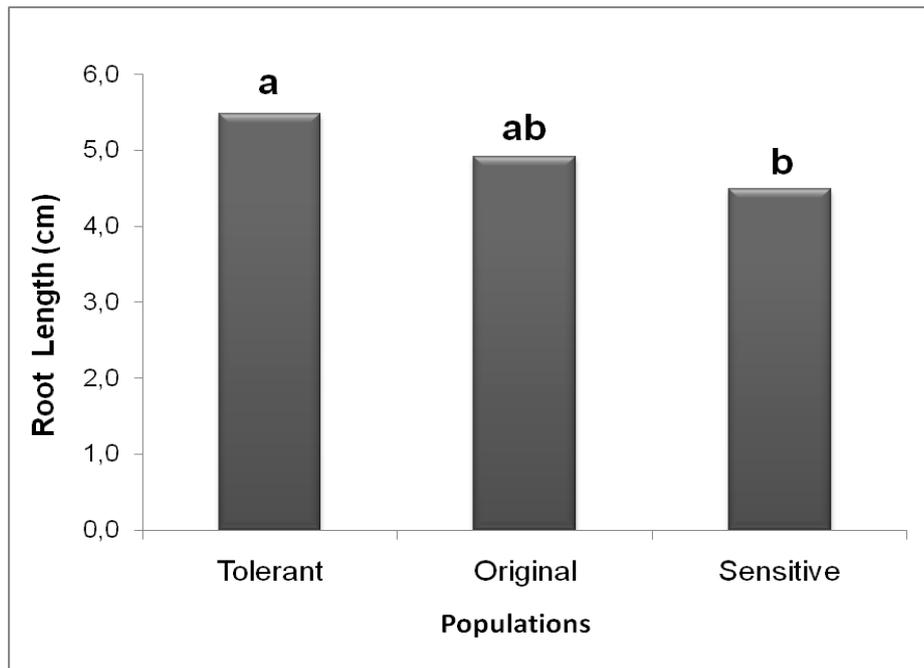


Figure 2. Average root length of white clover populations selected for tolerance (6-Bagé-T and 33-Ireland-T) and sensitivity (6-Bagé-S and 33-Ireland-S) to AI and the original populations (6-Bagé and 33-Ireland) after 10 days of growth in 1200 AI media. \*Letters indicate differences based on LSD ( $P < 0.05$ ).

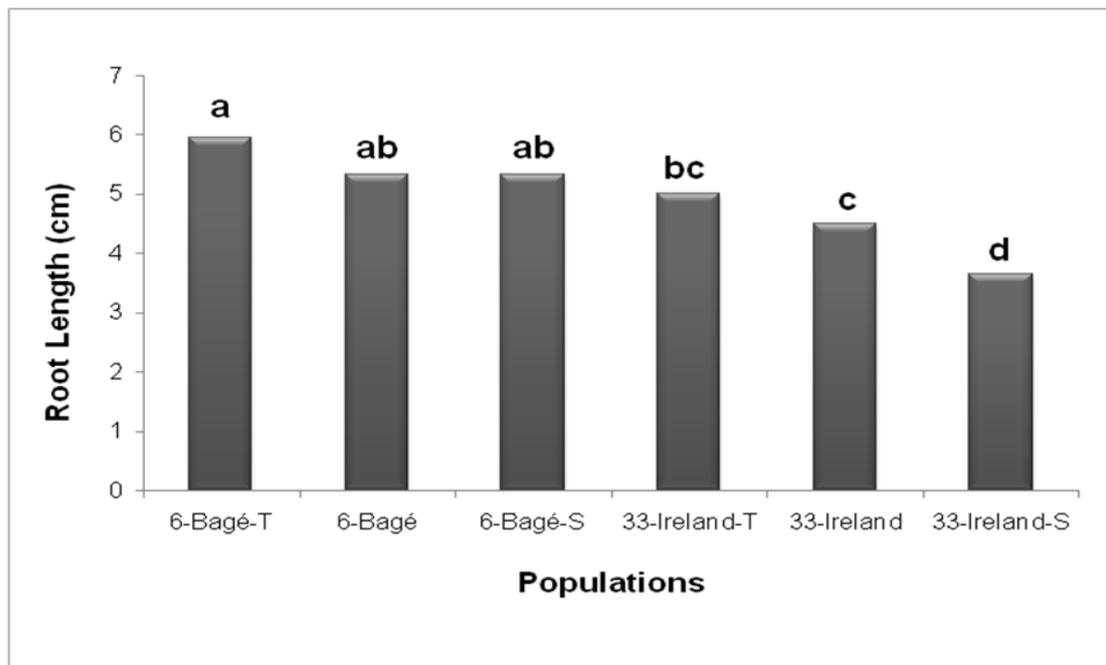


Figure 3. Average root length of white clover populations 6-Bagé-S, 6-Bagé-T, 6-Bagé, 33-Ireland-S, 33-Ireland-T and 33-Ireland after 10 days of growth in 1200 AI media.

\* Letters indicate differences based on LSD ( $P < 0.05$ ).

## **CAPÍTULO IV**

### **SELEÇÃO DE POPULAÇÕES DE TREVO-BRANCO TOLERANTES AO ALUMÍNIO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA**



## **Selection of white clover populations for aluminum tolerance in nutrient solution<sup>1</sup>**

ABSTRACT - The search for cultivars tolerant to toxic aluminum (Al) has been the most effective option to mitigate the problems brought on by acidic soils in agricultural production. Selections for Al tolerance in nutrient solution have been successfully used in birdsfoot trefoil and alfalfa in work carried out at “Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia” (DPFA), UFRGS. The objective of this work was to select white clover populations for aluminum tolerance in nutrient solution. Seeds of 24 populations that had high agronomic performance in previous work at DPFA were selected in nutrient solution containing  $AlCl_3$  ( $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ) and crossed to obtain  $F_{1s}$ . Six  $F_1$  populations and six original populations were compared in culture gel media. The analysis divided the populations into two groups. Two  $F_1$  populations from Brazil and an original population from Argentina performed the best and should be further studied.

Key Words: *Trifolium repens*, Al, tolerance, root length

---

<sup>1</sup> Artigo redigido pelas normas da revista Crop Breeding and Applied Biotechnology-CBAB.

## Introdução

Os solos ácidos determinam fortes limitações na produção agrícola, pois diminuem a disponibilidade de alguns nutrientes essenciais para as plantas e favorecem o surgimento de teores tóxicos de alumínio (Al) e manganês (Mn) na solução do solo (Delhaize & Ryan, 1995). No Rio Grande do Sul, 70% das amostras de solo apresentaram pH em água menor que 5,5, em levantamento que utilizou cerca de 60.000 amostras (Drescher et al., 1995). É provável, que atualmente muitos pontos tenham sido corrigidos, principalmente em áreas de lavoura, no entanto a acidez continua sendo um problema nas pastagens. O  $\text{Al}^{3+}$  em altas concentrações destaca-se como maior fator limitante em solos com baixo pH (Delhaize & Ryan, 1995).

O principal sintoma de toxidez por Al em plantas é a inibição do crescimento da raiz, resultando em redução e danos ao sistema radicular, podendo levar a deficiência mineral e estresse hídrico (Degenhardt et al., 1998). Este problema pode ser contornado por meio da correção dos solos ácidos, feita pela prática da calagem (Meurer et al., 2010). Entretanto, o uso de corretivos representa um acréscimo nos custos de produção e muitas vezes não é eficaz, pois, a capacidade corretiva, em geral, não ultrapassa as camadas superficiais do solo (Mascarenhas & Tanaka, 1995; Amaral et al., 2004). A opção que tem sido considerada mais promissora para contornar este problema é a exploração do potencial genético das plantas, uma vez que espécies, cultivares e variedades diferem amplamente quanto à tolerância ao excesso de alumínio no solo (Singh et al., 2011).

O trevo-branco (*Trifolium repens* L.) é uma leguminosa forrageira de inverno utilizada no Rio Grande do Sul no melhoramento de campo nativo e em pastagens, principalmente consorciadas com gramíneas. Entretanto, é conhecida por apresentar

baixa persistência durante os meses de verão (Paim & Riboldi 1994). Acredita-se que o problema da persistência do trevo-branco seja devido, principalmente, às altas temperaturas do verão e à baixa disponibilidade de água neste período (Paim, 1988). No entanto, pode ser agravado tanto pelos níveis tóxicos de Al e Mn como pela deficiência de fósforo, que caracterizam o solo de grande parte do Rio Grande do Sul (Nabinger, 1980). Em solos com baixo pH, o estabelecimento inicial das plântulas de trevo-branco é especialmente crítico, afetando também o estabelecimento, a dispersão e a persistência vegetativa, sendo um fator limitante para a espécie (Voigt et al. 1997; Caradus et al., 1987).

Plantas tolerantes podem ser identificadas avaliando características morfológicas, como crescimento radicular em ambientes contendo Al. Estes métodos são baratos e geralmente fornecem medidas confiáveis de tolerância (Wang et al., 2006). O trevo-branco tem sido selecionado em solo (Caradus, et al. 1987; Dodd et al., 1992; Voight & Staley, 2004) e solução nutritiva (Caradus, et al. 1987). A seleção em solo, geralmente, é mais demorada e o principal problema é a obtenção de solos adequados, pois a toxidez por Al não é o único fator limitante.

O método em solução nutritiva vem sendo utilizado com sucesso em trabalhos realizados no Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia (DPFA) da UFRGS – RS, visando a seleção de plantas tolerantes ao Al em outras leguminosas forrageiras como cornichão (Santos, 2009; Janke et al., 2010) e alfafa (Saraiva, 2011; Caetano, 1998). O método oferece várias vantagens, pois é rápido, mantém as raízes íntegras, possibilitando uma melhor análise do sistema radicular, além de permitir um controle rigoroso sobre a disponibilidade dos nutrientes e do pH (Hede et al., 2001).

O objetivo do trabalho foi selecionar populações de trevo-branco tolerantes ao Al em solução nutritiva, baseando-se no comprimento da raiz principal das plântulas. Neste estudo foram utilizadas populações de trevo-branco que já haviam sido avaliadas e que apresentaram alto desempenho agrônômico em trabalhos desenvolvidos anteriormente no DPFA da UFRGS.

## **Material e Métodos**

### **Local e material vegetal**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Análises Genéticas e nas casas-de-vegetação do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, localizada no município de Porto Alegre – RS.

Foram avaliados 24 acessos de trevo-branco (Tabela 1). Dentre estes, 20 acessos são oriundos da coleção nuclear de trevo-branco do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Estes acessos foram escolhidos por apresentarem maior produção de matéria seca em avaliação realizada por Bortolini et al. (2006). Os demais quatro acessos têm origem na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – CPPSUL, localizada em Bagé, na região fisiográfica da Campanha do Rio Grande do Sul. Estes acessos foram coletados após um período de estiagem, em pastagens que haviam sido implantadas há vários anos.

### **Seleção em solução nutritiva**

A seleção foi realizada entre os meses de outubro e novembro de 2010. A solução nutritiva utilizada era composta de água destilada, contendo 50  $\mu\text{M}$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )

de Al ( $\text{AlCl}_3$ ) e 200  $\mu\text{M}$  de Ca ( $\text{CaCl}_2$ ). A concentração 50  $\mu\text{M}$  de Al ( $\text{AlCl}_3$ ) foi utilizada por ser intermediária entre as concentrações utilizadas para a seleção de alfafa (8  $\mu\text{M}$  de Al) e cornichão (100  $\mu\text{M}$  de Al) (Saraiva, 2011; Janke et al., 2010), uma vez que o trevo-branco possui tolerância ao Al intermediária a estas duas espécies (Baligar et al., 1988, Caradus et al., 2001).

Após serem escarificadas com lixa nº180, cerca de 200-300 sementes de cada acesso foram postas para germinar em caixas do tipo “gerbox”, sobre papel toalha. As sementes foram umedecidas desde o primeiro dia com solução contendo 50  $\mu\text{M}$  de Al. As caixas foram mantidas em temperatura ambiente, sob luz natural.

As plântulas de trevo-branco foram mantidas nas caixas com solução contendo Al até o aparecimento da primeira folha trifoliolada. Neste estágio, foi avaliado o comprimento da raiz principal de cada plântula, onde foram selecionadas as 32 plântulas com maior comprimento de raiz de cada acesso. As plântulas selecionadas foram repicadas para bandejas de isopor contendo o substrato orgânico comercial (Carolina Soil do Brasil) e, posteriormente, colocadas em vasos.

### **Obtenção das sementes $F_1$**

As populações de plantas selecionadas foram mantidas em casa-de-vegetação durante o desenvolvimento vegetativo e floração, sob iluminação artificial, com o objetivo de estimular e manter o florescimento das plantas. A iluminação foi feita com lâmpadas alógenas de 150 W de potência, que permaneciam ligadas 16 h por dia. Algumas populações começaram a florescer em fevereiro de 2011 e o ápice de florescimento ocorreu entre maio e junho de 2011. Os cruzamentos foram realizados manualmente dentro de cada população.

As inflorescências contendo as sementes começaram a ser coletadas no fim do mês de julho de 2011, quando estavam totalmente senescentes. Estas foram secas, limpas e as sementes  $F_1$  foram identificadas e mantidas sob refrigeração até a próxima etapa de avaliação.

### **Comparação das populações selecionadas $F_1$ e populações originais**

O experimento foi desenvolvido durante os meses de outubro e novembro de 2013. Foram comparadas 12 populações sendo 6 populações originais e seis populações  $F_1$  (Tabela 2). Não foi possível comparar todas as populações que passaram pelo processo de seleção em solução, pois muitas destas não floresceram ou floresceram pouco, produzindo número insuficiente de sementes. Muitos dos acessos originais (ciclo 0) também possuem um número limitado de sementes, sendo necessário produzir mais sementes destes acessos antes de utilizá-los em mais avaliações.

Sementes de cada acesso foram escarificadas e esterilizadas em álcool, água e hipoclorito de sódio a 3%. As sementes esterilizadas foram postas em placas de *Petri* umedecidas com água destilada autoclavada e mantidas refrigeradas por 48 h. Após este período, foram colocadas em câmaras BOD com temperatura de 25 ° C e 16 h de luz por dia, para germinar durante 24 h.

Para o estudo de comparação das populações, a solução nutritiva usada na seleção foi substituída devido à dificuldade de manter a integridade das raízes no momento de serem retiradas das caixas para serem avaliadas. Neste experimento, foi utilizado um meio de cultura gel de  $\text{CaCl}_2$ , descrito por Khu et al. (2012) contendo 1200  $\mu\text{M}$  de Al ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) e 200  $\mu\text{M}$  de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). A composição do meio de cultura utilizado era água destilada, 1200  $\mu\text{M}$  de Al ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), 200  $\mu\text{M}$  de cálcio

(CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O), e o produto Gelzan (Sigma-Aldrich) para solidificar o meio. As sementes pré-germinadas, possuindo radículas entre 1-3 mm, foram colocadas para crescer em potes plásticos com 10 cm de diâmetro contendo o meio gel.

O delineamento do experimento foi completamente casualizado com três repetições e em torno de 7-10 de dez plântulas por repetição. Houve variação no número de plantas por repetição, pois algumas populações apresentaram baixa germinação e não foi possível obter-se 10 plantas em todas as repetições.

Os potes contendo as plantas foram mantidos em câmaras BOD, a uma temperatura de 25°C e 16 h de luz diária, durante dez dias. Após este período as raízes das plantas foram avaliadas, medindo-se o comprimento da raiz principal (CRP) e o comprimento das ramificações (CR) com o auxílio de uma folha milimetrada. O comprimento total de raiz (CTR) foi obtido somando-se o comprimento da raiz principal e das ramificações.

Foi realizada a análise de correlação de Pearson entre as variáveis de comprimento de raiz principal, comprimento de ramificações e comprimento total de raiz. Os valores para comprimento total de raiz foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knot a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no aplicativo computacional GENES (Cruz, 2001).

## **Resultados e Discussão**

### **Seleção de populações de trevo-branco em solução nutritiva**

Os valores médios obtidos para comprimento da raiz principal (CRP) das populações avaliadas e das 32 plântulas selecionadas em solução contendo Al são

apresentados na tabela 3. O CRP médio das plantas selecionadas foi de 5,9 cm, 61% maior que a média das populações originais que apresentaram 3,7 cm de CRP.

A maior população analisada possuía 194 plântulas e a menor 45, obtendo-se uma média de 134 plântulas por população. Somente foram contabilizadas as plântulas em que foi mantida a integridade da raiz para a mensuração. As plântulas de trevo-branco possuem radículas muito finas que facilmente quebravam no momento que eram retiradas do gerbox, pois penetravam no papel toalha utilizado para manter a solução contendo Al.

O baixo número de plântulas por população acarretou em uma baixa pressão de seleção (Tabela 3) com média de 27 %. Saraiva (2011) e Janke et al. (2009) utilizaram uma pressão de seleção de 10% para seleção de alfafa e cornichão, respectivamente, em solução nutritiva, enquanto que Santos (2009) selecionou 1% das plantas de cornichão na seleção em solo para tolerância ao Al. O progresso de seleção de plantas está intimamente ligado ao diferencial de seleção, isto é, a diferença entre a média do grupo selecionado e a média da população original. Portanto, numa seleção, quanto maior a pressão de seleção, maior será o diferencial (Paterniani & Miranda Filho, 1987). O número de plantas selecionadas foi estabelecido em torno de 30 para manter a variabilidade genética nas populações. O trevo-branco é de natureza alógama e altamente suscetível à depressão endogâmica (Woodfield & White, 1996), não sendo possível diminuir o número de plantas selecionadas para a formação das populações F<sub>1</sub>.

### **Avaliação das populações selecionadas e populações originais para tolerância ao Al**

No estudo de comparação das populações selecionadas com as populações originais, a análise estatística indicou diferenças significativas ( $P < 0,01$ ), possibilitando a formação de dois grupos pelo teste de Scott-Knot (Tabela 4).

O grupo com as maiores médias compreendeu duas populações  $F_1$  originadas do Brasil (17-Bagé- $F_1$ , 74-Brasil- $F_1$ ) e a população original 69-Argentina. As demais populações formaram o segundo grupo com médias de comprimento total de raiz variando entre 3,7-6,5 cm. Segundo a análise, pode-se dizer que dentre as populações analisadas, a seleção foi eficiente para as populações 17-Bagé e 74-Brasil. No entanto, não foi eficaz para a população 69-Argentina, onde a original apresentou maiores valores de CTR do que a selecionada e nas populações 20-Uruguai, 6-Bagé e 75-Uruguai, que não se diferenciaram. Conforme Caradus et al. (1987), rígidos critérios devem ser utilizados na primeira seleção para ser possível diferenciar plantas com superior tolerância ao Al de plantas com maiores taxas de crescimento de raiz. Os autores não obtiveram êxito na seleção de trevo-branco para tolerância ao Al em solução, sendo necessário um segundo ciclo de seleção para separar os grupos. Neste trabalho, além da baixa pressão de seleção, é possível que algumas plantas tolerantes não tenham sido selecionadas, devido à quebra das raízes que não permitiu a avaliação, apesar do grande cuidado empregado no momento de removê-las das caixas.

A análise indicou um coeficiente de correlação de 0,76 entre CRP x CTR (Tabela 5), enquanto que o comprimento de ramificação (CR) x CTR possui um coeficiente de correlação de 0,86. Apesar de o CRP estar altamente correlacionado com

CTR, plantas com maior ramificação nas raízes têm maior correlação com o CTR e maior capacidade de exploração do solo, sendo uma característica importante a ser avaliada (Lynch, 1995).

O método de seleção em solução nutritiva tem sido utilizado na seleção de alfafa (Saraiva, 2011) e cornichão (Janke et al., 2010) em trabalhos desenvolvidos no DPFA da UFRGS. Janke et al. (2010) obtiveram aumento de crescimento da raiz em solução contendo Al de até 10% após um ciclo de seleção e 16% após o segundo ciclo de seleção na população que apresentou maior tolerância ao Al. Saraiva (2011) obteve resultados positivos na seleção de alfafa tolerante ao Al em solução, sendo possível diferenciar as populações progenitoras das progênes após um ciclo de seleção. No entanto, nestes trabalhos, além da seleção ter ocorrido em grandes populações, as plantas foram mantidas em bandejas plásticas contendo 8 L de solução, sustentadas por telas coladas em isopor, o que possibilitou manter a integridade das raízes (Janke et al., 2010). Em futuras seleções no trevo-branco, em solução nutritiva, deveria ser testado outro material inerte com pequenas partículas para sustentar as plântulas, como plástico ou vidro.

Considerando os resultados obtidos na comparação das populações selecionadas com as originais, poderia ser vantajoso investir na seleção para tolerância ao Al nas populações 17-Bagé F1, 74-Brasil F1 e 69-Argentina, que se destacaram em relação as outras populações quanto o desenvolvimento das raízes em ambiente contendo Al. As duas populações originadas da coleção nuclear de trevo-branco (74-Brasil e 69-Argentina) estiveram entre os 20 acessos mais produtivos em estudo realizado por Bortolini et al. (2006). Já a população 17-Bagé foi coletada a campo após um período de estiagem, sendo provável que apresente características de maior tolerância à seca. As

demais populações que passaram pelo processo de seleção também devem ser comparadas quanto à tolerância ao AI, visando identificar as populações com maior aptidão para continuarem neste trabalho. A utilização de populações com alto desempenho agronômico na busca por tolerância ao AI torna possível a união de importantes características que podem aumentar a persistência e produção do trevo-branco em pastagens. A disponibilidade de cultivares mais eficientes e adaptadas é uma importante alternativa para manter a produtividade sem aumentar os custos com insumos.

### **Agradecimentos**

À CAPES pela concessão da bolsa e ao Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da UFRGS.

**Seleção de populações de trevo-branco tolerantes ao alumínio em solução nutritiva**

RESUMO – A busca de cultivares mais tolerantes à toxidez por alumínio (Al) tem sido a opção mais eficaz para amenizar os problemas que os solos ácidos trazem para a produção agrícola. Seleções para tolerância ao Al em solução nutritiva têm sido utilizadas com sucesso em cornichão e alfafa em trabalhos desenvolvidos no DPFA (Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia) da UFRGS. O objetivo do trabalho foi selecionar populações de trevo-branco para tolerância ao alumínio em solução nutritiva. Sementes de 24 populações que apresentaram alto desempenho agrônômico em trabalhos desenvolvidos anteriormente no DPFA foram selecionadas em solução nutritiva contendo  $\text{AlCl}_3$  ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) e cruzadas para obter  $F_{1s}$ . Seis populações  $F_1$  e seis originais foram comparadas em meio de cultura gel. A análise separou as populações em dois grupos. Duas populações  $F_1$  do Brasil e uma população original da Argentina obtiveram o melhor desempenho e podem ser utilizadas em trabalhos futuros.

Palavras-chave: *Trifolium repens*, Al, tolerância, comprimento de raiz

## Referências

- Amaral AS, Anghinoni I, Hinrichs R and Bertol I (2004) Movimentação de partículas de calcário no perfil de um cambissolo em plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** **28**: 359-367.
- Bortolini F, Dall' Agnol M, Schifino-Wittman MT, Trevisan M, Vieira V M, Scheffer-Basso SM and Montardo DP (2006) Caracterização morfológica e agronômica e divergência genética em germoplasma de trevo-branco. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia** **35**: 1601-1610.
- Caetano JHS, Dall' Agnol M, Meurer EJ et al. (2002) Seleção de alfafa (*Medicago sativa* L.) para solos ácidos. **Revista científica rural** **7**: 6-15.
- Caradus JR, Crush JR, Ouyange L, Fraser W (2001) Evaluation of aluminium-tolerant white clover (*Trifolium repens*) selections on East Otago upland soils. **New Zealand Journal of Agricultural Research** **44**: 141-150.
- Caradus JR, Mackay AD and Pritchard MW (1987) Towards improving the aluminium tolerance of white clover. **Proc. N. Z. Grassl. Assoc** **48**: 163-169.
- Cruz CD (2001) **Programa GENES: aplicativo computacional em genética e estatística**. Editora UFV, Viçosa, 648p.
- Degenhardt J, Larsen PB, Howell SH and Kochian LV (1998) Aluminum resistance in the arabidopsis mutant *alr-104* is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. **Plant Physiol** **117**: 19-27.
- Delhaize E and Ryan PR (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology** **107**: 315-321.
- Dodd MB, Orr SJ and Jackson BLJ (1992) Soil aluminium, phosphate, and moisture interactions affecting the growth of four white clover (*Trifolium repens* L.) lines. **N.Z.J. Agric. Res** **35**: 411-422.
- Drescher M, Bissani CA, Giasson E, Tedesco MJ and Gianello (1995) Avaliação da fertilidade dos solos do estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. DS/UFRGS. 24p **Boletim Técnico de Solos** **7**.
- Hede AR, Skovmand B and López-Cesatiz J (2001) Acid soils and aluminum toxicity. In: Reynolds, M.P., Ortiz-Monasterio, J.I.; McNab A. (eds.). **Application of Physiology in Wheat Breeding**. Editora CIMMYT Mexico, D.F., p.172-182.
- Janke A, Dall' Agnol M, Santos AM and Bissani CA (2010) Seleção de populações de *Lotus corniculatus* L. com maior tolerância ao alumínio em solução nutritiva. **R. Bras. Zootec** **39**: 2366-2370.

Khu D, Reyno R, Brummer EC and Monteros MJ (2012) Screening methods for aluminum tolerance in alfalfa. *Crop Science* 52: 161-167.

Lynch J (1995) **Root Architecture and Plant Productivity**. *Plant Physiol* 109: 7-13.

Mascarenhas HAA and Tanaka RT (1995) Crescimento em vasos, de cultivares de soja e de trigo em função da saturação de Alumínio. **Revista Scientia Agrícola** 52: 257- 262.

Meurer EJ, Bissani CA and Carmona F (2010) Solos ácidos e solos afetados por sais. In: Meurer EJ (ed.) **Fundamentos de Química do solo**. Editora Evangraf, Porto Alegre, p.149-169.

Nabinger C. (1980) Técnicas de melhoramento de pastagens naturais do Rio Grande do Sul. In: **Seminário Sobre Pastagens: “De que pastagens necessitamos”** Porto Alegre: FARSUL, 1980. p. 28-58.

Paim NR and Riboldi J (1994) Duas novas cultivares de trevo-branco comparadas com outras disponíveis no Rio Grande do Sul, em associação com gramíneas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 29: 43-53.

Paim, N. R. (1988) Manejo de leguminosas de clima temperado. In: **Simpósio de Manejo de Pastagem, 9. Piracicaba. Anais...** FEALQ, Piracicaba, p. 341-358.

Paterniani E and Miranda Filho JB (1987) Melhoramento de populações. In: Paterniani E and Viegas GP. **Melhoramento e produção de milho. 2ed.** Editora Cargil, Campinas, SP p. 217-274.

Santos, A. M. **Melhoramento genético de *Lotus corniculatus* visando tolerância à toxidez por alumínio.** 2009. 181f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,. 2009

Saraiva K.M. **Seleção de alfafa (*Medicago sativa* L.) para tolerância ao alumínio e aptidão ao pastejo.** 2011. 121f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

Schneider R, Dall’Agnol M, Montardo DP, Pereira EA, Martins JJ, Saraiva KM and Tafernaberrí Júnior V (2011) Avaliação agrônômica de progênies de policruzamento de trevo-branco (*Trifolium repens* L.) em dois locais do Rio Grande do Sul. **Rev. Brasileira de Zootecnia**: 1879-1885.

Singh D, Singh NP, Chauhan SK and Singh P (2011) Developing aluminium-tolerant crop plants using biotechnological tools. **Current Science** **100**: 1807-1814.

Voigt PW, Morris DR and Godwin HW (1997) A soil-on-agar method to evaluate acid-soil resistance in white clover. **Crop Science** **37**: 1493-1496.

Voigt PW and Staley TE (2004) Selection for aluminum and acid-soil resistance in white-clover. **Crop Science** **44**: 38-48.

Wang JP, Raman H, Read B, Zhou MX, Mendham NJ and Venkatanagappa, S (2006) Validation of an Alt locus for aluminium tolerance scored with eriochrome cyanine R staining method in barley cultivar Honen (*Hordeum vulgare* L.). **Aust. J. Agric. Res** **57**:113-118.

Woodfield DR and White DWR (1996) Breeding strategies for developing transgenic white clover cultivars. **Agronomy Society of New Zealand Special Publication**:No. 11 / **Grassland Research and Practice Series**: No. 6

Tabela 1. Identificação e origem dos acessos de trevo-branco.

<b>Nº</b>	<b>Identificação</b>	<b>Origem</b>
1	02 Bagé	CPPSUL
2	02 Israel	USDA
3	03 USA	USDA
4	06 Bagé	CPPSUL
5	07 Etiópia	USDA
6	07 Bagé	CPPSUL
7	13 Espanha	USDA
8	17 Bagé	CPPSUL
9	17 Camarões	USDA
10	19 Costa Rica	USDA
11	20 Uruguai	USDA
12	28 Austrália	USDA
13	33 Irlanda	USDA
14	48 Israel	USDA
15	58 Índia	USDA
16	59 Líbano	USDA
17	62 França	USDA
18	67 Portugal	USDA
19	68 Jamaica	USDA
20	69 Argentina	USDA
21	73 Polônia	USDA
22	74 Brasil	USDA
23	75 Uruguai	USDA
24	78 Marrocos	USDA

Tabela 2. Populações de trevo-branco avaliadas para tolerância ao Al.

<b>Nº</b>	<b>População</b>	<b>Ciclo de seleção</b>
1	06 Bagé	ciclo 0
2	17 Bagé	ciclo 0
3	20 Uruguai	ciclo 0
4	69 Argentina	ciclo 0
5	74 Brasil	ciclo 0
6	75 Uruguai	ciclo 0
7	06 Bagé	F <sub>1</sub>
8	17 Bagé	F <sub>1</sub>
9	20 Uruguai	F <sub>1</sub>
10	69 Argentina	F <sub>1</sub>
11	74 Brasil	F <sub>1</sub>
12	75 Uruguai	F <sub>1</sub>

Tabela 3. Número de plantas por população, pressão de seleção, média do comprimento da raiz principal (CRP) das populações originais e selecionadas e porcentagem de acréscimo no CRP.

Populações	Nº plantas/ População	Pressão de seleção (%)	Média CRP (cm)		Acréscimo no CRP (%)
			População	Selecionadas	
02 Bagé	97	33	2,7	4,1	49
02 Israel	65	49	5,5	7,0	28
03 USA	109	29	3,8	6,4	68
06 Bagé	139	23	3,5	5,6	61
07 Etiópia	142	23	4,1	6,5	58
07 Bagé	177	18	3,8	6,8	81
13 Espanha	141	23	4,9	8,5	73
17 Bagé	108	30	2,5	4,1	66
17Camarões	182	18	3,1	5,2	67
19 C. Rica	45	71	3,1	4,2	35
20 Uruguai	146	22	5,4	8,2	52
28 Austrália	152	21	3,2	6,1	92
33 Irlanda	103	31	5,9	8,7	46
48 Israel	194	16	4,8	7,3	51
58 Índia	175	18	4,2	6,7	59
59 Líbano	105	30	2,7	4,5	67
62 França	130	25	3,7	6,0	64
67 Portugal	145	22	3,5	6,1	76
68 Jamaica	66	48	2,9	4,1	41
69 Argentina	193	17	3,6	5,9	66
73 Polônia	122	26	3,1	5,2	68
74 Brasil	182	18	2,7	4,8	78
75 Uruguai	135	24	2,2	3,5	60
78 Marrocos	165	19	3,5	5,3	53
Média	134	27	3,7	5,9	61

Tabela 4. Médias de comprimento total de raiz (CTR) de populações de trevo-branco avaliadas em meio de cultura contendo 1200  $\mu\text{M}$  de Al.

População	Ciclo de seleção	CTR (cm)
17 Bagé	F <sub>1</sub>	9,7 A
74 Brasil	F <sub>1</sub>	9,6 A
69 Argentina	Ciclo 0	7,8 A
74 Brasil	Ciclo 0	6,5 B
75 Uruguai	Ciclo 0	5,9 B
6 Bagé	Ciclo 0	5,9 B
20 Uruguai	F <sub>1</sub>	5,6 B
75 Uruguai	F <sub>1</sub>	5,2 B
17 Bagé	Ciclo 0	4,4 B
20 Uruguai	Ciclo 0	4,4 B
69 Argentina	F <sub>1</sub>	3,8 B
6 Bagé	F <sub>1</sub>	3,7 B

\*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ( $P < 0,05$ ).

Tabela 5. Coeficiente de correlação entre as variáveis de comprimento de raiz principal (CRP), comprimento total de raiz (CTR) e comprimento de ramificações (CR).

Variáveis	Correlação
CRP x CTR	0,76**
CR x CTR	0,86**
CRP x CR	0,31**

\*\*,\* Significativo a 1 e 5% de probabilidade, pelo teste t.

## **CAPÍTULO V**



## 5.1 Considerações Gerais

Duas doenças fúngicas foliares, causadas por *Cymadothea trifolii* e *Curvularia trifolii*, foram identificadas em plantas de trevo-branco. Variabilidade genética para resistência e susceptibilidade a doença causada por *Curvularia trifolii* pôde ser verificada na Jacuí e na linhagem UFRGS-2004-2. A cv. Jacuí apresentou maior resistência do que a linhagem UFRGS-2004-2 e, após um ciclo de seleção foi possível diferenciar as populações divergentes. Levantamentos devem ser realizados na identificação e na quantificação dos efeitos das doenças que afetam o trevo-branco presente nas pastagens do Rio Grande do Sul, visando aumentar o conhecimento e direcionar os estudos na seleção de cultivares mais resistentes às doenças.

No método de avaliação para tolerância ao Al utilizando meio gel, foi possível observar a inibição do crescimento das raízes de trevo-branco após dois dias de crescimento em meios contendo baixo pH e Al. A concentração de 1200  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  foi a que mais restringiu o crescimento das raízes sem prejudicar a visualização da variabilidade genética existente entre as plantas, sendo a mais apropriada na seleção de plântulas tolerantes e/ou sensíveis ao Al. A metodologia utilizada em meio gel foi eficaz na seleção de populações divergentes de trevo-branco, possibilitando o diferimento de populações sensíveis e tolerantes após um ciclo de seleção.

O comprimento da raiz principal apresentou correlação significativa de 0,76 com o comprimento total de raiz, sendo que pode ser aplicada na seleção de plântulas com maior comprimento de raiz. No entanto, o comprimento de ramificações apresentou correlação significativa de 0,86 com o comprimento total de raiz, estando mais relacionada com esta variável. Devido à maior correlação e a importância das ramificações na arquitetura da raiz, o comprimento de ramificações deve ser incluído na seleção de plantas mais tolerantes ao Al.

O trabalho de seleção de trevo-branco visando tolerância ao Al deve ser continuado com as populações que apresentaram maiores médias de CTR no ensaio de comparação e as demais populações selecionadas devem ser avaliadas para verificar quais as mais promissoras para esta característica. Estas populações têm demonstrado alto desempenho agrônomo em relação à persistência e produção de matéria seca em trabalhos realizados no Rio Grande do Sul, sendo boas opções na formação de novas cultivares ainda mais adaptadas às condições edafoclimáticas do Estado.

## 5.2 Referências Bibliográficas

AMARAL, A. S. et al. Movimentação de partículas de calcário no perfil de um cambissolo em plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, p. 359-367, 2004.

ANDREW, C. S.. Effect of calcium, pH and nitrogen on the growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes. I. Nodulation and growth. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, Victoria, v. 27, p.611-623, 1976.

BALL, D. M.; HOVELAND, C. S.; LACEFIELD, G. D. **Southern forages**. Atlanta, Georgia: Potash & Phosphate Institute (PPI): Foundation for Agronomic Research (FAR), 1991. p.256.

BOHNEN, H.; MEURER, E.J.; BISSANI, C.A. Solos ácidos e solos afetados por sais. In: MEURER, E.J. (Ed). **Fundamentos de química do solo**. Porto Alegre: Genesis, 2000. p.109-126.

BORTOLINI, F.; DALL' AGNOL, M.; BISSANI, C.A. Características morfofisiológicas associadas à tolerância à seca em sete genótipos da coleção nuclear de trevo-branco. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.9, p. 1632-1638, 2011.

BORTOLINI, F. et al. Caracterização morfológica e agrônômica e divergência genética em germoplasma de trevo-branco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, n.4, p. 1601 – 1610, 2006.

BRAUER, D.; RITCHEY, D.; BELESKY, D. Effects of lime and calcium on root development and nodulation of clovers. **Crop Science**., Madison, v. 42, p.1640–1646, 2002.

BRINK G. E. et al. Growth of white clover ecotypes, cultivars, and germplasms in the southeastern USA. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1809 – 1814, 1999.

BROCK, J.L.; CARADUS, J.R.; HAY, M.J.M. Fitty years of white clover research in New Zealand. **Proceedings of the New Zealand Grassland Association**, Balclutha, v. 50, p.25-39, 1989.

CARADUS, J.R., MACKAY, A.D. Distribution of Al-tolerance in crosses between genotypes of white clover selected for either Al-tolerance or Al-susceptibility. In: R.A. DATE et al. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**. Netherlands: Kluwer ACAD. Publ., 1995. p.447-450.

CARADUS, J.R., MACKAY, A.D., PRITCHARD, M.W. Towards improving the

aluminium tolerance of white clover. **Proceedings of the New Zealand Grassland Association**, Palmerston North, v.48, p.163-169, 1987.

CARÁMBULA, M. **Producción y manejo de las pasturas sembradas**. Montevideo: Hemisfério Sur, 1977. 464p.

CARE, D.A. The effect of aluminium concentration on root hairs in white clover (*Trifolium repens* L.). **Plant and Soil**, Netherlands, v. 171, p. 159-162, 1995.

CLARKE, K.D. **Diseases of white clover - 2: fungal diseases**. Knoxfield, 1999. 2p. (Agriculture notes)

CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; SERENO, M. J. C. M.; NETO, J. F. B. Tolerância ao alumínio em plantas: toxicidade, mecanismos e genes em espécies cultivadas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.14, p.01-10, 2008.

DEGENHARDT, J. et al. Aluminum resistance in the Arabidopsis mutant *alr-104* is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 117, p. 19–27, 1998.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.107, p.315-321, 1995.

DODD, M.B., ORR, S.J., JACKSON, B.L.J. Soil aluminium, phosphate, and moisture interactions affecting the growth of four white clover (*Trifolium repens* L.) lines. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v.35, p.411-422, 1992.

DRESCHER, M. et. al. **Avaliação da fertilidade dos solos do estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Departamento de Solos, 1995. 24p . (Boletim Técnico de Solos, 7)

DUKE, J.A. **Handbook of legumes of world economic importance**. New York: Plenum Press, 1981. 345p.

ECHART, C. L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismos de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, p.531-541, 2001.

ELLISON, N. W.; LISTON, A.; STEINER J. J. Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium*—Leguminosae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.39, p. 688-705, 2006.

FALLOON, R. E. *Curvularia trifolii* as a high-temperature turfgrass pathogen. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Palmerston North, v.19, n.2, p.243-248, 1975.

FERREIRA, R. P. et al. Identificação de cultivares de arroz tolerantes à toxidez de alumínio por técnica multivariada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, p.789-795, 1995.

FERREIRA, R. P.; MOREIRA, A.; RASSINI, J. B. **Toxidez de alumínio em culturas anuais**. São Carlos: EMBRAPA, 2006. 35 p. (Documentos 63).

FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.29, p.511-566, 1978.

FRANCE, I.A.; GUERRERO, C.J. Enfermedades en las praderas.. In: NÚÑEZ, I.R. (Org.). **Praderas para Chile**. Santiago, Chile: Instituto de investigaciones agropecuárias (INIA), 1988. p. 251-269.

FREITAS, F. A. et al. Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, p.72-79, 2006.

GARCIA, J. A. **Variedades de trebol blanco**. Montevideo: INIA, 1995. 12 p. (Série Técnica, 70).

GIBSON, P. B.; COPE, W. White clover. In: TAYLOR, N. L. (Ed). **Clover Science and Tecnology**. Madison: American Society of Agronomy, 1985. p. 471-490.

HARTWIG, I.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F. et al. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, p.219-228, 2007.

HEDE, A.R.; SKOVMAND, B.; LÓPEZ-CESATIZ, J. Acid soils and aluminum toxicity. In: REYNOLDS, M.P., ORTIZ-MONASTERIO, J.I.; McNAB A. (Eds.). **Application of physiology in wheat breeding**. Mexico, D.F.: CIMMYT, p.172-182, 2001.

HOEKENGA, O.A. et al. Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (Landsberg *erecta* x Columbia) by quantitative trait locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.132, p.936–948, 2003.

HOLLOWELL, E. A. Ladino and other white clovers. In: HUGHES, H.D. et al. (Ed.) **Forages: the science of grassland agriculture**. Ames: Iowa State University Press, 1966. p.161 – 168.

IIDA W.; TAKAHASHI H. Relation of environmental factors and age of ladino clover plant to occurrence of *Curvularia* leafspot of Ladino clover. **Journal of Japanese Society of Grassland Science**, Nasushiobara, Japan, v.13, n.3, p.199-204, 1967.

JAHUFER, M.Z.Z. **National white clover improvement programme**. Sydney: NSW Agriculture, 1991. 1 p. (Newsletter 5)

JANSEN, S. et al. Aluminum hyperaccumulation in angiosperms: a review of its phylogenetic significance. **The Botanical Review**, Bronx, v.68, p.235-269, 2002.

JONES, R.M. Survival of seedlings and primary taproots of white clover (*Trifolium repens*) in subtropical pastures in south-east Queensland. **Tropical Grassland**, Sta. Lucia, v. 14, p. 19-22, 1980.

KHU, D. et al. Screening methods for aluminum tolerance in alfalfa. **Crop Science**, Madison, v. 52, p. 161-167, 2012.

LARSEN, P.B.; TAI, C.Y.; STENZLER, L. et al. Aluminum-resistant Arabidopsis mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. **Plant Physiology**, Rockville, v.117, p.9-18, 1998.

LATCH, G.C.M., SKIPP, R.A. Diseases. In: BAKER, M.J.; WILLIAMS, W.M. (Eds). **White clover**. Wallingford: CAB International, 1987. p 421-460.

LEATH, K. T. General Diseases. In: TAYLOR, N. L. (Ed). **Clover Science and Technology**. Madison: American Society of Agronomy, 1985. p. 205-233.

LEATH, K. T. et al. Pasture/forage crops and diseases in the United States. **Pasture and Forage Crop Pathology**, Madison, Miscellaneous Publication, p.33-58, 1996.

LEFFEL; GIBSON. White clover. In: HEATH, M. E. et al (Eds.). **Forages: the science of grassland agriculture**. Ames:Iowa State University Press, 1973. p.167 – 176.

LEWIS, G. et al. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005. 577p.

LIMA, A.; FURTADO, M. Espécies do género *Curvularia* (fungos anamórficos: hyphomycetes) na ilha de Santiago, Cabo Verde. **Portugaliae Acta Biologica.**, Lisboa, v.22, p.145-156, 2007.

MA, J. F. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants.

**Plant Cell Physiology**, Tokyo, v.41, p. 383-390, 2000.

MA, J. F. et al. Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea (Identification of Al form in the leaves). **Plant Physiology**, Rockville, v.113, n.4, p.1033-1039, 1997.

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

MACHADO, P. L. O. A. **Considerações gerais sobre a toxicidade do alumínio nas plantas**. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1997. 21 p. (Documentos n.2).

MALAVOLTA, E. et al. Seja o doutor dos seus citros. **Informações agronômicas**, Piracicaba, n. 65, p. 1-9, 1994.

MARCHI, C.E.; FERNANDES, C.D.; VERZIGNASSI, .R.J. **Doenças em plantas forrageiras**. Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2011. 47p.

MASCARENHAS, H. A. A.; TANAKA, R. T. Crescimento em vasos, de cultivares de soja e de trigo em função da saturação de alumínio. **Revista Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 257- 262, 1995.

McQUATTIE, C.J.; SCHIER, G.A. Response of red spruce seedlings to aluminum toxicity in nutrient solution: alterations in root anatomy. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.20, p.1001-1011, 1990.

MEURER, E.J.; BISSANI, C.A.; CARMONA, F. **Solos ácidos e solos afetados por sais**. In: MEURER, E.J. (Ed.). **Fundamentos de química do solo**. Porto Alegre: Evangraf, 2010. p.149-169.

MIGUEL, P. S. B.; et al. Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas: mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles genéticos. **CES Revista**, Juiz de Fora, v. 24, p. 1-30, 2010.

MILLER, D.A. White clover. In: **FORAGE Crops**. New York: McGraw-Hill Book Co, 1984. p. 306-317.

MUNNS, D.N.; KEYSER, H.H. Response of rhizobium strains to acid and aluminium stress. **Soil Biology & Biochemistry**., Great Britain, v. 13, p. 115-118, 1980.

NABINGER, C. Técnicas de melhoramento de pastagens naturais do Rio Grande do Sul. In: SEMINÁRIO SOBRE PASTAGENS: "DE QUE PASTAGENS NECESSITAMOS", 2., 1980, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: FARSUL, 1980. p. 28-58.

NABINGER, C., et al. Campos in Southern Brazil. In: GRASSLAND ecophysiology and grazing ecology. Cambridge : CABI, 2000. Cap. 18, p. 355-376..

NAIDOO, G.; STEWART, J. McD.; LEWIS, R.J. Accumulation sites of Al in snapbean and cotton roots. **Agronomy Journal**, Madison, v.70, n.3, p.489-492, 1978.

NELSON, S. C.; CAMPBELL, C. L. Incidence and patterns of association of pathogens in a leaf spot complex on white clover in the Piedmont region of North Carolina. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, p.1013-1021, 1992.

NELSON, S. C.; CAMPBELL, C. L. Comparative spatial analysis of foliar epidemics on white clover caused by viruses, fungi, and a bacterium. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, p.288-301, 1993b.

NELSON, S. C.; CAMPBELL, C. L. Disease progress, defoliation, and spatial pattern in a multiple-pathogen disease complex on white clover. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, p.419-429, 1993a.

NISHIHARA, N. A comparative study of *Curvularia trifolii* Boedijn isolated from Trifolium. **Bulletin National Institute of Animal Industry**, Japan, v.23, p.15-23, 1966.

OLIVEIRA, J. C. P.; MORAES, C. O. C. **Cadeia forrageira para a Região da Campanha**. In: CADEIAS forrageiras anuais. FEDERACITE VII. Porto Alegre, RS: Caramuru, 1995. 203p.

PAIM, N. R. Manejo de leguminosas de clima temperado. In: SIMPÓSIO DE MANEJO DE PASTAGEM, 9., 1988, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1988. p. 341-358.

PAIM, N.R.; RIBOLDI, J. Duas novas cultivares de trevo-branco comparadas com outras disponíveis no Rio Grande do Sul, em associação com gramíneas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n.1, p. 43 – 53, 1994.

PAUDYAL, S.P., RISHI, R. A., CHAUHAN, S.V.S., MAHESHWARI, D.K. Effect of reavy metals on growth of rhizobium trains and symbiotic efficiency of two species of tropical legumes. **Scientific World**, Nasr City, v. 5, p. 27-32, 2007.

PEDERSON, G. A. White clover and other perennial clovers. In: BARNES, R. F. et al. (Eds.). **Forages**: an introduction to grassland agriculture. Ames: Iowa state University Press, 1995. p.227 – 236.

PEDERSON, G. A.; PRATT, R. G. Differential summer survival of white clover stolons: germplasm and fungicide effects. **Crop Science**, Madison, v. 35, p.1282-1287, 1995.

PEDERSON, G. A.; PRATT, R. G.; BRINK G. E. Response to leaf inoculations with *Macrophomina phaseolina* in white clover. **Crop Science**, Madison, v. 40, p.687–692, 2000.

PRATT, R. G. Evaluation of foliar clipping treatments for cultural control of Sclerotinia crown and stem rot in crimson clover. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, p.59-62, 1991.

PUSHNER B. Problem weeds in hay and forages for livestock. In: CALIFORNIA ALFALFA & FORAGE SYMPOSIUM, 35., Visalia, California. **[Proceedings]**. Davis, USA.: Department of Agronomy and Range Science Extension, University of California, 2005. p.12–14

REIS, J. C. L.; AZEVEDO, A. S.; GONÇALVES, J. N. **Trevo branco Cv. BR1-Bagé**. Bagé: EMBRAPA.UEPAE, 1980. 8p. (Circular Técnico, 2).

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.

SANTOS, A. M. **Melhoramento genético de *Lotus corniculatus* visando tolerância à toxidez por alumínio**. 2009. 181f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SCHNEIDER, R. et al. Avaliação agronômica de progênies de policruzamento de trevo-branco (*Trifolium repens* L.) em dois locais do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.40, n.9, p.1879-1885, 2011.

SEKER, H.; ROWE, D. E.; BRINK, G. E. White clover morphology changes with stress treatments. **Crop Science**, Madison, v.43, p. 2218 – 2225, 2003.

SIMON, U.K., BAUER, R., OBERWINKER, F. The unique cellular interaction between the leaf pathogen *Cymadothea trifolii* and *Trifolium repens*. **Mycologia**, Lawrence, v.96, p.1210–1218, 2004.

SIMON, U.K., GROENEWALD, J.Z., CROUS, P.W. *Cymadothea trifolii*, an

obligate biotrophic leaf parasite of *Trifolium*, belongs to *Mycosphaerellaceae* as shown by nuclear ribosomal DNA analyses. **Persoonia**, Leiden, v. 22, p.49–55, 2009.

SINGH, D. et al. Developing aluminium-tolerant crop plants using biotechnological tools. **Current Science**, Bangalore, , v. 100, p. 1807-1814, 2011.

SKIPP, R. A.; LAMPERT, M. G. Damage to white clover foliage in grazed pastures caused by fungi and other organisms. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, NZ, V. 27, N.3, p.313-320, 1984.

TANG, Y.; SORRELS, M. E.; KOCHIAN, L. V. et al. Identification of RFLP markers linked to the barley aluminum tolerance gene *Alp*. **Crop Science**, Madison, v.40, p.778-782, 2000.

TEDESCO, M.J.; BISSANI, C.A. Acidez do solo e seus efeitos nas plantas. In: BISSANI, C.A. et al. (Ed.). **Fertilidade dos solos e manejo da adubação de culturas**. Porto Alegre: Genesis, 2004. p.75-92.

VIECELLI, L. C. **Melhoramento genético de trevo branco (*Trifolium repens* L.) visando persistência e produção**. 2000. 134f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

VOIGT, P. W., STALEY, T. E. Selection for aluminum and acid-soil resistance in white-clover. **Crop Science**, Madison, v. 44, p.38-48, 2004.

VOIGT, P.W., MORRIS, D.R., GODWIN, H.W. A soil-on-agar method to evaluate acid-soil resistance in white clover. **Crop Science**, Madison, v. 37, p.1493-1496, 1997.

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

WALLACE, S.U.; ANDERSON, I.C. Aluminum toxicity and DNA synthesis in wheat roots. **Agronomy Journal**, Madison, v.76, p.5-8, 1984.

WENZL, P. et al. The high level of aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. **Plant Physiology**, Rockville, v.125, n.3, p.1473-1484, 2001.

WOODFIELD, D. R.; CARADUS, J. R. Genetic improvement in white clover representing six decades of plant breeding. **Crop Science**, Madison, v.34, p.1205-1212, 1994.

ZHAO, X.-J.; SUCOFF, E.; STADELMANN, E.J.  $\text{Al}^{3+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells. **Plant Physiology**, Rockville, v.83, p.159-162, 1987.

ZHENG, S. J.; MA, J. F.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat: I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. **Plant Physiology**, Rockville, v.117, n.3, p.745-751, 1998.

### 5.3 Apêndices

**Apêndice 1.** Normas de acordo com a revista científica *Crop Breeding and Applied Biotechnology* – CBAB, utilizadas para escrever os Capítulos II, III e IV desta tese.

#### **CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY**

##### **Instruções aos Autores**

##### ***Política geral e escopo da revista***

A **CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY** (ISSN 1518-7853, versão impressa, ISSN 1984-7033, versão on line) - é a revista trimestral oficial da Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas (<http://www.sbmp.org.br>). O nome internacional abreviado é CROP BREED APPL BIOTECHNOL. A revista está indexada na ISI Thomson Reuters, Scopus, AGRIS, CAB International Abstracts, Biosys, Latindex, Periódica, Chemical Abstracts Service, Agrícola, Agrobase, Wilson, Ebsco, DOAJ, Acervo Documental da Embrapa and Portal da Capes e destina-se à publicação de artigos científicos originais que possam contribuir para o desenvolvimento científico e tecnológico do melhoramento e da agricultura. Os artigos deverão contemplar as pesquisas básica e aplicada em melhoramento de plantas perenes e anuais, nas áreas de genética, conservação de germoplasma, biotecnologia, genômica, citogenética, estatística experimental, sementes, qualidade de alimentos, estresse biótico e abiótico, e áreas correlatas. O artigo deve ser inédito, sendo vetada a submissão do mesmo a outro periódico. As opiniões e conceitos emitidos são de exclusiva responsabilidade dos autores, não refletindo necessariamente as idéias da Editoria. A Editoria, porém se reserva o direito de sugerir ou solicitar as modificações que se fizerem necessárias. A reprodução completa ou parcial dos artigos é permitida, desde que citada a fonte.

##### ***Artigo***

A **CBAB** publica artigo exclusivamente em inglês, porém faculta ao autor a possibilidade de submetê-lo em português para, após o aceite, providenciar a sua tradução. O ônus da tradução é de responsabilidade do autor, porém a **CBAB** recomenda que ela seja feita por seu tradutor oficial. Contribuições são submetidas via WEB acessando <http://www.sbmp.org.br/cbab/siscbab/index.php>, clicando **Submission**. O sistema de gerenciamento de artigos solicitará o e-mail do autor

correspondente e a geração de uma senha. **Os manuscritos deverão ser inseridos sem os nomes dos autores e seus endereços, os quais deverão ser disponibilizados em um formulário à parte.** Como a CBAB opera com revisão do tipo duplo cego, autores não devem revelar suas identidades no manuscrito. Com seu e-mail e sua senha pessoal, o autor poderá acompanhar toda a tramitação do seu artigo. A avaliação do artigo será feita por revisores *ad hoc* especialistas, para auxiliar a Editoria quanto à decisão final de aceite, modificações ou rejeição do mesmo. O artigo completo deverá conter, preferencialmente, a seguinte sequência: title, abstract, key words, introduction, material and methods, results and discussion, acknowledgements, título, resumo, palavras-chave, references, and tables and black-and-white figures. Ilustrações coloridas serão permitidas, porém com ônus para o autor correspondente. A digitação deverá ser feita em Word for Windows versão 6.0 em diante, em fonte times new roman, tamanho 12, espaçamento duplo, formato A4, com margens de 20 mm e paginação consecutiva no topo à direita. O artigo não deverá exceder a 18 páginas, incluindo tabelas e figuras digitadas em páginas separadas (uma por página) ao final do texto. Todas as equações, modelos e símbolos devem ser inseridos via Microsoft Equation. O Título deverá ser claro, conciso e refletir a essência do artigo. Escrito com a inicial maiúscula e posto a esquerda, não deve conter mais de 15 palavras digitadas em times new roman 14, bold. O Abstract, tanto quanto o Resumo, não deve exceder a 150 palavras. Um máximo de cinco palavras-chave, diferentes do título, será permitido. A introdução deve incluir uma breve revisão de literatura sobre o tema e os objetivos da pesquisa. O Material e Método deve ser redigido de modo que outro pesquisador possa repetir a experiência. Preferencialmente, Resultados e Discussão devem ser apresentados em conjunto, para maior dinâmica de leitura. Os agradecimentos devem ser sucintos, limitados a colaboradores efetivos e agências financiadoras. O Resumo deve ser precedido do título do artigo em português. **Cuidado com as Referências.** Não citar resumos de eventos, teses e nem artigos não publicados. Esses cuidados darão maior credibilidade ao artigo e a revista. As citações feitas no texto pelo sobrenome do autor e ano (por exemplo, Liu 1998, Pereira and Amaral Júnior 2001, William et al. 1990) deverão ser ordenadas alfabeticamente no item Referências, seguindo os exemplos abaixo:

*Artigos em periódicos:*

Pereira MG and Amaral Júnior AT (2001) Estimation of genetic components in popcorn based on the nested design. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 1: 3-10.

*Livro:*

Ramalho MAP, Ferreira DF and Oliveira AC (2000) **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. Editora UFLA, Lavras, 326p.

*Capítulo de livro:*

Sakiyama NS, Pereira AA and Zambolim L (1999) Melhoramento do café arábica. In: Borém A (ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Editora UFV, Viçosa, p. 189-204.

*Congresso:*

Frey KJ (1992) Plant breeding perspectives for the 1990s. In: Stalker HT and Murphy JP (eds.) **Proceedings of the Symposium on Plant Breeding in the 1990s**. CAB, Wallingford, p. 1-13.

A **CBAB** publica ainda outras modalidades de trabalhos, todos submetidos ao crivo de revisores *ad hoc*, do mesmo modo que os artigos.

**Revisões**

As Revisões, também limitadas a 18 páginas digitadas, serão solicitadas pela Editoria a(os) autor(es) consolidados nas pesquisas que envolvem o tema da revisão. Elas serão elaboradas com o objetivo de lançar luz a um tema instigante que mereça uma análise aprofundada sobre o seu estado-da-arte.

**Notas**

As Notas são limitadas a 12 páginas digitadas e destinadas a informar pesquisas ou observações novas, para as quais as ferramentas analíticas não se aplicam. Elas podem focar tema de amplo interesse; relato curto de uma pesquisa original; relato de pesquisa participativa; observações de especial interesse nas áreas de pesquisa, ensino, extensão; lançamento de um novo software relacionado com a área de melhoramento.

**Programas de melhoramento** - Programas de melhoramento inovadores ou que se destaquem pela eficiência, impacto e/ou continuidade poderão ser retratados na **CBAB**, limitados a 18 páginas digitadas.

**Lançamento de cultivares**

Os novos cultivares merecerão uma seção especial pela importância que representam para o melhoramento e, por conseguinte, para a agricultura nacional. A seção Lançamento de novos cultivares deverá conter abstract, limitado a 50 palavras, palavras chaves, introdução, métodos de melhoramento utilizados, características de desempenho, produção de sementes básicas e

um mínimo de referências, tabelas e figuras. Todo o texto ficará limitado a 12 páginas digitadas.

### ***Resenha de livro***

Esta nova seção foi criada para anunciar novos livros relacionados ao melhoramento de plantas. A contribuição para essa seção se dará mediante envio, pelo autor, de dois exemplares da obra. O livro será encaminhado para um revisor especializado, escolhido pela Editoria, para elaborar a resenha.

***Pontos de vista*** - Pontos de vista, assim como as revisões, serão elaborados para a **CBAB** a convite da Editoria, para retratar temas de interesse dos melhoristas e da sociedade.

### ***Cartas***

Cartas breves, também de interesse geral, serão aceitas para publicação. A Editoria se reserva o direito de editar as cartas por limitações de espaço e clareza de exposição.

#### 5.4 Vita

Raquel Schneider, filha de Bruno Schneider e Ruth Schneider, nasceu em 16 de dezembro de 1985 no município de Bagé – RS. Concluiu o ensino fundamental e ensino médio na Escola Estadual Manuel Lucas de Oliveira.

Ingressou na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, no curso de Tecnologia em Agropecuária, em 2004, graduando-se em 2007. Durante o período de junho de 2005 a fevereiro de 2008 atuou como bolsista de iniciação científica na Embrapa Pecuária Sul, no setor de plantas forrageiras.

Em março de 2008, iniciou o Mestrado em Zootecnia, Área de concentração Plantas Forrageiras, no Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Em 2010, ingressou no curso de Doutorado em Zootecnia na mesma instituição, realizando estágio de doutorado em 2012/2013 como bolsista Capes, na *The Samuel Roberts Noble Foundation*, Oklahoma-USA, no Departamento de Melhoramento de Forrageiras.