VARIABILIDADE GENÉTICA DA TOLERÂNCIA SALINA EM POPULAÇÕES DE
Stylosanthes humilis H.B.K. DE DIFERENTES REGIÕES
ECOGEOGRÁFICAS DO ESTADO DE PERNAMBUCO

MARIA BERNADETE LOVATO
Bióloga

Orientador: Prof. Dr. PAULO SODERO MARTINS

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiróz" da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo- Brasil
Junho-1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

L896v Lovato, Maria Bernadete
Variabilidade genética da tolerância salina em populações de
Stylosanthes humilis H.B.K. de diferentes regiões ecogeográficas
do Estado de Pernambuco, Piracicaba, 1991.
134p. ilus.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Eletroforese aplicada 2. Estilosante - Crescimento - Pernam-
buco 3. Estilosante - Genética ecológica - Pernambuco 4. Estilosan-
te - Germinação - Pernambuco 5. Estilosante - População - Pernam-
buco 6. Estilosante - Tolerância ao sal - Variação genética 7.
Isoenzima de estilosante - Eletroforese 8. Leguminosa forrageira
I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CDD 633.39

VARIABILIDADE GENÉTICA DA TOLERANCIA SALINA EM POPULAÇÕES DE
Stylosanthes humilis H.B.K. DE DIFERENTES REGIÕES
ECOGEOGRÁFICAS DO ESTADO DE PERNAMBUCO

MARIA BERNADETE LOVATO

Aprovada em: 28.06.91

Comissão julgadora:

Prof.Dr. Paulo Sodero Martins	ESALQ/USP
Prof.Dr. Paulo Roberto Camargo e Castro	ESALQ/USP
Prof.Dr. Roland Vencovsky	ESALQ/USP
Prof.Dr. George John Shepherd	UNICAMP
Prof.Dr. William José da Silva	UNICAMP

Prof. Dr. PAULO SODERO MARTINS
Orientador

Aos meus pais,

Antonio e Izaura

e irmãos,

OFEREÇO

Ao Pires,

Lívia e

Laura

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Paulo Soderro Martins, pela orientação, estímulo e amizade.
- Ao Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo afastamento concedido.
- Ao PICD/CAPES pela bolsa concedida.
- Ao Professor Roland Vencovsky pela atenção, boa vontade e importante contribuição na parte de análise quantitativa desse trabalho.
- Ao José Pires de Lemos Filho, pela ajuda e estímulo durante todas as fases desse trabalho.
- Ao Gothardo Marcon, pela possibilidade de utilização de material de sua coleta no Estado de Pernambuco.
- Aos colegas de pós-graduação, em especial aos amigos Angela Maria Maluf, Giancarlo C. X. Oliveira, Heidelinde Karla Avedikian, Levi de Moura Barros, Roberto Cury e Rosangela M.S. Resende, pela convivência, apoio e colaboração.
- Ao Professor Ronaldo Ivan Silveira, do Departamento de Solos, Geologia e Fertilizantes e aos Professores Itamar S. de Mello, Geraldo A. Tosello e Maria Lucia C. Vieira do Departamento de Genética, pela disponibilidade de instalações e equipamentos.

- Ao técnico Ronaldo Rabello, pela ajuda na fase experimental.
- a bibliotecária do Departamento de Genética, Rosmary dos Santos, pela colaboração na revisão das referências bibliográficas.
- Aos professores e funcionários do Departamento de Genética pela colaboração e atenção dispensadas.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. A espécie <i>Stylosanthes humilis</i> :considerações biológicas e agronômicas.....	4
2.2. Considerações gerais sobre salinidade.....	7
2.3. Efeitos da salinidade e mecanismos de tole- rância.....	8
2.4. Tolerância salina e estágio de crescimento da planta.....	11
2.5. Efeitos da salinidade na germinação.....	12
2.6. Métodos e critérios para a avaliação da tole- rância salina.....	15
2.7. Considerações genéticas e ecológicas.....	18
2.8. Eletroforese de enzimas:variabilidade, adapta- ção e caracteres quantitativos.....	23
2.8.1. Variabilidade isoenzimática e adap- tação.....	23
2.8.2. Associação de isoenzimas com carac- teres quantitativos.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Origem do material utilizado.....	32
3.2. Reprodução das famílias no campo.....	34
3.3. Ensaios de germinação.....	36

3.3.1. Avaliação da tolerância salina na germinação de <i>S. humilis</i>	36
3.3.2. Avaliação da variabilidade genética para tolerância ao estresse salino na germinação em populações de <i>S. humilis</i>	39
3.4. Ensaios de crescimento.....	41
3.4.1. Avaliação da tolerância à salinidade no crescimento inicial em populações de <i>S. humilis</i>	41
3.4.2. Avaliação da variabilidade genética para a tolerância à salinidade no crescimento em populações de <i>S.</i> <i>humilis</i>	46
3.5. Análise eletroforética das isoenzimas.....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1. Avaliação da tolerância à salinidade na ger- minação em populações de <i>S. humilis</i>	57
4.2. Avaliação da variabilidade genética da tole- rância à salinidade na germinação em popula- ções de <i>S. humilis</i>	65
4.3. Avaliação da tolerância salina no crescimen- to inicial em populações de <i>S. humilis</i>	76
4.4. Avaliação da variabilidade genética da tole- rância salina no crescimento inicial em po- pulações de <i>S. humilis</i>	91

4.5. Análise comparativa da tolerância salina e da variabilidade genética nas populações de <i>S.humilis</i> , entre os estádios de germinação e crescimento inicial.....	102
4.6. Análise eletroforética de isoenzimas associada com a tolerância salina nas populações de <i>S.humilis</i>	105
5. CONCLUSÕES.....	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121

VARIABILIDADE GENÉTICA DA TOLERÂNCIA SALINA EM POPULAÇÕES
DE *Stylosanthes humilis* H.B.K. DE DIFERENTES REGIÕES
ECOGEOGRÁFICAS DO ESTADO DE PERNAMBUCO

Autora:MARIA BERNADETE LOVATO

Orientador:Prof.Dr. PAULO SODERO MARTINS

RESUMO

Com o objetivo de estudar o comportamento de populações de *Stylosanthes humilis* em relação à salinidade e a variabilidade genética deste caráter nos estádios da germinação e do crescimento inicial foram analisadas seis populações provenientes de três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. Foram também realizadas eletroforeses de peroxidase, esterase e malato desidrogenase para investigar a possível associação da tolerância salina com os padrões eletroforéticos.

A tolerância salina das populações na germinação de sementes escarificadas foi avaliada em um gradiente de NaCl de 0 a 268 mM, através da porcentagem e da velocidade de germinação, e no crescimento inicial em solução nutritiva em quatro concentrações de NaCl ,0, 40, 80 e 120 mM, utilizando 11 caracteres. Para a estimativa de parâmetros genéticos foram realizados ensaios a nível de famílias na germinação com sementes escarificadas e não

escarificadas e no estágio de crescimento inicial.

Na germinação a tolerância salina é relativamente elevada, sendo que a porcentagem de germinação na maioria das populações só foi afetada por concentrações de NaCl acima de 134 mM e somente reduzida a 50% (G50) na média das populações na concentração de 268 mM, equivalendo ao potencial osmótico de -1,2 MPa. As populações nessa fase apresentaram-se muito diferentes quanto à tolerância salina, sendo também observada ampla variabilidade genética entre famílias nas populações do Sertão e em especial nas do Agreste, com coeficientes de variação genética de 21,3 a 52,3% e de determinação genotípica de 0,90 a 0,98, para sementes escarificadas.

A tolerância salina das populações no estágio de crescimento inicial foi menor do que na germinação e não houve relação de tolerância das populações nas duas fases. A posição relativa de cada população quanto ao grau de tolerância variou de acordo com o caráter considerado, mas foi obtida boa separação das populações considerando o conjunto de caracteres. Para uma correta avaliação quanto à tolerância salina em genótipos dessa espécie é necessário considerar uma combinação de caracteres.

Em comparação com outras espécies relatadas na literatura, algumas populações de *S. humilis* podem ser consideradas moderadamente tolerantes ao sal durante o crescimento inicial. A população Flores, a mais tolerante, apresentou para o caráter peso seco da parte

aérea, em relação ao controle, o valor de 74% em 80 mM de NaCl e 37% em 120 mM e a população Janga, uma das mais sensíveis 52% em 80 mM e 25% em 120 mM, sendo o valor do ponto de inflexão (nível máximo em que não há alteração no crescimento), ao redor de 40 mM na média das populações.

A magnitude dos coeficientes de variação genética e de herdabilidade no crescimento inicial dependeram do caráter e da população considerados, variando respectivamente de 0 a 56,5% e de 0 a 0,673. Houve relação entre o grau de variabilidade nas duas fases do ciclo de vida para todas as populações, com exceção de Caruaru, do Agreste. Houve também considerável variação dentro de famílias.

As duas populações da Mata, em especial a Tamandaré, apresentaram pequena variabilidade genética nos dois estádios do ciclo de vida, o que está de acordo com a baixa variabilidade isoenzimática encontrada por MARCON (1988) nessas populações, sendo mais uma evidência de que ela deve ser causada pelo efeito do fundador, levando à deriva genética.

Os níveis de variabilidade na tolerância salina entre e dentro da maioria das populações nas duas fases do ciclo de vida oferecem condições para a seleção e o melhoramento dessa espécie quanto a esse caráter. Essa variabilidade é também importante para a adaptação da espécie à níveis variáveis de salinidade.

A eletroforese de isoenzimas revelou a

associação de um alelo da peroxidase com a tolerância salina na germinação da população Caruaru. Entre as várias hipóteses para explicar essa associação, foram consideradas como mais plausíveis, o efeito do fundador , a redução no tamanho populacional e a possibilidade desse alelo ter uma origem recente.

GENETIC VARIABILITY OF SALT TOLERANCE IN POPULATIONS OF
Stylosanthes humilis H.B.K. OF DIFFERENT ECOGEOGRAPHIC
REGIONS OF THE STATE OF PERNAMBUCO

Author: MARIA BERNADETE LOVATO

Adviser: Prof. Dr. PAULO SODERO MARTINS

SUMMARY

The behavior of six populations of *Stylosanthes humilis* from three ecogeographic regions of the State of Pernambuco was analysed, in order to study the salt tolerance and the genetic variability of this character during germination and initial phase of growth. Electrophoresis for enzymes peroxidase, esterase and malate dehydrogenase was performed to investigate the possibility of association between salt tolerance and electrophoretic patterns.

Germination percentage and germination rate were used to evaluate the salt tolerance of populations in scarified seeds in a gradient of 0 to 268 mM NaCl. The effect of salt in the initial phase of growth was evaluated in nutrient solution with four different NaCl concentrations of 0, 40, 80 and 120 mM NaCl, for eleven characters. The estimation of the genetic parameters was obtained for germination of scarified and non-scarified seeds and initial

phase of growth at family level.

Salt tolerance in germination is high. In most populations germination percentage was only affected at concentrations higher than 134 mM. A reduction of germination up to 50% was observed at the average of the populations at a concentration of 268 mM, the equivalent to a -1,2 MPa osmotic potential. The populations showed to be differences in salt tolerance and a large genetic variability was observed among families of Sertão populations, and specially in the Agreste populations, with a coefficient of genetic variation varying from 21,3 to 52,3% and a coefficient of genotypic determination varying from 0,90 to 0,98 for scarified seeds.

Populations at the initial phase of growth showed less tolerance to salinity than at germination. No relation was observed in salt tolerance of the populations at both phases. The relative position of each population in relation to the degree of tolerance differed depending upon the character considered, but a good separation of populations could be achieved considering a set of characters. For the correct evaluation of genotypes of the species to salt tolerance, a combination of characters is necessary.

Some populations of *S. humilis* could be considered moderately salt tolerant at the initial phase of growth, when compared to other species referred in the literature. Flores, the most tolerant population, showed a

shoot dry weight in relation to the control of 74% at NaCl concentration of 80 mM and 37% at 120 mM, while Janga, the most sensitive population showed 52% at 80 mM and 25% at 120 mM. The threshold (max. level with no growth alteration) is around 40 mM for the average of the populations.

The extent of the coefficients of genetic variation and heritability in the initial phase of growth depends upon the character and the population analysed, varying from 0 to 56,5% and 0 to 0,673, respectively. A relation in variability exists in both phases of life cycle in all populations studied, with the exception of the Caruaru populations of Agreste. Considerable variation has been observed within families.

The two populations from Mata, specially the Tamandaré population, showed little genetic variability in both phases of life cycle, which agrees with the low isozymatic variability found by MARCON (1988) in these populations, constituting one more evidence that this low variability level must be due to founder effect, leading to genetic drift.

The level of variability for salt tolerance between and within most of the populations at both phases of life cycle offers the possibility of selection for this character. This variability is also important for the adaptation of the species to different salinity levels.

Isozyme electroforesis revealed the association of an peroxidase allele with salt tolerance at

germination in the Caruaru population. Among several hypothesis wich might explain this association, the founder effect, reduction of population size and the possibility that this alelle might be of recent origin, were considered the most plausible.

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento do comportamento e da variabilidade genética das populações naturais em relação a fatores ambientais pode fornecer subsídios para o entendimento das estratégias adaptativas e da dinâmica evolutiva dessas populações .

A salinidade tem sido considerada como um importante fator edáfico que limita a distribuição das plantas em ambientes naturais em muitas partes do mundo (TAL,1985).Em regiões de climas áridos ou semi-áridos é comum a presença de solos salinos,devido às altas taxas de evaporação que acarretam acúmulo de sais no solo e na água (RICHARDS,1954).

Stylosanthes humilis é considerada como uma importante espécie forrageira, especialmente adaptada para regiões tropicais semi-áridas.No Nordeste brasileiro ela tem ampla distribuição geográfica sendo encontrada desde o litoral até o sertão,em diferentes condições edafo-climáticas,entre as quais a salinidade do solo que pode ser um importante fator relacionado com a adaptação e distribuição dessa espécie.

O conhecimento da tolerância à salinidade e a variabilidade genética quanto a esse caráter além de auxiliar o entendimento da dinâmica dessas populações, pode ainda ser importante para orientar trabalhos de seleção e melhoramento.

A investigação de caracteres bioquímicos associados com a tolerância a estresses ambientais tem constituído uma preocupação de muitos pesquisadores, tanto para auxiliar no entendimento dos mecanismos responsáveis pela tolerância a esses estresses, como para serem utilizados para a caracterização de genótipos tolerantes.

A variabilidade isoenzimática detectada por eletroforese em populações naturais tem sido em vários casos correlacionada com características do ambiente dessas populações e com caracteres quantitativos de importância adaptativa e/ou agronômica.

O presente trabalho utilizando seis populações naturais de *Stylosanthes humilis*, coletadas em três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco, procura estudar a adaptação à salinidade e a estrutura genética dessas populações. Os objetivos específicos desse estudo são os seguintes:

- a) avaliar o efeito da salinidade na germinação e no crescimento inicial de diferentes populações de *Stylosanthes humilis*, submetidas à gradientes experimentais de salinidade;
- b) determinar o grau de variabilidade genética, estimando os parâmetros genéticos quanto à tolerância salina no estágio

de germinação e do crescimento inicial, de cada uma dessas populações;

c) associar a tolerância salina na germinação e no crescimento com diferentes padrões eletroforéticos de isoenzimas;

d) associar a tolerância salina e o grau de variabilidade genética desse caráter com a variabilidade ambiental e com a seleção e a adaptação das populações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A espécie *Stylosanthes humilis* :considerações biológicas e agronômicas

A espécie *Stylosanthes humilis* H.B.K. pertence à subtribo *Stylosanthinae*, tribo *Aeschynomenae*, subfamília *Papilionoideae*, família *Leguminosae* (RUDD, 1981). O gênero *Stylosanthes*, segundo FERREIRA & COSTA (1979), possui 39 espécies conhecidas, sendo que 25 ocorrem no Brasil e 19 são nativas do Estado de Minas Gerais.

Stylosanthes humilis é endêmico na América Central e do Sul, ocorrendo desde a parte central do México até o Estado do Rio de Janeiro. No Brasil essa espécie é encontrada nos Estados da Bahia, Ceará, Pará, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Maranhão, Piauí, Rio de Janeiro, Goiás, Paraíba, Minas Gerais e na Ilha de Fernando de Noronha (FERREIRA & COSTA, 1979). A espécie foi introduzida na Austrália no começo do século, sendo conhecida por "Townsville stylo" (GILLARD & FISHER, 1978).

Stylosanthes humilis é considerada uma

espécie especialmente adaptada às áreas de climas tropicais semi-áridos, embora ocorra em áreas do Brasil com precipitação anual de até 1500 mm anuais (NASCIMENTO JUNIOR, 1981). Segundo esse autor, a espécie desenvolve-se bem em solos de baixa fertilidade, sendo tolerante ao excesso de manganês e alumínio, tem capacidade de extrair fósforo de solos pobres nesse elemento, sendo ainda pouco exigente em micronutrientes.

A espécie é anual, exigindo dias curtos para florescer, apresentando alto grau de variabilidade quanto ao tempo de florescimento (CAMERON, 1967a; BARRIGA, 1979). Uma vez que o florescimento é iniciado, o crescimento vegetativo cessa e todos os ápices tornam-se florais (t`MANNETJE & VAN BENNEKOM, 1974).

As sementes de *Stylosanthes humilis*, apresentam dormência tegumentar e do embrião logo após a maturação, que é reduzida à medida que o verão se aproxima (CAMERON, 1967b; GARDNER, 1975). A dormência do tegumento é provavelmente quebrada pelas altas temperaturas da superfície do solo (HUMPHREYS, 1981). A dormência do embrião pode ser eliminada por flutuações de temperatura, sendo sensível à pequenas variações de curta duração (BALLARD, 1972; BUTLER, 1975). Os mecanismos de dormência servem como escape à seca, evitando que a germinação das sementes ocorra nas primeiras chuvas, que normalmente são seguidas de prolongados períodos de seca (MOTT *et alii*, 1981).

Durante a fase de estabelecimento, as plantas

de *Stylosanthes humilis* são capazes de suportar considerável estresse de água. As folhas das plântulas durante os períodos de estresse de água, orientam-se paralelamente em direção ao sol, reduzindo a absorção de radiação solar e desse modo a temperatura da folha e a perda de água. As plântulas apresentam rápido crescimento da raiz às expensas do crescimento da parte aérea (GILLARD & FISHER, 1978). Esse mecanismo, segundo esses autores, é vantajoso para garantir a sobrevivência durante o estresse de água, mas ao mesmo tempo, torna as plântulas vulneráveis ao sombreamento com outras espécies, sendo esse o fator mais deletério em pastagens consorciadas com gramíneas.

A importância das leguminosas nas pastagens está relacionada com a fixação do nitrogênio atmosférico. *Stylosanthes humilis* nodula com uma ampla variedade de linhagens de *Rhizobium* e, essa promiscuidade é um fator importante para sua amplitude de distribuição e utilização como forrageira.

Stylosanthes humilis mostra extrema tolerância ao pastoreio intenso e pode ser utilizada em pastagens puras ou consorciadas. Por ser sensível ao sombreamento, é vulnerável à competição com gramíneas perenes de porte alto e gramíneas anuais de rápido crescimento. No caso de pisoteio intenso essa interferência é reduzida e boas consorciações de gramíneas e leguminosas têm sido obtidas (GILLARD & FISHER, 1978).

2.2. Considerações gerais sobre salinidade

As regiões áridas e semi-áridas, que constituem cerca de 40% da superfície da terra são caracterizadas pela seca e temperaturas extremas e normalmente pela presença de água e solos salinos (TAL,1985). Nessas regiões, a elevada taxa de evaporação acarreta o acúmulo de sais no solo e na água, principalmente de cátions sódio, cálcio e magnésio e pelos ânions cloreto e sulfato (RICHARDS,1954).

As maiores áreas afetadas pelo sal, desse modo combinam duas características adversas, a salinidade e a aridez. Consequentemente, as plantas nativas das áreas salinas devem ser adaptadas para as situações adversas que estes ambientes apresentam em comum e, adicionalmente, aos efeitos combinados da baixa disponibilidade de água, com a presença da toxidez de sódio e de outros íons presentes em altas concentrações (EPSTEIN,1975).

Segundo KLAR (1984), os solos salinos são caracterizados por possuírem uma condutividade elétrica do extrato de saturação maior que 4 mmhos/cm a 25°C, sendo que a condutividade elétrica (EC) é diretamente relacionada com a concentração de sais solúveis na solução do solo, sendo o potencial osmótico igual a $-0,36 \text{ EC}$.

O excesso de salinidade tem sido considerado o mais importante fator edáfico que limita a distribuição das plantas em ambientes naturais e constitui-se em um sério

problema para a agricultura em muitas partes do mundo (TAL,1985).

A irrigação com água salina e a aplicação de fertilizantes são os fatores mais responsáveis pelo aumento da salinidade do solo, o que tem acarretado a inutilização de grandes áreas antes cultiváveis (EPSTEIN *et alii*, 1980). O custo da irrigação com água de alta qualidade é elevado e desse modo, a seleção e o melhoramento para tolerância à salinidade em espécies de importância agrônômica, têm sido considerados como uma estratégia econômica eficiente para sobrepor o problema de salinidade do solo (EPSTEIN, 1985).

As espécies que crescem em ambientes salinos, possuem adaptações especiais e são denominadas halófitas (EPSTEIN, 1975). Nesse caso, os solos salinos são definidos como aqueles que apresentam um potencial osmótico menor que -3,3 bar, sendo equivalente à 70 mM de sais monovalentes (GREENWAY & MUNNS, 1980).

2.3. Efeitos da salinidade e mecanismos de tolerância

A salinidade afeta muitos processos fisiológicos nas plantas (LEVITT, 1980), entretanto na maioria das espécies, a não ser no caso de extrema salinização, o sintoma mais aparente é uma diminuição no crescimento. A medida que a concentração de sal no ambiente aumenta acima de um determinado nível, tanto a taxa de crescimento como o tamanho da maioria das plantas progressivamente diminuem

(MAAS & HOFFMAN,1977).As espécies lenhosas entretanto,e algumas plantas herbáceas apresentam sintomas de injúria foliar,caracterizada por queimaduras das folhas,necrose e perda de folhas,devido a toxidez de íons específicos (MAAS & HOFFMAN, 1977; SHANNON,1979).

O excesso de salinidade no ambiente pode provocar em algumas plantas,desbalanços nutricionais que causam diminuição no crescimento e injúrias nas plantas (MAAS & HOFFMAN,1977).

Os mecanismos de tolerância salina em halófitas e não halófitas foram revistos por FLOWERS *et alii* (1977) e GREENWAY & MUNNS (1980), respectivamente.Segundo GREENWAY (1973) ,em ambientes com altos níveis de sódio e cloreto,as plantas alteram suas relações hídricas, diminuindo o seu potencial hídrico para manter o balanço com o menor potencial de água do ambiente.Os íons, sódio e cloreto,podem acumular na planta e causar efeitos adversos no metabolismo,estimulando ou inibindo reações metabólicas e também a absorção de outros íons.

Segundo HUMPHREYS (1981),a tolerância salina pode ocorrer através de uma série de mecanismos,nenhum entretanto é predominante em todas as espécies.Um nível de potencial osmótico é necessário para reter a hidratação e o turgor quando a água do ambiente é limitante.Issso pode ser alcançado através da alta absorção iônica que pode no entanto,causar toxidez iônica específica .A alta absorção iônica é a principal adaptação nas halófitas (LEVITT,1980),

entretanto a alta concentração iônica pode ser tolerada porque os sais são mantidos principalmente no vacúolo, enquanto solutos orgânicos neutros mantêm o potencial osmótico no citoplasma (GREENWAY & MUNNS, 1980).

Em plantas que absorvem altos níveis de íons sódio e cloreto, a tolerância pode ser obtida através da exclusão parcial desses íons da parte aérea, escapando desse modo da toxidez. Um mecanismo de exclusão de sais é a presença de glândulas salinas que eliminam o sal das folhas (HUMPHREYS, 1981).

Vários pesquisadores tentaram estabelecer como critérios de tolerância, a concentração de íons sódio e cloreto na parte aérea, entretanto nem sempre existe uma correlação clara entre o conteúdo desses íons na planta e a tolerância medida em termos de crescimento. Assim, RUSSELL (1976), em seu estudo com gramíneas e leguminosas forrageiras, não achou nenhuma correlação entre o conteúdo de sódio e cloreto da parte aérea e a tolerância, embora as gramíneas de modo geral mais tolerantes, apresentassem um maior conteúdo de sódio que as leguminosas, mais sensíveis.

Nas espécies excludentes, deve-se esperar que a tolerância tenha uma correlação negativa com o conteúdo de íons na parte aérea o que tem sido observado em algumas espécies como *Festuca rubra* (ROZEMA et alii, 1978) e *Neonotonia wightii* (GATES et alii, 1970), onde os genótipos mais tolerantes contiveram menos íons cloreto e sódio.

2.4. Tolerância salina e estágio de crescimento da planta

O efeito da salinidade na planta depende de vários fatores ambientais, como umidade, temperatura e fertilidade do solo, como também do estágio de desenvolvimento da planta (MAAS & HOFFMAN, 1977; SHANNON, 1979).

O arroz é tolerante durante a germinação, tornando-se muito sensível durante o crescimento inicial da plântula e então torna-se mais tolerante com a maturação (PEARSON & BERNSTEIN, 1959). Em contraste, a beterraba é relativamente sensível durante a germinação embora tenha alta tolerância durante o crescimento (FRANCOIS & GOODIN, 1972).

CHOUDHURI (1968), observou que em várias espécies da estepe de Washington, a fase de germinação foi mais sensível ao sal que o estágio de crescimento. Já em cultivares de *Trifolium subterraneum* L. (WEST & TAYLOR, 1981) e, em três espécies do gênero *Lolium* (MARCAR, 1987), a tolerância foi maior durante a fase de germinação do que durante o crescimento. Nesses dois estudos foi encontrada uma baixa correlação entre a tolerância salina na germinação e no crescimento, o que segundo WEST & TAYLOR (1981), é comum nas não halófitas.

2.5. Efeitos da salinidade na germinação

Um grande número de pesquisas têm sido realizadas para avaliar a tolerância salina durante a germinação, principalmente de espécies que apresentam maior interesse agrônomo. Os resultados indicam que todas as espécies de plantas vasculares respondem de maneira idêntica, no sentido de diminuir a porcentagem e a velocidade de germinação à medida que a concentração salina é aumentada (UNGAR, 1978). Existe entretanto uma amplitude muito grande de tolerância entre diferentes espécies e entre diferentes populações da mesma espécie.

Tanto as glicófitas como a maioria da halófitas apresentam melhores porcentagens de germinação em água destilada e à salinidade abaixo de 0,5% de NaCl, indicando que as halófitas não requerem baixos potenciais de água para germinar (UNGAR, 1978).

As halófitas apresentam algum tipo de mecanismo de dormência que distribui a germinação dentro e entre estações de crescimento, de tal modo que a germinação em ambientes salinos ocorre em períodos de baixa salinidade no solo (UNGAR, 1987).

O efeito da salinidade na germinação de espécies halófitas e glicófitas varia com a temperatura. A salinidade e a temperatura parecem interagir no controle da germinação, com os maiores efeitos sendo expressados nos extremos das duas variáveis (HAMPSON & SIMPSON, 1990).

A alta porcentagem de germinação das halófitas na primavera tem sido atribuída tanto às reduções na salinidade do solo, como às variações diurnas na temperatura (BADGER & UNGAR, 1989). Esses autores encontraram que na halófita *Hordeum jubatum*, a temperatura é o fator limitante para a germinação dessa espécie na época de dispersão, e não a alta salinidade do solo.

Uma das preocupações dos pesquisadores tem sido a de determinar se a salinidade afeta a germinação por um efeito puramente osmótico ou por toxidez iônica específica.

Segundo UNGAR (1978), o fato das sementes de halófitas germinarem em água, após as sementes serem embebidas em soluções salinas que são inibitórias para a germinação, indica que a influência principal dos sais na germinação é osmótico, e que nenhuma toxidez iônica permanente é produzida.

A comparação dos efeitos na germinação de tratamentos de diferentes sais com os de solutos impermeáveis tem sido utilizada para fornecer evidências se os sais tem efeito tóxico ou osmótico.

CHOUDHURI (1968) achou em seu estudo com plantas da estepe de Washington que os sais específicos são mais detrimenais que soluções isosmóticas. Ele encontrou que carbonato de sódio foi mais tóxico que cloreto de sódio, sulfato de sódio ou polietilenoglicol.

REDMAN (1974), mostrou que em *Medicago sativa*,

o efeito de NaCl, foi em parte devido à toxidez iônica específica, uma vez que sulfato de sódio e cloreto de magnésio foram mais tóxicos que soluções isotônicas de NaCl. Também a reversão da inibição da germinação por manitol e polietileno glicol após a lavagem em água foi maior do que para a reversão de sementes submetidas a qualquer dos tratamentos iônicos.

Em cevada, *BLISS et alii.* (1986 a,b) concluíram que o efeito principal do NaCl é osmótico, embora também apresente efeitos tóxicos. Em *Triticum aestivum*, *HAMPSON & SIMPSON* (1990), acharam que havia interação significativa entre potencial osmótico e tipo de sal na germinação.

Embora os vários trabalhos com glicófitas, revelem que os sais possam causar efeitos iônicos específicos na germinação, segundo *UNGAR* (1978) na maioria das halófitas esses estudos são inconclusivos. Assim, *MYERS & MORGAN* (1989), mostraram que o efeito principal do NaCl na germinação da halófitas *Diplacne fusca* foi osmótico, uma vez que havia inibição similar da germinação em soluções isosmóticas de NaCl e manitol e essa inibição foi grandemente revertida por subsequente lavagem em água destilada. Entretanto houve também evidência de um efeito tóxico do NaCl na germinação porque a adição de cálcio aumentou a germinação em meio salino.

2.6. Métodos e critérios para a avaliação da tolerância salina

A tolerância salina é mais comumente expressa como a diminuição da produção ou do crescimento para um dado nível de sais solúveis, no ambiente radicular, em relação à produção ou crescimento em condição não salina (MAAS & HOFFMAN, 1977). Esses autores propuseram que a tolerância à salinidade pode ser expressa por uma equação linear, $Y=a+b(x)$, onde y =produção relativa em relação ao controle (meio não salino) e x = salinidade do extrato de saturação do solo na região das raízes, medido em unidades de condutividade elétrica (dS/m). Significantes parâmetros da equação incluem o valor b que é a representação do declínio em produção por aumento da salinidade e o a que é o ponto de inflexão ("threshold"), nível de salinidade mais elevado em que não ocorre nenhuma redução na produção.

MAAS & HOFFMAN (1977), consideram o fato de que em geral, a produção não é significativamente reduzida e, às vezes até aumentada à baixos níveis de salinidade e, propuseram que a equação linear seja dirigida a partir desse nível de salinidade, o ponto de inflexão. Segundo esses autores, o fato de que em algumas espécies a produção aproxima-se a zero assintoticamente e não linearmente, não teria importância prática uma vez que esses desvios de linearidade ocorrem na parte inferior da curva, onde a produção é comercialmente inaceitável.

SHANNON (1985), considera que essas medidas relativas de tolerância salina são úteis para comparações entre espécies com grandes diferenças de produção, mas perde-se informações ao se fazer comparações entre variedades com diferentes potenciais de produção da mesma espécie, o que não ocorre quando os dados são expressos em produção absoluta em circunstâncias especiais, como no caso de informações para o melhorista. Esse autor considera ainda que devido a alta variabilidade da salinidade no solo e as interações ambientais, é questionável se o melhoramento deveria ser conduzido para tolerância ou para produção.

RICHARDS (1983), trabalhando com variedades de trigo e cevada, concluiu que o melhoramento para a tolerância salina é mais eficiente através da seleção para alta produção em ambientes não salinos, devido à alta variabilidade na salinidade no campo. A baixas salinidades, variedades de alta capacidade produtiva, podem produzir mais que variedades menos produtivas com maior tolerância à salinidade. Na presença de alta salinidade no solo, as variedades de baixa produção têm melhores resultados (variedades com maior estabilidade ambiental e maior tolerância relativa).

A tolerância salina tem sido analisada frequentemente após o crescimento das plantas em gradientes experimentais de sais, geralmente NaCl. Na grande maioria das vezes, a salinidade no meio de crescimento é aumentada

gradualmente, por um período de vários dias, para evitar choque osmótico. Quando o objetivo é a análise de variabilidade dentro de populações naturais e/ou para seleção e melhoramento, a resposta das plantas é analisada frequentemente em uma única concentração salina, sem o controle, e portanto a tolerância é avaliada em termos absolutos.

O meio de crescimento utilizado para determinar a tolerância salina tem sido muito variável entre os pesquisadores, sendo utilizado o cultivo hidropônico, cultivo em areia, areia e vermiculita ou solos artificialmente salinizados.

Há também na literatura muita variação em relação ao caráter adotado para avaliar a tolerância das diferentes espécies ou populações. Quando o estresse imposto é severo, vários pesquisadores tem utilizado um índice de sobrevivência (SHANNON, 1978; EPSTEIN *et alii*, 1980; BOWMANN & STRAIN, 1988).

Em algumas espécies tem-se utilizado da resistência aos danos foliares (clorose e necrose) como indicadora de genótipos tolerantes. Esses sintomas foram utilizados por BERNSTEIN & HAYWARD (1958) em diversas espécies frutíferas, por SHANNON (1978) em linhagens de *Thinopyrum elongatum*, MOELJOPAWIRO & IKEHASHI (1981) em arroz, NOBLE *et alii* (1984) em *Medicago sativa*, GREUB *et alii* (1985) em várias leguminosas e gramíneas.

Quanto aos caracteres utilizados para

avaliação de genótipos em relação à redução no crescimento, os autores tem utilizado os mais diversos, tais como comprimento da parte aérea, pesos seco ou fresco da parte aérea, comprimento da raiz, pesos seco ou fresco da raiz, razão entre o peso da parte aérea e das raízes, número de ramificações, largura da folha, número de perfílios.

Apesar dos recentes avanços no entendimento do efeito dos sais nas plantas, não tem sido encontrado um marcador fisiológico ou bioquímico para identificar rapidamente genótipos tolerantes à salinidade (SHANNON, 1985). Alguns autores tentam utilizar como critério de avaliação da tolerância, a concentração de íons na planta, entretanto, como discutido no item 2.3, nem sempre há correlação clara da tolerância avaliada em termos de redução no crescimento e/ou produção com a concentração desses íons na planta. Outros trabalhos utilizam o conteúdo de solutos orgânicos para ajudar a estabelecer diferenças de tolerância salina entre genótipos, como por exemplo o acúmulo de prolina, em ecótipos de *Festuca rubra* L. (ROZEMA et alii, 1978).

2.7. Considerações genéticas e ecológicas

Existe ampla variabilidade quanto à tolerância salina entre espécies. A resposta no crescimento de espécies cultivadas em termos de produtividade foi revista por MAAS & HOFFMAN (1977). A partir dos dados

apresentados por esses autores GREENWAY & MUNNS (1980), calcularam que o feijoeiro, uma das espécies mais sensíveis, apresenta uma redução de 50% na produção em relação ao controle à 60 mM de sais monovalentes e a beterraba, uma das mais tolerantes à 260 mM desses sais. Segundo GREENWAY & MUNNS (1980) a tolerância das espécies cultivadas se sobrepõe com as das halófitas e entre estas, observa-se uma grande variabilidade de resposta à salinidade sendo que há espécies que crescem vigorosamente a 200-500 mM de NaCl e outras cujo crescimento é muito afetado acima de 200 mM.

A tolerância à salinidade na germinação é também muito variável entre espécies, e a faixa de potencial osmótico que reduz em 50% a germinação em relação à água destilada (G50) das halófitas sobrepõe à das glicófitas. O G50 para a maioria das espécies varia de -0.3 MPa à cerca de -1,0 a -1,5 MPa, tanto para as halófitas como para as não halófitas (MYERS & MORGAN, 1989).

Quanto às pesquisas para a variabilidade genética intra específica, a ênfase tem sido dada às espécies cultivadas com a finalidade de posterior seleção e melhoramento, embora vários estudos tenham sido realizados com objetivos ecológicos para o entendimento das estratégias de adaptação das espécies.

Diversos estudos tem demonstrado que as populações de várias espécies, vivendo em ambientes com diferenças de salinidade, mostram diferenciação genética em

resposta à salinidade. De maneira geral, UNGAR (1978), considera que a tolerância salina na germinação das sementes é intimamente relacionada com as condições de salinidade nas quais as populações estão vivendo, indicando a ação da seleção natural.

BAZZAZ (1973) encontrou que as populações de *Prosopis farcta* de ambientes salinos foram mais tolerantes no estágio de germinação do que outras populações de solos menos salinos, indicando uma especialização ecotípica nessa espécie.

Já CHOUDHURI (1968) e MARANON *et alii* (1989), encontraram que em algumas espécies, há correlação de tolerância salina com a salinidade do habitat, enquanto em outras espécies não há diferenças na tolerância salina entre populações de ambientes salinos e não salinos.

Em *Festuca rubra* HANNON & BRADSHAW (1968) e ROZEMA *et alii* (1978), encontraram considerável variação na tolerância salina no crescimento entre populações de ambientes com níveis diferentes de salinidade. A tolerância foi relacionada com a salinidade do habitat e as diferenças entre populações foram suficientemente grandes e foram consideradas como ecótipos distintos. Em populações naturais de *Trifolium repens* de sítios salinos e não salinos foi também encontrada grande variabilidade quanto à tolerância salina entre as populações, que se correlacionava com a salinidade do habitat (AB-SHUKOR *et alii*, 1988).

Vários trabalhos têm demonstrado existir

suficiente variação genética intraespecífica para desenvolver cultivares tolerantes à salinidade. A base genética da tolerância salina, entretanto, tem sido pouco investigada, e o caráter tem sido analisado como quantitativo (SHANNON, 1985; TAL, 1985).

ASHRAF *et alii* (1986), mostraram que a seleção massal por impor alta pressão de seleção, produziu indivíduos altamente tolerantes ao sal, após um único ciclo de seleção em 7 espécies de gramíneas. Essa tolerância salina foi altamente herdável. As estimativas de herdabilidade no sentido restrito foram obtidas através de: 1) regressão mãe-progênie e, 2) resposta à seleção e diferencial de seleção (herdabilidade realizada). As estimativas das herdabilidades baseadas na regressão mãe-progênie e herdabilidade realizada variaram respectivamente de 0,19 a 0,23 em *Holcus lanatus* à 0,72 e 0,77 em *Puccinellia distans*.

A tolerância salina de um cultivar de alfafa se mostrou altamente herdável e foi melhorada por seleção recorrente (NOBLE *et alii*, 1984). Na germinação, ALLEN *et alii* (1985), aumentaram significativamente a tolerância nessa espécie após cinco ciclos de seleção massal, e a herdabilidade no sentido amplo foi estimada em 50%.

Em *Sorghum bicolor* (AZHAR & McNEILLY, 1988), foi analisada a base genética da tolerância salina pelo método dialélio. Efeitos aditivos e dominantes foram importantes na expressão da variação sob níveis de baixa e

alta salinidade,mas os efeitos de genes com propriedades de dominância foram mais pronunciados.

Para o milho,cereal considerado dentro do grupo sensível entre as espécies cultivadas (MAAS & HOFFMAN,1977),foi demonstrado que existe variabilidade genética dentro de dois cultivares suficiente para o melhoramento da tolerância salina nessa espécie (ASHRAF & McNEILLY,1990).

RUSSELL (1976),analisou a tolerância de 11 leguminosas tropicais,10 leguminosas de clima temperado e 11 gramíneas tropicais com potencial forrageiro.Ele estabeleceu equações para calcular o nível de salinidade do solo que reduzia a produção em 50% para facilitar a comparação entre as espécies.De um modo geral ,entre as gramíneas estão as espécies mais tolerantes,embora ocorra sobreposição de valores com as leguminosas.Dentre as leguminosas tropicais, *Stylosanthes humilis*, foi uma das espécies mais sensíveis e *Medicago sativa* a mais tolerante.

Como pode ser constatado na revisão de EDYE et alii (1984),das 10 espécies de *Stylosanthes* relacionadas quanto à atributos agronômicos,somente *S.humilis* e *S.hamata* foram analisados em seu comportamento em relação à salinidade.Esses estudos entretanto tem sido realizados em um ou dois cultivares,e como concluiu BURT(1984),embora haja numerosos estudos na fisiologia de *Stylosanthes humilis*,variações dentro de populações tem recebido pouca atenção.

2.8. Eletroforese de enzimas :variabilidade, adaptação e caracteres quantitativos

2.8.1. Variabilidade isoenzimática e adaptação

Nas últimas duas décadas,a técnica de eletroforese de enzimas tem sido amplamente utilizada para estabelecer a variação genética existente,tanto em plantas como em animais.

MARKERT & MOLLER (1959) definiram isoenzimas como diferentes formas moleculares de proteínas que exibem a mesma especificidade enzimática.Em estudos genéticos,as formas moleculares variantes são chamadas isoenzimas ou isozimas, se seus polipeptídeos são codificados por diferentes locos gênicos e aloenzimas ou alozimas, se seus polipeptídeos são codificados por diferentes alelos do mesmo loco (GOTTLLIEB,1981).

Uma vez que a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo é colinear com a sequência de nucleotídeos de um gene estrutural,as aloenzimas resultam de mutação gênica.Essa relação próxima do gene com os fenótipos aloenzimáticos é que tornou o estudo da eletroforese de enzimas um método analítico consistente para estudos de variação genética (GOTTLLIEB,1977).

Entretanto deve-se considerar quando se estabelece a variação genética através de eletroforese de enzimas,as várias limitações dessa técnica.Desse

modo, mecanismos epigenéticos operando nos níveis de transcrição ou tradução, podem produzir modificações nos polipeptídeos, como por exemplo, alterações de conformação, deaminação, fosforilação, adenilação, degradação seletiva e modificação covalente (JOHNSON, 1979).

Outra limitação da técnica de eletroforese de isoenzimas se refere ao fato de que ela detecta somente parte das variações existentes nos genes estruturais das proteínas. Somente um quarto das substituições de bases resultam em substituições de aminoácidos que alteram a carga líquida da proteína e são facilmente detectadas por eletroforese de rotina. As modificações em sequências não traduzidas dos genes, como os introns, não são detectados pela eletroforese de enzimas (BROWN & WEIR, 1983).

As técnicas de análise direta do DNA, tais como a RFLP (Polimorfismos de fragmentos de restrição), e o sequenciamento de nucleotídeos, ainda apresentam restrições de custos e equipamentos, entre outras, para poderem ser amplamente utilizadas em estudos de biologia de populações, que envolvem a análise de um grande número de indivíduos.

Com a utilização de eletroforese, tornou-se logo evidente que a variação genética isoenzimática em populações naturais é alta (GOTTILIEB, 1981).

Em uma revisão considerando um grande número de espécies GOTTILIEB (1981), mostrou que as espécies de fecundação cruzada apresentam maior variabilidade genética

que as de autofecundação. Esse autor concluiu que as espécies de fecundação cruzada têm cerca de três vezes mais locos polimórficos por espécie, 1,3 vezes mais alelos nesses locos e 8 vezes mais locos polimórficos por população, do que as espécies de autofecundação. As plantas de autofecundação tem menor variabilidade intra-populacional, por outro lado a sua variabilidade é mais distribuída entre populações.

O significado adaptativo dos polimorfismos enzimáticos não está esclarecido, sendo objeto de discussão. A controvérsia entre as duas escolas, a neutralista e a selecionista ainda permanece. A escola neutralista acredita que a maioria das variantes eletroforéticas encontradas não são funcionalmente diferentes, sendo portanto neutras na sua sensibilidade à seleção, sendo consequência da deriva genética e da migração. A escola selecionista advoga que a variação observada é mantida pela seleção natural, através de por exemplo, heterose ou seleção dependente de frequência (LEWONTIN, 1985).

Muitos trabalhos tem demonstrado existir relação entre a variabilidade de isoenzimas com o ambiente. CLEGG & ALLARD (1972), mostraram haver variação microgeográfica em variantes eletroforéticas em função de diferenças de temperatura e umidade entre os habitats em *Avena barbata*. McNAUGHTON (1974), observou variações entre populações nas propriedades enzimáticas da malato desidrogenase quanto à energia de ativação, termoestabilidade e nível de atividade em *Typha latifolia*,

que foram relacionadas com as condições climáticas.

NEVO *et alii* (1979), encontraram que o padrão de variação genética em *Hordeum spontaneum* foi correlacionado com o ambiente, principalmente pelas combinações de temperatura e umidade.

Em *Stylosanthes humilis*, MARCON (1988), através de um amplo estudo envolvendo 25 populações, de três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco, encontrou que o polimorfismo isoenzimático foi relacionado com a variação ambiental, concluindo que a diversidade gênica foi uma evidência da resposta às condições edafo-climáticas.

Em poucos casos, entretanto a importância adaptativa dos polimorfismos enzimáticos tem sido demonstrada. Um dos casos se refere ao polimorfismo para Leucina amino peptidase no crustáceo marinho *Mytilus edulis*. Através de uma série de trabalhos multidisciplinares tem sido demonstrado que: 1) a frequência dos alelos nesse loco varia de acordo com a salinidade ambiental; 2) a expressão dos gens, isto é, o nível total de atividade da amino peptidase é afetado pela salinidade ambiental; 3) há diferenças catalíticas entre as aloenzimas; 4) essas diferenças catalíticas têm efeitos fisiológicos relacionados com a resistência à salinidade; 5) a taxa de mortalidade varia entre os diferentes genótipos moleculares (KOEHN & HILBISH, 1987). Essas evidências demonstram que a variação aloenzimática nesse caso é adaptativa e que o agente

seletivo é o nível de salinidade ambiental.

Segundo KOEHN & HILBISH (1987), a eletroforese de isoenzimas oferece meios de se entender a importância adaptativa da variação genética em populações naturais porque 1) os polimorfismos moleculares ocorrem como fenótipos discretos e a sua base genética pode ser facilmente estabelecida e 2) as enzimas tem função metabólica conhecida e propriedades catalíticas mensuráveis. Essas propriedades segundo os autores, faz com que seja possível testar hipóteses referentes ao efeito de fatores ambientais específicos nas variantes enzimáticas, aos diferentes fenótipos fisiológicos que podem resultar de diferentes aloenzimas, e como essas diferenças se traduzem em medidas de valor adaptativo como sobrevivência e reprodução.

Outro polimorfismo bem estudado com respeito à seu papel na adaptação se refere ao da fosfoglicose isomerase em *Colias*. WATT (1983) e WATT *et alii* (1985), mostraram que as aloenzimas de fosfoglicose isomerase diferem em parâmetros cinéticos e essas diferenças são bem correlacionadas com a sobrevivência, habilidade de voo e sucesso de acasalamento em diferentes temperaturas. Todas as evidências apontam para uma vantagem do heterozigoto e seleção em ambiente flutuante como responsável pela manutenção desse polimorfismo.

2.8.2. Associação de isoenzimas com caracteres quantitativos

Vários trabalhos tem demonstrado associação de genótipos e de variabilidade isoenzimática com caracteres quantitativos, inclusive com aqueles de importância agrônômica. Certas isoenzimas marcadoras, desse modo, podem ser utilizadas para detectar genes desejáveis em populações de plantas (SIMPSON & WITHERS, 1986).

As isoenzimas segundo TANKSLEY *et alii* (1982) apresentam uma série de vantagens para a análise da variação genética em caracteres quantitativos, tais como: 1) ausência de efeitos detectáveis na morfologia e fisiologia, 2) expressão codominante permitindo a identificação exata dos genótipos, 3) ausência de epistasia o que permite a identificação de qualquer número de tais marcadores.

HAMRICK & ALLARD (1975), estudando populações da autógena *Avena barbata* de diferentes regiões ecogeográficas acharam que populações enzimaticamente similares dessa espécie foram também similares para cinco caracteres quantitativos, enquanto que populações que diferiram enzimaticamente, também mostraram diferenças nesses caracteres.

No híbrido interespecífico entre *Lycopersicum esculentum* L e *Solanum pennellii* L., TANKSLEY *et alii* (1981 e 1982), encontraram ligação entre genótipos de enzimas e quatro caracteres quantitativos e, utilizando

diferenças alélicas em 12 locos enzimáticos, conseguiram mapear 21 genes ou blocos de genes controlando esses caracteres quantitativos. Desse modo, como argumentam os autores, pode-se através das eletroforeses de isoenzimas, fazer seleção precoce para caracteres quantitativos.

Em milho, STUBER *et alii* (1982), demonstraram ligação de genes que afetam a produção e outros caracteres quantitativos com marcadores isoenzimáticos, verificando que a seleção baseada em frequências de locos enzimáticos resultou em aumentos significativos na produção e no número de espigas.

POWELL *et alii* (1990), encontraram também em cevada, associação entre locos marcadores de isoenzimas e caracteres quantitativos. Os autores encontraram, por exemplo, que a variação alélica em um loco da amilase é correlacionado com a produção dessa planta e sugeriram que a seleção baseada em isoenzimas poderia afetar a expressão de locos de caracteres quantitativos em cevada.

Em uma leguminosa anual autógama *Amphicarpea bracteata*, PARKER (1988), encontrou forte associação entre fenótipos resistentes a um fungo patogênico e variantes aloenzimáticos, e sugeriu que o patógeno seria o maior agente seletivo que influenciaria a evolução de alelos neutros ou quase neutros nos locos enzimáticos dessa planta.

Considerando que a variação isoenzimática tem sido amplamente utilizada para estimar a quantidade de

variabilidade genética dentro e entre populações de plantas PRICE *et alii* (1984),questionaram quanto da variabilidade isoenzimática reflete a variabilidade em caracteres quantitativos.Esses autores compararam a diferenciação de populações baseada em genótipos isoenzimáticas com as estimativas baseadas em caracteres quantitativos em três espécies autógamas,*Avena barbata*,*Hordeum jubatum* e *Hordeum vulgare* e na alógama *Clarkia williamsonii*.Foi encontrada correlação entre as duas estimativas nas três espécies autógamas,mas não na espécie alógama.Os autores desse modo,sugeriram que os locos marcadores isoenzimáticos podem ser úteis na identificação de características desejáveis em espécies predominantemente autógamas.

KIANG & CHIANG (1990),também compararam a diferenciação baseada em enzimas e em caracteres quantitativos entre 12 populações de soja selvagem,*Glycine soja*.Em geral, a concordância da diferenciação entre populações baseada nas duas estimativas não foi alta,mas as distâncias estimadas com base em 42 locos enzimáticos mostrou correlação significativa com as distâncias estimadas para caracteres fisiológicos e agronomicos.

A existência e a magnitude de associações entre pares de locos e loco-caráter são frequentemente medidas em termos de desequilíbrio gamético (PRICE *et alii* 1984).O desequilíbrio gamético ou associações de multi-locos são devidos a vários fatores, entre os quais seleção epistática, ligação, casamentos preferenciais, deriva

genética e migração. Em populações com alto grau de autofecundação, as associações geradas por efeito de fundador, migração ou outros fatores podem persistir por várias gerações, mesmo na ausência de ligação física ou seleção epistática (HEDRICK et alii ,1978).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem do material utilizado

O material utilizado neste trabalho foi constituído de amostras de seis populações de *Stylosanthes humilis*, coletadas originalmente por MARCON (1988) em três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco, a saber, Mata, Agreste e Sertão. As sementes foram coletadas de plantas individuais e mantidas separadamente, sendo que cada conjunto de sementes de uma planta constituiu uma família. Como o número de sementes coletadas não foi suficiente para a realização do presente trabalho, essas populações foram reproduzidas em Piracicaba, SP.

As características ecogeográficas dos locais onde essas populações foram coletadas estão apresentadas na Tabela 1. Foram estudadas duas populações em cada uma das três regiões, Mata, Agreste e Sertão.

Na região da Mata, tanto a população de Janga, quanto a de Tamandaré, foram constituídas da reunião de amostras de sementes de plantas da área de praia, comumente associadas com gramíneas, e da área dos coqueirais.

A população de Janga é constituída de amostras de plantas da área da praia, a partir de 5 a 10 metros da primeira vegetação da beira da praia e de amostras da população do coqueiral, distante 1000 metros da praia. A população de Tamandaré é formada de amostras da área da praia, distando 500 metros da praia e da região do coqueiral, a uma distância de 2500 metros da praia (MARCON, 1988).

Tabela 1: Dados ecogeográficos das populações de *Stylosanthes humilis* coletadas em Pernambuco.¹

População	Região	Distância de Recife (Km)		Precipitação média anual (mm)	Tipo de solo ²	Características da vegetação ³
		L-O	N-S			
Janga	Mata		15	1651	AB	1
Tamandaré	Mata		130	1191	AB	1
Caruaru	Agreste	130		525	D	2
S. Caetano	Agreste	150		477	C	2
Sertânia	Sertão	283		561	D	2
Flores	Sertão	350		756	CD	2

¹ Parcialmente reproduzida e adaptada de MARCON (1988).

² A= solos com alta capacidade de infiltração e transmissão de água - areias profundas e agregados siltosos; B= solos de capacidade moderada de infiltração e transmissão de água - solos arenosos fracos; C= solos com capacidade baixa de infiltração e transmissão de água - solos argilosos fracos, arenosos fracos e rasos, com baixo teor de matéria orgânica e alto teor de argila; D= solos de capacidade muito baixa de infiltração e transmissão de água - solos salinos sódicos (CONDEPE/SUDENE, 1987).

³ 1= vegetação de praia e coqueirais; 2= margem de rodovia

Como pode ser observado na Tabela 1, os solos dos locais das populações da Mata são do tipo AB, isto é, solos com alta capacidade de infiltração de água, com areias profundas e agregados siltosos. A Zona da Mata, apresenta um clima tropical chuvoso, com precipitação pluviométrica anual elevada. Nessa região *S. humilis* somente foi encontrado em locais muito alterados pela ação do homem (MARCON, 1988).

Embora as duas populações da região do Agreste estudadas neste trabalho ocorram em áreas de precipitação pluvial anual semelhante (Tabela 1), essa região é muito heterogênea quanto a essa característica e em relação às outras variáveis ambientais, como período de precipitação, topografia, altitude e tipos de solo. Já as regiões da Mata e do Sertão são mais homogêneas quanto a essas características ambientais (MARCON, 1988)

3.2. Reprodução das famílias no campo

Para a realização deste trabalho, amostras das famílias de cada população coletada por MARCON (1988), foram plantadas no campo experimental do Departamento de Genética da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP, em setembro de 1988, com a finalidade de aumentar o número de sementes por família.

Sementes de 25 famílias de cada uma das seis populações descritas no item 3.1 foram escarificadas manualmente e colocadas para germinar em caixas gerbox, em

substrato de papel, na estufa incubadora para BOD. As sementes pré-germinadas foram a seguir plantadas em copos plásticos de capacidade de 250 ml, contendo uma mistura de areia e solo, na proporção 1:1.

Cerca de dois meses após, as mudas foram transplantadas para o campo. Cada população foi representada por duas plantas de cada família originalmente coletada, sendo que cada fileira foi constituída por uma população com espaçamento de 2 metros entre plantas. Como houve um período prolongado de chuvas, muitas plantas morreram, de tal modo que duas populações ficaram somente com um número de plantas que representavam 18 famílias originais.

As sementes foram coletadas durante o final de junho e início de julho de 1989, no pico da maturação, a nível de planta individual. As sementes foram beneficiadas e acondicionadas em sacos de papel, à temperatura e umidade ambientais, até serem utilizadas nos ensaios.

As sementes utilizadas mantiveram a estrutura de famílias das populações coletadas na natureza, de tal modo que de cada família original foi amostrada uma planta, cuja progênie constituiu uma família utilizada no presente trabalho.

Em alguns ensaios, as análises foram realizadas a nível de famílias, enquanto que em outros, em "bulks". Esses "bulks" foram constituídos da mistura de 100 sementes de cada planta, sendo que o número de plantas

amostradas por população variou de 18 a 24.

3.3. Ensaio de germinação

As sementes foram testadas quanto ao seu poder de germinação, durante os meses de setembro e outubro de 1989 e a maioria das famílias apresentava dormência do embrião. Segundo BALLARD (1972), pequenas oscilações de temperatura de curta duração (0,25 a 1,0 hora) durante ensaios de germinação podem quebrar a dormência do embrião de *S. humilis*, de tal forma que foram realizados alguns testes prévios com intensidade e duração variáveis de oscilações de temperatura, para quebrar a dormência do embrião, que poderia de alguma forma interagir com a resposta à salinidade.

A oscilação diária de 9°C, com a diminuição da temperatura de 25°C para 16°C, durante duas horas, revelou ser eficaz para quebrar totalmente a dormência devida ao embrião, sendo então utilizada nos ensaios posteriores de germinação.

3.3.1. Avaliação da tolerância salina na germinação em populações de S. humilis

Para este ensaio foram utilizados "bulks" para cada uma das seis populações. As sementes escarificadas manualmente com uma lixa d'água, foram tratadas com o

fungicida Arazan para retardar o aparecimento de fungos, e colocadas para germinar em estufa incubadora BOD no escuro, a 25°C em caixas plásticas gerbox, com três folhas de papel de filtro, umedecidas com 12 ml de água destilada ou soluções de cloreto de sódio.

A germinação das sementes foi testada em cinco concentrações de cloreto de sódio a saber, 0 (água destilada), 67, 134, 201 e 268 mM que corresponderam aproximadamente aos potenciais osmóticos de 0,0; -0,3; -0,6; -0,9 e -1,2 MPa (MPa=mega Pascal).

Os potenciais osmóticos foram calculados de acordo com a equação de Van't Hoff (SALISBURY & ROSS, 1985):

$$\pi = -miRT$$

onde: π = potencial osmótico em MPa;

m = molalidade da solução (moles do soluto/1000 g H₂O);

i = constante de ionização do soluto;

R = constante dos gases (0,00831 l.MPa.mol⁻¹.K⁻¹);

T = Temperatura absoluta (°K).

De acordo com SALISBURY & ROSS (1985), o valor de i para o NaCl é igual a 1,8.

Uma vez que a massa de NaCl nas soluções foi relativamente pequena, a molalidade da solução foi considerada igual à molaridade.

Foram realizadas três repetições para cada concentração de NaCl, para cada população, de tal modo que o ensaio foi constituído de 90 parcelas (6 populações X 5 concentrações de NaCl X 3 repetições). O experimento foi

conduzido em novembro de 1989 segundo o delineamento inteiramente casualizado.

No primeiro dia do experimento, após cinco horas de embebição a 25°C , a temperatura da estufa foi alterada durante 2 horas para chegar à 16°C e após esse período, novamente ajustada à 25°C . Durante os 10 dias de duração do experimento as sementes foram mantidas no escuro e submetidas ao mesmo regime térmico (2 horas à 16°C e 22 horas à 25°C).

Diariamente, depois de 24 horas da instalação do ensaio, foram feitas as contagens das sementes germinadas que eram removidas da placa. Foram consideradas germinadas aquelas que apresentavam radícula com comprimento igual ou superior a dois milímetros.

Sempre que o volume da solução nas placas era diminuído por evaporação, completava-se com água destilada, que era colocada sob as folhas de papel de filtro evitando que as sementes entrassem em contato direto com a água.

A partir dos dados, foram calculados:

- 1) Porcentagem de germinação :G;
- 2) Velocidade de germinação utilizando o índice de velocidade de emergência :IVE (POPINIGS, 1977);

$$\text{IVE} = \sum (n_i / t_i)$$

onde: n_i = número de sementes germinadas no i-ésimo dia

t_i = tempo em dias, para germinação.

Os dados de porcentagem de germinação foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{\% \text{ germinação}}$, para aproximação à

curva normal (STEEL & TORRIE,1980).

*3.3.2.Avaliação da variabilidade genética para tolerância
ao estresse salino na germinação em populações de
S.humilis*

Para esse estudo,foram realizados ensaios com sementes escarificadas e não escarificadas ao nível de famílias,com 18 famílias por população.

Os ensaios foram realizados durante os meses de abril e maio de 1990,sendo que o ensaio com sementes não escarificadas foi realizado após um dia do término daquele com semente escarificada.

Antes do início do experimento,foram realizados testes prévios de germinação com sementes escarificadas,verificando-se que a grande maioria das famílias não apresentava dormência do embrião.Entretanto para eliminar qualquer dormência que poderia existir em sementes de algumas famílias,foi aplicado um único "choque térmico" de duas horas de duração à 16^oC,cinco horas após a instalação do experimento.Durante todo o restante do período experimental,que foi de 14 dias para sementes escarificadas e de 10 dias para as sementes não escarificadas,as sementes foram mantidas a 25^oC,no escuro.

A germinação das sementes foi avaliada em um único nível de sal ,201 mM de NaCl ,correspondendo a um potencial osmótico de - 0,9 MPa,nível que revelou maiores

diferenças entre as populações, de acordo com os resultados do ensaio do item 3.3.1.

Os experimentos foram realizados de acordo com o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por família, com cada repetição constituída de 50 sementes. Todos os demais procedimentos e as avaliações foram idênticos aos descritos no item 3.3.1.

Foram realizadas análises de variância para cada população de acordo com a Tabela 2. A partir das esperanças dos quadrados médios foram estimados os parâmetros genéticos.

Tabela 2. Esquema de análise de variância para os dados de germinação, para a obtenção das estimativas de parâmetros genéticos.

FV	GL	QM	E(QM)	F
Famílias	f-1	Q_1	$\sigma_e^2 + r \sigma_f^2$	Q_1/Q_2
Resíduo	f(r-1)	Q_2	σ_e^2	

tal que: f = número de famílias

r = número de repetições

σ_e^2 = variância do resíduo

σ_f^2 = variância genética entre famílias.

Foram estimados o coeficiente de variação genética entre famílias (CV_g) e o coeficiente de

determinação genotípica (b) ou herdabilidade no sentido amplo, para cada população da seguinte maneira:

$$CV_g = \sqrt{\frac{\sigma_f^2}{\bar{Y}}} \times 100$$

$$b = \sigma_f^2 / \sigma_F^2$$

tal que: $\bar{Y}$ = média geral das 18 famílias

$$\sigma_F^2 = \text{variância fenotípica}$$

$$\sigma_F^2 = Q_1/r$$

3.4. Ensaios de crescimento

3.4.1. Avaliação da tolerância à salinidade no crescimento inicial em populações de *S. humilis*

Para determinar a tolerância à salinidade no crescimento inicial foi realizado um experimento em solução nutritiva no mês de dezembro de 1989, em casa de vegetação no Departamento de Genética da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP. Foram utilizados "bulks" das populações descritas no item 3.1..

As sementes foram esscarificadas manualmente, tratadas com fungicida Arazan e colocadas para germinar em caixas Gerbox, em estufa para germinação tipo BOD, a 25°C no escuro. Para homogenizar a germinação e eliminar qualquer resquício de dormência, foram aplicados

choques de temperatura durante dois dias, conforme indicado no item 3.3..

Após 68-72 horas, as plântulas foram transplantadas para solução nutritiva em tanques de material plástico com capacidade de 32 litros, pintados com tinta preta externamente para evitar o desenvolvimento de algas e manter o ambiente escuro para as raízes. Para manter as plântulas suspensas na solução nutritiva, utilizaram-se bandejas brancas de PVC, removíveis e encaixáveis sobre os tanques, contendo 201 orifícios, igualmente espaçados, onde foram colocadas as plântulas.

Cada tanque recebeu aeração intermitente, através de um tubo de aeração com orifícios de saída de ar colocado no fundo do tanque. Um relógio de tempo assegurava a duração de 15 minutos de aeração a intervalos de 30 minutos.

A solução nutritiva utilizada foi a de Steinberg modificada, descrita por FOY *et alii*. (1967). As concentrações em ppm foram : 50,8 de Ca; 6,6 de Mg; 56 de N (51,9 como NO_3^- e 4,1 como NH_4^+); 3,8 de S; 29,4 de K; 0,01 de Na; 3 de P; 0,34 de Cl; 0,13 de Mn; 0,07 de B; 0,04 de Zn; 0,01 de Cu; 0,005 de Mo e 1,0 de Fe, adicionado separadamente na forma de Fe-EDTA.

O pH da solução foi mantido em 6,0 durante todo o experimento, através de adições de solução de NaOH, quando necessário. O nível inicial da solução nutritiva dos tanques próximo ao fundo da bandeja, foi mantido constante durante a duração do experimento por adição de água

destilada quando necessário.

Para evitar possíveis diferenças no ambiente ao longo de cada tanque, devido ao fato de o tubo de aeração ter sido posicionado em uma das extremidades, as plântulas foram distribuídas em quatro quadrantes ou blocos dentro de cada tanque, sendo que cada bloco, foi chamado de estrato. Cada estrato conteve as seis populações distribuídas aleatoriamente, com seis plantas por população.

Após quatro dias de crescimento em solução nutritiva, foram selecionadas as quatro plantas mais homogêneas dentro de cada população, e de cada estrato, de acordo com o estágio de desenvolvimento. As plantas que apresentavam a primeira folha expandida e, os primórdios da segunda folha foram selecionadas. Nesse estágio, foram iniciados os tratamentos com sal, iniciando com 20 mM de NaCl, com acréscimos diários de 20 mM nos primeiros três dias e 30 mM diários nos outros dois dias, até atingir as concentrações desejadas em cada um dos quatro tanques, isto é, 0 (solução nutritiva), 40, 80 e 120 mM de NaCl.

O experimento durou 28 dias, contados a partir do transplante das plântulas para a solução nutritiva. Após esse tempo as plantas foram coletadas e foram avaliadas as seguintes características:

CA= comprimento da parte aérea em cm
(comprimento do ramo principal, desde o colo da planta até a inserção da última folha);

CR= comprimento da maior raiz, em cm;

CF= comprimento do folíolo central da folha mais jovem totalmente expandida, em cm;

LF= largura do folíolo central da folha mais jovem totalmente expandida, em cm;

NR= número de ramificações (transformado em $\sqrt{\text{número} + 0,5}$);

NF= número de folhas (transformado em $\sqrt{\text{número} + 0,5}$);

NFC= número de folhas com clorose (contagem do número de folhas que se apresentavam amareladas, transformado em $\sqrt{\text{número} + 0,5}$);

NFN= número de folhas com necrose (contagem do número de folhas que se apresentavam total ou parcialmente necrosadas, transformado em $\sqrt{\text{número} + 0,5}$);

PA= Peso seco da parte aérea, em mg (medido após a secagem do material durante 5 dias à 60°C);

PR= Peso seco das raízes, em mg (medido após a secagem das raízes, durante 5 dias à 60°C);

PT= Peso seco total em mg, calculado a partir da soma de PA e PR.

Para facilidade de discussão, estas características serão referidas através de seus símbolos

As plantas foram avaliadas individualmente e então para a análise estatística foi considerada a média das quatro plantas de cada estrato, de tal modo que cada população foi representada por quatro valores em cada nível

de NaCl. Algumas plantas no nível de 120 mM morreram e a elas foram atribuídas o valor zero para cada variável, de tal modo que o valor em cada estrato reflete ambos, o crescimento e a sobrevivência nesse nível.

Foram realizadas análises de variância para cada característica, em cada nível de NaCl. A seguir foi efetuada uma análise de variância conjunta considerando os vários níveis de sal conjuntamente, de acordo com o esquema que consta da Tabela 3.

Tabela 3. Esquema da análise de variância para avaliação da tolerância salina durante o crescimento inicial de populações de *Stylosanthes humilis*.

FV	GL	QM	F
Estratos / níveis	$n(r-1)$	Q_1	Q_1 / Q_5
Populações (P)	$p - 1$	Q_2	Q_2 / Q_5
Níveis (N)	$n - 1$	Q_3	Q_3 / Q_1
P X N	$(p-1)(n-1)$	Q_4	Q_4 / Q_5
Erro médio	$n(r-1)(p-1)$	Q_5	

tal que:

p = número de populações

n = número de níveis

r = número de repetições (estratos)

3.4.2. Avaliação da variabilidade genética para a tolerância à salinidade no crescimento em populações de *S.humilis*

Para a avaliação da variabilidade genética quanto à tolerância salina durante o crescimento, foi conduzido um experimento em solução nutritiva com NaCl, em casa de vegetação do Departamento de Genética da ESALQ/USP, nos meses de janeiro e fevereiro de 1990.

Foram avaliados nesse experimento 18 famílias de cada uma das seis populações de *S.humilis*. O aparato experimental, o estágio das plântulas e a metodologia utilizados foram semelhantes aos descritos no item 3.4.1. Nesse caso, entretanto, foi empregada somente a concentração de 80 mM de NaCl, uma vez que de acordo com os resultados de avaliação das populações em vários níveis de NaCl, a maior variabilidade entre os materiais foi observada nessa concentração.

A salinização foi gradual, começando a partir do quarto dia de transplante das plantas, com 20 mM de NaCl, e depois acréscimos diários de 20 mM.

Devido à limitação no número de plantas que poderiam ser acondicionadas em um único tanque com solução nutritiva e, considerando a necessidade de avaliação de um número significativo de plantas em cada família e ainda que o objetivo maior desse experimento foi a análise da variabilidade genética dentro de populações, optou-se pelo

uso do delineamento denominado blocos de famílias compactas ("compact family blocks"). Esse delineamento é semelhante ao de parcelas subdivididas, onde as parcelas são as populações e as subparcelas são as famílias agrupadas dentro de populações. Neste caso as comparações entre famílias dentro de populações são mais precisas que aquelas entre populações (TORGGLER, 1987).

Cada população foi acondicionada em um tanque, sendo que foram realizadas duas repetições. Devido à limitação no número de tanques, a repetição foi realizada no tempo, dois dias após o término da primeira repetição, para diminuir a possibilidade de interação de genótipos com o tempo.

Considerando a possibilidade de variação ambiental dentro dos tanques, estes foram subdivididos em dez estratos, cada um contendo 18 plantas, uma de cada família, portanto cada tanque conteve 180 plantas de uma população.

Após 28 dias de experimento, as plantas foram coletadas e analisadas quanto às mesmas características descritas no item 3.4.1, com exceção da largura do folíolo. Essa característica não foi avaliada com o objetivo de diminuir o tempo requerido para todas as avaliações, dado o grande número de plantas.

A análise estatística dos dados desse experimento foi realizada conforme VENCovsky¹. Primeiramente,

¹VENCovsky, R. (ESALQ/USP, Piracicaba) Comunicação pessoal, 1990.

foi realizada uma análise de variância para cada população conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Análise de variância dos dados de crescimento em solução nutritiva, para cada população de *S. humilis*.

FV	GL	QM	F
Repetições (R)	$r-1$	Q_1	Q_1 / Q_3
Estratos (S)	$s-1$	Q_2	Q_2 / Q_3
R X S	$(s-1)(r-1)$	Q_3	Q_3 / Q_5
Famílias (F)	$f-1$	Q_4	Q_4 / Q_5
Erro	$(f-1)((r-1)+(s-1)+$ $(r-1)(s-1))$	Q_5	

tal que:

r = número de repetições

f = número de famílias da população

s = número de estratos

No quadrado médio do erro, foram incluídos os quadrados médios referentes às interações F X R, F X S e F X R X S, uma vez que a relação entre o maior quadrado médio e o menor deles não foi superior a 4, conforme condição necessária para a inclusão dos vários erros (PIMENTEL GOMES, 1987).

Após a análise individual, foi realizada uma análise conjunta considerando todas as populações de acordo com a Tabela 5

Tabela 5. Esquema de análise de variância dos dados de crescimento, em blocos de famílias compactas.

FV	GL	QM	E(QM)	F
Repetições	r-1	Q_1	$\sigma_c^2 + f\sigma_b^2 + fs\sigma_a^2 + fsp\sigma_r^2$	Q_1/Q_3
Populações	p-1	Q_2	$\sigma_c^2 + f\sigma_b^2 + fs\sigma_a^2 + rs\sigma_f^2 + fsrV_p$	(*)
Erro (a)	(r-1)(p-1)	Q_3	$\sigma_c^2 + f\sigma_b^2 + fs\sigma_a^2$	
Estratos/pop	p(s-1)	Q_4	$\sigma_c^2 + f\sigma_b^2 + frV_s$	Q_4/Q_5
Erro (b)/pop	p(s-1)(r-1)	Q_5	$\sigma_c^2 + f\sigma_b^2$	
Famílias/pop	p(f-1)	Q_6	$\sigma_c^2 + rs\sigma_f^2$	Q_6/Q_7
Erro (c)/pop	p(f-1)((r-1)+(s-1) +(r-1)(s-1))	Q_7	σ_c^2	
Famílias/pop ₁	f-1	Q_8	$\sigma_c^2 + rs\sigma_{f_1}^2$	Q_8/Q_7
Famílias/pop ₂	f-1	Q_9	$\sigma_c^2 + rs\sigma_{f_2}^2$	Q_9/Q_7
Famílias/pop ₃	f-1	Q_{10}	$\sigma_c^2 + rs\sigma_{f_3}^2$	Q_{10}/Q_7
Famílias/pop ₄	f-1	Q_{11}	$\sigma_c^2 + rs\sigma_{f_4}^2$	Q_{11}/Q_7
Famílias/pop ₅	f-1	Q_{12}	$\sigma_c^2 + rs\sigma_{f_5}^2$	Q_{12}/Q_7
Famílias/pop ₆	f-1	Q_{13}	$\sigma_c^2 + rs\sigma_{f_6}^2$	Q_{13}/Q_7

(*) O teste F para populações neste caso consiste em:

$$F = (Q_2 + Q_7) / (Q_3 + Q_8)$$

Tal que: r= número de repetições; p= número de populações; s= número de estratos; f=número de famílias por população; σ_c^2 = variância do erro (c) (variância do erro entre famílias dentro de populações; σ_b^2 = variância do erro (b) (variância do erro entre estratos dentro de populações); σ_a^2 = variância do erro (a) (variância do erro entre populações); σ_f^2 = variância genética entre famílias dentro de populações; V_F = variância entre populações; V_s = variância entre estratos

Os números de graus de liberdade para o teste de F para populações podem ser assim calculados (PIMENTEL GOMES, 1987):

$$n_1 = \frac{(Q_2 + Q_7)^2}{\frac{(Q_2)^2}{p-1} + \frac{(Q_7)^2}{p(f-1)((r-1)+(s-1)+(r-1)(s-1))}}$$

$$n_2 = \frac{(Q_3 + Q_6)^2}{\frac{(Q_3)^2}{(r-1)(p-1)} + \frac{(Q_6)^2}{p(f-1)}}$$

A partir das esperanças dos quadrados médios foram estimados os parâmetros genéticos.

A estimativa das variâncias genéticas entre famílias dentro de populações (σ_f^2) foi assim obtida:

$$\sigma_f^2 = (Q_x - Q_7) / rs$$

onde: Q_x refere-se aos quadrados médios de famílias dentro de populações, x de 8 a 13.

O coeficiente de variação genética entre famílias (CV_g) e o coeficiente de variação ambiental (CV_e), foram estimados através das seguintes expressões:

$$CV_g(\%) = \frac{\sqrt{\sigma_{f_i}^2}}{\bar{Y}_i} \times 100$$

$$CV_e(\%) = \frac{\sqrt{\sigma_c^2}}{\bar{Y}_i} \times 100$$

Tal que : $\sigma_{f_i}^2$ = variância genética entre famílias da população i ; $\bar{Y}_i$ = média geral da população i.

O coeficiente de herdabilidade no sentido amplo foi obtido a partir da seguinte expressão:

$$h^2 = \sigma_{f_i}^2 / (\sigma_{f_i}^2 + \sigma_c^2)$$

A variância entre plantas dentro de famílias e populações ($\sigma_{d_i}^2$) foi calculada, conforme a expressão:

$$\sigma_{d_i}^2 = QM_{d_i} - V_S - \sigma_b^2$$

Tal que: QM_{d_i} = variância entre plantas dentro de famílias da população i, calculada a partir da média das 36 variâncias dentro de famílias, dentro da população i (18 famílias, 2 repetições). Número de graus de liberdade = 324 (36 X (10-1)).

$$V_S = (Q_4 - Q_5) / fr$$

$$\sigma_b^2 = (Q_5 - Q_7) / f$$

A σ_d^2 é composta por fatores genéticos e ambientais, representando portanto uma variância fenotípica.

3.5. Análise eletroforética das isoenzimas

A análise eletroforética foi realizada em gel de amido, migração horizontal. O amido utilizado para a confecção do gel foi hidrolizado no laboratório em uma metodologia baseada no trabalho de SMITHIES (1955), a partir de fécula de batata comercial. Esse método consiste basicamente na hidrólise do amido com ácido clorídrico em acetona à temperatura de $38,5^{\circ}\text{C}$, durante 45 minutos sendo a reação interrompida com acetato de sódio 1M. Após o descarte da fase líquida, o amido é lavado várias vezes com água destilada, sendo posteriormente secado em estufa por duas horas em temperatura entre 45 a 65°C .

Foram analisados três sistemas enzimáticos, esterase (Est), peroxidase (Px) e malato desidrogenase (Mdh). A análise das esterases foi realizada em sementes embebidas durante 14 horas e peroxidase e malato desidrogenase em plântulas com 2 cm de comprimento.

As sementes após serem escarificadas, foram colocadas para germinar em caixas gerbox à 25°C , no escuro em estufa BOD para germinação.

Foram analisadas 18 famílias para cada uma das seis populações descritas no item 3.1., uma plântula ou

semente embebida por família.

Com base nos experimentos de germinação, foram selecionadas cinco famílias tolerantes e cinco famílias sensíveis dentro das populações São Caetano e Caruaru, e o sistema das peroxidases foi também analisado em 5 a 10 plântulas em cada uma dessas 20 famílias.

O gel de amido utilizado apresentou espessura de 2 mm e concentração de 12%. Para a análise de peroxidase e esterase, o gel foi preparado com os tampões A e B de SCANDALIOS (1969), na proporção de 1A:9B, pH 8,3. Para a análise de malato desidrogenase foi utilizado no gel o seguinte tampão: TRIS 0,0135 M; histidina 0.005 M e ácido cítrico até pH 7,0 (SOLTIS *et alii*, 1983).

O gel foi preparado na tarde anterior à sua utilização em kitasato, sobre o fogo, com movimentos rotativos contínuos, até começar a ferver. Nesse momento, o gel era retirado do fogo e após a retirada das bolhas com auxílio de uma bomba de vácuo, o gel era colocado em canaleta de vidro com 17,0 cm X 15,0 cm X 0,2 cm sendo coberto por uma placa de vidro. Após esfriar, esse conjunto era coberto com plástico até a manhã seguinte, quando era colocado para refrigerar uma hora antes de ser utilizado.

A extração das enzimas foi realizada através da maceração dos materiais com auxílio de um bastão de vidro, sobre placas de acrílico com escavações arredondadas, onde se colocava a plântula. Cada amostra recebeu uma gota (40 µl) de tampão de extração. A placa com

as amostras foi mantida durante a maceração até o tempo em que foram utilizadas sobre placas com gêlo.

O tampão de extração utilizado foi o seguinte: TRIS 0.1M pH 7,5; sacarose 0,2M; polivinil pirrolidona 0,6 %; soro albumina bovina 0,1%; EDTA 1 mM. Pouco antes de ser utilizado, foi adicionado 20 μ l de 2-mercapto-etanol 0,6% em 15 ml desse tampão.

Os extratos foram absorvidos em papel de filtro de 2mm X 3 mm e as amostras foram aplicadas no gel previamente cortado com um pente de acrílico.

As amostras foram aplicadas no gel a 2,0 cm da ponte do polo negativo para a análise de esterase e malato desidrogenase, e para as peroxidases que mostraram bandas catódicas, à 5 cm do polo negativo. Em cada uma das duas extremidades do gel foi colocado papel de filtro embebido com solução de azul de bromofenol para marcar a linha de frente durante a migração.

A corrida foi feita em refrigerador à 4°C, em cubas horizontais. O tampão das cubas com os eletrodos foi o tampão A de SCANDALIOS (1969), pH 8,3 para peroxidase e esterase. Para a malato desidrogenase, utilizou-se o tampão TRIS 0,135 M e ácido cítrico até pH 7,0 (SOLTIS *et alii*, 1983). A migração era interrompida quando a linha de frente atingia 9 cm do ponto de aplicação para as esterases e malato desidrogenases e 6,5 cm para as peroxidases.

Após a corrida eletroforética era feita a revelação do gel. A revelação das esterases foi de acordo com

SCANDALIOS (1969) modificado.

- 1- H_2O 20 ml
- 2- α naftil acetato (1%) em etanol e
 agua (7:3)..... 1,5 ml
- 3- Fast garnet GBC 0,4 g
- 4- Tampão C ($Na H_2PO_4$, 0,2 M)..... 25 ml
- 5- Tampão D ($Na_2H PO_4$, 0,2 M)..... 5 ml

A revelação das peroxidases foi realizada pela técnica de BREWBAKER *et alii* (1968), modificada.

- 1- ortodianisidina..... 0,05 g
- 2- etanol 95 % 35 ml
- 3- Tampão fosfato 1,0 M (pH 6,0)... 14 ml
- 4- $H_2 O_2$ (1%) 1 ml

As malato desidrogenases foram reveladas de acordo com SOLTIS *et alii* (1983).

- 1- tampão TRIS-HCl 1,0 M pH 8,0.....5 ml
- 2- NBT ("nitro blue tetrazolium").....0,005g
- 3- PMS ("Phenazine methosulfate")..... 0,001g
- 4- ácido DL málico.....1,34 g
- 5- NAD0,005g

O ácido DL málico, 1,34 g, era dissolvido em 30 ml de H_2O e depois acrescentado 5 ml de tampão TRIS-HCl 1 M pH 8,0. Essa solução era acertada para pH 8,0 com NaOH 4 N e o volume completado para 50 ml com H_2O . A seguir eram dissolvidas os demais reagentes nessa solução.

As enzimas foram reveladas em estufa a 30 °C, durante o tempo necessário para a clara visualização das

bandas. Após a revelação, os géis eram lavados e fixados em solução de H_2O , álcool metílico e ácido acético (5:5:1) por 15 minutos e posteriormente conservado na geladeira.

A análise dos zimogramas foi feita, obtendo-se para cada banda um R_m (Migração relativa). O R_m de cada sistema enzimático, foi obtido pela divisão da distância migrada pela enzima pela distância migrada por uma banda padrão. A banda padrão de cada sistema foi escolhida pela sua alta frequência, constância e nitidez em todos os indivíduos.

A frequência das bandas em cada população foi obtida através da razão entre o número de plântulas com a banda e o número de plântulas analisadas. Foram também calculadas em cada população a frequência de alguns alelos. Foram analisadas 18 plântulas em cada população.

A frequência de alelos de peroxidase foi também calculada dentro de cada uma das 20 famílias das populações Caruaru e São Caetano.

Foram realizadas análises de correlação linear das frequências de bandas e alelos com a porcentagem de germinação transformada (GT), índice de velocidade de emergência (IVE), número de folhas com necrose transformado (NFN) e peso seco da parte aérea (PA), estimados nos experimentos com famílias. Para tanto, as frequências dos alelos e bandas foram transformados em $\arcsen \sqrt{\text{frequência}}$, sendo as frequências iguais a 0,0 substituídas por $1/4N$, e as iguais a 1,0 por $1-1/4N$, onde N = número de plântulas analisadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da tolerância à salinidade na germinação em populações de *S.humilis*

Os resultados das análises de variância para o índice de velocidade de emergência (IVE) e porcentagem de germinação transformada em $\text{arc sen } \sqrt{\% \text{ germinação}}$ (GT), referentes às seis populações de *S.humilis* descritas no item 3.1. e submetidas a um gradiente de níveis de salinidade são apresentados na Tabela 6.

Verifica-se na Tabela 6, a existência de diferenças significativas ao nível de 1 % de probabilidade entre populações e entre níveis de salinidade para as duas características. A existência de interação altamente significativa entre os níveis de salinidade e populações quanto à porcentagem de germinação indica que as populações foram diferentemente afetadas pelo gradiente, e que portanto em relação a essa característica, as populações apresentaram diferentes tolerâncias relativas ao sal. Com relação à velocidade de germinação, o fato de não existir interação significativa entre níveis e populações, mostra que o sal

afetou de maneira similar as diferentes populações.

Tabela 6. Análise de variância do índice de velocidade de emergência(IVE) e da porcentagem de germinação transformada em $\text{arc sen } \sqrt{\% \text{ germinação}}$ (GT) em populações de *S.humilis*, submetidas a diferentes níveis de NaCl.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios	
		IVE	GT
Níveis de NaCl (N)	4	1853,893**	5881,321**
Populações (P)	5	185,306**	667,191**
Interação (N X P)	20	10,520 _{ns}	100,286**
Erro	60	6,343	29,386
CV (%)		14,82	8,25

** significativo ao nível de 1% pelo teste F.
_{ns} não significativo.

Na Tabela 7 são apresentadas as médias para IVE e porcentagem de germinação (G) nos diferentes níveis de sal, considerando o conjunto das populações.

Pode-se observar que à medida que a concentração de NaCl aumenta, a velocidade e a porcentagem de germinação diminuem, como tem sido amplamente documentado em um grande número de espécies halófitas e glicófitas, embora em grau diferente para cada espécie (UNGAR, 1978).

Tabela 7. Médias nos diferentes níveis de NaCl, do índice de velocidade de germinação (IVE) e da porcentagem de germinação (G) em *S. humilis*.

Nível de NaCl (mM)	IVE	G ²
0	29,91 a ¹	97,78 a
67	23,53 b	96,44 a
134	16,89 c	87,89 b
201	10,10 d	67,44 c
268	4,55 e	40,11 d

¹ As médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

² Para a realização do teste de Tukey foram utilizados valores transformados em $\arcsen \sqrt{\% \text{ germinação}}$.

A imposição de um estresse salino resultou em um atraso no início da germinação e em um maior tempo para a germinação se completar. A velocidade de germinação mostrou-se mais sensível à salinidade do que a porcentagem final de germinação, uma vez que a menor concentração de NaCl, 67 mM de afetou somente a velocidade de germinação e concentrações maiores de sal afetaram em maior proporção a velocidade do que a porcentagem de germinação. A maior sensibilidade da velocidade de germinação à salinidade em relação à porcentagem final de germinação também foi observada por WEST & TAYLOR (1981) em cultivares de *Trifolium subterraneum*, WEST & FRANCOIS (1982) em *Vigna*

unguiculata, MARCAR (1987) no gênero *Lolium* e TORRES-SCHUMANN *et alii* (1989) em *Licopersicum esculentum*.

WEST & TAYLOR (1981) e WEST & FRANCOIS (1982), sugeriram que nas menores concentrações de sal, onde somente a velocidade de germinação é afetada, a influência do sal na germinação deve ser devido a um efeito puramente osmótico, e que concentrações maiores de NaCl que afetam também a porcentagem de germinação devem produzir efeitos tóxicos ou osmóticos ou ambos. Embora fossem necessários estudos comparativos com soluções isosmóticas de solutos impermeáveis, para concluir a respeito dos efeitos do NaCl na germinação de *S. humilis*, os dados obtidos podem sugerir que até a concentração de 67 mM a influência do sal na germinação pode ser devido a um efeito puramente osmótico. Em concentrações maiores, o sal pode ter afetado a germinação também por efeitos tóxicos. Embora a maioria dos trabalhos pareça sustentar a idéia de que o principal efeito dos sais na germinação é osmótico (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1975; BLISS *et alii*, 1986), há evidências de que em glicófitas a inibição da germinação pelo NaCl deve-se também à efeitos tóxicos (REDMAN, 1974; UNGAR, 1978, BLISS *et alii*, 1986b).

As Figuras 1A e 1B mostram porcentagem de germinação transformada (GT) e a velocidade de germinação (IVE), respectivamente nas seis populações de *S. humilis* nos diferentes níveis de NaCl, e a Tabela 8 apresenta os valores médios das populações nos níveis de NaCl.

Tabela 8. Médias das seis populações de *S. humilis*, submetidas à diferentes níveis de salinidade, do índice de velocidade de emergência (IVE) e da porcentagem de germinação (G)

População	IVE	G ²
Flores	14,07 cd ¹	81,07 a
Sertânia	12,97 d	64,80 b
Caruaru	22,17 a	86,00 a
São Caetano	15,81 bc	68,40 b
Janga	19,77 a	82,40 a
Tamandaré	16,99 b	84,93 a

¹Valores com a mesma letra em cada coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

²Para a realização do teste de Tukey, foram utilizados valores transformados em $\arcsen \sqrt{\% \text{ germinação}}$.

Pela análise da Figura 1B, pode-se observar que as linhas são praticamente paralelas, não havendo interação entre populações e níveis de NaCl como já foi discutido anteriormente, embora as populações tenham apresentado valores bem diferentes, com Janga e Caruarú, mostrando as maiores velocidades (Tabela 8).

Com relação à porcentagem de germinação (Figura 1A e Tabela 8), as populações Sertânia e São Caetano

Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de NaCl, na porcentagem de germinação transformada em $\text{arc sen } \sqrt{\% \text{ germinação}}$ (A) e na velocidade de germinação, (B) em seis populações de *S. humilis*.

mostraram-se bem diferentes das demais, com uma tolerância salina bem menor. Um parâmetro utilizado para avaliar a tolerância salina é o nível de salinidade máximo em que não há diferenças significativas em relação ao controle, denominado ponto de inflexão ("threshold") (MAAS & HOFFMAN, 1977). Esse nível seria 67 mM para as populações São Caetano e Sertânia e 134 mM para as demais (Figura 1A). Embora as outras populações na média dos níveis de NaCl, tenham tido um comportamento semelhante (Tabela 8), como ocorreu interação significativa entre níveis de sal e populações, pode-se considerar que Janga e Caruarú são mais tolerantes, uma vez que a maior concentração de sal (268 mM), parece ter afetado menos a sua germinação do que as populações Flores e Tamandaré conforme pode ser observado na Figura 1A.

Como a salinidade do solo apresenta-se muito variável dentro de uma mesma área (RICHARDS, 1983) e no tempo (UNGAR, 1978), a existência de interação entre nível de sal e populações na porcentagem de germinação pode ter uma importância adaptativa, significando que em diferentes locais do ambiente dessas populações e em diferentes ocasiões a germinação preferencial dos genótipos é alterada.

Pelo que se tem conhecimento, essas são as primeiras avaliações relatadas na literatura da tolerância salina na germinação de *S. humilis*. O conhecimento dos fatores ambientais que podem influir na germinação são particularmente importantes em espécies anuais, que dependem a cada ano de uma germinação bem sucedida para a sua

sobrevivência. A germinação de um modo geral é considerada como um dos estádios mais críticos do ciclo de vida das plantas (SOLBRIG, 1980).

Comparando-se a tolerância salina de *S. humilis* com outras espécies na literatura, pode-se concluir que essa espécie está entre as mais tolerantes, sendo comparável a algumas halófitas. Um outro parâmetro que se tem utilizado na literatura para comparar diferentes genótipos quanto à tolerância à salinidade na germinação, é a concentração do sal que reduz 50% da germinação em relação à germinação em água destilada (G50). Embora as populações aqui estudadas tenham apresentado grandes diferenças, em média *S. humilis* apresentou 50% de redução da porcentagem de germinação à 268 mM, equivalente à -1,2 MPa de potencial osmótico (Tabela 7), um valor similar à espécie *Lolium perene*, relatada como tolerante, em que a porcentagem de germinação foi reduzida à 50% em 250 mM de NaCl (MARCAR, 1987). O G50 para a maioria das espécies varia de -0,3 MPa a cerca de -1,0 a -1,5 MPa, tanto para halófitas como para glicófitas (MYERS & MORGAN, 1989).

As populações avaliadas neste trabalho são oriundas de regiões com solos diferentes quanto à salinidade (Tabela 1), sendo que as populações Sertânia, Flores e Caruaru são de regiões com solos classificados como salinos sódicos, enquanto que as demais não apresentam solos salinos. Parece não existir nenhuma relação da tolerância salina na germinação com a classificação geral dos solos

das regiões, uma vez que Sertânia foi uma das populações mais sensíveis, sendo localizada em região de solo salino, enquanto que Janga uma das mais tolerantes é oriunda da região onde o solo foi classificado como não salino. Embora a tolerância salina na germinação de maneira geral tenha sido relacionada com a salinidade do ambiente das populações (BAZZAZ, 1973; UNGAR, 1978), indicando ação da seleção natural, em várias espécies essa relação não foi encontrada (CHOUDHURI, 1968; MARANON *et alii*, 1989).

Entretanto, como o solo do local de coleta dessas populações não foi analisado quanto à salinidade, e considerando ainda que há grandes variações na salinidade dentro de uma mesma área (RICHARDS, 1983), a análise da relação da tolerância salina das populações com a salinidade do ambiente de origem fica comprometida, sendo mais prudente não tecer conclusões a esse respeito.

4.2. Avaliação da variabilidade genética da tolerância à salinidade na germinação em populações de S. humilis

O experimento em gradiente de salinidade (item 4.1.) mostrou que na concentração de 201 mM de NaCl foi observada maior variabilidade entre as populações (Figura 1A). Desse modo, essa concentração foi escolhida para avaliar a variabilidade existente dentro de populações quanto à tolerância salina na germinação.

As Tabelas 9 e 10 apresentam, respectivamente as análises de variâncias para a porcentagem de germinação transformada (GT) e para a velocidade de germinação (IVE), em sementes escarificadas, avaliadas em 18 famílias de cada uma das seis populações. Os resultados das duas variáveis, foram similares, no sentido de que houve diferenças altamente significativas entre famílias, em todas as populações, com exceção da população Tamandaré que não mostrou diferenças significativas quanto a velocidade de germinação.

Nas Tabelas 11 e 12 que apresentam os valores de G e IVE de sementes escarificadas, respectivamente para cada família nas populações, pode-se observar realmente que a população Tamandaré apresenta baixa variabilidade, com uma diferença de 50,7 entre as famílias que apresentaram a maior G e a menor e de 8,5 entre as famílias que apresentaram o maior IVE e o menor. Já as populações de Caruaru e S. Caetano, apresentaram grandes amplitudes entre as famílias com diferenças de 75,4 % e 90,00% respectivamente para G e 25,0 e 20,9 respectivamente para IVE.

Com relação à porcentagem de germinação (Tabela 9), os coeficientes de variação genética (CV_g), evidenciaram que com exceção da população Tamandaré que apresentou um CV_g de 14,6% e menor que o coeficiente de variação ambiental (CV), todas as populações apresentaram considerável variabilidade genética entre famílias, com valores de 19,7% a 52,3% e maiores que os respectivos coeficientes de variação

ambiental. As populações Caruaru e S. Caetano são as que mostraram a maior variabilidade genética entre famílias, com valores de 33,2% e 52,3% respectivamente. A população Janga apresentou um valor intermediário de CV_g , igual a 19,7%. Todas as populações, com exceção da Tamandaré, apresentaram coeficientes de determinação genotípica (b) altos, com valores de 0,89 a 0,98, mostrando que a maior parte da variabilidade dessas populações observada na tabela 11 é de origem genética. Esses elevados valores de b indicam que a tolerância salina na germinação dessas populações pode ser alterada com relativa facilidade por pressões de seleção, o que pode ter importância do ponto de vista da adaptação dessas populações à salinidade do solo.

Tabela 9. Análise de variâncias para porcentagem de germinação transformada (GT) de sementes escarificadas, envolvendo 18 famílias em seis populações de *Stylosanthes humilis*, submetidas à 201mM de NaCl, e seus respectivos coeficientes de variação (CV %), coeficientes de variação genética (CV_g %) e coeficientes de determinação genotípica (b).

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios					
		Flores	Sertânia	Caruaru	S. Caetano	Janga	Tamandaré
Família	17	393,638**	315.722**	1176,540**	1470,430**	589,008**	181,229**
Resíduo	36	40,930	34,382	36,490	29,677	33,421	70,275
Média		50,97	36,85	58,75	41,87	68,97	41,05
CV (%)		12,6	15,9	10,3	13,0	8,4	20,4
CV_g (%)		21,3	26,3	33,2	52,3	19,7	14,6
b		0,90	0,89	0,97	0,98	0,94	0,61

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 10. Análise de variâncias de velocidade de germinação de sementes escarificadas envolvendo 18 famílias em seis populações de *Stylosanthes humilis*, submetidas à 201 mM de NaCl, e seus respectivos coeficientes de variação (CV %), coeficientes de variação genética (CV_g %) e coeficiente de determinação genotípica (b)

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios					
		Flores	Sertânia	Caruaru	S. Caetano	Janga	Tamandaré
Famílias	17	34,752**	20,606**	222,847**	179,381**	138,526**	15,022 ^{ns}
Resíduo	36	3,528	4,409	7,005	1,990	5,786	7,786
Média		7,96	5,62	17,43	7,72	19,55	6,13
CV (%)		23,6	37,4	15,2	18,3	12,3	45,5
CV_g (%)		40,5	41,3	48,7	99,6	34,0	25,3
b		0,90	0,79	0,97	0,99	0,96	0,48

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

^{ns} não significativo.

Os coeficientes de variação ambiental para velocidade de germinação (Tabela 10) foram em todas as populações maiores do que os respectivos valores para porcentagem de germinação (Tabela 9). Isso provavelmente deve-se ao fato de que as variações diárias na quantidade de sementes germinadas entre as repetições tendem a se anular à medida que o experimento ocorre, diminuindo portanto a variação entre as repetições na porcentagem final da germinação. Os valores dos coeficientes de variação genética quanto à velocidade de germinação foram também proporcionalmente maiores do que as de porcentagem de germinação, mas mantiveram as mesmas relações entre as populações. Desse modo, os coeficientes b foram da mesma

magnitude nas duas variáveis, sendo baixo para Tamandaré (0,48) e alto nas demais populações (0,79 a 0,99).

Tabela 11. Porcentagem de germinação (G) de sementes escarificadas de 18 famílias de cada uma das seis populações de *Stylosanthes humilis*, na presença de 201 mM de NaCl.

Famílias	Populações					
	Flores	Sertânia	Caruaru	S. Caetano	Janga	Tamandaré
1	50,7	40,7	84,0	42,0	98,7	40,0
2	75,3	42,7	94,0	17,3	92,0	53,3
3	58,0	56,7	24,0	24,7	100,0	42,0
4	64,7	17,3	86,0	90,7	76,7	67,3
5	76,7	32,0	90,7	54,7	92,7	38,0
6	88,0	39,3	91,3	14,7	95,3	36,0
7	59,3	36,7	94,7	88,0	53,7	42,7
8	82,0	14,7	20,7	54,7	92,0	44,7
9	58,7	35,3	31,3	24,0	97,3	26,7
10	57,3	30,0	94,0	12,0	74,0	35,3
11	57,3	38,0	82,7	86,7	99,3	42,7
12	29,3	30,0	89,3	8,0	57,3	48,7
13	50,7	26,7	19,3	30,0	95,3	50,7
14	22,0	30,0	70,7	92,0	92,0	74,0
15	66,7	27,3	26,0	16,7	56,0	44,0
16	79,3	24,0	91,3	15,3	70,7	31,3
17	68,7	47,3	92,0	22,7	54,7	23,3
18	29,3	86,0	78,7	98,0	97,3	41,3
Média	59,7	36,4	70,0	44,0	83,0	40,1
Ampli- tude	22,0 a 88,0	14,7 a 86,0	19,3 a 94,7	8,0 a 98,0	53,7 a 100,0	23,3 a 74,0

Tabela 12. índice de velocidade de emergência de sementes escarificadas de cada uma das 18 famílias das seis populações de *S. humilis*, na presença de 201 mM de NaCl.

Famílias	Populações					
	Flores	Sertânia	Caruaru	S. Caetano	Janga	Tamandaré
1	8,2	7,6	23,3	6,6	24,1	3,8
2	11,0	3,8	23,2	2,5	21,2	8,0
3	8,7	6,3	3,1	3,3	25,0	6,7
4	8,9	2,9	20,0	19,6	15,0	11,4
5	9,4	4,9	21,6	5,3	22,7	5,7
6	12,0	5,0	22,2	2,1	24,3	7,7
7	6,1	5,1	27,0	18,4	14,1	6,0
8	13,6	2,2	4,2	6,2	21,8	7,0
9	6,2	6,8	6,4	2,8	24,0	3,4
10	6,3	5,6	28,1	1,6	12,6	4,3
11	7,1	7,0	20,0	18,7	28,6	5,6
12	2,9	3,1	23,5	0,8	9,0	6,3
13	6,1	3,2	4,6	3,3	25,3	6,9
14	2,3	4,4	19,9	19,3	23,1	8,9
15	8,7	6,2	3,7	1,9	10,6	5,7
16	14,6	4,4	21,7	1,4	11,3	2,9
17	7,5	9,6	22,0	3,3	9,9	3,4
18	3,5	13,0	19,1	21,7	29,2	5,3
Média	8,0	5,6	17,4	7,7	19,5	6,1
Amplitude	2,3 a 14,6	2,2 a 13,0	3,1 a 28,1	0,8 a 21,7	9,0 a 29,2	2,9 a 11,4

Devido ao fato que *S. humilis* apresenta dormência tegumentar, procurou-se nesse trabalho avaliar também a resposta à salinidade em sementes não escarificadas. As famílias foram avaliadas nas mesmas

condições experimentais que as sementes escarificadas e na mesma concentração de NaCl, isto é 201 mM. O experimento entretanto foi realizado somente durante 10 dias, porque após esse período, algumas parcelas apresentaram contaminação por microorganismos que poderiam alterar os resultados.

As Tabelas 13 e 14 apresentam as análises de variância e as estimativas dos parâmetros genéticos para GT e IVE, respectivamente, para as sementes não escarificadas, envolvendo 18 famílias de cada uma das seis populações de *S. humilis*. Com exceção da população Tamandaré, observam-se nas demais populações, diferenças significativas entre famílias, ao nível de 1% de probabilidade e de 5% para GT na população Janga. Os coeficientes de variação ambiental foram altos, particularmente para velocidade de germinação, o que se deve provavelmente ao fato dos pequenos valores observados.

As médias das populações quanto à GT variaram de 5,52 a 15,63 e de 0,09 a 0,84 para IVE. Esses valores são bem menores que os obtidos para sementes escarificadas (Tabelas 9 e 10), evidenciando o alto grau de dormência tegumentar nessas populações. Os resultados sugerem que houve interação entre dormência e resistência salina, uma vez que a população Tamandaré apresentou médias bem menores que as demais populações, e a população Caruaru apresentou proporcionalmente valores mais próximos das outras populações, diferente do que ocorreu com o experimento com sementes escarificadas.

Tabela 13: Análise de variâncias da porcentagem de germinação transformada (GT), de sementes não escarificadas, envolvendo 18 famílias de cada uma das seis populações de *Stylosanthes humilis*, submetidas à 201 mM de NaCl, e seus respectivos coeficientes de variação (CV%), coeficientes de variação genética ($CV_g\%$) e coeficientes de determinação genotípica (b).

Fontes de Variação	GL	Quadrados médios					
		Flores	Sertânia	Caruaru	S. Caetano	Janga	Tamandaré
Famílias	17	95,887**	68,316**	87,559**	197,864**	75,425*	9,403ns
Resíduo	36	17,450	16,171	21,133	10,882	35,719	6,391
Média		13,53	10,71	11,48	9,36	15,63	5,52
CV (%)		30,9	37,5	40,0	35,2	38,2	47,8
CV_g (%)		37,8	38,9	41,0	84,3	23,3	18,1
b		0,82	0,76	0,76	0,94	0,53	0,32

* significativo à 5% pelo teste F.

** significativo à 1% pelo teste F.

ns não significativo

Tabela 14. Análise de variâncias da velocidade de germinação (IVE) de sementes não escarificadas, envolvendo 18 famílias de cada uma das seis populações de *Stylosanthes humilis*, submetidas à 201 mM de NaCl, e seus respectivos coeficientes de variação (CV %), coeficientes de variação genética (CV_g %) e coeficientes de determinação genotípica (b).

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios				
		Flores	Sertânia	Caruaru	S. Caetano	Janga Tamandaré
Famílias	17	1,572**	0,225**	0,529**	2,276**	0,888**
Resíduo	36	0,117	0,057	0,195	0,140	0,279
Média		0,74	0,32	0,55	0,46	0,84
CV (%)		46,1	75,3	79,6	81,3	62,7
CV _g (%)		94,1	73,9	60,6	183,4	53,6
b		0,92	0,74	0,63	0,94	0,69

** significativo à 1% pelo teste F.

ns não significativo.

Com relação aos coeficientes de variação genética (Tabelas 13 e 14), embora em números absolutos tenham sido maiores para sementes não escarificadas do que para as escarificadas,mostraram a mesma tendência nos dois casos,tanto para GT,como para IVE .A população Tamandaré apresentou os menores valores de CVg, tendo inclusive valor negativo de variância genética para IVE;a população Janga valores relativamente pequenos e as demais altos valores.Os coeficientes de determinação genotípica foram baixos para Tamandaré quanto as duas variáveis e para a população Janga para GT.Os resultados parecem indicar portanto que a variabilidade genética quanto a tolerância salina na germinação,pode ser avaliada tanto em sementes dormentes como em sementes não dormentes.

Em resumo,os resultados apresentados mostram que as populações do Sertão,Flores e Sertânia,e do Agreste, São Caetano e Caruaru, apresentam grande variabilidade genética entre famílias quanto à tolerância salina na germinação e as populações da zona da Mata, Janga e Tamandaré,apresentam menor variabilidade,notadamente a população Tamandaré.

A quantidade de polimorfismo nas populações é dependente das magnitudes relativas da seleção disruptiva e do fluxo gênico (SPIETH,1979).A seleção disruptiva é determinada pelo padrão e magnitude da heterogeneidade ambiental,enquanto que o fluxo gênico é determinado por vários fatores,entre os quais a taxa de cruzamento. A

autogamia reduz a variação genética dentro de populações e aumenta a variação entre populações (LOVELESS & HAMRICK, 1984).

As estimativas de variabilidade genética quanto à tolerância salina na germinação nas populações de *S. humilis* obtidas no presente trabalho, são comparáveis com os resultados de variabilidade isoenzimática obtidas por MARCON (1988) nessas populações. Segundo esse autor, as populações da Mata mostraram menor variabilidade do que as populações do Agreste e Sertão, sendo que a variabilidade nas populações foram correlacionadas com a variabilidade ambiental, sendo o Agreste a região mais variável e a que apresentou populações com maior variabilidade genética.

As populações do Agreste estudadas no presente trabalho apresentaram-se muito diferentes quanto à tolerância salina na germinação, sendo a população Caruaru tolerante e a São Caetano mais sensível, e ambas apresentaram grande variabilidade genética intrapopulacional. A heterogeneidade ambiental, quanto à salinidade do solo e/ou pluviosidade entre e dentro dos habitats dessas populações, através de mecanismos da seleção disruptiva, poderiam explicar a diferença entre os graus de tolerância dessas populações e a manutenção da alta variabilidade nessas populações.

MARCON (1988), baseado nos níveis de variabilidade genética, nas distâncias gênicas entre populações e, nas taxas de cruzamento e evidências

históricas, sugeriu que as populações da zona da Mata teriam uma distribuição marginal, cujo estreitamento de variabilidade deveria ter sido ocasionado pelo efeito do fundador, levando à deriva genética. Os baixos níveis de variabilidade quanto à tolerância salina na germinação obtidas na população Tamandaré e em menor grau na população Janga, favorecem a hipótese de MARCON (1988).

A variabilidade genética intrapopulacional quanto à tolerância salina na germinação não mostrou uma correlação clara com as taxas de cruzamentos dessas mesmas populações, estimadas por MARCON (1988). Segundo esse autor, as populações Flores, Sertânia, São Caetano e Tamandaré, mostraram taxas de cruzamento de 0,31 à 0,39, enquanto que as populações Caruaru e Janga, apresentaram taxas menores equivalentes a 0,24 e 0,19, respectivamente.

4.3. Avaliação da tolerância salina no crescimento inicial em populações de S. humilis

A tolerância salina no crescimento das seis populações de *S. humilis* foi avaliada após seu crescimento durante 28 dias em solução nutritiva em quatro níveis de NaCl 0, 40, 80 e 120 mM.

As análises de variâncias para as 11 características descritas no item 3.4.1 são apresentadas nas

Tabelas 15 e 16. Para todas as características avaliadas, foram encontradas diferenças altamente significativas entre populações e entre níveis de NaCl, mostrando que os níveis utilizados discriminaram bem as populações e que há diferenças na tolerância salina absoluta entre as populações. O fato de que para quatro características analisadas, CF, PA, PR e PT, terem ocorrido diferenças significativas entre estratos dentro dos níveis, mostra que o cuidado no controle ambiental dentro dos tanques foi procedente. A interação entre populações e níveis mostrou significância para oito das características estudadas, sugerindo que as populações podem apresentar tolerâncias relativas diferentes.

As Tabelas 17 e 18 apresentam as médias de cada população considerando todos os quatro níveis de NaCl para as 11 características e as Figuras 2 a 6 mostram o comportamento das populações em cada nível de sal quanto a esses caracteres. A análise conjunta dessas tabelas e figuras, mostra que existe uma certa dificuldade em classificar as populações quanto ao seu grau de tolerância, uma vez que a posição relativa de cada população varia de acordo com o caráter considerado. Todos os caracteres analisados nesse estudo são importantes, uma vez que todos foram afetados pelo sal, discriminando os genótipos e tem sido utilizados por pesquisadores da área, embora a grande maioria utilize apenas um, dois ou três caracteres em seus trabalhos.

Tabela 15. Análise de variâncias de número de ramificações (NR), número de folhas (NF), número de folhas com clorose (NFC), número de folhas com necrose (NFN), transformados em $\sqrt{\text{número} + 0,5}$, comprimento do folíolo (CF) e largura do folíolo (LF) em seis populações de *S. humilis*, submetidas à quatro níveis de NaCl.

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios				
		NR	NF	NFC	NFN	CF LF
Estratos /níveis	12	0,0254ns	0,0601ns	0,0294ns	0,0447ns	0,1296** 0,0025ns
Níveis (N)	3	1,1474**	3,4101**	6,7802**	4,2583**	12,2981** 0,1561**
Popula- ções (P)	5	0,5676**	1,4473**	0,1594**	0,4737**	0,3890** 0,0235**
P X N	15	0,0485*	0,0525ns	0,0794**	0,1438**	0,1855** 0,0037*
Resíduo médio	60	0,0235	0,0343	0,0246	0,0266	0,0448 0,0017

* significativo à 5% pelo teste F.

** significativo à 1% pelo teste F.
ns não significativo.

Tabela 16. Análise de variâncias do comprimento da parte aérea (CA), comprimento da maior raiz (CR), peso seco da parte aérea (PA), peso seco do sistema radicular (PR) e peso seco total (PT), em seis populações de *Stylosanthes humilis*, submetidas à quatro níveis de NaCl.

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios				
		CA	CR	PA	PR	PT
Estratos /níveis	12	0,5157ns	26,2513ns	65,6488**	15,2197*	136,5057**
Níveis (N)	3	275,264**	691,5097**	7775,2720**	1198,8144**	15023,7110**
Popula- ções(P)	5	2,2806**	358,6550**	672,9822**	207,1091**	1553,4197**
P X N	15	0,9977ns	27,9410ns	47,6938*	14,9334*	104,0168*
Resíduo médio	60	0,5479	16,7391	24,8521	6,5790	52,8289

* significativo à 5% pelo teste F.

** significativo à 1% pelo teste F.

ns não significativo.

Tabela 17. Médias de número de ramificações (NR), número de folhas (NF), número de folhas com clorose (NFC), número de folhas com necrose (NFN), comprimento do folíolo (CF) e largura do folíolo em seis populações de *Stylosanthes humilis*, submetidas a quatro níveis de NaCl.

População	Características					
	NR #	NF #	NFC #	NFN #	CF	LF
Flôres	1,61a ¹	10,78a ¹	1,06b ¹	0,44b ¹	2,45ab ³	0,54a ¹
Sertânia	0,70b ²	7,17b ³	1,25ab ³	0,69b ³	2,34abc ⁴	0,45bc ³
Caruaru	0,42b ⁵	6,58bc ⁴	1,23ab ²	0,75b ⁴	2,52a ¹	0,44c ⁴
S.Caetano	0,31b ⁶	5,92c ⁶	1,39ab ⁴	1,23a ⁵	2,25bc ⁵	0,49b ²
Tamandaré	0,45b ⁴	6,05c ⁵	1,70a ⁵	0,47b ²	2,48a ²	0,45bc ³
Janga	0,61b ³	7,23b ²	1,81a ⁶	1,75a ⁶	2,12c ⁶	0,44c ⁴

(*) Os números referem-se à posição relativa de cada população, dentro de cada característica.

As médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Para a realização do teste de Tukey foram utilizados dados transformados em $\sqrt{\text{número} + 0,5}$.

Tabela 18. Médias de comprimento da parte aérea (CA), comprimento da maior raiz (CR), peso seco da parte aérea (PA), peso seco do sistema radicular (PR) e peso seco total (PT) em seis populações de *Stylosanthes humilis*, submetidas à quatro níveis de NaCl.

População	Características				
	CA	CR	PA	PR	PT
Flôres	7,49ab ²	43,7a ¹	47,86a ¹	21,25a ¹	69,10a ¹
Sertânia	7,36ab ⁴	34,7b ³	35,13bc ³	12,42b ⁵	47,60bc ⁴
Caruaru	7,86a ¹	31,5b ⁶	34,80bc ⁴	13,05b ²	47,85bc ³
S. Caetano	6,96b ⁵	32,7b ⁵	30,34c ⁵	11,49b ⁶	41,89c ⁶
Tamandaré	7,47ab ³	34,0b ⁴	38,61b ²	12,97b ³	51,39b ²
Janga	6,84b ⁶	40,1a ²	30,64c ⁶	12,81b ⁴	43,45c ⁵

(*) Os números referem-se à posição relativa de cada população, dentro de cada característica.

As médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de NaCl no número de ramificações (A), número de folhas (B) transformados em $\sqrt{\text{número} + 0,5}$, em seis populações de *S. humilis*.

Figura 3. Efeito de concentrações de NaCl no número de folhas com clorose (A), número de folhas com necrose (B), transformados em $\sqrt{\text{número} + 0,5}$, em seis populações de *S. humilis*.

Figura 4. Efeito de concentrações de NaCl no comprimento do folíolo (A) e largura do folíolo (B) em seis populações de *S. humilis*.

Figura 5. Efeito da concentração de NaCl no comprimento da parte aérea (A) e comprimento da maior raiz (B) em seis populações de *S. humilis*.

Figura 6. Efeito da concentração de NaCl no peso seco da raiz (A), peso seco da parte aérea (B) e peso seco total (C) em seis populações de *S. humilis*.

A inclusão dos caracteres número de folhas com clorose (NFC) e número de folhas com necrose (NFN) justifica-se na espécie *S. humilis*, uma vez que esses sintomas de danos foliares são atribuídos à toxidez por íons (MAAS & HOFFMAN, 1977) ,e Hall, citado por HUMPHREYS (1981), encontrou que *S. humilis* é sensível à toxidez por cloreto, induzida pela utilização de cloreto de potássio como fertilizante. No presente trabalho, as populações apresentaram-se diferentes quanto a esses sintomas de danos (Tabelas 15 e 17), sendo que no nível de 40mM a maioria das populações já mostrou a presença de folhas com clorose, embora não apresentasse folhas necrosadas, enquanto que em 80 mM a maioria das populações apresentou em graus variados folhas parcialmente ou completamente necrosadas (Figura 3).

O nível máximo de sal em que a população não apresenta diferenças significativas em relação ao controle, o ponto de inflexão, e a inclinação da reta a partir desse nível, critérios utilizados para avaliar a tolerância salina (MAAS & HOFFMAN, 1977), dependeram do caráter e da população considerados, como pode ser concluído a partir das figuras 2 a 6. Para alguns caracteres, no nível mais baixo de NaCl (40mM), algumas populações apresentaram aumento em relação ao controle, sugerindo que o sal em baixo nível pode produzir um estímulo no crescimento das populações mais tolerantes. Os

¹HALL, R.L. Some implications of the use of potassium chloride in nutrient studies. Journal of Australian Institute of Agriculture Science, Melbourne, 37 :249, 1971.

caracteres, número de folhas, número de ramificações (Figura 2) e comprimento da maior raiz (Figura 5), só mostraram diferenças em relação ao controle para a maioria das populações no nível 120 mM de NaCl, sendo menos afetados pelo sal que os demais caracteres, em que as populações mostraram diferenças em relação ao controle em níveis menores. O peso do sistema radicular e da parte aérea foram igualmente afetados pelo sal (Figura 6), diferentemente do que ocorre para muitas espécies, onde o crescimento da raiz é menos afetado que o da parte aérea (SHANNON, 1979).

A avaliação das populações considerando o conjunto de caracteres (Figuras 2 a 6), mostra que a população Flores na maioria dos caracteres estudados, mostrou-se superior às demais, apresentando um ponto de inflexão maior e mostrando a partir desse nível uma redução menor do que as outras populações, devendo ser, portanto, considerada a mais tolerante. Um comportamento inverso ao da população Flores foi apresentado pelas populações Janga e São Caetano, que para a maioria dos caracteres, apresentaram pontos de inflexão menores e um decréscimo considerável a partir desses níveis, podendo desse modo serem consideradas as mais sensíveis. Através de uma análise similar, as demais populações, seriam classificadas como intermediárias entre Flores e Janga e São Caetano. As avaliações das posições relativas das populações nas diversas características (Tabelas 17 e 18) permitem as mesmas conclusões.

A dificuldade de usar um único critério para

caracterizar genótipos quanto a tolerância à salinidade foi também observada por ASHRAF & Mc NEILLY (1987) em *Pennisetum americanum*. Esses autores avaliaram a tolerância em cultivares dessa espécie considerando sete caracteres e observaram também que a posição de cada população variava de acordo com o caráter considerado ,concluindo que a variação de planta como um todo em relação à salinidade deve ser o melhor meio para a discriminação de genótipos.

Os dados deste trabalho sugerem que a discriminação de genótipos quanto a tolerância salina em *Stylosanthes humilis* baseada em um único caráter pode levar a erros de avaliação, e que uma boa separação pode ser conseguida através da combinação de vários caracteres.

A comparação do grau de tolerância à salinidade no crescimento de *Stylosanthes humilis* com o de outras espécies relatadas na literatura, é relativamente difícil, uma vez que os autores utilizam as mais diversas medidas de salinidade do meio de crescimento assim como diferentes parâmetros de análise da tolerância. Entretanto, pode-se fazer uma comparação com *Lolium multiflorum* que apresentou uma redução de 50 % no peso seco da parte aérea em 100 mM de NaCl em relação ao controle (MARCAR, 1987) e com *Secale montanum* que apresentou um ponto de inflexão de 20 mM e uma redução de 50% à 85 mM (NOBLE, 1985), sendo ambas espécies consideradas pelos autores como moderadamente tolerantes. A população Flores, a mais tolerante, apresentou para esse caráter, o valor 74% em 80 mM e 37% em 120 mM em

relação ao controle e a população Janga, uma das mais sensíveis, 57% em 80 mM e 25% em 120 mM, sendo que o valor do ponto de inflexão em média deve estar situado ao redor de 40 mM (Figura 6).

A espécie *S. humilis* foi avaliada quanto a tolerância salina por RUSSEL (1976), que a considerou como uma mais sensíveis entre as várias espécies de leguminosas forrageiras que estudou. Entretanto, os resultados do presente trabalho demonstraram existir uma variabilidade considerável entre as populações, algumas das quais podendo ser consideradas como moderadamente tolerantes, com base na comparação com outras espécies..

De maneira similar à associação que foi feita da tolerância salina das populações na germinação, em relação ao ambiente de origem, e considerando as mesmas restrições já levantadas, pode-se considerar que quanto à tolerância no crescimento as populações mostraram-se mais condizentes com a salinidade do seu ambiente. Assim, as populações mais sensíveis, São Caetano e Janga, são originárias de ambientes em que os solos não foram classificados como salinos enquanto que a população Flores, a mais tolerante, é proveniente de uma região em que se encontra solos classificados como salinos.

4.4. Avaliação da variabilidade genética da tolerância salina no crescimento inicial em populações de *S. humilis*

A análise do crescimento das populações de *S. humilis* em quatro níveis de NaCl, mostrou que a concentração de 80 mM discrimina bem as populações (item 4.3), e desse modo a análise da variabilidade genética nas populações foi realizada em solução nutritiva nessa concentração de NaCl.

Nas Tabelas 19 e 20 são apresentados os resultados das análises de variância para o delineamento de blocos de famílias compactas, com 18 famílias em cada uma das seis populações de *S. humilis*. Os coeficientes de variação experimental para populações (erro a), mostraram-se sempre superiores aos coeficientes de variação experimental para famílias dentro de populações (erro c), mostrando uma tendência já esperada de uma precisão menor para as comparações entre médias de populações em relação às médias de famílias.

Para algumas características houve diferenças significativas entre estratos, justificando-se a subdivisão dos tanques nessas dez partes (Tabelas 19 e 20).

As análises mostraram diferenças significativas entre populações, ao nível de 1% de probabilidade para as características NR, CF, PA, PR e PT e ao nível de 5% para NF, CA e CR, enquanto que para as características NFC e NFN as populações não diferiram

significativamente (Tabelas 19 e 20).Esses resultados são diferentes dos obtidos no experimento com gradientes de salinidade,no qual as populações apresentaram diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade para todas as características (Tabela 15 e 16).

As diferenças de resultados entre os dois experimentos podem ser devido a varios fatores,entre os quais,o próprio delineamento experimental,que no caso do bloco de famílias compactas,apresentou uma sensibilidade menor para detecção de diferenças entre populações,devido ao menor número de graus de liberdade para o resíduo.Outras causas das diferenças podem ser os fatos de que os dois tipos de experimentos foram realizados em épocas diferentes e de que no primeiro experimento,as populações foram submetidas à vários níveis de sal enquanto que,no segundo, para se avaliar a variabilidade,foi utilizado um único nível

Com relação às diferenças entre famílias dentro de populações,a análise das Tabelas 19 e 20 mostra que as populações,Flores ,São Caetano e Janga apresentaram diferenças significativas entre famílias ao nível de 1 % de probabilidade para todos os caracteres.A população Sertânia somente não mostrou diferenças significativas entre famílias para CR .A população Caruaru não apresentou diferenças significativas para NFC,CR e PA e somente ao nível de 5% de probabilidade para PT e na população Tamandaré não houve diferenças significativas entre famílias para NFC,NFN,CR e diferenças somente à 5% para NR,CF e PR.

Tabela 19. Análise de variâncias de número de ramificações (NR), número de folhas (NF), número de folhas com clorose (NFC), número de folhas com necrose (NFN), transformados em $\sqrt{\text{número} + 0,5}$, e comprimento do folíolo (CF), em 18 famílias em cada uma das seis populações de *S. humilis*, submetidas à concentração de 80 mM de NaCl.

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios				
		NR	NF	NFC	NFN	CF
Repetição	1	6,0589*	30,4370**	16,9600ns	2,7667ns	7,2558ns
População	5	5,8943**	6,7888*	5,4047ns	6,7416ns	17,2777**
Erro a	5	0,6014	1,1982	2,8116	1,6120	1,3479
Estrato/Pop	54	0,0352ns	0,0400ns	0,2863**	0,3332**	0,0852*
Erro b /Pop	54	0,0433	0,0351	0,1362	0,0933	0,0537
Fam./ Pop	102	0,3577**	0,4571**	0,3253**	0,6718**	0,2477**
Erro c /Pop	1938	0,0347	0,0341	0,0572	0,0872	0,0397
Fam./ Pop F	17	0,0623*	0,1901**	0,1727**	0,4066**	0,7008**
Fam./ Pop S	17	0,7859**	0,9942**	0,3180**	0,3129**	0,7245**
Fam./ Pop SC	17	0,1778**	0,2381**	0,5119**	0,9139**	0,3822**
Fam./ Pop C	17	0,3354**	0,3790**	0,0750**	0,4665**	0,1134**
Fam./ Pop J	17	0,7254**	0,9181**	0,8059**	2,0194**	0,0782**
Fam./ Pop T	17	0,0596*	0,0729**	0,0669ns	0,0317ns	0,0755*
CV (%) Erro a		81,07	45,22	100,82	130,94	57,79
CV (%) Erro b		21,75	7,07	22,19	31,50	11,53
CV (%) Erro c		19,47	6,87	14,38	30,45	9,92

* significativo à 5% pelo teste F.

** significativo à 1% pelo teste F.

ns não significativo

Populações: F=Flores; S=Sertânia; SC=São Caetano; C=Caruaru; J=Janga
T=Tamandaré.

Tabela 20. Análise de variâncias para comprimento da parte aérea (CA), comprimento da maior raiz (CR), peso seco da parte aérea (PA), peso seco do sistema radicular (PR) e peso seco total (PT), em 18 famílias em cada uma das seis populações de *S. humilis* submetidas à concentração de 80 mM de NaCl.

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios				
		CA	CR	PA	PR	PT
Repetição	1	34,935ns	612,198ns	15299,361**	1487,625ns	26328,422**
População	5	179,046*	9919,321*	7196,043**	9201,231**	21725,134**
Erro a	5	24,539	1397,204	835,488	929,661	1613,796
Estrato/Pop	54	1,770*	180,139ns	85,751*	87,295*	313,663**
Erro b /Pop	54	1,092	175,430	51,218	46,808	146,642
Fam./ Pop	102	4,440**	249,588**	520,615**	422,217**	1712,963**
Erro c/Pop	1938	0,569	98,861	55,982	35,201	166,226
Fam./ Pop F	17	4,605**	364,191**	556,494**	1030,184**	2803,350**
Fam./ Pop S	17	7,207**	141,966ns	1281,731**	418,045**	3109,894**
Fam./ Pop SC	17	6,422**	255,146**	837,406**	535,135**	2667,450**
Fam./ Pop C	17	5,353**	101,224ns	80,332ns	93,985**	295,755*
Fam./ Pop J	17	1,362**	554,157**	165,993**	388,167**	946,510**
Fam./ Pop T	17	1,693**	80,846ns	201,732**	67,788*	454,822**
CV (%) Erro a		87,70	81,73	83,41	133,57	69,89
CV (%) Erro b		18,50	28,96	20,65	29,97	21,07
CV (%) Erro c		13,36	21,74	21,59	25,99	22,43

* significativo à 5% pelo teste F.

** significativo à 1% pelo teste F.

ns não significativo

Populações: F=Flores; S=Sertânia; SC=São Caetano; C=Caruaru; J=Janga
T=Tamandaré.

As Tabelas 21 e 22 apresentam as estimativas dos parâmetros genéticos, obtidos a partir das esperanças dos quadrados médios das análises de variância das Tabelas 19 e 20. Houve grande variação nos parâmetros genéticos entre populações e entre caracteres. Os coeficientes de variação genética (CV_g) foram baixos para CR, CA e NFC, sendo em todas as populações menores que o coeficiente de variação experimental (CV_e). Para as demais características, os CV_g , foram altos para certas populações e baixos para outras.

Considerando a variação entre famílias pode-se observar que a população Tamandaré apresenta grande uniformidade com coeficientes de variação genética muito baixos, todos inferiores à 7% e coeficientes de herdabilidade (h^2) variando de 0 a 0,115. A população Caruaru apresentou também, de um modo geral, pequena variabilidade genética, embora pouco maior que Tamandaré, com valor de CV_g variando de 0,86 a 14,66%.

A população Janga apresentou um nível médio de variabilidade entre famílias com valores relativamente altos de CV_g para algumas características e relativamente mais baixas para outras.

As populações da região do Sertão, Flores e Sertânia e a população São Caetano, do Agreste, apresentaram variabilidade relativamente alta para a grande maioria das características. A população Sertânia apresentou valores de CV_g baixos para NFC e CR e relativamente altos para as

demaís características, que variaram entre 8,10 a 45,12% com valores de h^2 de 0,352 a 0,673. As populações Flores e São Caetano apresentaram baixa variabilidade para NR, NF, NFC e CR, e relativamente alta para as demais características cujos CV_g variaram de 7,34 a 56,51%, com h^2 de 0,262 a 0,586.

Os valores dos coeficientes de herdabilidade nas populações Sertânia, Flores e São Caetano, mostram que grande parte da variação dessas populações é genética, indicando que o grau de tolerância nessas populações pode ser passível de alteração pela seleção natural ou artificial.

Uma outra análise da variabilidade das populações se refere àquela existente dentro de famílias (σ^2_{di}) que é apresentada na Tabela 23. Os valores de σ^2_{di} representam componentes genéticos e ambientais, portanto a avaliação da variabilidade dentro de famílias é fenotípica. Pode-se observar que a variabilidade existente dentro de famílias não apresentou valores muito diferentes entre as populações em cada caráter considerado, sendo que a relação de σ^2_{di} entre a população com maior e a menor variabilidade para cada caráter, variou de 1,3 à 3,7. Essa relação é bem menor que a variância genética entre famílias nas populações que variou de 8,9 a 74,8 nos vários caracteres (Tabelas 21 e 22). De modo geral a variância dentro de famílias foi maior nas populações que apresentaram as menores variâncias genéticas entre famílias.

Tabela 21. Variâncias genéticas entre famílias (σ_f^2), coeficientes de variação genética (CV_g), coeficientes de variação ambiental (CV_e) e herdabilidade (h^2) para número de ramificações (NR), número de folhas (NF), número de folhas com clorose (NFC), número de folhas com necrose (NFN), transformados em $\sqrt{\text{número} + 0,5}$, e comprimento do folíolo (CF) em seis populações de *S. humilis* submetidas à 80 mM de NaCl.

Populações	Parâmetros	Características				
		NR	NF	NFC	NFN	CF
Flores	σ_f^2	0,0014	0,0078	0,0058	0,2332	0,0331
	$CV_g(\%)$	3,19	3,11	4,94	56,51	9,76
	h^2	0,038	0,186	0,092	0,553	0,454
Sertânia	σ_f^2	0,0376	0,0455	0,0130	0,1795	0,0342
	$CV_g(\%)$	20,05	8,10	7,54	45,12	8,52
	h^2	0,520	0,571	0,185	0,673	0,462
Caruaru	σ_f^2	0,0150	0,0172	0,0009	0,0190	0,0037
	$CV_g(\%)$	14,66	5,05	1,80	12,42	2,76
	h^2	0,301	0,335	0,012	0,178	0,085
S. Caetano	σ_f^2	0,007	0,010	0,022	0,041	0,017
	$CV_g(\%)$	9,72	4,06	8,85	19,31	7,34
	h^2	0,169	0,230	0,396	0,321	0,301
Tamandaré	σ_f^2	0,0012	0,0019	0,0005	-0,0028	0,0018
	$CV_g(\%)$	4,05	1,72	1,29	----	1,88
	h^2	0,033	0,053	0,009	----	0,085
Janga	σ_f^2	0,0345	0,0442	0,0374	0,0866	0,0019
	$CV_g(\%)$	18,04	7,55	10,48	28,51	2,45
	h^2	0,498	0,564	0,395	0,525	0,045
	$CV_e(\%)$	19,47	6,97	14,38	30,45	9,92

Tabela 22. Variâncias genéticas entre famílias (σ_f^2), coeficientes de variação genética (CV_g), coeficientes de variação ambiental (CV_e) e herdabilidade (h^2) para comprimento da parte aérea (CA), comprimento da maior raiz (CR), peso seco da parte aérea (PA), peso seco do sistema radicular (PR) e peso seco total (PT) em seis populações de *Stylosanthes humilis* submetidas à 80 mM de NaCl.

Populações	Parâmetros	Características				
		CA	CR	PA	PR	PT
Flores	σ_f^2	0,2018	13,2665	25,0256	49,7491	131,8562
	$CV_g(\%)$	8,47	7,38	13,46	22,30	16,69
	h^2	0,262	0,118	0,309	0,586	0,442
Sertânia	σ_f^2	0,3319	2,1553	61,2875	19,1422	147,1834
	$CV_g(\%)$	9,37	3,38	21,95	22,59	22,04
	h^2	0,368	0,021	0,523	0,352	0,470
Caruaru	σ_f^2	0,2392	0,1181	1,2175	2,9392	6,4765
	$CV_g(\%)$	7,55	0,86	3,08	7,12	2,54
	h^2	0,296	0,001	0,021	0,077	0,038
S. Caetano	σ_f^2	0,2927	7,8143	39,0712	24,9967	125,0612
	$CV_g(\%)$	11,22	6,84	22,78	28,29	27,72
	h^2	0,340	0,073	0,411	0,415	0,429
Tamandaré	σ_f^2	0,0562	-0,9007	7,2875	1,6320	14,4298
	$CV_g(\%)$	3,83	----	6,72	6,40	6,31
	h^2	0,090	----	0,115	0,044	0,080
Janga	σ_f^2	0,0396	22,7648	5,5005	17,6483	39,0142
	$CV_g(\%)$	4,01	8,91	7,40	17,32	11,56
	h^2	0,065	0,187	0,090	0,334	0,190
	$CV_e(\%)$	13,36	21,74	21,59	25,99	22,43

Tabela 23. Estimativas das variâncias entre plantas dentro de famílias e populações (c_{d1}^2) para número de ramificações (NR), número de folhas (NF), número de folhas com clorose (NFC), número de folhas com necrose (NFN), transformados em $\sqrt{\text{número} + 0,5}$, e comprimento do folíolo (CF), comprimento da parte aérea (CA), comprimento da maior raiz (CR), peso seco da parte aérea (PA), peso seco do sistema radicular (PR) e peso seco total (PT), em populações de *S. humilis* submetidas à 80 mM de NaCl.

Características	Populações						
	Flores	Sertânia	Caruaru	S. Caetano	Tamandaré	Janga	
NR	0,0216	0,0292	0,0341	0,0512	0,0365	0,0275	
NF	0,0282	0,0235	0,0356	0,0382	0,0306	0,0400	
NFC	0,0803	0,0406	0,0673	0,0417	0,0260	0,0714	
NFN	0,0597	0,0792	0,1289	0,1157	0,0347	0,0986	
CF	0,0165	0,0451	0,0388	0,0593	0,0454	0,0280	
CA	0,2614	0,6785	0,8949	0,3987	0,6835	0,3523	
CR	122,0073	58,8998	107,1470	120,7778	64,2825	120,3284	
PA	38,3818	53,8083	54,2045	47,5300	74,9698	49,1399	
PR	44,9036	22,4511	30,6875	31,5602	28,3166	43,1008	
PT	150,2321	139,8869	156,0433	148,6994	181,9436	176,1791	

Considerando a hipótese de existir um mesmo erro experimental para as diferentes populações dentro de um dado caráter, as diferenças nas σ^2_{di} entre as populações sugerem que devem existir diferentes graus de variabilidade genética dentro de famílias nas várias populações.

Como *S. humilis* pode ser classificada com uma espécie intermediária quanto à taxa de cruzamento (MARCON, 1988), deve-se esperar certo grau de variabilidade genética dentro de famílias. Entretanto, não existiu uma correlação entre os diferentes níveis de variabilidade apresentados pelas populações dentro das famílias e as taxas de cruzamento determinadas nessas populações (MARCON, 1988). Assim as populações Janga e Caruaru que segundo esse autor apresentaram as menores taxas de cruzamento entre as populações estudadas nesse trabalho, 0,19 e 0,24, respectivamente, são as que contiveram maior variabilidade dentro de famílias.

A taxa de cruzamento entretanto é apenas um dos muitos fatores que afetam a estrutura genética das populações, sendo outro fator muito importante a ser considerado, a heterogeneidade ambiental, que promove a variabilidade através de mecanismos de seleção disruptiva (LOVELESS & HAMRICK, 1984).

A heterogeneidade ambiental pode explicar os níveis altos de variabilidade genética entre famílias nas populações Sertânia e Flores (do Sertão) e na população São Caetano, no Agreste. Entretanto, a variabilidade ambiental

deve se expressar nos fatores que são importantes na adaptação à salinidade, tais como a própria salinidade do meio e a umidade. Devido à grandes flutuações na pluviosidade dessas regiões no tempo, deve se esperar que elas apresentam também variações temporais na salinidade do solo.

A população Caruaru, também do Agreste, por outro lado, apresentou baixa variabilidade genética entre famílias quanto ao grau de tolerância salina no crescimento, desse modo outros fatores devem ser responsáveis por essa relativa uniformidade genética, como a menor taxa de cruzamento dessa população, apesar dela ter sido uma das que apresentou uma das mais altas variabilidades dentro de famílias.

Devido ao fato de existir um número grande de fatores genéticos e ecológicos que podem afetar a quantidade e o padrão de variabilidade genética nas populações, torna-se difícil estabelecer para uma determinada população, qual fator deve exercer uma maior influência na variabilidade.

O fato de que as populações da Mata, especialmente a Tamandaré, apresentarem baixa variabilidade genética quanto à tolerância salina no crescimento à semelhança do que foi verificado no estágio de germinação, é mais uma evidência para a confirmação da hipótese levantada por MARCON (1988) de que o efeito do fundador seja o responsável pela relativa uniformidade genética nessas populações.

4.5. *Análise comparativa da tolerância salina e da variabilidade genética nas populações de S. humilis, entre os estádios de germinação e crescimento inicial*

A Tabela 24 apresenta os valores relativos ao controle nos diferentes níveis de salinidade, quanto aos 11 caracteres avaliados no crescimento e aos dois caracteres de germinação, na média das populações de *S. humilis*, para permitir uma comparação da tolerância da espécie, nas duas fases do ciclo de vida.

Apesar de serem utilizados diferentes níveis para avaliar a tolerância salina nas duas fases do ciclo de vida, e considerando ainda a grande variabilidade entre as populações, pode-se observar que em média o nível de 134 mM afetou menos a germinação do que o nível de 120 mM alterou o crescimento, considerando a maioria dos caracteres. Somente para os caracteres NR, NF e CR que mostraram pouca alteração com a salinidade é que a tolerância nas duas fases mostrou-se semelhante. Além disso, deve-se considerar que no nível 120 mM muitas plantas apresentaram número grande de folhas com necrose adiantada e muitas plantas mortas nas populações mais sensíveis, o que leva a crer que níveis maiores de salinidade levariam à morte a grande maioria das plantas. Por outro lado, a concentração de 201 mM não afetou drasticamente a germinação de *S. humilis*.

Tabela 24. Valores relativos nos diferentes níveis de salinidade (porcentagem em relação ao controle) para número de ramificações (NR), número de folhas (NF), número de folhas com clorose (NFC), número de folhas com necrose (NFN), transformados em $\sqrt{\text{número} + 0,5}$, e comprimento do folíolo (CF), largura do folíolo (LF), comprimento da parte aérea (CA), comprimento da maior raiz (CR), peso seco da parte aérea (PA), peso seco da raiz (PR), peso seco total (PT), porcentagem de germinação (GT) e índice de velocidade de emergência (IVE), considerando a média de seis populações de *Stylosanthes humilis*.

Caracteres	Concentração de NaCl (mM)				
	0	40	80	120	
NR	100,0	118,8	103,7	69,8	
NF	100,0	106,8	93,8	76,7	
NFC	100,0	139,7	225,6	262,9	
NFN	100,0	109,0	188,5	221,2	
CF	100,0	97,9	75,5	47,7	
LF	100,0	93,6	82,1	66,4	
CA	100,0	76,3	47,8	33,2	
CR	100,0	101,7	98,1	72,4	
PA	100,0	99,7	57,3	27,5	
PR	100,0	98,9	56,8	26,5	
PT	100,0	99,7	57,3	27,3	
	Concentração de NaCl (mM)				
	0	67	134	201	268
GT	100,0	97,6	87,5	69,0	47,3
IVE	100,0	78,7	56,5	33,8	15,2

Essas análises permitem concluir que *S. humilis* apresenta uma tolerância salina maior na germinação que no crescimento inicial. A tolerância salina em genótipos dessa espécie deve portanto ser avaliada independentemente, na germinação e no crescimento. Essas análises também evidenciam que a salinidade do ambiente deve ser mais limitante para o crescimento do que para a germinação dessa espécie.

Comparando-se cada população na germinação e no crescimento, o que se observa é que a posição relativa das populações quanto à tolerância varia nas duas fases. Assim, a população Sertânia apresentou-se como uma das mais sensíveis na germinação e com tolerância intermediária no crescimento. A população Janga mostrou-se bem tolerante na germinação e foi uma mais afetada pelo sal no crescimento.

A variação na posição relativa quanto à tolerância salina nas populações entre as fases de crescimento e germinação também foi observada por WEST & TAYLOR (1981) em *Trifolium subterraneum* e por MARCAR (1987) em três espécies de *Lolium*.

Com relação à variabilidade genética quanto à tolerância salina, de maneira geral as populações apresentaram-se mais variáveis na germinação (Tabelas 9 e 10) do que no crescimento (Tabelas 21 e 22), como pode ser observado pelos valores dos coeficientes de variação genética e de herdabilidade.

Independentemente dos valores absolutos

quanto à variabilidade nas populações nas duas fases do ciclo de vida, a população Tamandaré da região da Mata, apresentou a mais baixa variabilidade genética entre todas as populações nas duas fases. A outra população da Zona da Mata, Janga apresentou também níveis relativamente baixos de variabilidade tanto na germinação como no crescimento. As populações do Sertão, Sertânia e Flores e a população São Caetano do Agreste, apresentaram níveis altos de variabilidade nas duas fases. A única exceção foi a população Caruaru que mostrou-se bem variável quanto à tolerância salina na germinação e com relativa uniformidade genética entre as famílias no crescimento inicial.

Considerando os níveis de variabilidade existentes entre as populações e dentro das populações de *S. humilis*, tanto na germinação, como no crescimento, pode-se dizer que existem condições para a seleção e o melhoramento nessa espécie quanto à tolerância salina. A existência dessa grande variabilidade permite a espécie explorar ambientes com níveis variáveis de salinidade.

4.6. Análise eletroforética de isoenzimas associada com a tolerância salina nas populações de S. humilis

A análise eletroforética foi realizada com objetivo de investigar a existência de possíveis associações dos padrões eletroforéticos com o caráter tolerância salina das populações. Para tanto, foram analisadas uma planta de

cada família em cada população para os sistemas esterase, peroxidase e malato desidrogenase.

A Figura 7 apresenta os zimogramas obtidos referentes a esses sistemas. Os resultados das esterases, indicaram a semelhança do que foi obtido por MARCON (1988), a existência de dois locos, E_1 e E_2 , cada um com dois alelos. Não foi possível com as malato desidrogenases concluir a cerca da determinação genética de seus zimogramas, desse modo nesse sistema, as quatro regiões de atividade serão referidas como bandas M_1 , M_2 , M_3 e M_4 .

A análise das peroxidases nas populações mostraram a existência de três zonas de atividade, uma anódica com uma única banda P_1 , e duas catódicas, uma com duas bandas P_2 e P_3 , e outra zona (P_4) com duas bandas (Figura 7).

Como essas análises pareceram indicar a possível associação de determinadas bandas de peroxidase com a tolerância salina na germinação, escolheram-se as populações Caruaru e São Caetano que apresentaram alta variabilidade quanto a esse caráter (Tabelas 11 e 12), para uma análise mais detalhada. Assim, foram selecionadas cinco famílias tolerantes e cinco sensíveis dentro de cada uma dessas populações e foram realizadas análises de peroxidases em cinco a dez plantas de cada uma dessas vinte famílias. Essas análises sugeriram que a zona de atividade P_4 é determinada por um loco com dois alelos (R_m -0,82 e -0,70). Para as demais zonas de atividade das peroxidases não foi possível determinar a base genética.

A Tabela 25 apresenta as frequências alélicas nos três locos identificados, dois de esterase, E_1 e E_2 e um de peroxidase, P_4 , nas seis populações e a Tabela 26 mostra as frequências nessas mesmas populações das bandas de malato desidrogenase e das demais bandas de peroxidase, para as quais não foi possível a determinação genética.

Figura 7. Padrões eletroforéticos representando dois locos de esterase (E_1 e E_2) e de um loco de peroxidase (P_4), e de bandas de peroxidase (P_1 a P_3) e de malato desidrogenase (M_1 a M_4), em seis populações de *S. humilis*.

Tabela 25. Frequências alélicas em 3 locos, E_1 e E_2 (esterase) e P_4 (peroxidase) estabelecidas a partir de 18 plantas, uma de cada família, nas seis populações de *S. humilis*.

Locos	Populações							
	Alelos (R_m)		Flores	Sertânia	Caruaru	S. Caetano	Janga	Tamandaré
E_1	R	(1,00)	1,00	1,00	1,00	0,83	0,42	1,00
	L	(0,97)	0,00	0,00	0,00	0,17	0,58	0,00
E_2	R	(0,90)	0,39	0,00	0,00	0,00	0,28	0,00
	L	(0,84)	0,61	1,00	1,00	1,00	0,72	1,00
P_4	R	(-0,82)	1,00	1,00	0,28	0,86	0,67	1,00
	L	(-0,70)	0,00	0,00	0,72	0,14	0,33	0,00

Tabela 26. Frequências das bandas (número de indivíduos que apresentam a banda, em relação ao total) de peroxidases e malato desidrogenases estabelecidas a partir de 18 plantas, uma de cada família, em seis populações de *S. humilis*.

Banda	R_m	Populações					
		Flores	Sertânia	Caruaru	S. Caetano	Janga	Tamandaré
M_1	1,65	0,39	0,50	0,72	0,00	0,44	0,72
M_2	1,40	0,61	0,50	0,28	1,00	0,56	0,28
M_3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
M_4	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
P_1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
P_2	-0,23	0,94	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
P_3	-0,35	0,94	1,00	0,83	0,89	0,67	0,83

Procurou - se investigar a associação das frequências alélicas e das bandas dos sistemas enzimáticos com a tolerância salina na germinação e no crescimento. A Tabela 27 mostra os valores dos coeficientes de correlação das frequências de três alelos, dois de esterase E_1^R (Rm 1,00) e E_2^R (Rm 0,90) e um de peroxidase, P_4^L (Rm -0,70) e de bandas não monomórficas de peroxidases e malato desidrogenases com os parâmetros GT e IVE, e NFN e PA nas populações. Por essas análises verifica-se que só foi encontrada uma correlação significativa e a nível de 5% de probabilidade entre a frequência do alelo P_4^L com IVE e com NFN e das bandas M_1 e M_2 com PA.

Tabela 27. Valores dos coeficientes de correlação de alelos de esterase E_1^R e E_2^R , e de peroxidase P_4^L , e das bandas de peroxidase P_2 e P_3 , e malato desidrogenases M_1 e M_2 , com GT, IVE, NFN e PA nas populações de *S. humilis*.

Alelos	Rm	GT	IVE	NFN	PA
P_4^L	-0,70	0,69	0,86*	0,83*	-0,29
E_1^R	1,00	-0,64	-0,61	-0,55	0,65
E_2^R	0,90	0,57	0,29	-0,06	0,02
Bandas	Rm				
P_2	-0,23	-0,05	0,22	0,41	-0,27
P_3	-0,35	-0,77	0,77	-0,39	0,18
M_1	1,65	0,20	0,22	-0,28	0,85*
M_2	1,40	-0,20	-0,22	0,28	-0,85*

* Significativo para a regressão ao nível de 5% .

A Tabela 28 mostra as frequências do alelo P_4^L nas famílias analisadas das populações Caruaru e São Caetano e os valores respectivos de GT, IVE, NFN e PA. As cinco primeiras famílias nas duas populações podem ser classificadas como tolerantes e as últimas cinco como sensíveis quanto à sua resposta na germinação. Chama a atenção nessa Tabela o fato que todas as famílias tolerantes da população Caruaru apresentam frequência do alelo P_4^L igual a 1,0, mostrando portanto esse alelo fixo, enquanto que as famílias sensíveis não apresentam esse alelo. Já na população São Caetano nem todas as famílias tolerantes apresentam o alelo P_4^L , embora todas as sensíveis à semelhança da população Caruaru também não tenham esse alelo.

Os coeficientes da correlação linear entre as frequências do alelo P_4^L e os valores de GT e IVE nas famílias dessas duas populações confirmam a associação desse alelo com a tolerância na germinação na população Caruaru (Tabela 29), que mostraram valores de 0,97 para GT e 0,98 para IVE. Entretanto na população São Caetano esses valores são baixos e não significativos. Parece não existir associação desse alelo com tolerância das famílias no crescimento, sendo que na população São Caetano essa associação foi significativa somente ao nível de 5% com NFN.

A baixa significância do coeficiente de correlação do alelo P_4^L com IVE nas populações (Tabela 27) pode refletir a correlação observada na população Caruaru e as baixas correlações das bandas M_1 e M_2 com PA podem ser de

pouca relevância uma vez que não houve correlação com NFN, a outra característica de avaliação da tolerância no crescimento.

Tabela 28. Frequências do alelo P_4^L e valores médios de $\arcsen\sqrt{\% \text{ germinação}}$ (GT), índice de velocidade de emergência (IVE), $\sqrt{\text{número de folhas com necrose}+0,5}$ (NFN) e peso da parte aérea (PA), em famílias das populações Caruaru e São Caetano de *S. humilis*.

Famílias Caruaru	Frequência do alelo P_4^L	GT	IVE	NFN	PA (mg)
2	1,00	76,3	23,2	0,972	34,8
10	1,00	75,9	27,0	1,184	35,1
16	1,00	73,3	21,7	1,279	35,5
5	1,00	72,6	21,7	0,956	36,3
14	1,00	57,2	19,4	1,187	38,3
9	0,00	33,1	6,4	1,363	37,7
15	0,00	30,4	3,7	1,044	36,2
3	0,00	28,9	3,1	1,019	35,7
8	0,00	26,6	4,2	1,209	34,3
13	0,00	25,1	4,6	1,314	30,6
Famílias S. Caetano					
18	0,11	82,6	21,7	0,803	41,0
14	0,00	73,6	19,3	0,880	36,8
4	0,00	72,7	19,6	1,011	34,5
7	1,00	70,0	18,4	1,748	24,8
11	1,00	69,4	18,7	1,131	14,9
3	0,00	29,7	3,3	0,895	33,7
9	0,00	28,8	2,8	1,027	28,7
2	0,00	24,5	2,5	1,192	25,6
15	0,00	24,0	1,9	0,924	23,2
6	0,00	22,2	2,1	1,138	20,9

Tabela 29. Coeficientes de correlação linear entre as frequências do alelo P_4^L e GT, IVE, NFN transformados e PA em famílias das populações Caruaru e São Caetano de *S. humilis*.

População	GT	IVE	NFN	PA
Caruaru	0,97**	0,98**	- 0,27	0,28
São Caetano	0,46	0,49	0,64*	- 0,51

*,** Significativos pela regressão nos níveis de 5% e 1%, respectivamente.

Várias hipóteses podem ser levantadas para a associação observada entre o alelo P_4^L da peroxidase e a tolerância salina na germinação da população Caruaru. Uma possível explicação poderia ser a existência de uma relação de função entre esse alelo de peroxidase e a resistência salina. Essa explicação está relacionada com a questão da importância adaptativa dos polimorfismos enzimáticos. Embora várias associações tenham sido encontradas entre variantes eletroforéticas e caracteres quantitativos, na maioria dos casos não foi possível determinar a causa dessas associações, a não ser levantar hipóteses mais plausíveis.

Os fisiologistas de plantas tem tentado estabelecer os mais significativos processos e parâmetros bioquímicos e fisiológicos que são alterados quando as plantas são sujeitas ao estresse salino. Há evidências que o estresse salino induz mudanças na atividade enzimática e síntese "de novo" de proteínas (LEVITT, 1980).

Um consenso geral acerca da função das peroxidases se refere à síntese de lignina, quer para a diferenciação celular ou para a defesa contra a invasão de patógenos (Van HUUSTEE, 1987), no catabolismo do ácido indol acético e biogênese da parede celular (FIELDES, 1987). As peroxidases, ácidas e básicas, são sintetizadas em resposta a estresse mecânico ou patogênico (LI & Mc CLURE, 1990).

O possível envolvimento das peroxidases com a resistência salina tem sido investigado, mas não tem sido possível estabelecer o seu papel nesse caráter. Assim STEVENS *et alii* (1978) não encontraram associação na resposta à salinidade de cultivares de *Brassica* com diferentes tolerâncias salinas com os níveis de atividade de peroxidase. GUERRIER (1987), mostrou que em três espécies bem diferentes quanto à tolerância salina, a saber, o tomate bem sensível, o rabanete intermediário e o repolho roxo, a espécie mais tolerante, a atividade da peroxidase é alterada diferentemente com o estresse salino nas três espécies. Houve um aumento da atividade dessa enzima com o aumento da salinidade em repolho e rabanete e uma diminuição na atividade com o estresse salino no tomateiro.

Embora a simples análise eletroforética das enzimas não permita uma conclusão a respeito de uma relação de função do alelo P_4^L da peroxidase com a tolerância salina na germinação, o fato de que uma associação forte desse alelo com a resistência salina foi encontrada somente na população Caruaru, não parece sugerir uma função importante

da aloenzima desse alelo em conferir tolerância salina na germinação em *S. humilis*.

Uma outra explicação possível para a associação observada entre o alelo P_4^L da peroxidase e a tolerância salina na germinação na população Caruaru, poderia ser devido a uma ligação física entre o loco da peroxidase e locos de tolerância salina, desse modo, o alelo para isoenzima, poderia ser neutro ou quase e a seleção natural agiria nos locos para resistência salina (HEDRICH, 1982). Desse modo, as frequências alélicas no loco enzimático evoluíram junto com o caráter tolerância salina.

O alelo P_4^L foi encontrado somente nas populações Caruaru, São Caetano e Janga (Tabela 25) e uma associação entre esse alelo e a tolerância salina somente na população Caruaru. O possível desequilíbrio gamético nessa população poderia ser explicado por eventos históricos, tais como o efeito do fundador ou devido à redução do tamanho da população, ambos levando à deriva genética (HEDRICH et alii, 1978). Uma taxa menor de cruzamento nessa população em relação às demais (MARCON, 1988), poderia diminuir a taxa de queda do desequilíbrio gamético (HEDRICH, 1982). O fato de que na população Caruaru foi encontrada baixa variabilidade genética na tolerância salina no crescimento (item 4.4) favorece a hipótese de que o fato do fundador ou reduções no tamanho populacional podem ser fatores importantes na história evolutiva dessa população.

O alelo P_4^L pode ter uma origem mais recente

que o alelo alternativo P_4^R que é encontrado fixo nas populações do Sertão e na população Tamandaré, e em frequência alta nas populações São Caetano e Janga (Tabela 20). Se o alelo P_4^L apresentar um efeito pouco pronunciado na adaptação, ele pode estar sujeito a variações casuais na sua frequência, devido ao fenômeno da deriva genética.

A população São Caetano é entre as populações investigadas a que está geograficamente mais próxima da população Caruaru, ambas localizadas à beira da rodovia (Tabela 1), o que facilita o fluxo gênico entre elas. O fato do alelo P_4^L ter sido encontrado nessas duas populações, pode indicar que tenha ocorrido migração entre essas populações.

As populações Janga e Tamandaré da Zona da Mata são populações encontradas somente em ambientes alterados pelo homem e provavelmente são populações recentes (MARCON, 1988). A existência do alelo P_4^L na população Janga pode sugerir que essa população foi fundada pelo menos em parte por migração de sementes das populações São Caetano e/ou Caruaru, ou alguma outra população do Agreste não investigada neste trabalho que apresentasse esse alelo. A dispersão de sementes de *S. humilis* é facilitada pela presença de estilete residual na forma de gancho que pode se prender ao pelo dos animais (BARRIGA, 1979).

Independente das causas responsáveis pela associação do alelo P_4^L da peroxidase com a tolerância salina na germinação na população Caruaru, deve se considerar o fato de que esse alelo pode representar um marcador para

tolerância salina nessa população. Marcadores isoenzimáticos tem sido reportados na literatura, como o caso de uma banda de peroxidase para resistência ao fungo *Sclerotinia graminicola* em milho (CHAHAL *et alii*, 1988).

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

1. A tolerância salina na germinação de *Stylosanthes humilis* é relativamente elevada, sendo que a porcentagem de germinação na maioria das populações estudadas só foi afetada por concentrações de NaCl acima de 134 mM. A porcentagem de germinação foi reduzida em 50% (G50) na média das populações na concentração de 268 mM de NaCl, equivalendo ao potencial osmótico de -1,2 MPa. Já a velocidade de germinação é mais afetada pelo estresse salino do que a porcentagem final de germinação.
2. Há ampla variabilidade quanto ao grau de tolerância salina na germinação entre populações. Observa-se também grande variabilidade genética dentro de populações, notadamente nas do Sertão e do Agreste, observada tanto para sementes escarificadas como para as não escarificadas, com coeficientes de determinação genotípica elevados, indicando que o caráter tolerância salina na germinação dessas populações pode ser facilmente alterado pela seleção natural ou artificial.

3. O alto grau de variabilidade genética do caráter tolerância salina na germinação das duas populações do Agreste, e a grande diferença que apresentaram quanto ao seu grau de tolerância parece ter relação com a heterogeneidade ambiental da região de origem dessas populações.
4. Dependendo do caráter utilizado na avaliação do efeito da salinidade no crescimento inicial, ocorreram diferenças na classificação das populações estudadas quanto a sua tolerância, mas considerando o conjunto de caracteres estudados pode se conseguir uma boa discriminação de populações e genótipos.
5. Em comparação com outras espécies relatadas na literatura, *Stylosanthes humilis* pode ser classificada como moderadamente tolerante durante o crescimento inicial, mostrando para o caráter peso seco da parte aérea um ponto de inflexão (nível máximo em que não ocorre redução no crescimento) ao redor de 40 mM de NaCl, e um valor de 74% a 57% em relação ao controle a 80 mM desse sal.
6. *Stylosanthes humilis* apresenta maior tolerância salina na germinação do que no crescimento inicial, evidenciando que a salinidade do ambiente deve ser mais limitante para o crescimento do que para a germinação dessa espécie.
7. Não há relação entre a tolerância salina nos estádios de germinação e crescimento inicial, sendo que a posição relativa quanto ao grau de tolerância de cada população é diferente nas duas fases do desenvolvimento. A tolerância

salina em genótipos dessa espécie deve portanto ser avaliada independentemente, na germinação e no crescimento.

8. Há considerável variabilidade entre populações e dentro de populações quanto à tolerância salina durante o crescimento, sendo que os coeficientes de variação genética e herdabilidade dependeram do caráter considerado.

9. A variabilidade genética da tolerância salina dentro de populações foi maior na fase de germinação que no crescimento inicial, mas independente dos valores absolutos dos parâmetros genéticos houve para todas as populações, com exceção de Caruaru, relação entre o grau de variabilidade nas duas fases.

10. As duas populações da Mata, especialmente Tamandaré, apresentaram baixa variabilidade genética quanto à tolerância salina, tanto na germinação como no crescimento, o que está de acordo com a baixa variabilidade isoenzimática relatada por MARCON (1988) nessas populações, e reforça a hipótese levantada por esse autor de que o efeito do fundador, levando à deriva genética pode ser responsável pela relativa uniformidade dessas populações.

11. Os níveis de variabilidade genética na tolerância salina entre e dentro da maioria das populações de *S. humilis*, nas duas fases do ciclo de vida, oferecem condições para a seleção e o melhoramento nessa espécie quanto a esse caráter. Essa variabilidade genética é importante para a adaptação dessa espécie, permitindo a exploração de ambientes

com níveis variáveis de salinidade.

12. Na população Caruaru houve associação entre um alelo da peroxidase (P_4^L) com a tolerância salina na germinação, as famílias tolerantes apresentando esse alelo e as sensíveis não. Entre as várias hipóteses possíveis para explicar essa associação, as mais plausíveis parecem ser ligadas a eventos históricos, como o efeito do fundador ou redução do tamanho da população, ambos levando à deriva genética, ou a origem recente desse alelo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AB-SHUKOR, N.A.; KAY, Q.O.N.; STEVENS, D.P.; SKIBINSKI, D.O.F. Salt tolerance in natural populations of *Trifolium repens* L. *New Phytologist*, Cambridge, 109: 483-90, 1988.
- ALLEN, S.G.; DOBRENZ, A.K.; SCHONHORST, M.H.; STONER, J.E. Heritability of NaCl tolerance in germinating alfalfa seeds. *Agronomy Journal*, Madison, 77: 99-101, 1985.
- ASHRAF, M. & McNEILLY, T. Salinity effects on five cultivars/lines of pearl millet (*Pennisetum americanum* L. Leeke). *Plant and Soil*, Dordrecht, 103: 13-9, 1987.
- ASHRAF, M. & McNEILLY, T. Improvement of salt tolerance in maize by selection and breeding. *Plant Breeding*, Berlin, 104: 101-7, 1990.
- ASHRAF, M.; McNEILLY, T.; BRADSHAW, A.D. Heritability of NaCl tolerance at the seedling stage in seven grass species. *Euphytica*, Wageningen, 35: 935-40, 1986.
- AZHAR, F.M. & McNEILLY, T. The genetic basis of variation for salt tolerance in *Sorghum bicolor* L. Moench seedlings. *Plant Breeding*, Berlin, 101: 114-21, 1988.

- BADGER, K.S. & UNGAR, J.A. The effects of salinity and temperature on the germination of the inland halophyte *Hordeum jubatum*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 67: 1420-35, 1989.
- BALLARD, L.A.T. High sensitivity to temperature of the germination responses of seeds of Townsville stylo (*Stylosanthes humilis* H.B.K). *Proceedings of the International Seed Testing Association*, Norway, 37: 779-91, 1972.
- BARRIGA, J.P. Autoecologia de *Stylosanthes humilis* H.B.K : avaliação da variabilidade morfológica e estudos da biologia da semente. Piracicaba, 1979. 97p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"/USP).
- BAZZAZ, F.A. Seed germination in relation to salt concentration in three populations of *Prosopis farcta*. *Oecologia*, Berlin, 13: 81-92, 1973.
- BERNSTEIN, L. & HAYWARD, H.E. Physiology of salt tolerance. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto 9: 25-46, 1958.
- BLISS, R.D.; PLATT-ALOIA, K.A.; THOMSON, W.W. Osmotic sensitivity in germinating barley seeds. *Plant, Cell and Environment*, Oxford, 9: 721-5, 1986a.
- BLISS, R.D.; PLATT-ALOIA, K.A.; TOMSON, W.W. The inhibitory effect of NaCl on barley germination. *Plant, Cell and Environment*, Oxford, 9: 727-33, 1986b.

- BOWMAN, W.D. & STRAIN, B.R. Response to long- and short-term salinity in populations of the C_4 nonhalophyte *Andropogon glomeratus* Walter B.S.P. *Oecologia*, Berlin, 75: 73-7, 1988.
- BREWBAKER, J.L.; UPADHYA, M.D.; MAKINEN, J.; McDONALD, T. Isoenzyme polymorphism in flowering plants; III. Gel electrophoretic methods and applications. *Physiologia Plantarum*, Lund, 21: 930-40, 1968.
- BROWN, A.H.D. & WEIR, B.S. Measuring genetic variability in plant populations In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J. ed. *Isozyme in plant genetics and breeding*. Amsterdam, Elsevier, 1983. Part A, p 241-56.
- BURT, R.L. Natural variation in *Stylosanthes*. In: STACE, H.M. & EDEY, L.A., ed. *The biology and agronomy of Stylosanthes*. Sydney, Academic Press, 1984. p.103-24.
- BUTLER, J.E. Germination of *Stylosanthes humilis* (Townsville stylo) in short cycles of alternating temperature. *Seed Science and Technology*, Zurich, 3: 523-28, 1975.
- CAMERON, D.F. Flowering in Townsville lucerne (*Stylosanthes humilis*). 1-Studies in controlled environments. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, Melbourne, 7: 489-94, 1967a.
- CAMERON, D.F. Hardseedness and seed dormancy of Townsville lucerne (*Stylosanthes humilis*) selections. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, Melbourne, 7: 237-40, 1967b.

- CHAHAL, S.S.; KUMAR, R.; SIDHU, J.S.; MINOCHA, J.L. Peroxidase isozyme pattern in pearl millet lines resistant and susceptible to downy mildew. *Plant Breeding*, Berlin, 101: 256-9, 1988.
- CHOUDHURI, G.N. Effect of soil salinity on germination and survival of some steppe plants in Washington. *Ecology*, Brooklyn, 49: 465-71, 1968.
- CLEGG, M.T. & ALLARD, R.W. Patterns of genetic differentiation in the slender wild oat species *Avena barbata*. *Proceedings of the National Academy of Science*, Washington, 69: 1820-4, 1972.
- CONDEPE/SUDENE, Recife, *Zoneamento pedo-climático do Estado de Pernambuco*. Recife, 1987.V. 1.
- EDYE, L.A.; GROF, B.; WALKER, B. Agronomic variation and potential utilization of *Stylosanthes*. In: STACE, H.M. & EDYE, L.A., ed. *The biology and agronomy of Stylosanthes*. Sydney, Academic Press, 1984. p.547-70.
- EPSTEIN, E. *Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas*. Trad. E. Malavolta. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, 1975. 341p.
- EPSTEIN, E. Salt-tolerant crops: origins, development, and prospects of the concept. *Plant and Soil*, Dordrecht, 89: 187-98, 1985.
- EPSTEIN, E.; NORLYN, J.D.; RUSH, D.W.; KIWGSBURT, R.W.; KELLEY, D.B.; CUNNINGHAM, G.A.; WRONA, A.F. Saline culture of crops: a genetical approach. *Science*, Lancaster, 210: 399-404, 1980.

- FERREIRA, M.B. & COSTA, N.M.S. *O gênero Stylosanthes Sw. no Brasil*. Belo Horizonte, EPAMIG, 1979. 108p.
- FIELDES, M.A.; TYSON, H.; GAUDREAU, P.R. Direct response of peroxidase isozyme relative mobility to short-term environmental temperature changes in flax (*Linum usitatissimum*). *Plant, Cell and Environment*, Oxford, 10: 213-9, 1987.
- FLOWERS, T.J.; TROKE, P.F.; YEO, A.R. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 28: 89-121, 1977.
- FOY, C.D.; FLEMING, A.L.; BURNS, G.R.; ARMIGER, W.H. Characterization of differential aluminum tolerance among varieties of wheat and barley. *Soil Science Society of America Proceedings*, Madison, 31: 513-21, 1967.
- FRANCOIS, L.E. & GOODIN, J.R. Interaction of temperature and salinity on sugar beet germination. *Agronomy Journal*, Madison, 64: 272-3, 1972.
- GARDNER, C.J. Mechanisms regulating germination in seeds of *Stylosanthes*. *Australian Journal of Agriculture Research*, Melbourne, 26: 281-94, 1975.
- GATES, C.T.; HAYDOCK, K.P.; ROBINS, M.F. Response to salinity in *Glycine*. 4. Salt concentration and the content of phosphorus, potassium, sodium and chloride in cultivars of *G. wightii* (*G. javanica*). *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, Melbourne, 10: 99-110, 1970.

- GILLARD,P.& FISHER,M.J. The ecology of Townsville stylo-based pasture in Northern Australia. In: WILSON,J.R.,ed. *Plant Relation in Pastures*. Melbourne. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1978. p 340-52.
- GOTTLIEB,L.D. Electrophoretic evidence and plant systematics. *Annals Missouri Garden,Davies*, 64: 161-80, 1977.
- GOTTLIEB,L.D. Electrophoretic evidence and plant populations *Progress in Phytochemistry*, Elmsford, 7: 1-46, 1981.
- GREENWAY,H. & MUNNS,R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto 31: 149-90, 1980.
- GREUB,L.J.;DROLSON,P.N. e ROHWEDER,D.A. Salt tolerance of grasses and legumes for roadside use. *Agronomy Journal*, Madison, 77: 76-80, 1985.
- GUERRIER,G. Effects of NaCl on oxidase activities during germination of salt-sensitive or salt-tolerance species. *Biologia Plantarum*, Prague, 29: 299-306, 1987.
- HAMPSON,C.R. & SIMPSON,G.M. Effects of temperature, salt, and osmotic potential on early growth of wheat (*Triticum aestivum*).I. Germination. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 68: 524-8, 1990.
- HAMRICK,J.L. & ALLARD,R.W. Correlations between quantitative characters and enzyme genotypes in *Avena barbata*. *Evolution*, Lancaster, 29: 438-42, 1975.

- HANNON, N. & BRADSHAW, A.D. Evolution of salt tolerance in two coexisting species of grass. *Nature*, London, **220**: 1 342-3, 1968.
- HEDRICK, P.W. Genetic hitchhiking: a new factor in evolution? *Bioscience*, Washington, **32** : 845-53, 1982.
- HEDRICK, P.W.; JAIN, S.; HOLDEN, L. Multilocus systems in evolution. *Evolutionary Biology*, New York, **11**: 101-82, 1978.
- HUMPHREYS, L.R. *Environmental adaptation of tropical pasture plants*. London, MacMillan Publishers Ltd, 1981. 261p.
- KIANG, Y.T. & CHIANG, Y.C. Comparing differentiation of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc) populations based on isozymes and quantitative traits. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, Taipei, **31**: 129-42, 1990.
- KLAR, A.E. *A água no sistema solo-planta-atmosfera*. São Paulo, Nobel, 1984. 408p.
- KOEHN, R.K. & HILBISH, T.J. The adaptative importance of genetic variation. *American Scientist*, New Haven, **75**: 134-41, 1987.
- JOHNSON, G. Genetic polymorphism among enzyme loci. In: SCANDALIOS, J.G., ed. *Physiological Genetics*. New York, Academic Press, Inc. 1979. p 239-273.
- LEVITT, J. *Responses of plants to environmental stresses*. vol II: water, radiation, salt and other stresses. New York, Academic Press, 1980. 607p.
- LEWONTIN, R.C. Population genetics. *Annual Review of Genetics*, Palo Alto, **19**: 81-102, 1985.

- LI, Z.C. & McCLURE, J.W. Soluble and bound apoplastic patterns and isozymes of peroxidase, esterase and malate dehydrogenase in oat primary leaves. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, 136: 398-403, 1990.
- LOVELESS, M.D. & HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematic*, Palo Alto, 15: 65-95, 1984.
- MAAS, E.V. & HOFFMAN, G.J. Crop salt tolerance-current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division*, New York, ASCE 103 (IR2): 115-34, 1977.
- MANNETJE, L.t` & BENNEKON, K.H.L.VAN. Effect of time of sowing on flowering and growth of Townsville stylo (*Stylosanthes humilis*). *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, Melbourne, 14: 182-5, 1974.
- MARASON, T.; GARCIA, L.V.; TRONCOSO, A. Salinity and germination of annual Melilotus from the Guadalquivir delta (SW Spain). *Plant and Soil*, Dordrecht, 119: 223-8, 1989.
- MARCAR, N.E. Salt tolerance in the genus *Lolium* (Ryegrass) during germination and growth. *Australian Journal of Agriculture Research*, Melbourne, 38: 297-307, 1987.
- MARCON, G. Estrutura genética de populações de *Stylosanthes humilis* H.B.K. (Leguminosae) de três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco. Piracicaba, 1988. 179p (Doutorado- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- MARKERT, C.L. & MOLLER, F. Multiple forms of enzymes tissue, ontogenetic and species specific patterns. *Biochemistry*, New York, 45: 753-63, 1959.
- McNAUGHTON, S.J. Natural selection at the enzyme level. *The American Naturalist*, Chicago, 108: 616-24, 1974.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. *The germination of seeds*. 2.ed. Oxford, Pergamon Press, 1975. 192p
- MOELJOPAWIRO, S. & IKEHASHI, H. Inheritance of salt tolerance in rice. *Euphytica*, Wageningen, 30: 291-300, 1981.
- MOTT, J.J.; McKEON, G.M.; GARDNER, C.J.; t`MANNETJE, L. Geografic variation in the reduction of hard seed content of *Stylosanthes* seeds in the tropics and subtropics or northern Australia. *Australian Journal of Agriculture Research*, Melbourne, 32: 861-9, 1981.
- MYERS, B.A. & MORGAN, W.C. Germination of the salt-tolerant grass *Diplachne fusca*. II. Salinity responses. *Australian Journal of Botany*, Melbourne, 37: 239-51, 1989.
- NASCIMENTO JÚNIOR, D. *Informações sobre plantas forrageiras*. Viçosa, UFV, 1981. 56p.
- NEVO, E.; ZOHARY, D.; BROWN, A.H.D.; HABER, M. Genetic diversity and environmental association of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in Israel. *Evolution*, Lancaster, 33: 815-33, 1979.
- NOBLE, C.L. Germination and growth of *Secale montanum* Guss. in the presence of sodium chloride. *Australian Journal of Agriculture Research*, Melbourne, 36: 385-95, 1985.

- NOBLE, C.L.; HALLORAN, G.M.; WEST, D.W. Identification and selection for salt tolerance in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Australian Journal of Agriculture Research*, Melbourne, 35: 239-52, 1984.
- PARKER, M.A. Disequilibrium between disease resistance variants and allozyme loci in an annual legume. *Evolution* Lancaster, 42: 239-47, 1988.
- PEARSON, G.A. & BERNSTEIN, L. Salinity effects at several growth stages of rice. *Agronomy Journal*, Madison, 51: 654-57, 1959.
- PIMENTEL GOMES, F. *Curso de Estatística Experimental*. 12. ed. São Paulo, Nobel, 1987. 467p.
- POPINIGS, F. *Fisiologia da semente*. Brasília, AGIPLAN, 1977. 289p.
- POWELL, W.; ELLIS, R.P.; MACAULAY, M.; McNICOL, J.; FORSTER, B.P. The effect of selection for protein and isozyme loci on quantitative traits in a doubled haploid population of barley. *Heredity*, London, 65: 115-22, 1990.
- PRICE, S.C.; SHUMAKER, K.M.; KAHLER, A.L.; ALLARD, R.W.; HILL, J.E. Estimates of population differentiation obtained from enzyme polymorphisms and quantitative characters. *The Journal of Heredity*, Washington, 75: 141-42, 1984.
- REDMAN, R.E. Osmotic and specific ion effects on the germination of alfafa. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 52: 803-8, 1974.

- RICHARDS, L.A. *Diagnosis and improvement of saline and alkali soils*. Washington, USDA, 1954 160 p. (USDA Agriculture Handbook, 60).
- RICHARDS, R.A. Should selection for yield in saline regions be made on saline or non-saline soils?. *Euphytica*, Wageningen, **32**: 431-8, 1983.
- ROZEMA, J.; ROZEMA-DIJST, E.; FREIJSEN, A.H.J.; HUBER, J.J.L. Population differentiation within *Festuca rubra* L. with regard to soil salinity and soil water. *Oecologia*, Berlin, **34**: 329-41, 1978.
- RUDD, V.R. *Aeschynomene* (Benth.) Hutch. In: POLHILL, R.M. & RAVE, P.H. ed. *Advances in legume systematics*; Part 1. Royal Botanic Garden, Kew, 1981. p 347-54.
- RUSSELL, J.S. Comparative salt tolerance of some tropical and temperate legumes and tropical grasses. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, Melbourne **16**: 103-9, 1976.
- SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. *Plant Physiology* 3. ed. Belmont, Weidsworth Publishing Company, 1985. 540p.
- SCANDALIOS, J.B. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. *Biochemical Genetic*, New York, **3**: 37-79, 1969.
- SHANNON, M.C. Testing salt tolerance variability among tall wheatgrass lines. *Agronomy Journal*, Madison, **70**: 719-22, 1978.

- SHANNON,M.C. In quest of rapid screening techniques for plant salt tolerance. *HortScience*, Alexandria, 14: 587-9, 1979.
- SHANNON,M.C. Principles and strategies in breeding for higher salt tolerance. *Plant and Soil*, Dordrecht 89: 227-41, 1985.
- SIMPSON,M.J.A. & WITHERS,L.A. *Characterization of plant genetic resources using isozyme electrophoresis:a guide to the literature*, Roma, International Board for Plant Genetic Resources, 1986. 102p.
- SMITHIES,O. Zone electrophoresis in starch gels:group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochemical Journal*, Colchester, 61: 629-41, 1955.
- SOLBRIG,O.T. Demography and natural selection. In:*Demography and evolution in plant populations*. Oxford, Blackwell Scientific.1980, p 1-20.
- SOLTIS,D.E.; HAUFLER,C.H.;DARROW,D.C.;GASTONY,G.J. Starch gel electrophoresis of ferns: A compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers,and staining schedules. *American Fern Journal*, Burlington, 73: 9-27, 1983.
- SPIETH,P.T. Environmental heterogeneity: a problem of contradictory selection pressures, gene flow, and local polymorphism. *The American Naturalist*, Chicago, 113:247-60, 1979.

- STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. *Principles and procedures of statistics*. 2.ed New York, McGraw-Hill, 1980. 481p.
- STEVENS, H.C.; CALVAN, M.; LEE, K.; SIEGEL, B.Z. Peroxidase activity as a screening parameter for salt stress in *Brassica* species. *Phytochemistry*, Oxford, 17: 1521-2, 1978.
- STUBER, C.W.; GOODMAN, M.M.; MOLL, R.H. Improvement of yield and ear number resulting from selection at allozyme loci in a maize population. *Crop Science*, Madison, 22: 737-40, 1982.
- TAL, M. Genetics of salt tolerance in higher plants: Theoretical and practical considerations. *Plant and Soil*, Dordrecht, 89: 199-226, 1985.
- TANKSLEY, D.; MEDINA FILHO, H.; RICK, C.M. The effect of isozyme selection on metric characters in a interspecific backcross of tomato- basis of an early screening procedure. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 60: 291-6, 1981.
- TANKSLEY, S.D.; MEDINA-FILHO, H.; RICK, C.M. Use of naturally-occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. *Heredity*, London, 49: 11-25, 1982.
- TORGGLER, M.G.F. Variação genética entre progênies dentro de procedências de *Eucalyptus saligna* Smith. Piracicaba, 1987. 198p (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queirós"/USP).

- TORRES-SCHUMANN, S.; GODOY, J. A.; PINTOR-TORO, J. A.; MORENO, F. J.; RODRIGO, R. M.; GARCIA-HERDUGO, G. NaCl effects on tomato seed germination, cell activity and ion allocation. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, 135: 228-32, 1989.
- UNGAR, I. A. Halophyte seed germination. *Botanical Review*, New York, 44: 233-64, 1978.
- UNGAR, I. A. Population ecology of halophyte seeds. *Botanical Review*, New York, 53: 301-34, 1987.
- VAN HUUSTEE. Some molecular aspects of plant peroxidases biosynthetic studies. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 38: 205-19, 1987.
- WATT, W. B. Adaptation at specific loci. II Demographic and biochemical elements in the maintenance of the *Colias* PGI polymorphism. *Genetics*, Princeton, 109: 691-724, 1983.
- WATT, W. B.; CARTER, P. A.; BLOWER, S. M. Adaptation of specific loci IV Differential meeting success among glycolytic allozyme genotypes of *Colias* butterflies. *Genetics*, Princeton, 109: 157-75, 1985.
- WEST, D. W. & FRANCOIS, L. E. Effects of salinity on germination growth and yield of cowpea. *Irrigation Science*, Dordrecht, 3: 169-75, 1982.
- WEST, D. W. & TAYLOR, J. A. Germination and growth of cultivars of *Trifolium subterraneum* L. in the presence of sodium chloride salinity. *Plant and Soil*, Dordrecht, 62: 221-30, 1981.