

USO DO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE RAÍZES COM HEMATOXILINA PARA CLASSIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE LEUCENA QUANTO À TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO

Andrade, L.R.M. de¹; Cavalcante, D.P²; Karia, C.T.¹; Ramos, A.K.B.¹; Carvalho, M.A. de¹.
¹Embrapa Cerrados; ²Bolsista PIBIC/UnB. (leide@cpac.embrapa.br).

INTRODUÇÃO

A leucena é uma leguminosa forrageira arbustiva, cuja produção de forragem é bastante limitada devido à acidez e à alta saturação de alumínio (Al) presentes nos solos dos Cerrados. Vários métodos têm sido usados para a detecção de Al nas raízes e com isto correlacionar com a sensibilidade das plantas a este elemento. O método que utiliza a hematoxilina é baseado na propriedade deste composto orgânico de desenvolver uma cor azul-turquesa quando complexado com o Al. A classificação é feita comparando o padrão de coloração de extremidade de raízes de plântulas, após a exposição ao Al por poucas horas. Através desta técnica, tem sido possível indicar diferenças em tolerância ao Al em espécies anuais (milho, trigo), mas ainda não foi descrita para classificação de genótipos de plantas perenes.

OBJETIVO

Avaliar a capacidade do método de coloração das raízes com hematoxilina de classificar genótipos de leucena quanto à tolerância ao Al.

MATERIAIS E MÉTODOS

1) Solução nutritiva de crescimento:

0,5 mM NH₄Cl, 1,0 mM Ca(NO₃)₂.4H₂O, 0,25 mM K₂SO₄, 0,6 mM MgCl₂.6H₂O, 0,0025 mM NaH₂PO₄.H₂O, 8 mM ZnSO₄.7H₂O, 3 mM CuSO₄.5H₂O, 4,3 mM H₃BO₃, 1,8 mM MnCl₂, 3,2 mM EDTA-Na-Fe, pH 5,5, (30 ml/frasco), por 96 horas

2) Soluções tratamentos:

Experimento 1:

- a) com Al = 50, 100, 150 e 200 mM AlCl₃ + 400 mM CaCl₂, pH 4,5
 - b) sem Al = 400 mM CaCl₂, pH 4,5
- Tempo de tratamento: duas, quatro, seis, oito e 24 horas.

Experimento 2:

Ca = 200, 400 e 600 mM CaCl₂ X
 Al = 0, 50, 100, 150 e 200 mM AlCl₃
 pH das soluções = pH 4,5
 Tempo de tratamento: seis horas

3) Tratamento com hematoxilina:

2,0 g hematoxilina (VETEC) + 0,2 g de NaIO₃/l, por 30 minutos.

Condições de crescimento das plântulas:

- câmara de crescimento, a 25 °C, 70 % umidade, 12 horas/ luz

Parâmetros avaliados:

- sintomas de toxidez de Al na parte aérea e raízes;
- padrão de coloração das raízes com hematoxilina;
- localização do Al nas células da zona apical.

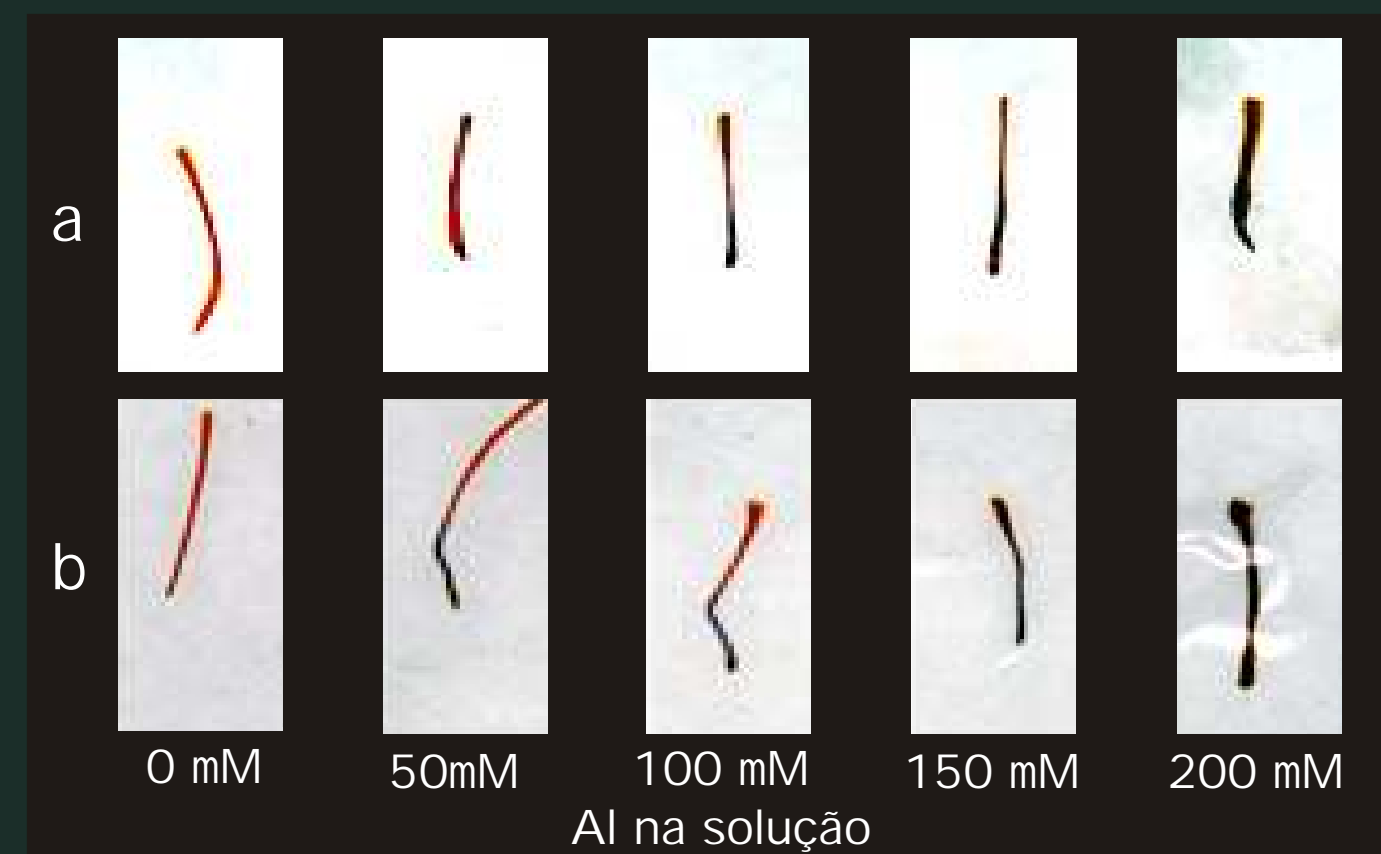
Registro dos resultados:

microscópio (Axiophoto); scanner de mesa HP, fixação dos ápices das raízes com fita adesiva transparente.

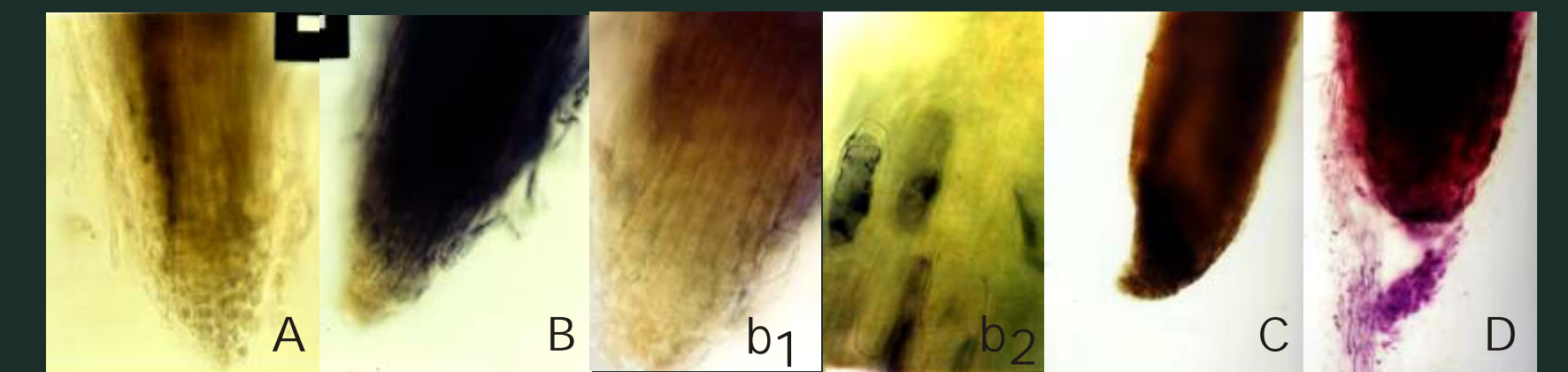
RESULTADOS E DISCUSSÃO



Padrão de desenvolvimento do sistema radicular de plântulas de *L. diversifolia* (26), de a) sete dias de idade e b) 24 dias, submetidas a diferentes concentrações de Al na solução.



Padrão de coloração com hematoxilina das raízes de plântulas do híbrido *L. diversifolia* (25) X *L. leucocephala* (11), de sete dias de idade, submetidas a diferentes concentrações de Al na solução, por a) 6 horas, b) 24 horas.

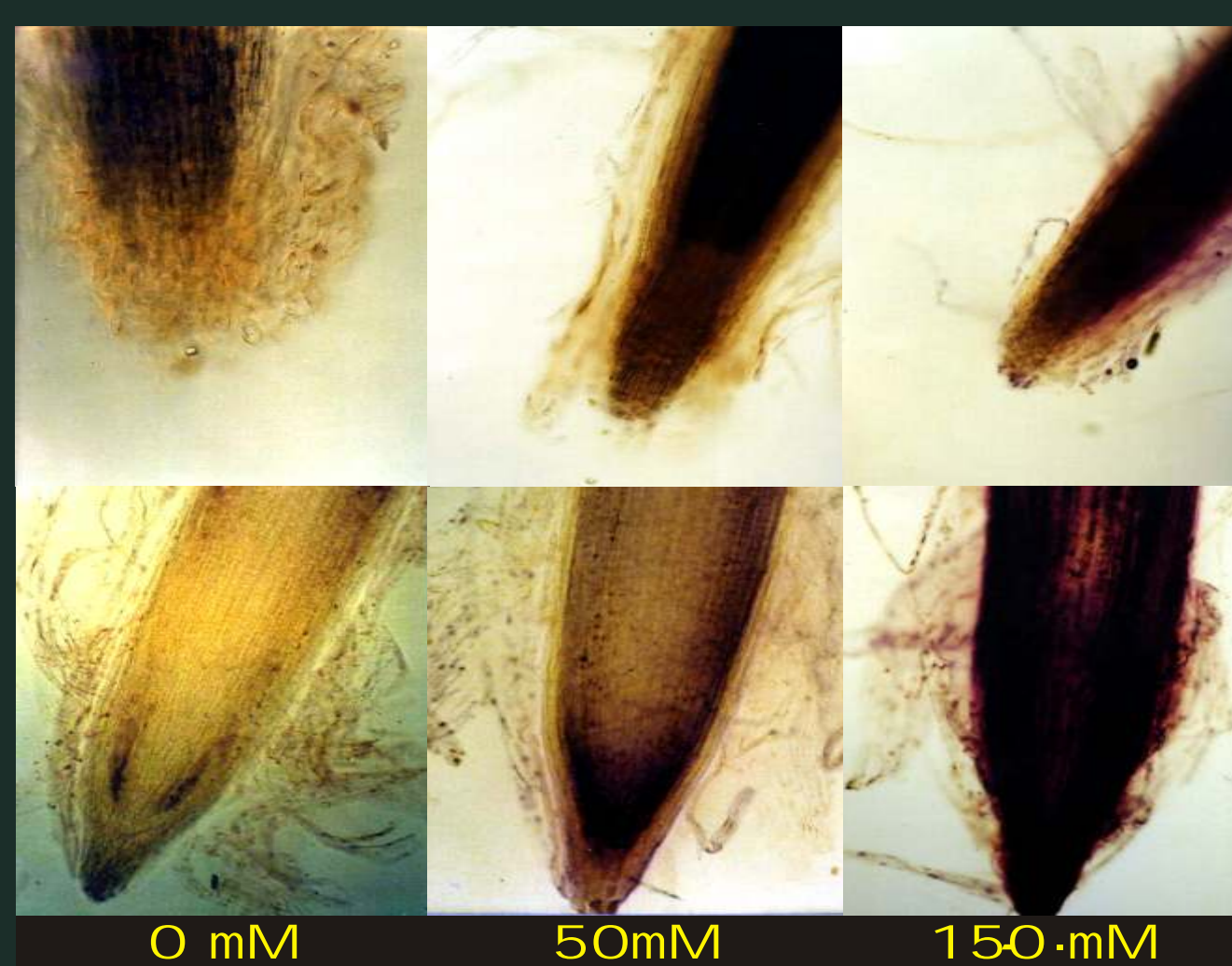


Localização do Al, pela hematoxilina, na região apical de plântulas do híbrido *L. leucocephala* 11 x *L. diversifolia* 25, de sete dias de idade, submetidas ao estresse por Al (AlCl₃ + 400 mM CaCl₂) em diferentes concentrações e tempo de exposição: A) Controle = 0 Al (400 mM CaCl₂), (aumento 200 X); B) 50 mM Al, por 4 horas: presença de Al nas células da região apical (aumento 200 X); b₁) detalhe da coifa (aumento 400 X); b₂) presença do Al no núcleo e com aumento do vacúolo (?) (aumento 400 X); C) 100 mM Al, por 6 horas: região apical completamente colorida; D) 150 mM Al, por 6 horas: perda de células da epiderme e da coifa para o meio. (C e D = aumento 200 X).

Padrão de coloração com hematoxilina da zona apical de raízes de genótipos de leucena submetidas a diferentes concentrações de Al, por 6 horas.

Genótipos	Concentração de Al					
	0 mM	25 mM	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM
25						
26						
11 x 25						
11						
Cunningham						
Texas						

Genótipo	Padrão de coloração do ápice da raiz concentração do Al - (mM)				
	25	50	100	150	200
<i>L. diversifolia</i> (25)					
<i>L. diversifolia</i> (26)					
Híbrido (11 X 25)					
<i>L. leucocephala</i> (11)					
<i>L. leucocephala</i> , cv. Cunningham					
<i>L. leucocephala</i> , cv. Texas					

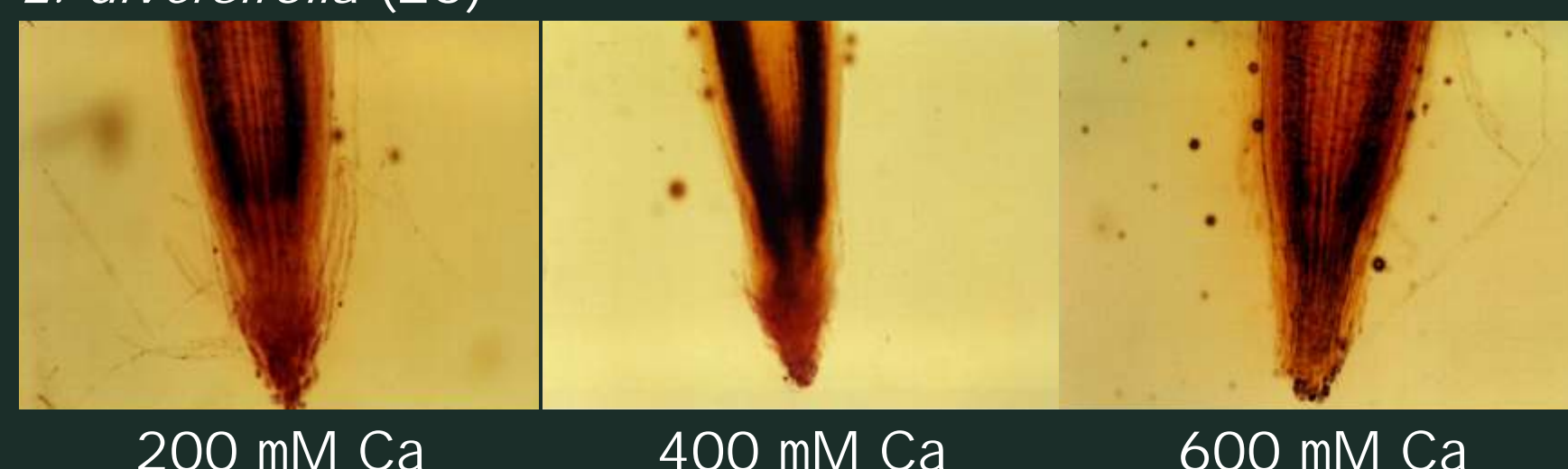


Padrão de coloração com hematoxilina dos ápices de raízes de *L. leucocephala*, A) cv. Cunningham e B) cv. Texas, de sete dias, nas concentrações de 0, 50 e 150 mM Al (AlCl₃ + 400 mM CaCl₂), 4 h. (aumento: A) 0 mM Al = 200 X; demais = 100 X).

L. Leucocephala cv. Cunningham



L. diversifolia (25)



Efeito da concentração de Ca (CaCl₂) no padrão de tolerância a 100 mM Al (AlCl₃) pelo método de coloração dos ápices das raízes com hematoxilina.

CONCLUSÕES

- O protocolo experimental em desenvolvimento para classificação dos genótipos de leucena quanto a tolerância ao Al pelo método de coloração das raízes com hematoxilina é simples e rápido, permitindo a avaliação ainda nos primeiros estágios de desenvolvimento das plântulas;

- o nível de Ca na solução afetou o padrão de coloração das raízes dos genótipos *L. diversifolia* (25) e *L. leucocephala* cv. Cunningham. Com o aumento da concentração, os ápices ficaram menos coloridos, mas com intensidade diferentes indicando maior tolerância do *L. diversifolia* (25) aos mesmos níveis de Ca e Al na solução;

- a observação ao microscópio ou lupa, e registro, como fotos/imagens, da zona apical das raízes auxiliam na classificação dos genótipos;

- a classificação dos genótipos de leucena avaliados pelo método da hematoxilina com o protocolo desenvolvido indicou a seguinte ordem de tolerância ao Al: *L. diversifolia* (25) > *L. diversifolia* (26) > Híbrido *L. diversifolia* (25) X *L. leucocephala* (11) > *L. leucocephala* cv. Cunningham > *L. leucocephala* cv. Texas @ *L. leucocephala* (11);

- apesar da pertinência dos resultados obtidos em laboratório com os reportados em literatura, alguns ajustes na metodologia deverão ser feitos para que o método tenha um maior grau de repetibilidade.