

## Citogenética do gênero *Leucaena* Benth

### Cytogenetics of the genus *Leucaena* Benth

Maria Teresa Schifino-Wittmann<sup>1</sup>

#### - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

#### RESUMO

Neste trabalho, são revistos e discutidos os resultados mais relevantes dos estudos citogenéticos em *Leucaena* realizados pelo grupo do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que envolvem híbridos selecionados dentro de programas de melhoramento, e as espécies selvagens e cultivadas do gênero. Estes resultados revelaram variabilidade intra e interespecífica para o número cromossômico, mostrando a ocorrência de multivalentes mesmo nas espécies consideradas diplóides (o que apóia a origem paleopoliploide de muitas espécies) e constituem uma importante contribuição para a citogenética das espécies de *Leucaena*, com repercussões na taxonomia e no melhor entendimento da complexa evolução do gênero. Os resultados indicam que deve haver um acompanhamento citogenético em programas de melhoramento genético destas espécies.

**Palavras-chave:** citogenética, evolução, *Leucaena*, melhoramento.

#### ABSTRACT

The cytogenetics group of the Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil determined the chromosome numbers of all species of *Leucaena*. Cytogenetic results of some selected hybrids and wild and cultivated species of *Leucaena* are reviewed and discussed. The results showed an intra and interespecific chromosome number variability and the occurrence of multivalents even in the presumed diploid species (what supports a paleopolyploid origin for these species). This is a very important contribution and may reflect on the taxonomy and on the understanding of the complex evolution of *Leucaena*. These results suggest that cytogenetic studies should be part of all *Leucaena* breeding programs.

**Key words:** cytogenetics, evolution, *Leucaena*, plant breeding.

#### INTRODUÇÃO

O gênero *Leucaena* (Mimosae, Mimosoideae, Leguminosae) compreende árvores (Figura 1) fixadoras de nitrogênio, nativas das Américas e distribuídas desde o sul do Texas até o Perú. As múltiplas utilizações destas árvores incluem a produção de madeira, alimentação humana, forragem para o gado, adubação verde, sistemas agroflorestais, artesanato, cercas e cercas vivas, etc. Além de economicamente importantes em algumas de suas utilizações específicas, como forragem e produção de madeira, o fato de serem árvores multipropósito faz com que muitas destas espécies sejam amplamente utilizadas em locais mais pobres das regiões tropicais. Espécies como *L. leucocephala* Lam. podem comportar-se como invasoras agressivas (HUGHES, 1993). Algumas espécies, principalmente *L. leucocephala* e *L. diversifolia* Schltldl, e em menor escala *L. pallida* Britton & Rose, são amplamente cultivadas fora de sua região de origem, especialmente nos trópicos (HUGHES, 1993; HUGHES, 1998a; HUGHES, 1998b). Em regiões de clima temperado a subtropical, como, por exemplo, no sul do Brasil, tem havido muito interesse na utilização de *Leucaena* como uma alternativa forrageira, ou em sistemas agroflorestais (SCHIFINO-WITTMANN, 2000).

A taxonomia do gênero tem sido discutida por vários autores (BREWBAKER, 1987; HUGHES, 1993; ZÁRATE, 1994). Recentemente, uma ampla revisão taxonômica envolvendo morfologia, análise

<sup>1</sup>Biólogo, Professor Adjunto, Doutor, Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. CP 15100, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Bolsista do CNPq. E-mail: mtschif@ufrgs.br.



Figura 1 - Inflorescência de *L. retusa*

cladística e dados de cpDNA (HUGHES, 1998a) delimitou 22 espécies, quatro subespécies, duas variedades e dois taxa híbridos. A evolução do gênero parece ser bastante complexa, envolvendo especiação reticulada, e é sugerida uma ação antrópica no surgimento de *L. leucocephala* (HUGHES & HARRIS, 1995; HARRIS et al., 1996).

Os cromossomos de *Leucaena* são pequenos (ca 1  $\mu$ m), numerosos ( $2n=52, 56, 104$  e  $112$ ) e pouco estudados, sendo as informações disponíveis restritas a algumas contagens cromossômicas e análises meióticas. (GONZALEZ et al., 1967; PAN & BREWBAKER, 1988; PALOMINO et al., 1995). Muitas das contagens não estavam confirmadas ou apresentavam dúvidas devido à falta de uma delimitação taxonômica bem definida.

Neste trabalho, são revistos e discutidos os resultados mais relevantes dos estudos citogenéticos em *Leucaena* realizados pelo grupo do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (DPFA), iniciados em 1984, e que compreendem: análises dos números cromossômicos, comportamento meiótico e fertilidade do pólen, em híbridos selecionados dentro de programas de melhoramento, e em espécies selvagens e cultivadas do gênero. Além disso, é comentada a contribuição destes trabalhos para o melhoramento genético e para o entendimento das relações citogenéticas entre as espécies do gênero.

#### Citogenética de híbridos

A análise de híbridos foi realizada a partir de materiais cruzados e selecionados pelo Dr. E. Mark Hutton no CIAT, Cali, Colômbia e CPAC-EMBRAPA, Planaltina,

Brasil, dentro de um programa de seleção de plantas para adaptação aos solos ácidos do cerrado brasileiro.

Foi estudado o número cromossômico e o comportamento meiótico em híbridos F1, F2 e F3 de *L. leucocephala* x *L. diversifolia*, ambas  $2n=104$ , *L. leucocephala* x *L. diversifolia* “diplóide” ( $2n=52$ ) [atual *L. trichandra* (Zucc.) Urban], *L. leucocephala* x *L. esculenta* (Sessé & Moc. ex DC.) Benth. ( $2n=52$ ) e *L. leucocephala* x *L. pulverulenta* (Schltdl.) Benth. (FREITAS et al., 1988). Foi verificada uma grande variação interespecífica em árvores consideradas “puras” (*L. leucocephala*, *L. diversifolia* e *L. trichandra*) o que talvez possa ser explicado pela facilidade de hibridação natural entre estes taxa. Nos híbridos F1 entre estas espécies, os números eram muito variáveis, mas, nas F2 e F3, houve uma tendência a números mais altos, próximos do nível tetraplóide, indicando uma tendência ao aumento de números cromossômicos em gerações avançadas destas plantas selecionadas para tolerância a solos ácidos. Apenas bivalentes foram observados na meiose, o que levou os autores a sugerir a ocorrência de pareamento intraespecífico.

Trabalho posterior foi realizado com uma população de híbridos F2, F3 e F4 entre as tetraplóides *L. leucocephala* x *L. diversifolia* (Figura 2) (FREITAS et al., 1991). Para alguns caracteres morfológicos como número de flores por inflorescência e número de legumes por inflorescência, e cor da inflorescência, a população híbrida apresentou-se mais próxima a *L. leucocephala*. Das 183 plantas analisadas, a grande maioria apresentava  $2n=104$ , mas alguns eventuais números mais baixos (86-98) foram observados em algumas árvores. Apesar de predominarem associações

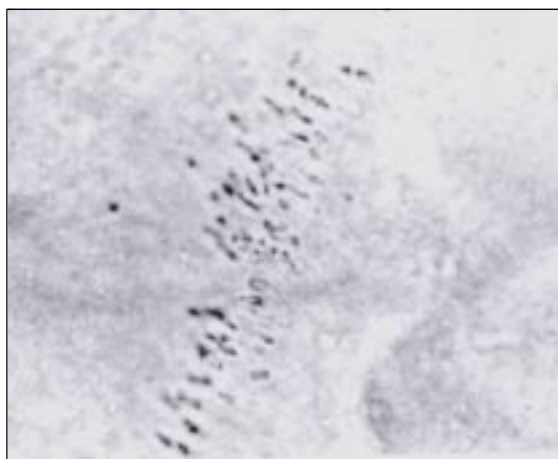


Figura 2 - Metáfase meiótica, 52II, em híbridos de *Leucaena leucocephala* e *L. diversifolia*; escala igual a 10  $\mu$  m

em bivalentes (Figura 2), quadrivalentes trivalentes e univalentes foram observados. O índice meiótico, ou seja, a percentagem de tetrades de pólen normais, que reflete a estabilidade meiótica de uma planta, sendo consideradas estáveis aquelas com índices maiores ou iguais a 90%, variou de 31,4 a 96,6% e a fertilidade do pólen de 14,8 a 96,2%. Esta grande variabilidade indica a necessidade de um levantamento citogenético prévio para a seleção de genitores em cruzamentos controlados.

### Número cromossômico

Dentro de uma linha ligada à taxonomia e evolução, os trabalhos realizados com acessos das diversas espécies, coletadas nos seus locais de ocorrência natural, foi, sem dúvida, a maior contribuição do grupo do grupo de citogenética.

Esta abordagem partiu de um intercâmbio com os pesquisadores do Oxford Forestry Institute (OFI), Universidade de Oxford, Reino Unido, Dr. Colin Hughes e Allan Pottinger, que disponibilizaram os acessos da coleção de germoplasma de *Leucaena* do OFI para análise citogenética.

A análise do número cromossômico de 73 populações das 22 espécies (SCHIFINO-WITTMANN et al., 2000; CARDOSO et al., 2000) (Tabela 1) mostrou resultados interessantes:

a) a descoberta de mais uma espécie tetraplóide no gênero, *L. involucrata* S. Zárate,  $2n=112$ ; b) a confirmação de contagens consideradas duvidosas; c) contagens inéditas para algumas espécies, como *L. cuspidata* Standley ( $2n=52$ ), *L. lempirana* C. E. Hughes ( $2n=52$  e  $56$ ) (Figura 3), *L. magnifica* (C. E. Hughes) C.E. Hughes ( $2n=52$ ), *L. matudae* (S. Zárate) C.E. Hughes ( $2n=56$ ), *L. pueblana* Britton & Rose ( $2n=52$ ); d) identificação de variabilidade intraespecífica em diversas taxa, como *L. macrophylla* Benth. subsp. *istmensis* ( $2n=52$  e  $56$ ), *L. confertiflora* S. Zárate var. *adenotheloidea* ( $2n=104$  e  $112$ ), *L. pallida* ( $2n=104$  e  $112$ ) and *L. trichandra* ( $2n=52$  and  $104$ ), em alguns casos inclusive aparentemente ligada à delimitação taxonômica de subespécies (*L. collinsii* Britton & Rose subsp. *collinsii*  $2n=52$ , subsp. *zacapana*  $2n=56$ , *L. macrophylla* Benth. subsp. *istmensis*  $2n=52,56$ , subsp. *macrophylla*  $2n=56$ ).

Tabela 1 – Números cromossômicos em *Leucaena* obtidos na literatura : Hughes (1998 b) e Schifino-Wittmann et al. (2000) e Cardoso et al. (2000).

Espécies	2n (Hughes1998)	2n (Schifino-Wittmann et al., 2000 e Cardoso et al., 2000)
<i>L. collinsii</i> Britton & Rose	52 (?56)	52 and 56*
<i>L. confertiflora</i> S. Zárate	112	104* and 112
<i>L. cuspidata</i> Standley	?	52*
<i>L. diversifolia</i> (Schltdl.) Benth.	104	104
<i>L. esculenta</i> (Sessé & Moc. ex DC.) Benth.	52 (?56) (?112)	52
<i>L. greggii</i> S. Watson	56	56
<i>L. involucrata</i> S.Zárate	?	112*
<i>L. lanceolata</i> S. Watson	52	52
<i>L. lempirana</i> C.E. Hughes	?	52*, 56*
<i>L. leucocephala</i> Lam. (de Wit)	104	104
<i>L. macrophylla</i> Benth	?52	52* and 56*
<i>L. magnifica</i> (C.E.Hughes) C.E.Hughes	?52	52*
<i>L. matudae</i> (S. Zárate) C.E.Hughes	?52	56*
<i>L. multicapitula</i> Schery	?52	52**
<i>L. pallida</i> Britton & Rose	104 (?110, 112)	104 and 112*
<i>L. pueblana</i> Britton & Rose	?	52*
<i>L. pulverulenta</i> (Schltdl.) Benth.	56	56
Espécies	2n (Hughes1998)	2n (Schifino-Wittmann et al., 2000 e Cardoso et al., 2000)
<i>L. retusa</i> Benth.	56	52*
<i>L. salvadorensis</i> Standley ex Britton & Rose	?56	56**
<i>L. shanonii</i> J.D. Smith	52	52, 56**
<i>L. trichandra</i> (Zucc.) Urban	52 (?56)	52 and 104*
<i>L. trichodes</i> (Jacq.) Benth	52	56*

\* contagens novas

\*\* confirmação de contagens controversas

Os dados de número cromossômico, em síntese, demonstraram a grande variabilidade, mesmo em números básicos [ $n=26$  e  $28$  considerando-se as espécies supostamente diplóides do gênero, ou  $x=13$  e  $14$  considerando-se outras Mimosoideae (GOLDBLATT, 1981)] nas espécies de *Leucaena*. Além disto, os resultados sugerem: a) que as diferenças interespecíficas de número cromossômico poderiam ter surgido por uma provável disploidia nas espécies diplóides e consequentemente nas tetraplóides; b) origens múltiplas das espécies tetraplóides; e apoiam o padrão evolutivo complexo do gênero (evolução reticulada) como sugerido por HUGHES & HARRIS (1995) e HARRIS et al. (1996).

### Comportamento meiótico

Uma análise recente do comportamento meiótico e fertilidade do pólen em 49 acessos de 14 taxa de *Leucaena* (BOFF & SCHIFINO-WITTMANN, 2002; BOFF & SCHIFINO-WITTMANN, 2003) (Tabela 2) mostrou que as espécies diplóides *L. pulverulenta*, *L. retusa* Benth., *L. shannonii* J.D. Smith e *L. trichandra* apresentaram comportamento meiótico preferencialmente em bivalentes e quadrivalentes. Foram também observados univalentes e outras associações múltiplas, porém em frequências variadas. O acesso estudado de *L. macrophylla* apresentou predominância de células com anormalidades. Nas espécies tetraplóides *L. confertiflora*, *L. diversifolia*, *L. involucrata*, *L. leucocephala* (Figura 3), *L. pallida* e *L. x spontanea* (Tabela 2), apesar da predominância

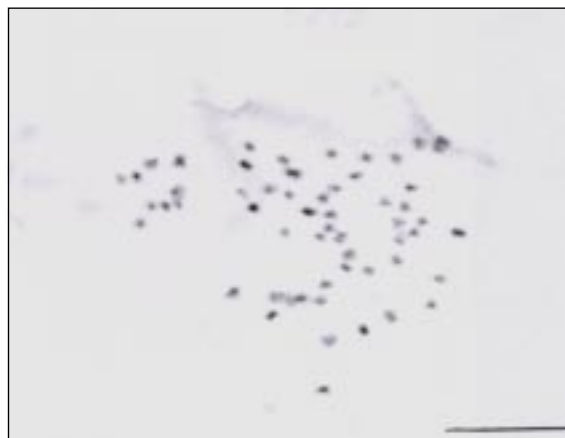


Figura 3 – *L. lempirana*,  $2n=56$ ; escala 10  $\mu\text{m}$

de bivalentes, quadrivalentes e outras irregularidades foram observadas em frequências variadas.

Os índices meióticos médios e a fertilidade média do pólen, incluindo também *L. salvadorensis* Standley ex Britton & Rose e *L. cuspidata*, variaram de 73,5 a 98,9 % e de 54,2 a 98,8 %, respectivamente.

Estes dados sugerem que as espécies diplóides de *Leucaena* podem ser paleopoliplóides, como já proposto com base no alto número cromossômico ‘diplóide’ ( $2n=52$  e  $56$ ) do gênero, quando comparado com os números básicos sugeridos para algumas Mimosoideae ( $x=13$  e  $14$ ) (GOLDBLATT, 1981). Em relação às espécies poliplóides, dados da literatura (HUGHES, 1998 a) têm proposto origem alopólípode. Os dados de comportamento meiótico sugerem uma origem alopólípode segmentar *sensu* STEBBINS (1971), apesar de a autopoliploidia não poder ser descartada. Até 7% (BOFF & SCHIFINO-WITTMANN, 2003) ou mesmo 12% (SCHIFINO-WITTMANN et al., 2000) de gametas não reduzidos podem ocorrer em *L. trichandra*. A identificação de um poliplóide natural em *L. trichandra* (SCHIFINO-WITTMANN et al., 2000) sugere que a autopoliploidia pode ocorrer em *Leucaena*. Dados recentes de DNA de cloroplastos (cp DNA), e de espaçadores gênicos internos (ITS) (HUGHES et al., 2002) sugerem uma origem alotetraplóide para quatro das espécies tetraplóides de *Leucaena* (nas quais foi detectado polimorfismo para ITS) mas não excluem a possibilidade de autotetraploidia em *L. diversifolia*, já que nesta última apenas um tipo de ITS foi encontrado (Figura 4).

Em resumo, os trabalhos aqui discutidos em termos de número de cromossomos em *Leucaena* revelam variabilidade intra e interespecífica,

Tabela 2 – Associações cromossômicas em espécies diplóides e tetraplóides de *Leucaena* (adaptado de Boff & Schifino-Wittmann, 2002; Boff & Schifino-Wittmann, no prelo)

Espécie	2n	nº acessos	associações cromossômicas
<i>L. macrophylla</i>	56	1	28 II (98,0) *
<i>L. pulverulenta</i>	56	3	28II (16,0)
<i>L. retusa</i>	52	1	26 II (39,0)
<i>L. shannonii</i>	52	2	26 II (48,0)
	56	1	28 II (60,0)
<i>L. trichandra</i>	52	7	26 II (7,0)
<i>L. confertiflora</i>	104	1	52 II (21,7)
<i>L. diversifolia</i>	104	9	52 II (9,0)
<i>L. involucrata</i>	112	1	56 II (55,0)
<i>L. leucocephala glabrata</i>	104	11	52 II (17,0)
<i>L. leucocephala leucocephala</i>	104	1	52II (55,0)
<i>L. pallida</i>	112	2	56 II (43,0)
<i>L. x spontanea</i>	104	1	52 II (51,0)

\*entre parênteses, percentagem máxima de células com irregularidades, principalmente univalentes, trivalentes, quadrivalentes, outros multivalentes

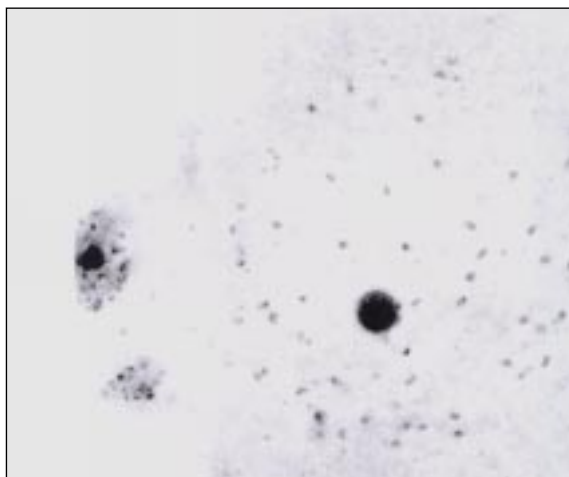


Figura 4 - Diacinese em *L. leucocephala glabrata*, 52 II; escala 10 µm

demonstram a ocorrência de multivalentes, mesmo nas espécies consideradas diplóides, apoiando a origem paleopoliplóide de muitas espécies e constituem uma importante contribuição para a citogenética destas espécies. Estes resultados também podem trazer repercussões na taxonomia e no melhor entendimento da complexa evolução do gênero. Além disto, demonstram a importância de um acompanhamento citogenético em programas de melhoramento genético destas espécies.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOFF, T.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Pollen fertility and meiotic behaviour in accessions and species of *Leucaena*. **Tropical Grassland**, Brisbane, v.36, p.54-58, 2002.
- BOFF, T.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Paleopolyploidy and segmental allopolyploidy in species of *Leucaena* Benth: evidence from meiotic behaviour analysis. **Hereditas**, Lund, v.138, p.27-35, 2003.
- BREWBAKER, J.L. Species in the genus *Leucaena*. **Leucaena Research Reports**, Taiwan, v.7, p.6-20, 1987.
- CARDOSO, M.B.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Taxonomic and evolutionary implications of intraspecific variability in chromosome numbers of species of *Leucaena* Benth (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.134, p.549-556, 2000.
- FREITAS, L.H.C.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; HUTTON, E.M. Cytogenetic analysis of species and hybrids of *Leucaena* (Leguminosae) in relation to acid soil tolerance. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.11, p.97-109, 1988.
- FREITAS, L.H.C.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; PAIM, N.R. Floral characteristics, chromosome numbers and meiotic behavior of hybrids between *Leucaena leucocephala* (2n=104) and tetraploid *L. diversifolia* (2n=104) (Leguminosae). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.14, p.781-789, 1991.
- GOLDBLATT, P. Cytology and the phylogeny of the Leguminosae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P.H. (Eds). **Advances in legume systematics. Part 2**. Kew : Royal Botanic Gardens, 1981. p.427-464.
- GONZALEZ, V.; BREWBAKER, J.L.; HAMIL, D.E. *Leucaena* cytogenetics in relation to the breeding of low mimosine lines. **Crop Science**, Madison, v.7, p.140-143, 1967.
- HARRIS, S.A.; CHAMBERLAIN, J. R.; HUGHES C.E. New insights into the evolution of *Leucaena* Benth. In: PICKERSGIL, B.; LOCK, J.M. (eds.). **Advances in legume systematics. Part 8. Legumes of economic importance**. Kew : Royal Botanic Gardens, 1996. p.117-126.
- HUGHES, C.E. **Leucaena genetic resources: The OFI seed collections and a synopsis of species characteristics**. Oxford : Oxford Forestry Institute, 1993. 117p.
- HUGHES, C.E. **Monograph of Leucaena (Leguminosae-Mimosoideae)**. **Systematic botany monographs 55**. Ann Harbor : The American Society of Plant Taxonomists, 1998a. 244p.
- HUGHES, C.E. **Leucaena. A genetic resources handbook. Tropical forestry paper 37**. Oxford : Oxford Forestry Institute, 1998b. 274p.
- HUGHES, C.E.; HARRIS, S.A. Systematics of *Leucaena*: recent findings and implications for breeding and conservation. In: SHELTON, H.M.; PIGGIN, C.M.; BREWBAKER, J.L. (eds.). **Leucaena- opportunities and limitations. ACIAR Proceedings 57**. Canberra : ACIAR, 1995. p.54-65.
- HUGHES, C.E.; BAILEY, C.D.; HARRIS, S.A. Divergent and reticulate species relationships in *Leucaena* (Fabaceae) inferred from multiple data sources: insights into polyploid origins and nrDNA polymorphism. **American Journal of Botany**, Ithaca, v.89, p.1057-1073, 2002.
- PALOMINO, G.; ROMO, V.; ZÁRATE S. Chromosome numbers and DNA content in some taxa of *Leucaena* (Fabaceae Mimosoideae). **Cytologia**, Tokyo, v.60, p.31-37, 1995.
- PAN, F.J.; BREWBAKER, J.L. Cytological studies in the genus *Leucaena* Benth. **Cytologia**, Tokyo, v.53, p.393-399, 1988.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Hybrids between *Leucaena leucocephala* and *L. diversifolia* in Rio Grande do Sul, Southern Brazil; a summary. **Leucnet News**, Oxford, v.7, p.3-15, 2000.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T. et al. Chromosome numbers and unreduced gametes in species of *Leucaena* Benth (Leguminosae) – new contributions for the taxonomy, evolutionary studies and breeding of the genus. In: GUTTENBERGER, H. *et al.* (eds.) **Cytogenetic**

**studies of forest trees and shrubs - Review, present status and outlook on the future.**

Zvolen: Arbora , 2000. p.181-190

STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher**

**plants.** Reading: Addison-Wesley, 1971. 216 p.

ZÁRATE, S. Revisión del genero *Leucaena* in Mexico. **Anales del Instituto de Biología, serie Botanica**, Mexico v. 65, p. 83- 162, 1994.