

NÚMERO DE CROMOSSOMOS, COMPORTAMENTO MEIÓTICO E VIABILIDADE DO PÓLEN EM TRÊS ESPÉCIES DE *STYLOSANTHES* Sw. (LEGUMINOSAE-PAPILIONOIDEAE) NATIVAS DO SUL DO BRASIL

CHROMOSOME NUMBER, MEIOTIC BEHAVIOR AND POLLEN VIABILITY IN THREE SPECIES OF *STYLOSANTHES* SW. (LEGUMINOSAE-PAPILIONOIDEAE) NATIVE TO SOUTHERN BRAZIL

Alice BATTISTIN¹
Ana Carine Feltrin de MATTOS²

RESUMO

Dez acessos de três espécies da leguminosa forrageira *Stylosanthes* Sw. foram analisados quanto a recontagem do número de cromossomos, o comportamento meiótico e a estimativa da porcentagem de viabilidade do pólen, pela comparação de três diferentes corantes. Para a recontagem do número de cromossomos as zonas meristemáticas das radículas foram tratadas com pectinase-celulase 2% e coradas comorceína propiônica 2%. No estudo da meiose e estimativa da viabilidade do pólen, os botões florais foram fixados em etanol absoluto — clorofórmio — ácido acético nas proporções 6:3:1. O corante utilizado para análise da meiose foiorceína lacto-pro-piônica 1% e na estimativa da viabilidade do pólen foram usados e comparados os corantes:orceína acética 1%, reativo de alexander (verde malaquita + fucsina ácida) e carmin propiônico 1%. Todos os acessos são diplóides com $2n=2x=20$ cromossomos. O comportamento meiótico da microsporogênese foi considerado normal, com índices meióticos acima de 90%. Na estimativa da viabilidade do pólen nestas espécies, o corante mais confiável é o reativo de alexander por diferenciar através das cores o protoplasma e a parede celular.

Palavras-chave: cromossomos, pareamento meiótico, pólen, leguminosas.

ABSTRACT

In this paper ten accessions of three species of leguminous forage Stylosanthes Sw. were analyzed with regard to the recount of the number of chromosomes, meiotic behavior and the percentage pollen viability by comparing three different dyes. In order to count the chromosome number, the meristematic regions of the roots were treated with pectinase-celullase 2% and stained with propionic orcein 2%. In the meiosis study and

⁽¹⁾ Laboratório de citogenética Vegetal e Biotecnologia, Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria. 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil. Correspondência para/Correspondence to A. BATTISTIN. E-mail: batti@terra.com.br.

⁽²⁾ Universidade Federal de Santa Maria.

the estimation of pollen viability the flower-buds were fixed in absolute ethanol: chloroform: acetic acid (6:3:1). The material for meiosis was stained with lactopropionic orcein 1% and the pollen was stained with acetic orcein 1%, Alexander reactive and propionic carmine 1%. All accessions were diploids with $2n=2x=20$ chromosomes. The meiotic behavior concerning microsporogenesis was considered normal with the meiotic index (MI) higher than 90%. In the estimation of pollen viability of these species the most dependable pigment was the Alexander reactive because it could differentiate through colors the cellular wall and the protoplasm.

Key-words: chromosomes, meiotic pairing, pollen, legumes.

INTRODUÇÃO

O gênero *Stylosanthes* pertence a subtribo Stylosanthinae, tribo Aeschynomeneae, subfamília Faboideae, família Leguminosae (POLHILL & RAVEN 1981). No Brasil ocorrem 25 espécies e três variedades distribuídas desde o norte até o sul do país (FERREIRA & COSTA, 1979). As espécies deste gênero, são bem adaptadas, a condições de baixa fertilidade e toxidez de alumínio no solo, suportando o estresse hídrico, além de possuírem um significativo número de ecotipos geográficos, climáticos e edáficos, caracterizando a importância destas espécies na formação e recuperação de pastagens naturais (GARDENER, 1984; THOMAS, 1984; BURT, 1984; SOUSA, 1986; COSTA & SCHULTZE, 1990; BRANDÃO, 1992; SPERONI & ARTUCIO, 1994).

Os estudos referentes a citogenética do gênero *Stylosanthes*, relatam a existência de diplóides, tetraplóides e hexaplóides, em várias espécies. Autores consultados afirmam que o número básico do gênero é $x=10$ cromossomos (CAMERON, 1967; GOLDBLATT, 1981; BATTISTIN, 1981; VIEIRA, 1988; VIEIRA *et al.*, 1993). Referente ao comportamento meiótico e a viabilidade do pólen nas espécies deste gênero, no Brasil, México e Austrália STACE & CAMERON (1984); MATTOS *et al.* (1998), constataram que a distribuição dos cromossomos na meiose é normal e a viabilidade do pólen alta.

Este trabalho teve como objetivos a recontagem do número de cromossomos, análise do comportamento meiótico e uma estimativa da viabilidade do pólen pelo uso de três diferentes corantes, propondo o mais confiável para ser usado nas espécies: *S. viscosa* Sw. *S. montevidensis* Vog. e *S. leiocarpa* Vog., nativas no sul do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

As espécies com seus respectivos acessos, procedência e locais de coleta, estão registrados na Tabela 1. Vinte e cinco sementes de cada acesso foram escarificadas manualmente com auxílio de lixa e germinadas em placas de petri num germinador a 25°C.

Contagem de cromossomos: Em 10 sementes germinadas em cada um dos acessos, as radículas foram pré-tratadas em solução de 8-hidroxiquinoleína 0,002M, por aproximadamente três horas em temperatura de 12-16°C, fixadas em etanol absoluto-ácido acético (3 : 1) durante quatro horas em temperatura ambiente e após conservadas em etanol 70% na geladeira, até a realização das análises. As zonas meristemáticas das radículas, foram submetidas a ação da enzima pectinase+celulase 2% por um período de 40 minutos à temperatura de 37°C. O corante utilizado foi orceína propiônica 2%. Para a contagem do número de cromossomos foram escolhidas ao acaso, oito metáfases com cromossomos bem visíveis.

Análise da meiose e estimativa da viabilidade do pólen: As restantes sementes germinadas foram mantidas em copos de plástico contendo vermiculita, até desenvolverem as quatro primeiras folhas. Após foram transferidas para terra, preparada e adubada de acordo com as orientações de BARTZ *et al.* (1995), numa área de aproximadamente 400m², pertencente ao Departamento de Engenharia Florestal da UFSM. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quinze plantas por acesso. Para o estudo da meiose e estimativa da viabilidade do pólen foram coletados ao acaso, botões florais no mínimo sete e no máximo dez, em cada planta de cada acesso. Os botões florais foram fixados em etanol absoluto-clorofórmio-ácido acético na proporção 6 : 3 : 1 respectivamente, mantidos à temperatura de aproximadamente 4°C por 24 horas,

sendo posteriormente transferidos para etanol 70% e mantidos na geladeira até as análises. No preparo das lâminas, para análise das fases da meiose foi empregado o corante orceína lacto-propionica 1%. Na análise do comportamento das fases da meiose na microsporogênese foram levados em consideração: associação e disjunção dos cromossomos na meiose I e II e a formação das tétrades. Na observação do pólen os corantes utilizados foram: orceína acética 1%, reativo de alexander (verde malaquita + fucsina ácida) proposto por ALEXANDER (1980) e carmin propiônico 1%. Os corantes foram comparados entre si, usando como parâmetro a nitidez diferencial das estruturas coradas no pólen.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os acessos sul brasileiros, das três espécies em questão (Tabela 1), foram analisados pela primeira vez. Todos são diplóides com $2n=2x=20$ cromossomos, como proposto por CAMERON (1967), nas três espécies em questão. Na citoevolução, estas espécies mantiveram o nível diplóide, formando juntamente com outras espécies a seção *Stylosanthes*. Esta foi entre outras, uma característica marcante que levou pesquisadores dividirem o gênero em duas seções: *Stylosanthes*, no qual fazem parte todos os diplóides, sem um eixo rudimentar associado às flores; a seção *Astyposanthes* constituída de diplóides e poliplóides com a presença de um eixo rudimentar associado às flores. Neste gênero parece que o rumo evolutivo na diferenciação das espécies foi bem

caracterizado por alterações no número de cromossomos.

Na microsporogênese dos dez acessos analisados a meiose foi normal, com formação de dez bivalentes (10II) em diacinese e ou metáfase I e disjunção normal na anáfase e telófase I e anáfase II. Na telófase II foram observadas irregularidades formando-se tríades no lugar de tétrades. As tríades caracterizaram-se pela formação de duas células com $n=10$ cromossomos e uma célula com $n=20$ cromossomos. Porém, estas irregularidades não foram significativas em nenhum dos acessos estudados, que mantiveram um elevado número de tétrades normais e um índice meiótico (IM) acima de 90%, (Tabela 2).

As porcentagens mais altas, nas três espécies ocorreram com o uso do corante orceína acética. Na realidade aconteceu uma superestimativa, não havendo diferenciação de cor nos pólenes viáveis dos inviáveis. Como este corante não favoreceu ao objetivo proposto, a diferenciação foi feita considerando-se grãos de pólen inviáveis os que apresentaram, no máximo, 1/3 do tamanho dos grãos viáveis. O uso deste corante não é aconselhável quando o objetivo é testar a viabilidade, (Figura 1).

O carmin propiônico tinge fracamente os grãos de pólen inviáveis e cora mais forte os grãos viáveis. Porém não diferencia parede celular de protoplasma. Oferece uma margem de erro na observação da cor, podendo também ocasionar uma superestimativa na percentual de viabilidade, embora esta superestimativa seja mais amena quando comparada com o corante orceína.

Tabela 1. Espécies, procedência, número dos acessos, locais de coleta, e número cromossômico, em dez acessos de três espécies de *Stylosanthes* Sw.

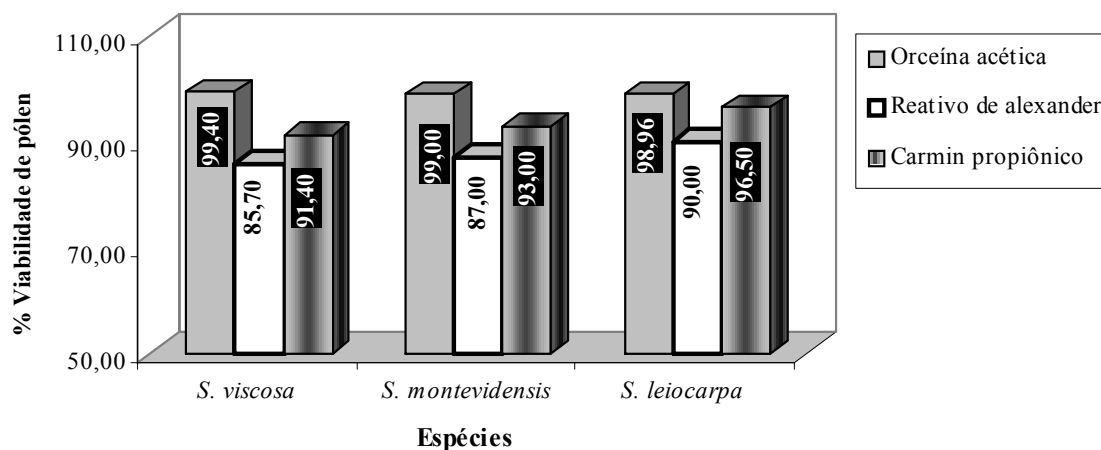
Espécies	Procedência (nº do acesso)	Local de coleta	Crom. (2n) n
<i>S. viscosa</i> Sw.	CENARGEN/10197	Guaratuba/PR	20
	CENARGEN/10125	Laguna/SC	20
	CENARGEN/10174	Barra Velha/SC	20
	CENARGEN/10096	Morro dos Conventos/SC	20
	CENARGEN/10192	Guaratuba/PR	20
	CENARGEN/10209	Guaratuba/PR	20
<i>S. montevidensis</i> Vog.	CENARGEN/9718	Encruzilhada do Sul/RS	20
	CENARGEN/12238	S ^o Antônio das Missões/RS	20
<i>S. leiocarpa</i> Vog.	SMDB-UFSM/6359	Santa Maria/RS	20
	SMDB-UFSM/6358	Santa Maria/RS	20

CENARGEN = Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia - Brasília/DF. SMDB = Santa Maria Departamento de Biologia. UFSM = Universidade Federal de Santa Maria/RS Crom. = cromossomos.

Tabela 2. Resumo da análise da meiose e índice meiótico (IM) na microsporogênese em dez acessos de três espécies de *Stylosanthes* Sw., nativas da região sul do Brasil.

Disjunção	Meiose I		Meiose II			
	Associação		Disjunção			
Espécie/acesso	Dia./meta I Cel. analis.	Ana./telo I Cel. analis.	Ana./telo II Cel. analis.	Tétrades N. Cel.	IM %	
<i>S. viscosa</i>						
	10197	75	50	105	912	99
	10125	50	75	110	998	98
	10174	95	102	115	1.200	93
	10096	115	145	112	1.274	97
	10192	122	98	108	980	91
	10209	78	122	95	1.142	92
<i>S. montevidensis</i>						
	9718	93	98	102	1.230	97
	12238	128	147	193	1.296	96
	6359	145	97	93	1.365	98
<i>S. leiocarpa</i>						
	6358	274	85	97	1.020	97

Dia./meta. I = Diacinese e metáfase I. Ana./telo I = Anáfase e telófase I. Cel. analis. = Células analisadas. Ana./telo II = Anáfase e telófase II. N. Cel. = Número de células.

**Figura 1.** Efeito da visualização da porcentagem de viabilidade do pólen pelo uso de três diferentes corantes.

Reativo de alexander foi o corante mais eficiente nestas espécies, na identificação de pólen viável e inviável. Corou diferencialmente parede celular de verde e protoplasma de púrpura (Figura. 2). Grãos de pólen inviáveis tem o protoplasma reduzido ou ausente, que é mostrado claramente com este corante. A principal vantagem em relação aos outros dois corantes, está na diferenciação do protoplasma e da parede celulósica. Permite com maior segurança, diferenciar nitidamente os grãos de pólen inviáveis

que deixam transparecer a deficiência do protoplasma e coram normalmente a parede celular.

O elevado número de tétrades normais, o alto índice meiótico e o alto índice de viabilidade do pólen, confirmam a regularidade meiótica na microsporogênese destas espécies. Caso ocorra a mesma regularidade na megasporogênese, estas plantas não apresentarão problemas em termos de produção e viabilidade de sementes, garantindo desta forma, a manutenção de novas gerações.

Poderão ser usadas em programas de melhoramento envolvendo seleção, cruzamentos e produção de sementes viáveis.



Figura 2. Grãos de pólen corados com reativo de alexander. a) viável; b) inviável. Barra 10 μm .

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem CNPq, FAPERGS e FIPE/UFMS pelo suporte financeiro do trabalho.

Um agradecimento especial ao Dr. José Francisco Montenegro Valls, pesquisador do CENARGEN/EMBRAPA, pelo fornecimento das sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M.P.A. 1980. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology*, 55 (1): 13-18.
- BARTZ, R. H., BISSANI, C.A. & SCHERER, E.E. 1995. **Recomendação de adubação e calagem para os estados do RS e SC**. 3.ed. Passo Fundo-RS: EMBRAPA-CNTV, 221p.
- BATTISTIN, A. 1981. **Estudo biosistemático de diferentes taxons do gênero *Stylosanthes* Sw. (Leguminosae-Papilionoideae)**, São Paulo. 106p.. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo.
- BRANDÃO, M. 1992. Plantas do cerrado. *Inf. Agrop.*, 16 (173): 36-39.
- BURT, R. 1984. Natural variation in *Stylosanthes*. In: STACE, H. & EDYE, L.A. **The Biology and Agronomy *Stylosanthes***. Australy: Academic press. P. 104-120.
- CAMERON, D.F. 1967. Chromosome number and morphology of some introduced *Stylosanthes* species. *Aust. J. Agric. Res.*, 18 : 375-379.
- COSTA, N.M.S. & SCHWLTZE, K.R. 1990. Biogeografia de *Stylosanthes capitata* Vog. e *S. guianensis* Sw. var. *paciflora*. *Pesq. Agrop. Bras.*, 25 (11): 1547-1554.
- FERREIRA, N.B. & COSTA, M. B. S. 1979. **O gênero *Stylosanthes* Sw no Brasil**. Lavras: EPAMIG. 108 p.
- GARDENER, C. J. 1984. The dynamics of *Stylosanthes* pasture. In: STACE, H. & EDYE, L. A. **The biology and agronomy of *Stylosantes***. Australy: Academic press. p. 333-347.
- GOLDBLATT, P. 1981. Cytology and phylogeny of leguminosae. In: POLHILL, R.M. & RAVEN, R.H. **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Garden. p. 427- 463.
- MATTOS, A.C.F., BATTISTIN, A. & BIONDO E. 1998. Comportamento meiótico e estimativa da viabilidade de grãos de pólen em 10 genótipos de 3 espécies do gênero *Stylosanthes* Sw. nativas do sul do Brasil. **Genetics and Molecular Biology**, 21 (3) (supplement):194.
- POLHILL, R.M. & RAVEN, R.H. 1981. **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Garden, 425 p.
- SOUSA, F.B. 1986. Avaliação de plantas forrageiras tropicais. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL (3º). Campo Grande. **Anais...** Campo Grande-MS: Fundação Cargil. p. 59-63.
- SPERONI, G. & ARTUCIO, P.I. 1994. El genero *Stylosanthes* (Fabaceae, Aeschynomeneae, Stylosanthinae) en Uruguay. **Bol. Soc. Arg. Bot.**, 30 (1-2): 103-109.
- STACE, H.M. & CAMERON, D.F. 1984. Cytogenetics and evolution of *Stylosanthes*. In: STACE, H.M. & EDYE, L.A. **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Australy: Academic Press. p. 148-157.
- THOMAS, D. 1984 . Global venture in *Stylosanthes* I south America. In: STACE, H.M. & EDYE, L.A. **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Australy: Academic Press. p. 451- 464.
- VIEIRA, M.L.C. 1988. **Estudo citotaxonômico de espécies brasileiras do gênero *Stylosanthes* Sw**. Piracicaba. 135p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz Universidade de São Paulo.
- VIEIRA, M.L.C.; AGUIAR-PERECIN, M L.R. & MARTINS, P.S. 1993. Cytotaxonomic study in twelve Brazilian taxa *Stylosanthes* Sw., Leguminosae. **Cytologia**, 58: 305-311.

