

***Genética e Melhoramento de
Plantas***

Caracterização Citogenética de Acessos de *Stylosanthes* Sw. Ocorrentes no Semiárido Brasileiro

Cytogenetic Characterization of *Stylosanthes* Sw. Accessions Occurring in the Brazilian Semiarid

*Suelen Jaiane Benevides da Silva*¹; *Maria do Socorro Evangelista Coelho*²; *José Nilton Moreira*³; *Natoniel Franklin de Melo*⁴

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a germinação de sementes e a caracterização citogenética de acessos do gênero *Stylosanthes*. Os acessos analisados foram provenientes do Estado da Bahia, dos municípios de Tucano, Teofilândia, Santaluz e Ichu. Trinta sementes de cada acesso foram distribuídas em placas de Petri com papel filtro umedecido ou contendo meio MS. Para germinação das sementes, foi retirado o tegumento e realizada a desinfestação. Após a germinação, as raízes foram coletadas, pré-tratadas, fixadas em Carnoy e coradas com Giemsa. A germinação ocorreu após sete dias em placa de Petri, quando obteve-se percentagens entre 3,33% (acessos P81-3B e P83-4B) e 13,33% (acessos P81-1B e P83-1B). Em meio MS, a germinação ocorreu após cinco dias, com valores entre zero (acesso P83-4B) e 26,66% (acesso P91-3B). Do ponto de vista citogenético, os acessos P91-3B e P81-1B foram analisados, observando-se $2n = 20$

¹Bolsista IC/Embrapa, Univasf, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina, PE;

²Mestra em Agronomia, UFPB, Areia, PB; ³Pesquisador da Embrapa Semi-Árido, BR 428, Km 125, Zona rural, Caixa postal 23 - CEP 56302-970; natoniel@cpatsa.embrapa.br.

cromossomos. A morfologia cromossômica variou de metacêntrico a submetacêntrico e os núcleos interfásicos foram do tipo arreticulado, com grandes cromocentros corados. De maneira geral, observou-se maior eficiência na germinação em meio MS. As análises cariotípicas poderão subsidiar estudos para caracterizar acessos e populações que ocorrem em ambientes distintos.

Palavras-chave: Cromossomo. Cariótipo. Morfologia, Germinação.

Introdução

O gênero *Stylosanthes* Sw., compreende cerca de 50 espécies das quais aproximadamente 25 ocorrem no Brasil, principalmente no Cerrado. A distribuição geográfica das espécies deste gênero ocorre espontaneamente pelas zonas tropicais e subtropicais da América de forma extensa (COSTA et al., 2008), constituindo uma rica fonte protéico-energética para a nutrição animal (CASTILLO; GUENNI, 2001).

Existem poucas informações sobre a delimitação taxonômica entre as espécies de *Stylosanthes*, tornando-se necessária a realização de estudos mais detalhados para caracterização das espécies.

As técnicas em citogenética têm sido uma importante ferramenta de estudo para caracterização de espécies e acessos dos mais variados táxons. A citogenética compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e replicação quanto a sua variação e evolução (GUERRA, 1988).

A análise cromossômica é a única forma de observar todo o genoma de um eucarioto na forma de blocos individualizados de material genético, passíveis de serem mensurados, diferenciados em subunidades e manipulado de diversas maneiras (GUERRA; SOUZA, 2002). Nesse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a germinação de sementes, assim como a morfologia e número de cromossomos de acessos do gênero *Stylosanthes* coletados no Semiárido brasileiro.

Material e métodos

Os acessos de *Stylosanthes* analisados foram provenientes do Estado da Bahia, nos municípios de Tucano, Teofilândia, Santaluz e Ichu. A Fig. 1a mostra a planta cultivada em casa de vegetação. Foram coletados seis acessos do gênero *Stylosanthes*, conforme códigos a seguir: P54-1B, P81-1B, P81-3B, P83-1B, P83-4B, P91-3B. No Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semi-Árido foi realizada a germinação das sementes in vitro, sendo retirado o tegumento, com o auxílio de pinça, bisturi e lupa. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas com etanol 70% durante 1 min e hipoclorito de sódio 1% durante 20 min, seguida de três lavagens em água destilada autoclavada por cinco minutos cada. Trinta sementes de cada acesso foram distribuídas em duas condições de incubação sendo, placas de Petri esterilizadas contendo papel filtro umedecido com água destilada autoclavada, ou contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

Após a germinação, as raízes foram coletadas e pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína 0,002 M por cerca de 10 h a 4 °C e fixadas em Carnoy 3:1 (álcool etílico: ácido acético glacial v/v). As fixações foram mantidas por duas horas à temperatura ambiente, em seguida, estocadas a -20°C até posterior análise. As lâminas foram preparadas após lavagem e hidrólise em ácido clorídrico 5N, por 20 min, em seguida, foram esmagados em ácido acético 45%, congeladas em nitrogênio líquido para remoção da lamínula, secas ao ar, coradas com Giemsa 2% e montadas com Entellan (GUERRA; SOUZA, 2002). As melhores células foram capturadas com câmera fotográfica digital com resolução de 4.0 "megapixels" através do programa ZoomBrowser Ex acoplada a um microscópio de fluorescência.

Resultados e Discussão

A germinação dos acessos de *Stylosanthes* ocorreu, em média, dentro de sete dias quando semeadas em placas de Petri com papel filtro umedecido e cinco dias em meio de cultura MS (Tabela 1).

Tabela 1. Percentagem de germinação dos acessos de *Stylosanthes* em placa de Petri com papel filtro ou com meio MS.

Acessos de <i>Stylosanthes</i> spp.	Nº sementes cultivadas/ Placa	Nº sementes germinadas em placa de Petri com papel filtro	Nº sementes germinadas em placa de Petri com meio MS	Germinadas em placa de Petri (%)	Germinadas em meio MS (%)
P54-1B	30	2	5	6,66 %	16,66 %
P81-1B	30	4	1	13,33 %	3,33 %
P81-3B	30	1	2	3,33 %	6,66 %
P83-1B	30	4	1	13,33 %	3,33 %
P83-4B	30	1	0	3,33 %	0 %
P91-3B	30	3	8	10 %	26,66 %

A partir da observação dos resultados em diferentes condições de germinação, verificou-se diferenças significativas no número e porcentagem de germinação dos acessos. Com relação à germinação em placas de Petri com papel filtro, os acessos P81-1B e P83-1B (13,33%) apresentaram maiores porcentagens de germinação, já os acessos P81-3B e P83-4B (3,33%) mostraram valores menores. Em meio de cultura MS, foi verificado no acesso P91-3B a maior porcentagem de germinação com 26,66%, entretanto, em P83-4B não houve germinação.

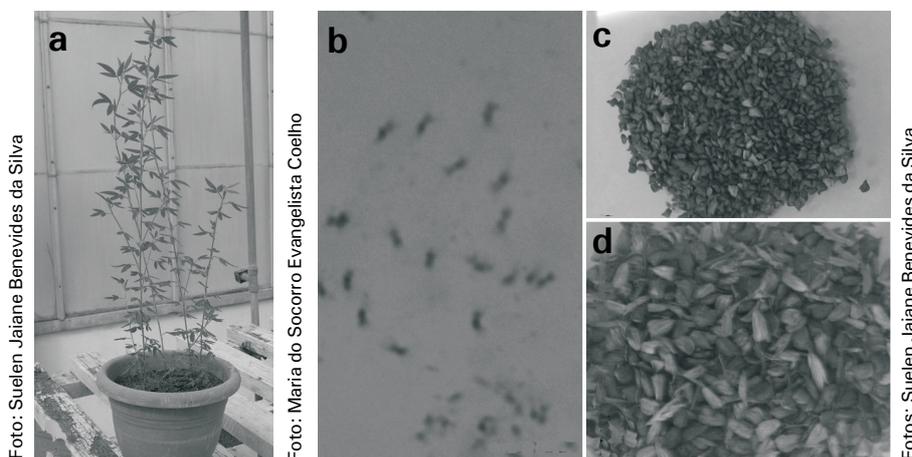


Fig. 1. Acessos de *Stylosanthes*. Aspecto morfológico de P54-1B (a), metáfase mitótica com $2n = 20$ cromossomos em P91-3B (b), sementes sem tegumento de P91-3B (c) e sementes com tegumento de P54-1B (d). Barra em B corresponde a 10 μ m.

Estes baixos valores quanto ao número e porcentagem de germinação do gênero *Stylosanthes*, mesmo em condições ideais (meio MS), relacionam-se com uma característica peculiar da maioria das leguminosas, pois estas têm alta produção de sementes, mas não germinam com facilidade devido à presença do tegumento (Fig. 1d), que dificulta a absorção de água e a penetração de gases (sementes duras). A proporção de “sementes duras” é influenciada pela espécie, variedade, ano e local de produção da planta.

O Semiárido é uma região que apresenta altas temperaturas e baixa disponibilidade de água favorecendo a produção deste tipo de semente, fator que deve ser analisado na formação de pastos (FERNANDES et al. 2000). Esta é uma estratégia de sobrevivência da espécie na natureza, pois a impermeabilidade do tegumento reduz gradativamente e uma proporção de sementes germina a cada período.

Vale ressaltar que para as duas condições de germinação avaliadas neste trabalho, o tegumento foi retirado (Fig. 1c) na tentativa de viabilizar a germinação de uma maior quantidade de sementes.

Sob o ponto de vista citogenético, até o momento, apenas os acessos P91-3B e P81-1B foram analisados. Estes apresentaram $2n = 20$ cromossomos (Fig. 1b). A morfologia cromossômica variou de metacêntrico a submetacêntrico e os núcleos interfásicos foram do tipo arreticulado, com grandes cromocentros corados. Por outro lado, estudos realizados em sete espécies e três variedades do gênero *Stylosanthes* constataram plantas diplóides com $2n = 20$ e tetraplóides com $2n = 40$ cromossomos (BATTISTIN; MARTINS, 1987).

A finalização das análises cariotípicas irá subsidiar os estudos de caracterização dos acessos de populações que ocorrem em ambientes distintos do Semiárido brasileiro.

Conclusões

O maior número e porcentagem de germinação de sementes de *Stylosanthes* foram verificados em meio de cultura MS quando comparada à germinação em placa de Petri com papel filtro umedecido. Os acessos P91-3B e P81-1B apresentam $2n = 20$ cromossomos, com morfologia cromossômica variando de metacêntrico a submetacêntrico.

Agradecimentos

Ao CNPq e à Embrapa pela concessão da bolsa de estudo.

Referências

- BATTISTIN, A.; MARTINS, P. S. Chromosome number of seven species and three varieties of the genus *Stylosanthes* Sw. (Leguminosae - Papilionoideae). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 3, p. 599-602, 1987.
- CASTILLO, R.; GUENNI, O. Latencia em semillas de *Stylosanthes hamata* (Leguminosae) y su relación com la morfología de la cubierta seminal. **Revista de Biología Tropical**. San José Mar, v. 49, n. 1, 287-299, 2001.
- COSTA, L. C.; SARTORI, A. L. B.; POTT, A.; SOUSA, P. R. Estudo taxonômico de *Stylosanthes* (Leguminosae Papilionoideae-Dalbergieae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 3, p. 547-572, 2008.
- FERNANDES, C. D.; GROF, B.; CARVALHO, de J. **Escarificação mecânica de sementes de *Stylosanthes* spp. com beneficiadora de arroz**. Campo grande: Embrapa Gado de Corte, 2000. 4 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 60).
- GUERRA, M. dos S. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.
- GUERRA, M. dos S.; SOUZA, M. J. **Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo: FUNPEC, 2002. 131 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 6, p. 473-479, 1962.