

RELAÇÃO ENTRE MICROSPOROGÊNESE E FERTILIDADE DAS SEMENTES EM *Stevia rebaudiana* BERT.

Relationship Between Microsporogenesis and Seed Fertility in *Stevia rebaudiana* Bert.

Wilson Manara*, Nublea Teresa F. Manara*, Peri Veiga** e Manoel Fernando S. Tarragó**

RESUMO

Com a finalidade de verificar a variabilidade do caráter fertilidade da semente, para fins de seleção, procedeu-se o estudo do pareamento e segregação dos cromossomos em células-mãe dos grãos de pólen e viabilidade do pólen, pelo método de coloração, em plantas de *Stevia rebaudiana* Bert. procedentes do Brasil e do Paraguai.

O comportamento normal dos cromossomos na microsporogênese, em todas as plantas, aliado à alta porcentagem de viabilidade do pólen, mostram que a esterilidade da semente não é devida a irregularidade meióticas. Portanto, no material disponível não é possível melhorar o caráter por seleção.

Outros estudos relacionados com megasporogênese, embriologia e autoincompatibilidade são sugeridos.

SUMMARY

In order to study the variability of the trait seed fertility for selection purposes, chromosome pairing and segregation in pollen mother cells, as well as pollen viability of *Stevia rebaudiana* Bert. plants, from Brazil and Paraguay, were observed.

The normal behavior of chromosomes during microsporogenesis, in all observed plants, as well as the high viability percentage of pollen grains suggests that seed sterility is not due to meiotic irregularities. Thus, in the observed plants this trait cannot be improved, by selection.

Others studies related to megasporogenesis, embryology and self incompatibility are suggested.

* Professor Adjunto do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria. 97.100 - Santa Maria, RS, Brasil.

** Professor Adjunto do Departamento de Defesa Fito-Sanitária da Universidade Federal de Santa Maria. 97.100 - Santa Maria, RS, Brasil.

INTRODUÇÃO

A *Stevia rebaudiana* Bert., erva nativa do Paraguai, chamada "Ka'ahe'e" em guarani, tem despertado o interesse dos pesquisadores pelo fato de possuir, nas folhas e talos, uma substância (steviosídeo) 300 a 400 vezes mais doce do que o açúcar de cana. Por este motivo, tem potencial para tornar-se importante cultivo comercial.

Desde as primeiras tentativas de cultivo as sementes desta espécie mostraram possuir alta percentagem de esterilidade (Jimenez, citado por SCHMELING, 6).

Recentemente, estudos de FELIPPE & LUCAS (3) e FELIPPE et alii (4) demonstraram que os frutos de *S. rebaudiana* podem ser separados, a olho nũ, em claros e escuros. Os frutos claros são destituídos de embrião e, portanto, estêreis. Dos frutos escuros, apenas 50% germinam. ROCHA (5) verificou que, do total de frutos, 78% são claros (estêreis).

A propagação vegetativa é uma prática comum para muitas espécies vegetais e, apesar do seu uso ser possível para *S. rebaudiana*, a implantação de um cultivo extensivo é mais prático e econômico quando feito através de sementes. Portanto, a fertilidade da semente é fator de extrema importância na produção agrícola.

Os problemas de esterilidade das sementes, na maioria das vezes, estão associados a irregularidades na meiose. Multivalentes e univalentes podem apresentar segregação cromossômica irregular com caminhamento adiantado ou atrasado em relação aos bivalentes, formando gametas com número irregular de cromossomos. Isto se reflete em queda na fertilidade do pólen.

Considerando-se a importância da abundante produção de sementes férteis para a implantação de novos cultivos, a possibilidade do uso de hibridação artificial como método de melhoramento e a ausência de estudos da meiose em *S. rebaudiana* na literatura consultada, elaborou-se o presente trabalho com os seguintes objetivos: 1) estudar o pareamento e a segregação dos cromossomos na meiose em células-mãe dos grãos de pólen; 2) estimar a viabilidade do pólen e sua possível relação com a esterilidade das sementes; 3) detectar a existência de variabilidade quanto a viabilidade do pólen, a fim de selecionar plantas com maior fertilidade das sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas, para os estudos citogenéticos, oito plantas de *S. rebaudiana* Bert., sendo uma procedente do Instituto Biológico (SP) e sete da região de Pedro Juan Caballero, no Paraguai.

As plantas foram cultivadas no campo experimental do Departamento de Fito-tecnia/UFMS, no ano agrícola de 1980/81.

Para o estudo da meiose, as inflorescências, logo após colhidas, foram fixadas em álcool-acético 3:1 à temperatura ambiente, por 24 horas. A seguir o

material foi lavado em álcool 70% e conservado em novo álcool 70%, no refrigerador. As lâminas foram preparadas pelo método do esmagamento, utilizando-se como corante o carmim acético a 1%.

Para determinação do pareamento cromossômico foram analisadas células em diacinese e metáfase I. A segregação cromossômica foi estudada em anáfase IeII, utilizando-se, em média, 50 células por planta. O índice meiótico foi determinado em aproximadamente 100 tetrades por planta e a viabilidade dos grãos de pólen foi determinada através do método da coloração, utilizando-se como corante a "Mescla de Müntzig".

A análise das lâminas e as fotografias foram obtidas em Fotomicroscópio Zeiss, com filme de alta sensibilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de cromossomos observados ($2n = 22$) confirma o resultado obtido anteriormente pelo Dr. E.K. Janaki-Ammal, segundo DARLINGTON & WYLIE (1).

Os resultados do pareamento cromossômico são apresentados na Tabela 1.

Os cromossomos apresentaram boa visualização devido ao seu tamanho relativamente grande e a intensa coloração, o que facilitou a análise.

Em diacinese observou-se com maior frequência a formação de bivalentes em cadeia do que em anel. Parece ocorrer rápida terminalização dos quiasmas uma vez que, em metáfase I, os homólogos aparecem na maioria das vezes bem separados, unidos apenas por filamentos muito finos. O número de quiasmas por bivalente foi de um a dois. Outra indicação da rápida terminalização dos quiasmas se deve à ocorrência de maior número de univalentes em metáfase I do que em diacinese. A terminalização dos quiasmas é mais rápida nos bivalentes em cadeia do que nos bivalentes em anel.

Outros tipos de pareamento foram encontrados com frequência muito baixa conforme mostra a Tabela 1. Das oito plantas analisadas apenas duas apresentaram formações trivalentes e uma apresentou formação quadrivalente, todas em porcentagens muito baixas. Este pareamento evidencia pequena homologia no material genético de diferentes cromossomos, a qual poderia ter sido adquirida através de alterações estruturais dos cromossomos não homólogos.

Entre as raras irregularidades encontradas no material observou-se, com maior frequência, a presença de univalentes. Tal situação pode ser atribuída à rápida terminalização dos quiasmas nos bivalentes uma vez que, com raras exceções, os univalentes apareceram com frequência mais elevada do que trivalentes e sempre em números pares.

A análise da segregação cromossômica em anáfase I (Figura 2) e anáfase II mostrou comportamento normal em sete das oito plantas analisadas, tendo ocorrido apenas 3,6% de células anormais em uma planta (nº 234).

A análise de tetrades mostrou 100% de normalidade em todas as plantas, por-

TABELA 1. Pareamento em diacinese e metáfase I, de plantas de *Stevia rebaudiana* Bert.

Nº da planta	Procedência	Nº células estudadas	Tipos de Pareamento											
			Univalentes			Bivalentes			Trivalentes			Quadrivalentes		
			\bar{x}	%	Amplitude	\bar{x}	%	Amplitude	\bar{x}	%	Amplitude	\bar{x}	%	Amplitude
001	Inst. Biol. São Paulo	50	0,12	0,5	(0-2)	10,94	99,5	(10-11)	-	-	-	-	-	-
226	Pedro Juan Ca-llero-Paraguai	35	0,18	0,8	(0-4)	10,91	99,2	(9-11)	-	-	-	-	-	-
234	"	21	0,33	1,5	(0-2)	10,76	97,8	(9-11)	0,05	0,7	(0-1)	-	-	-
239	"	45	0,20	0,9	(0-2)	10,87	98,8	(9-11)	0,02	0,3	(0-1)	-	-	-
246	"	27	0,44	2,0	(0-4)	10,78	98,0	(9-11)	-	-	-	-	-	-
253	"	13	0,30	1,4	(0-2)	10,85	98,6	(10-11)	-	-	-	-	-	-
261	"	36	0,60	2,7	(0-2)	10,64	96,7	(9-11)	-	-	-	0,03	0,5	(0-1)
267	"	33	-	-	-	11,00	100,0	(11-11)	-	-	-	-	-	-

\bar{x} = Média da associação p/ célula.

% = Porcentagem de cromossomos, por célula, envolvidos na associação.

tanto, um índice meiótico de 100% (Figura 3). A viabilidade dos grãos de pólen foi sempre superior a 92%.

Comparando os resultados do pareamento com os obtidos na segregação, deduz-se que os univalentes, trivalentes e o quadrivalente observados apresentaram distribuição normal na primeira e segunda divisões, uma vez que não ocorreram problemas com o índice meiótico.

As anormalidades meióticas geralmente se refletem em queda na viabilidade do pólen. No presente caso as irregularidades observadas não chegaram a afetar o índice meiótico e seu reflexo na viabilidade do pólen foi muito pequeno. De acordo com LOVE (2), um índice meiótico acima de 90%, em trigo, demonstra estabilidade do material, não trazendo problemas para o melhorista.

Pelo exposto verifica-se que os problemas de alta porcentagem de esterilidade das sementes de *S. rebaudiana* não estão relacionados com irregularidades durante a formação dos grãos de pólen.

Outros aspectos relacionados com a fertilidade de sementes, tais como macrosporogênese, embriologia e autoincompatibilidade, devem ser pesquisados para auxiliar na determinação da causa da esterilidade das sementes.

No material em estudo não houve variabilidade suficiente da viabilidade do pólen para selecionar plantas superiores.

CONCLUSÕES

1. A esterilidade das sementes de *Stevia rebaudiana* Bert. não é devida a irregularidades meióticas.
2. No material disponível, a falta da variabilidade não permite melhorar o caráter fertilidade da semente.
3. Outros aspectos, tais como macrosporogênese, embriologia e autoincompatibilidade, devem ser pesquisados para auxiliarem na determinação das causas da esterilidade das sementes.

LITERATURA CITADA

1. DARLINGTON, C.D. & WYLIE, A.P. *Chromosome Atlas of Flowering Plants*. 2nd ed. London, George Allen & Unwin Ltd., 1961. 519 p.
2. LOVE, R.M. *Estudos citogenéticos preliminares de trigos riograndenses*. Porto Alegre, Secr. Agric., 1949. 14 p. (SIPA, Circular nº 74)
3. FELLIPPE, G.M. & LUCAS, N.M.C. Estudo da viabilidade dos frutos de *Stevia rebaudiana* Bert. *Hoehnea*, 1:95-105, 1971.
4. FELLIPPE, G.M.; LUCAS, N.M.C.; BEHAR, L.; OLIVEIRA, M.A.C. Observações a respeito da germinação de *Stevia rebaudiana* Bert. *Hoehnea*, 1:81-93, 1971.
5. ROCHA, R.F. *Estudos em Stevia rebaudiana* Bert.: fotoperiodismo, esteviosídeo e substâncias giberelínicas. São Paulo, Esc. Paulista de Medicina, 1975. 120 p. (tese de Mestrado)
6. SCHMELING, G.A. von. Caã-heê: edulcorante natural não calórico (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Boletim do Sanatório São Lucas*, 29(5):3-14, 1967.

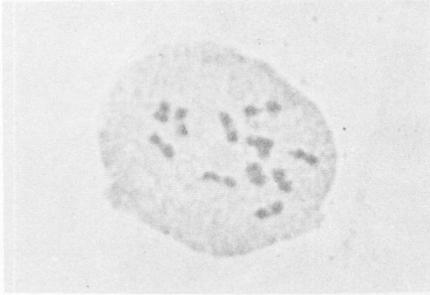


FIGURA 1. Diacinese em célula-mãe de pólen, mostrando pareamento normal em bivalentes (aumento de 1.740x).

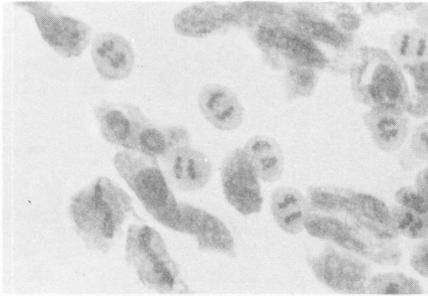


FIGURA 2. Anáfase I em células-mãe de pólen com segregação normal, dos cromossomos (aumento de 261x).

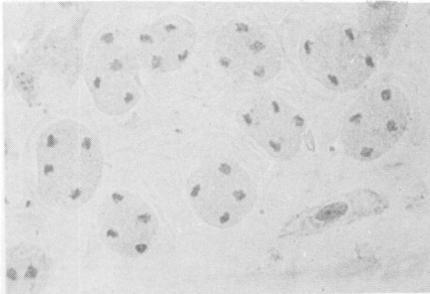


FIGURA 3. Tétrades de células normais (aumento de 647x).