

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Eduarda Schmitz Furtado Hauck

Obtenção de plantas poliploides de *Stylosanthes guianensis* via cultura de calos

Juiz de Fora

2025

Eduarda Schmitz Furtado Hauck

Obtenção de plantas poliploides de *Stylosanthes guianensis* via cultura de calos

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas .

Orientador: Prof Dr. Saulo Marçal de Sousa

Juiz de Fora

2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

HAUCK, Eduarda Schmitz Furtado .

Título: Obtenção de plantas poliploides de *Stylosanthes guianensis* via cultura de calos / Eduarda Schmitz Furtado HAUCK. -- 2025.

26 f.

Orientador: Saulo Marçal Sousa

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, 2025.

1. Calogênese . 2. Citogenética . 3. Cultura de tecidos . 4. Poliploidia sintética . I. Sousa, Saulo Marçal , orient. II. Título. Doutor

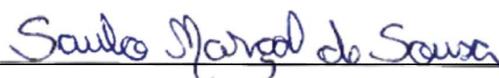
Eduarda Schmitz Furtado Hauck

Obtenção de plantas poliploides de *Stylosanthes guianensis* via cultura de calos

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas .

Aprovada em 19 de março de 2025

BANCA EXAMINADORA



Prof Dr .Saulo Marçal de Sousa - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora



Dra. Aryane Campos Reis
Universidade Federal de Juiz de Fora



Dr. Elyabe Monteiro de Matos
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho aos meus pais e a minha
família que me inspiram e me auxiliaram .

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, que me guiou até aqui, abriu caminhos e me permitiu trilhar essa jornada acadêmica. Sem Ele, nada disso seria possível.

À minha família e, em especial, aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado. Um agradecimento especial à minha mãe, minha maior inspiração e fortaleza. Sua força, determinação e amor incondicional foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Obrigado por cada palavra de incentivo, por cada gesto de apoio e por ser um exemplo de coragem e perseverança.

À minha avó Solange e à minha tia Glória, minha profunda gratidão pelo carinho, pelo incentivo e por tornarem possível a realização desse sonho. O apoio de vocês foi essencial para que eu pudesse me dedicar aos estudos e seguir em frente.

Ao meu orientador, Saulo Marçal de Sousa, minha eterna gratidão por sua orientação, paciência e por me permitir ingressar em uma carreira que me faz feliz e realizada. Sua dedicação e ensinamentos foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e profissional.

Aos meus colegas de laboratório, obrigado por cada troca de conhecimento, pelo companheirismo e por tornarem essa caminhada mais leve e enriquecedora. Um agradecimento especial aos meus amigos Rafael Vallotti e Ana Clara Martins, que estiveram ao meu lado nessa jornada, compartilhando desafios e conquistas.

Aos meus tios, tias e primos, que de alguma forma contribuíram para minha formação, minha gratidão por cada gesto de apoio e incentivo.

À minha bisavó Maria, que me inspira a ser mais forte a cada dia, meu carinho e admiração.

As minhas amigas Laiane e Karina, que compartilharam toda a jornada, me auxiliaram e foram companheiras até o final.

E, por fim, às minhas queridas amigas Isabela, Layssa e Letycia, obrigado por sempre me apoiarem, acreditarem em mim e estarem presentes em todos os momentos.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo induzir a poliploidia em *Stylosanthes guianensis* por meio da aplicação de colchicina como agente antimitótico em calos cultivados in vitro. *S. guianensis* é uma leguminosa de grande relevância agrícola, amplamente utilizada em sistemas de pastejo e na recuperação de solos degradados, destacando-se por sua adaptabilidade a solos ácidos e pobres em nutrientes, além da eficiente fixação biológica de nitrogênio, que favorece a fertilidade do solo e beneficia espécies associadas.

No experimento, calos foram submetidos a diferentes concentrações de colchicina (0,01% e 0,05%) por períodos de 6 e 12 horas. Todas as concentrações se mostraram eficientes ao que diz respeito a poliploidização, porém a concentração de 0,01% aplicada por 12 horas apresentou mais indivíduos poliploides, resultando na duplicação do conteúdo de DNA (5,8 picogramas) e no número de cromossomos ($2n = 4x = 40$). As análises morfológicas das folhas e dos estômatos evidenciaram diferenças significativas entre plantas diploides e tetraploides, com aumento nas dimensões foliares e estomáticas nos indivíduos poliploides, indicando alterações fenotípicas associadas à duplicação cromossômica.

A indução de poliploidia em *S. guianensis* demonstrou potencial para a obtenção de plantas com maior porte contribuindo para o desenvolvimento de cultivares mais nutritivas. Os resultados obtidos fornecem subsídios relevantes para programas de melhoramento genético em forrageiras tropicais e reforçam a importância da biotecnologia vegetal na agricultura sustentável.

Palavras-chave: Calogênese; Citogenética; Cultura de tecidos; Poliploidia sintética.

ABSTRACT

This study aimed to induce polyploidy in *Stylosanthes guianensis* through the application of colchicine as an antimitotic agent in calli cultured *in vitro*. *S. guianensis* is a leguminous species of great agricultural relevance, widely used in grazing systems and for the recovery of degraded soils. It is notable for its adaptability to acidic and nutrient-poor soils, as well as for its efficient biological nitrogen fixation, which improves soil fertility and benefits associated plant species.

In the experiment, calli were exposed to different concentrations of colchicine (0.01% and 0.05%) for 6 and 12 hours. All concentrations proved effective in producing polyploid individuals; however, the concentration of 0.01% applied for 12 hours yielded the highest number of polyploids, resulting in successful DNA duplication (5.8 picograms) and an increased chromosome number ($2n = 4x = 40$). Morphological analyses of leaves and stomata showed significant differences between diploid and tetraploid plants, with increased leaf and stomatal dimensions in the polyploid individuals, indicating phenotypic changes associated with chromosome duplication.

The induction of polyploidy in *S. guianensis* showed potential for obtaining plants with greater biomass, contributing to the development of more nutritious cultivars. The results provide valuable insights for genetic improvement programs in tropical forage species and highlight the importance of plant biotechnology in sustainable agriculture.

Keyword: Callogenesis; Cytogenetics; Tissue culture; Synthetic polyploidy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Indivíduo diploide de <i>Stylosanthes guianensis</i>	8
Figura 2- Fragmentação de calos em <i>Stylosanthes guianensis</i>	11
Figura 3- Esquema do protocolo experimental para indução de poliploidia em <i>Stylosanthes guianensis</i>	12
Figura 4- Sala de crescimento utilizada para micropropagação de <i>Stylosanthes guianensis</i>	13
Figura 5- Esquema esclarecendo o padrão de medidas utilizado na morfometria de folhas de <i>Stylosanthes guianensis</i> diploide e tetraploides.....	15
Figura 6- Esquema esclarecendo o padrão de medidas utilizado na morfometria de estômatos de <i>Stylosanthes guianensis</i> diploide e tetraploides	16
Figura 7 - Histograma de indivíduos diploide ,mixoploide e tetraploide de <i>Stylosanthes guianensis</i>	20
Figura 8- Indivíduo tetraploide de <i>Stylosanthes guianensis</i> estabelecido em campo.....	20
Figura 9- Metáfase de indivíduos de <i>Stylosnathes guianensis</i>	21
Figura 10-Comparação morfológica de Folhas diploide e tetraploide de <i>Stylosanthes guianensis</i>	23
Figura 11- Estacas de <i>Stylosanthes guianensis</i> de indivíduos diploide e tetraploide.....	24
Figura 12- Folhas de <i>Stylosanthes guianensis</i> de indivíduos diploide (A) e tetraploides (B).	25

Figura 13- Comparação morfológica de estômatos diploide e tetraploide de *Stylosanthes guianensis*26

Figura 14- Campo fotografado em microscopia óptica de Lâminas foliares de indivíduos diploide (A) e tetraploides (B).....22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Diferentes cultivares de <i>Stylosanthes guianensis</i> e suas características	8
Tabela 2- Desenvolvimento dos calos de <i>Stylosanthes guianensis</i>	17
Tabela 3 - Efeito dos diferentes tratamentos com colchicina e distribuição de ploidia em <i>Stylosanthes guianensis</i>	19
Tabela 4- Dados morfométricos da lâmina foliar de indivíduos diploides e tetraploides.....	22
Tabela 5- Dados morfométricos de estômatos de indivíduos diploides e tetraploides.....	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 Poliploidia: Conceitos, Classificação e Aspectos Evolutivos.....	2
1.2 Melhoramento Vegetal.....	3
1.3 Poliploidia induzida como ferramenta no melhoramento de forrageiras.....	4
1.4 Organogênese e a Formação de Calos.....	5
1.5 <i>Stylosanthes guianensis</i>	6
2 OBJETIVO GERAL.....	9
3 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	9
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
4.1 Material vegetal.....	9
4.2 Introdução do material vegetal em cultura in vitro.....	9
4.3 Indução de poliploidia em calos de <i>Stylosanthes guianensis</i>	10
4.4 Citometria de fluxo.....	12
4.5 Micropropagação.....	13
4.6 Técnicas citogenéticas para avaliação do citótipo.....	14
4.7 Análise morfológica das lâminas foliares.....	14
4.8 Análise estomática.....	15
4.9 Análises estatísticas.....	16
5 RESULTADOS.....	17
5.1 Indução de brotação a partir de calos e análise de poliploidia em <i>Stylosanthes guianensis</i>	17
5.2 Aclimatização.....	20
5.3 Análises citogenéticas para avaliação do citótipo.....	21
5.4 Análise morfológica das lâminas foliares.....	21
5.5 Análise estomática.....	25
6 DISCUSSÃO.....	28
7 CONCLUSÃO.....	30

8 REFERÊNCIAS.....	30
---------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

A poliploidia, caracterizada pela presença de mais de dois conjuntos cromossômicos completos em um organismo, é um dos principais mecanismos de diversificação evolutiva nas plantas, contribuindo de forma expressiva para a origem e a manutenção da biodiversidade vegetal (WENDEL, 2000). Ao promover a duplicação genômica, esse fenômeno possibilita eventos de especiação quase instantâneos e amplia a variabilidade genética, favorecendo a adaptação a diferentes ambientes e o sucesso evolutivo das espécies (SOLTIS et al., 2014).

Com o passar dos séculos, o melhoramento vegetal passou de práticas empíricas de seleção para o uso de ferramentas biotecnológicas altamente precisas. Dentre essas, destaca-se a indução artificial da poliploidia, utilizando agentes como a colchicina, que bloqueiam a formação do fuso mitótico e duplicam o número cromossômico (RAUF et al., 2021). Essa técnica tem sido essencial na criação de cultivares com maior produtividade, resistência a estresses e melhor qualidade fisiológica (SATTLER et al., 2016; AVERSANO et al., 2012).

Outra abordagem relevante é a organogênese indireta, processo pelo qual novas plantas são regeneradas a partir de calos — massas de células indiferenciadas formadas em resposta a estímulos hormonais e ambientais (IKEUCHI et al., 2013). A calibração precisa das concentrações de auxinas e citocininas é fundamental para o sucesso dessa técnica, influenciando diretamente a formação e a morfologia dos calos (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

Dentro desse cenário, a espécie *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. surge como uma possível planta para tal abordagem. Leguminosa forrageira de grande importância agrícola, a espécie se destaca pela adaptabilidade a solos ácidos e inférteis, capacidade de fixação biológica de nitrogênio e alto valor nutritivo (COSTA, 2006; ZEMEK et al., 2018; ANGEL, 2023). Além disso, possui ampla diversidade genética, o que a torna excelente candidata para programas de melhoramento vegetal que visam desenvolver cultivares mais eficientes e sustentáveis (SILVA, 1992; DA SILVA, 2024).

Neste trabalho, o objetivo geral foi desenvolver um protocolo eficiente para a poliploidização de *Stylosanthes guianensis* via cultura de calos. Para isso, foram testadas diferentes concentrações e tempos de exposição à colchicina, um agente antimitótico amplamente utilizado para indução de poliploidia. Além disso, os tratamentos aplicados foram

avaliados por meio de citometria de fluxo, a fim de verificar sua eficiência e assegurar a estabilidade dos cultivares gerados *in vitro*. Também foi realizado o estudo do número cromossômico para confirmar a presença de possíveis indivíduos tetraploides e comparar suas características morfológicas com as de indivíduos diploides

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Poliploidia: Conceitos, Classificação e Aspectos Evolutivos

A poliploidia é um fenômeno genético caracterizado pela presença de mais de dois conjuntos cromossômicos completos em um organismo (WENDEL, 2000). Esse fenômeno representa um dos principais mecanismos de diversificação evolutiva nas plantas, contribuindo significativamente para a origem e a manutenção da biodiversidade vegetal. A duplicação genômica, característica central da poliploidia, pode promover eventos de especiação praticamente instantâneos. Esse processo ocorre quando as alterações no número de cromossomos resultam na formação de barreiras reprodutivas efetivas, isolando geneticamente as populações poliploides de suas espécies parentais e permitindo o estabelecimento de novas linhagens. Além disso, a poliploidia é responsável por ampliar a variabilidade genética dentro das populações. A introdução de cópias adicionais de genes possibilita uma maior plasticidade genômica, favorecendo a adaptação a condições ambientais variadas e a exploração de novos nichos ecológicos. Esse incremento na diversidade genética oferece uma base para processos adaptativos, especialmente em cenários de mudanças ambientais ou competição. Estudos apontam que a poliploidia está presente em todas as angiospermas e na maioria das pteridófitas (SOLTIS et al., 2014)

O fenômeno de poliploidização pode ocorrer de forma natural por mecanismos distintos, incluindo a fusão de gametas não reduzidos como erros gerados na divisão celular meiótica, resultando na duplicação do genoma em uma mesma espécie (autopoliploidia), e hibridações interespecíficas seguidas de duplicação cromossômica (alopoliploidia) para viabilização dos gametas (RANDOLPH, 1932), ou de forma artificial, por meio de bloqueadores mitóticos. Tais mecanismos podem levar à formação de organismos poliploides, conferindo-lhes, possivelmente, características adaptativas vantajosas, como maior tolerância a ambientes expostos a estresse, maior produção de metabólitos secundários e aumento no tamanho das células (HARLAN et al., 1975). Adicionalmente, a poliploidização tem demonstrado exercer um impacto significativo diante de grandes transformações ambientais. Em cenários de estresse ambiental, como alterações climáticas, eventos de

extinção em massa e outras perturbações ecológicas, a poliploidia pode favorecer o desenvolvimento de características adaptativas vantajosas. A maior plasticidade fenotípica conferida pela duplicação genômica, associada a variabilidade genética, proporciona às plantas um potencial adaptativo ampliado, permitindo-lhes persistir e colonizar ambientes adversos. Essa capacidade de resposta adaptativa amplia as chances de sobrevivência e sucesso evolutivo em contextos ecológicos desafiadores (SOLTIS et al ., 2014).

1.2 Melhoramento Vegetal

O melhoramento genético em plantas possui um longa trajetória ,datada de 10.000 a.C com o início da domesticação das espécies vegetais ,onde comunidades humanas passaram a selecionar de forma empírica ,plantas que obtinham características favoráveis ,como maior produção de frutos palatáveis , grande número de sementes etc.Esse processo ,baseado na observação e prática ,já representa uma forma primitiva de seleção com interferência humana (AMABILE et al .,2018).

Com o avanço de práticas agrícolas ,estabeleceu-se a seleção artificial ,na qual os agricultores selecionavam de maneira proposital indivíduos que apresentavam características desejáveis ,como resistência a pragas ,maior produtividade e maior resistência a intempéries ambientais .Essa técnica foi fundamental para o aprimoramento de variedades e cultivares ao longo do tempo (AMABILE et al .,2018)

No século XIX o melhoramento vegetal teve um grande avanço com os trabalhos executados por Gregor Mendel ,em 1865, os quais consistem em entender e estabelecer o princípio da herdabilidade em *Pisum sativum* . As leis de Mendel, amplamente difundidas ,ajudaram a entender como atuava o mecanismo de transmissão de características genéticas ,fornecendo uma base científica para a genética moderna . (AMABILE et al .,2018; BORÉM et al .,2021)

O século XX foi marcado por inovações e avanços no melhoramento vegetal ,em 1937 o uso da poliploidia como técnica no melhoramento foi utilizado pela primeira vez com o uso da colchicina ,com a extração do composto natural que tem a função de inibir a formação das fibras do fuso e causando falhas na disjunção das cromátides e na citocinese durante a divisão celular ,resultando em uma célula com o dobro do número cromossômico (RAUF et al ,2021) .Na década de 1970 e 1980 a chegada da engenharia genética permitiram a transferência de genes específicos entre espécies diferentes, viabilizando a introdução de características agronomicamente vantajosas de maneira rápida e precisa (AMABILE et al .,2018) .

Na década de 1990, as cultivares transgênicas ganharam espaço, trazendo melhorias como resistência a pragas e tolerância a herbicidas, o que resultou em expressivos ganhos de produtividade e contribuiu para a redução do impacto ambiental da agricultura (AMABILE et al., 2018).

Atualmente, o melhoramento genético de plantas integra metodologias clássicas com ferramentas de ponta, como a edição gênica por CRISPR-Cas9, permitindo modificações direcionadas no genoma das culturas (AMABILE et al., 2018). Além disso, a poliploidia mantém um papel relevante, conferindo maior plasticidade fenotípica e adaptabilidade às plantas diante das mudanças climáticas e outros estresses ambientais, graças ao aumento da variabilidade genética que proporciona maior potencial adaptativo (SOLTIS et al. 2014)

1.3 Poliploidia induzida como ferramenta no melhoramento de forrageiras

A poliploidia induzida é uma ferramenta que vem sendo amplamente utilizada na biotecnologia e no melhoramento genético, com o propósito de criar cultivares com características agronômicas desejáveis. Culturas como o algodão (*Gossypium hirsutum*) e o trigo (*Triticum aestivum*) são exemplos de plantas poliploides com maior resistência a estresses ambientais, maior produtividade e melhor qualidade (WITTMANN et al., 2003). A duplicação cromossômica pode conferir à planta maior vigor, aumento do tamanho das células, biomassa e metabólitos secundários, elevando a eficiência fisiológica do organismo (SATTLER et al., 2016).

Algumas técnicas de duplicação cromossômica vêm sendo empregadas em estudos de indução artificial da poliploidia, utilizando agentes químicos (bloqueadores mitóticos) para induzir a poliploidia em cultivares de interesse comercial e agrônomico (LEHRER et al., 2008). Essa técnica permite a obtenção de cultivares mais resistentes a fatores ambientais adversos (pragas, doenças, etc.), minimizando a intervenção de agentes químicos para combater possíveis intempéries, contribuindo para um plantio mais sustentável (AVERSANO et al., 2012).

A utilização de colchicina, amiprofos-metil, trifluralina ou orizalina é bem difundida em trabalhos de utilizando a poliploidia como ferramenta para o melhoramento. tais químicos impedem a formação das fibras do fuso, afetando a disjunção das cromátides e a citocinese nas células resultando na duplicação cromossômica (RAUF et al., 2021 DUSI et al., 2003)

A indução de poliploidia artificial em forrageiras vem sendo amplamente discutida, devido às vantagens agronômicas que o processo proporciona. Estudos relatam que a duplicação em *Brachiaria* resulta em sementes com maior viabilidade (PEREIRA et al., 2012), além de possibilitar a obtenção de indivíduos com maior vigor e produtividade (ISHIGAKI et al., 2009).

1.4 Organogênese e a Formação de Calos

A organogênese vegetal é o processo responsável pela criação de tecidos e órgãos em plantas a partir de células indiferenciadas. Esse processo pode ocorrer de forma direta, quando há a formação de novos órgãos sem passar pelo estágio de calo, ou de forma indireta, quando há a formação de calo no primeiro estágio e, posteriormente, a diferenciação dos órgãos (CARVALHO et al, 2006).

A calogênese é um estágio da organogênese indireta, onde células somáticas indiferenciadas se agrupam para formar o calo, que são massas celulares sem estrutura definida. Após a formação do calo, as células podem se diferenciar novamente, permitindo o desenvolvimento de novos órgãos vegetais . Esse processo ocorre devido à reprogramação celular em resposta a estímulos externos, como ferimentos, infecções patogênicas, exposição a hormônios vegetais e outros (IKEUCHI et al., 2013). Os calos podem se apresentar de diferentes formas ,incluindo os calos friáveis ou compactos ,que não apresentam regeneração aparente e os que apresentam regeneração de órgãos ,são classificado em calos “rooty”, “shooty” ou embriogênicos dependendo do tipo de órgão gerado pelo calo .(IKEUCHI et al .,2013).

Além disso, é importante destacar que diferentes tipos de calos apresentam perfis variados de expressão gênica, o que reflete a complexidade dos mecanismos envolvidos em sua formação. Estudos realizados em *Arabidopsis thaliana* demonstram que, diante de ferimentos, há uma regulação específica das vias hormonais, como a sinalização por citocininas, que contribui para a indução do calo. Esses achados reforçam que existem mecanismos genéticos e epigenéticos que controlam a capacidade das células de reverter seu estado diferenciado, permitindo que retomem a proliferação e adquiram a competência necessária para a formação do calo.(IKEUCHI et al .,2013)

Murashige e Skoog (1962) evidenciaram que o equilíbrio entre auxinas e citocininas é fundamental para a formação de calos em culturas de tecidos vegetais. Auxinas como o IAA estimulam o alongamento e a divisão celular, essenciais para a indução do calo, enquanto as citocininas, como a kinetina, favorecem a divisão celular e o desenvolvimento de brotos. A proporção entre esses hormônios determina o desenvolvimento do tecido: altas auxinas favorecem raízes, altas citocininas promovem brotações, e o equilíbrio entre ambos induz a formação de calos.

Por exemplo, concentrações de cerca de 2,0 mg/L de IAA e 0,2 mg/L de kinetina favorecem o crescimento vigoroso do calo, enquanto elevações de kinetina para 3 a 4 mg/L podem estimular a regeneração de brotos. Pequenas variações nas concentrações hormonais impactam a morfologia, textura e capacidade regenerativa do calo. Portanto, a correta otimização hormonal é crucial para o sucesso na organogênese indireta, uma vez que concentrações inadequadas podem comprometer o desenvolvimento do tecido (MURASHIGE & SKOOG, 1962)

A organogênese indireta representa uma ferramenta valiosa na biotecnologia e no melhoramento vegetal. Estudos demonstram sua eficácia na indução de calos em programas de melhoramento, possibilitando a seleção de calos com características desejáveis, como maior capacidade regenerativa ou resistência a estresses abióticos. Essa abordagem viabiliza a obtenção de plantas geneticamente modificadas e o desenvolvimento de novas variedades adaptadas a condições ambientais adversas (IKEUCHI et al., 2013).

1.5 *Stylosanthes guianensis*

Stylosanthes é um gênero pertencente à família Fabaceae, reconhecido por sua importância agrícola, principalmente como leguminosa forrageira. Nativo das Américas, o gênero apresenta grande diversidade genética e variedades adaptadas a diferentes ecossistemas (COSTA, 2006; VIEIRA, 1988; HUSSON, 2008).

Dentre as várias espécies do gênero, *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. , $2x=20$ (diploide) ,se destaca por sua tolerância e adaptabilidade a diferentes condições climáticas, bem como a solos inférteis e ácidos. Essa espécie apresenta significativo potencial nutricional como forrageira, além de ampla diversidade genética.

Morfologicamente, *S. guianensis* é uma leguminosa perene, com hábito de crescimento ereto ou semiprostrado, podendo atingir cerca de 1,5 metro de altura. Suas folhas são trifolioladas, com folíolos oblongos e lanceolados. As flores, pequenas e de coloração amarelada ou alaranjada, estão dispostas em inflorescências terminais. Os frutos são do tipo vagem, contendo uma ou mais sementes em seu interior (Figura 2) (HUSSON et al., 2008).

Fisiologicamente, *S. guianensis* destaca-se pela alta eficiência na fixação biológica de nitrogênio, graças à simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*. Essa característica contribui para a melhoria da fertilidade do solo, reduzindo a necessidade de fertilizantes nitrogenados em sistemas agrícolas (ZEMEK et al., 2018). Além disso, sua tolerância a solos ácidos e pobres em nutrientes faz da espécie uma excelente alternativa para a recuperação de áreas degradadas (COSTA et al., 2006).

Como forrageira, *Stylosanthes guianensis* é amplamente utilizada na alimentação animal, tanto em pastagens quanto na forma de feno ou silagem, especialmente durante períodos de estiagem. Sua taxa de proteína bruta, que varia entre 18% e 22%, aliada à boa digestibilidade, a torna uma excelente opção para suplementação de bovinos, suínos e caprinos (BRAGA, 2020; PHENGSAVANH, 2006). Estudos apontam que a inclusão de *S. guianensis* na dieta dos animais contribui para o ganho de peso e melhora a eficiência reprodutiva (ANGEL, 2023).

Por fim, *Stylosanthes guianensis* é amplamente empregada em programas de melhoramento vegetal, com foco no desenvolvimento de cultivares mais resistentes, produtivos e adaptados a condições adversas (Tabela 1). Técnicas como a indução de poliploidia e a cultura de tecidos vegetais têm sido aplicadas para ampliar a variabilidade genética da espécie, resultando em linhagens superiores (SILVA, 1992; DA SILVA, 2024).

Tabela 1 - Diferentes cultivares de *Stylosanthes guianenses* e suas características .

Cultivar	Principais Características	Referência
cv. Mineirão	Alta produção de biomassa; resistência a solos ácidos; boa capacidade de fixação de nitrogênio; alta resistência ao pastejo e pisoteio.	DE PINHO et al., 2002
cv. Pucallpa	Melhor qualidade na nutrição animal; resistência a doenças foliares; utilizada em bancos de proteínas para suplementação de gado durante a seca.	ANGEL, 2023
cv. Reyan 2	Destaca-se na recuperação de áreas degradadas; eficiente fixação biológica de nitrogênio; indicada para solos tropicais de baixa fertilidade.	TANG et al ,2009
cv. CIAT 184	Boa adaptação a solos pobres; alta tolerância à estiagem; alto teor de proteína.	RAMOS et al 2017
cv. IRI 1022	Alta performance em cultura de tecidos vegetais; elevada capacidade de regeneração em condições controladas.	SILVA, 1992

Figura 1- Indivíduo diploide de *Stylosanthes guianensis*

Fonte : acervo pessoal

2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um protocolo eficiente para a poliploidização de *Stylosanthes guianensis* via cultura de calos.

3 OBJETIVO ESPECÍFICO

i. Testar diferentes concentrações e tempos de exposição à colchicina (anti-mitótico), com o intuito de estabelecer um protocolo eficiente para poliploidização via calo em *Stylosanthes guianensis*.

ii. Avaliar via citometria de fluxo a eficiência dos tratamentos de indução e certificar a estabilidade dos cultivares *in vitro*.

iii. Confirmar o número cromossômico de possíveis tetraploides

iv. Comparar características morfológicas de indivíduos diploides e tetraploides

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Foi utilizado sementes do cultivar de *Stylosanthes guianensis* utilizados foi a cultivar Mineirão, desenvolvida pela Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (CPAC).

4.2 Introdução do material vegetal em cultura *in vitro*

A esterilização das sementes de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão para a cultura **in vitro** iniciou-se com a seleção de sementes de boa qualidade, sem sinais evidentes de contaminação. Em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente por 15 minutos para a remoção de impurezas superficiais.

Posteriormente, em ambiente estéril (cabine de fluxo laminar), as sementes foram desinfetadas com álcool 70% por 1 minuto e, em seguida, imersas em uma solução de hipoclorito de sódio (água sanitária) a 2,5% por 15 minutos, com agitação constante para garantir a exposição homogênea à solução. Após esse período, as sementes foram lavadas de 4 a 5 vezes com água estéril, a fim de remover completamente os resíduos de hipoclorito.

Ao final do processo de desinfestação, as sementes foram transferidas para tubos de vidro contendo meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962). O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,01$, sendo em seguida autoclavado a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 108 kPa durante 15 minutos.

As sementes introduzidas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16/ 8 (Luz/escuro) com temperatura variando entre $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Essas condições foram mantidas para otimizar o crescimento das sementes e, posteriormente, o crescimento dos explantes. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética e Biotecnologia, no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF, MG, Brasil)

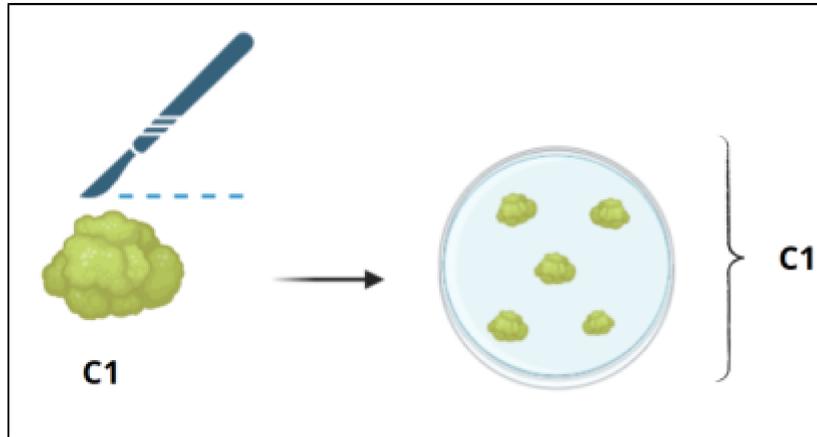
Os explantes obtidos a partir das sementes de *Stylosanthes guianensis* foram submetidos a manutenção periódica, a qual consistiu na subcultura dos materiais. Esse procedimento envolveu a replicação dos explantes por meio de seccionamento dos segmentos entrenodais, que foram posteriormente transferidos para um novo meio de cultivo (MS).

Essa prática teve como finalidade assegurar a homogeneidade e a vitalidade do material vegetal utilizado no experimento.

4.3 Indução de poliploidia em calos de *Stylosanthes guianensis*

O material vegetal utilizado foi oriundo do banco de germoplasma de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão, diplóide ($2n = 20$), mantido em laboratório. Foram utilizados calos não embriogênicos originados de forma natural a partir de estresse mecânico (ferimento) durante o processo de replicagem.

Para a condução do experimento, foram selecionados 12 calos, os quais foram seccionados em cinco explantes cada, totalizando 60 explantes. Cada explante manteve a identificação do calo de origem, de modo que os fragmentos derivados do calo 1 foram denominados C1, os do calo 2 como C2, e assim sucessivamente até C12 (Figura 2).

Figura 2- Fragmentação de calos em *Stylosanthes guianensis*

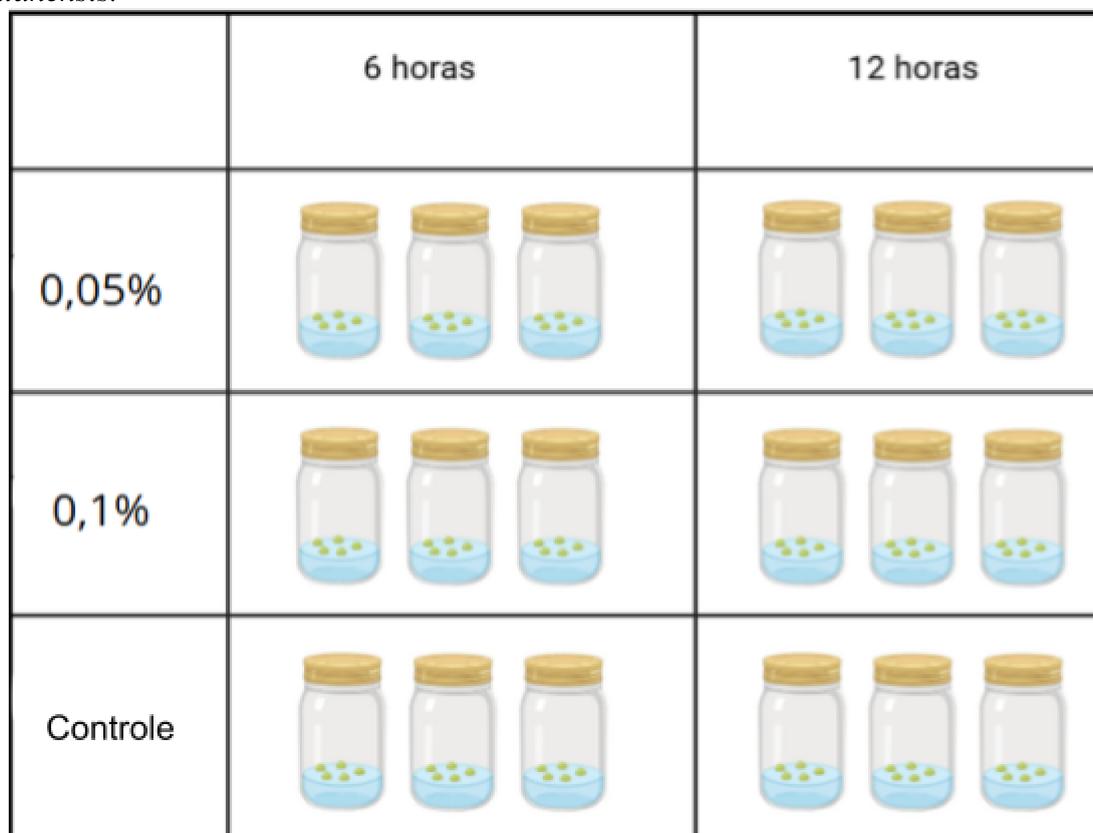
Fonte : BioRender

O experimento foi realizado seguindo o protocolo descrito por Da Cunha et al. (2024), com algumas modificações para melhor atender às características de *S. guianensis*.

Os explantes foram expostos a duas concentrações de colchicina (0,05% e 0,1%), diluídas em meio MS, durante períodos de 6 e 12 horas. Além das condições experimentais, foram preparados dois frascos contendo apenas meio MS, sem suplementação de colchicina, que foram utilizados como controle (Figura 3).

Após o período de exposição, os calos foram transferidos cuidadosamente para frascos de vidro de 600 ml, contendo 20 ml de meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com fitohormônios vegetais, especificamente auxina (ANA 0,01 mg/L) e citocinina (BAP 3 mg/L), para induzir o desenvolvimento radicular e caulinar (SILVA, et al, 2019). Os frascos foram mantidos em condições controladas, com fotoperíodo de 16 horas de claridade e 8 horas de escuridão, e temperatura variando entre 22°C e 28°C. Após 15 dias, os calos submetidos à suplementação foram remanejados para frascos com meio MS sem reguladores de crescimento, para promover o crescimento e regeneração dos calos.

Figura 3- Esquema do protocolo experimental para indução de poliploidia em *Stylosanthes guianensis*.



Fonte :BioRender

4.4 Citometria de fluxo

Após o desenvolvimento das plantas oriundas dos calos, foi realizada a citometria de fluxo para quantificar o conteúdo de DNA das amostras. Para isso, folhas dos explantes já desenvolvidos durante 60 dias foram retiradas dentro da câmara de fluxo laminar. Em seguida aproximadamente 50 miligramas de folha foram maceradas em solução tampão WPB (LOUREIRO et al., 2007) com auxílio de lâmina de bisturi os núcleos foram separados dos resíduos em filtro 30 μ m. Posteriormente, a solução filtrada foi corada com iodeto de propídeo, que se liga ao DNA, permitindo a visualização e quantificação.

Para a leitura no citômetro de fluxo, utilizou-se a ervilha (*Pisum sativum*), que possui 9,09 pg de DNA na fase G1, conforme descrito por Galbraith et al. (1983), como padrão para a determinação da quantidade de DNA em *S guianensis*.

4.5 Micropropagação

Após a confirmação da ploidia por meio da citometria de fluxo, os explantes poliploides foram numerados e submetidos à replicagem constante, permitindo a micropropagação dos indivíduos tetraploides em sala de crescimento, sob fotoperíodo previamente descrito (Figura 4).

Figura 4- Sala de crescimento utilizada para micropropagação de *Stylosanthes guianensis*.



Fonte : Acervo pessoal

4.5 Aclimatização

Os indivíduos poliploides de *Stylosanthes guianensis* foram selecionados com base em seu desenvolvimento e submetidos ao processo de aclimatização. No primeiro estágio, as estacas foram inseridas em tubos com tampas, contendo água destilada. A água era trocada diariamente e os tubos eram levemente abertos para permitir a troca gasosa. Este processo durou 7 dias, com o objetivo de estimular o crescimento de raízes adventícias e adaptar os indivíduos ao ambiente *ex vitro*.

Após os 7 dias, os indivíduos foram transferidos para copos plásticos contendo uma mistura de terra e substrato (1:1), e cobertos com saco plástico para manter a umidade elevada ao redor das plantas. Durante esse processo, o saco plástico foi gradualmente aberto para

permitir que as plantas se acostumassem com o ambiente externo. Após 14 dias, o saco plástico foi completamente retirado. A partir desse momento, as plantas foram transplantadas em vasos de 1,03 litros e regadas frequentemente para garantir seu desenvolvimento em meio *ex vitro*. Após o desenvolvimento das plantas vaso, a mesma foi introduzida em canteiro na Estação Experimental de Plantas UFJF, para um melhor desenvolvimento.

4.6 Técnicas citogenéticas para avaliação do citótipo

Meristemas radiculares obtidos de estacas mantidas em hidroculutura por aproximadamente sete dias foram tratados com 8-hidroxiquinoleína a 3,0 mM por 9 horas, à temperatura ambiente, e posteriormente fixados em Carnoy (etanol: ácido acético glacial-,3:1), mantidos a 4°C por, no mínimo, 24 horas para confecção das lâminas.

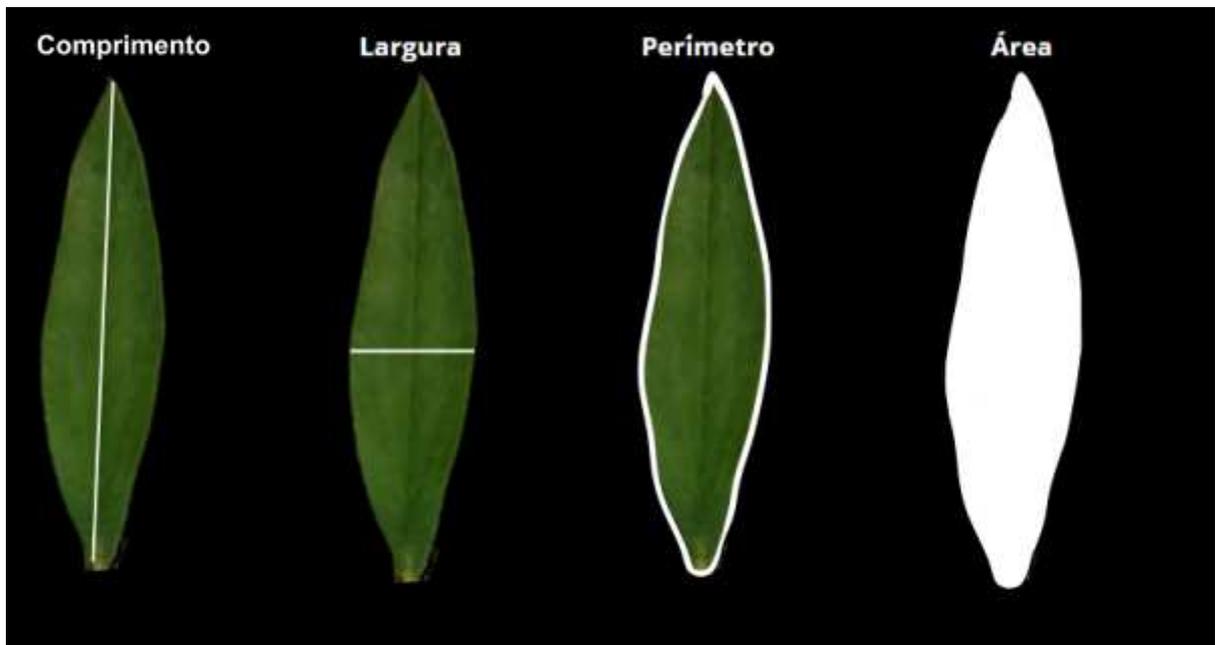
Para remoção da parede celular, os meristemas radiculares, já fixados, foram tratados com solução enzimática de Pectinase e Celulase (Onozuka®) por 4 horas a 37°C. Após a remoção dos resíduos da solução enzimática, as lâminas foram confeccionadas a partir da técnica de dissociação celular e secagem ao ar (CARVALHO & SARAIVA, 1993, 1997). Em seguida, as lâminas passaram pelo processo de bandeamento com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Guerra, 2002). Os cromossomos foram analisados em microscópio de fluorescência BX53 com softwares CellSens (Olympus) e as imagens foram capturadas pelo mesmo e submetidas à contagem do número cromossômico no software ImageJ (National Institutes of Health, USA).

4.7 Análise morfológica das lâminas foliares

Três folhas, provenientes de cinco indivíduos, foram coletadas a partir do terceiro entrenó e analisadas com o objetivo de identificar possíveis alterações morfológicas causadas pela poliploidização. A seleção desse número de folhas teve como finalidade garantir uma amostragem representativa, equilibrando a variabilidade entre indivíduos e a viabilidade das análises.

Utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, USA), as lâminas foliares foram mensuradas considerando os seguintes parâmetros: Comprimento, largura, perímetro e área (Figura 5).

Imagem 5- Esquema esclarecendo o padrão de medidas utilizado na morfometria de folhas de *Stylosanthes guianensis* diploide e tetraploides



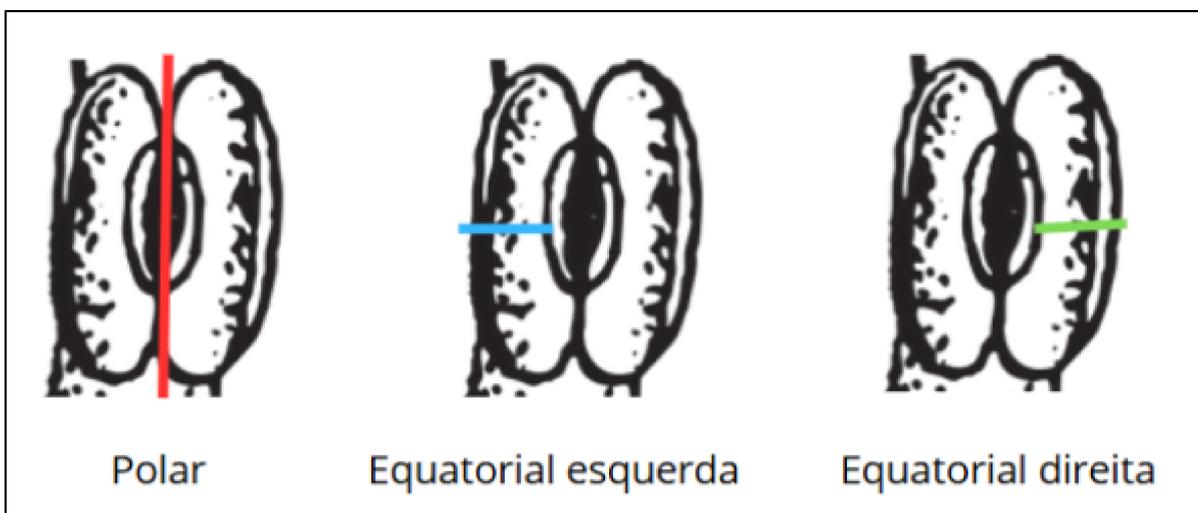
Fonte : Acervo pessoal

4.8 Análise estomática

Folhas de *S. guianensis* foram diafanizadas em NaOH (2,5 M) durante 16 horas e, posteriormente, imersas em solução contendo NaClO (hipoclorito de sódio comercial) diluído em água (1:3) por uma hora e trinta minutos. Após esse processo, as folhas foram lavadas em água destilada para remover possíveis resíduos de NaClO e, em seguida, corada com Safranina a 1%.

Foram medidos 20 estômatos aleatórios, em cinco indivíduos, da região abaxial das lâminas foliares de diploides e tetraploides. Foram consideradas as medidas: polar, equatorial, excluindo a abertura estomática (Figura 6), além do índice e da densidade estomática de uma lâmina foliar de cada citótipo. As imagens foram capturadas, como indicado anteriormente, e submetidas a morfometria no software Image J (National Institutes of Health, USA).

Figura 6- Esquema esclarecendo o padrão de medidas utilizado na morfometria de estômatos de *Stylosanthes guianensis* diploide e tetraploides .



Fonte : Canva

4.9 Análises estatísticas

Os dados obtidos por meio das medições no software ImageJ (National Institutes of Health, EUA) foram analisados utilizando o software estatístico GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Todos os dados foram processados e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido pelo teste não paramétrico de ordem (teste de Mann-Whitney).

5 RESULTADOS

5.1 Indução de brotação a partir de calos e análise de poliploidia em *Stylosanthes guianensis*

Os calos apresentaram brotação no meio suplementado após 30 dias, sendo que 81,6% desenvolveram órgãos vegetativos (caule, folhas e raízes), 18,33% não apresentaram desenvolvimento aparente (Tabela 2). Após o desenvolvimento dos brotos, as estacas derivadas dos calos foram isoladas e devidamente etiquetadas para melhor identificação.

Tabela 1- Desenvolvimento de brotações a partir de calos de *Stylosanthes guianensis*

Calos	Órgãos vegetativos desenvolvidos (Caule, folha e raiz)	Órgãos vegetativos não desenvolvidos	Indivíduos mortos
C1	5	0	0
C2	3	2	0
C3	4	1	
C4	5	0	0
C5	4	1	0
C6	5	0	0
C7	4	1	0
C8	4	1	0
C9	3	2	0
C10	5	0	0
C11	5	0	0
C12	2	3	0
Total	49	11	0
%	81,6%	18,33%	0%

Fonte: Laboratório de genética e biotecnologia UFJF (2024)

De acordo com os resultados obtidos por citometria de fluxo, foi possível observar a formação de poliploides em todos os tratamentos. No entanto, a análise dos dados revelou diferenças na eficiência de indução entre os tratamentos.

No primeiro tratamento (0,05% por 6 horas), foram identificados 16 indivíduos diploides, 1 mixoploide e 3 tetraploides. No segundo tratamento (0,05% por 12 horas), encontraram-se 15 diploides, 3 mixoploides e 2 tetraploides. No terceiro tratamento (0,1% por

6 horas), a distribuição foi de 20 diploides e 3 tetraploides, sem ocorrência de mixoploides. Já no quarto tratamento (0,1% por 12 horas), observou-se maior diversidade, com 9 diploides, 2 mixoploides, 10 tetraploides e 1 octaploide (Tabela 3).

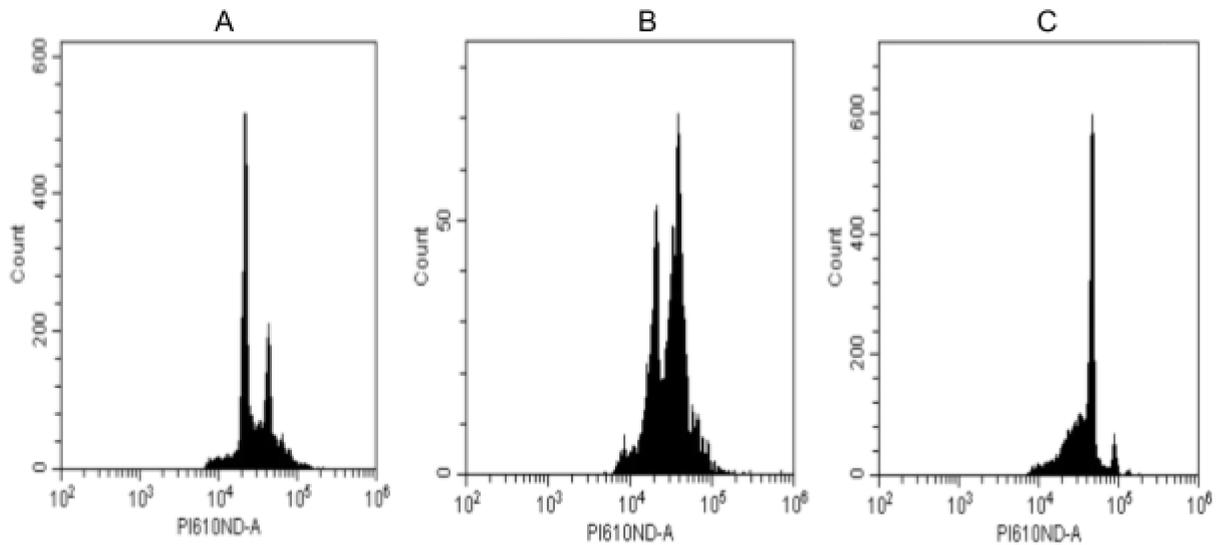
Os histogramas gerados pela citometria de fluxo mostraram picos distintos para os diferentes citótipos. O pico dos indivíduos diploides foi registrado em aproximadamente 2,8 pg de DNA, enquanto os indivíduos tetraploides apresentaram um pico de cerca de 5,6 pg, indicando o dobro de material genético em relação ao diploide (Figura 7).

Tabela 2 - Efeito dos diferentes tratamentos com colchicina e distribuição de ploidia em *Stylosanthes guianensis*.

	Calos	N° total de				
		brotos	Diploide	Mixoploide	Tetraploide	Octaploide
0,05% 6						
horas	C1	7	4	1	2	0
	C2	8	7	0	1	0
	C3	5	5	0	0	0
0,05% 12						
horas	C4	8	5	1	2	0
	C5	6	6	0	0	0
	C6	6	4	2	0	0
0,1% 6						
horas	C7	10	8	0	2	0
	C8	8	8	0	0	0
	C9	5	4	0	1	0
0,1% 12						
horas	C10	11	3	0	7	1
	C11	5	3	1	1	0
	C12	6	3	1	2	0
	Total	85	60	6	18	1
	%	100	70.5	7.05	21.17	1.17

Fonte : laboratório de genética e biotecnologia UFJF.

Figura 7 - Histogramas representativos de indivíduos diploide ,mixoploide e tetraploide de *Stylosanthes guianensis*.



Diploide (A) - 2,6 pg ; ,mixoploide (B) ;Tetraploide (C) - 5,6 . (Fonte :acervo pessoal) .

5.2 Aclimatização

Os indivíduos foram transplantados em canteiro de experimento, se estabeleceram e permaneceram em desenvolvimento durante esse processo (Figura 8)

Figura 8- Indivíduo tetraploide de *Stylosanthes guianensis* estabelecido em campo.

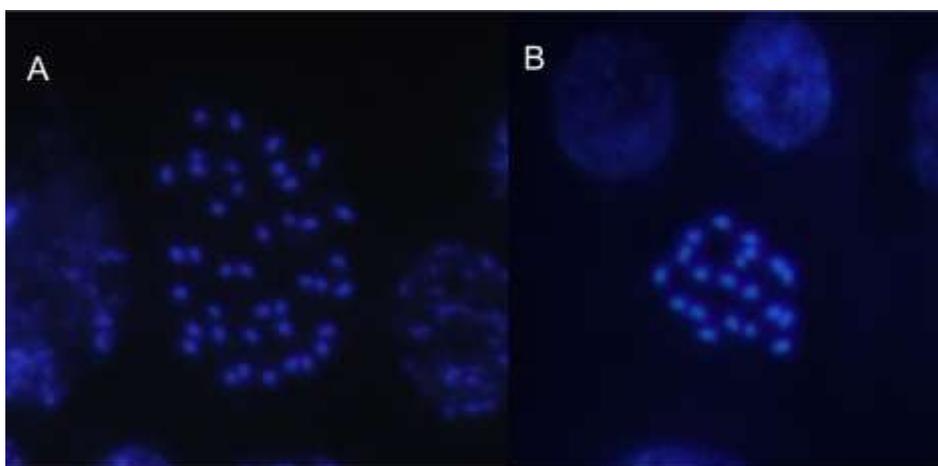


Fonte : Acervo pessoal (2024)

5.3 Análises citogenéticas para avaliação do citotipo

A partir das células meristemáticas, observou-se que os indivíduos diploides apresentaram um número cromossômico de $2n = 20$, enquanto os indivíduos tetraploides exibiram $2n = 40$, confirmando a duplicação do número de cromossomos nos poliploides (Figura 9).

Figura 9- Metáfases representativas de indivíduos diploide e poliploidia de *Stylosnathes guianensis*



Tetraplóide ($2n=4x=40$; 5.6 pg) (A) e indivíduos diploide ($2n=2x=20$; 2,6 pg) (B) (Fonte : Acervo pessoal)

5.4 Análise morfológica das lâminas foliares

Os indivíduos tetraploides apresentaram médias superiores em todos os parâmetros analisados quando comparados aos diploides. A altura média das folhas nos diploides foi de 28,19 mm, enquanto nos tetraploides essa média foi de 39,91 mm. A largura média da lâmina foliar também foi maior nos indivíduos tetraploides (13,18 mm) em comparação aos diploides (6,86 mm). O mesmo padrão foi observado para a área foliar, com valores médios de 399,35 mm² nos tetraploides e 142,58 mm² nos diploides, assim como para o perímetro foliar, que foi de 88,21 mm nos tetraploides e 61,64 mm nos diploides (Tabela 4) .

Os testes de normalidade de Shapiro-Wilk apresentaram valores de $p < 0,05$, indicando que os dados não seguem uma distribuição normal. Dessa forma, a comparação entre os grupos foi realizada por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney, para a comparação entre indivíduos diplóides e tetraploides em cada parâmetro analisado. Os resultados indicaram

diferença estatística significativa (*) entre diplóides e tetraploides (Figura 10 , Figura 11 e Figura 12).

Tabela 4- Dados morfométricos da lâmina foliar de indivíduos diploides e tetraploides

	Comprimento	Largura		Perímetro
Indivíduo	(mm)	(mm)	Área (mm²)	(mm)
I	29,85 (4,09)	7,08 (1,24)	158,85 (48,93)	63,99 (9,12)
II	25,41 (1,92)	6,29 (0,86)	117,44 (18,77)	56,01 (4,18)
Diploide III	27,68 (2,53)	6,45 (1,51)	129,93 (37,70)	60,28 (5,67)
IV	31,98 (4,33)	7,26 (1,52)	171,69 (42,01)	69,06 (8,74)
V	26,02 (2,96)	7,21 (0,68)	135,01 (22,74)	58,88 (6,46)
Média total	28,19 (4,00)	6,86 (1,23)	142,58 (39,67)	61,64 (8,15)
I	39,88 (4,76)	12,84 (1,05)	462,75 (154,71)	91,87 (5,63)
II	38,24 (3,01)	12,37 (1,48)	348,21 (54,05)	87,79 (6,05)
Tetraploide III	39,06 (2,51)	12,37 (1,07)	356,95 (42,69)	72,54 (26,53)
IV	44,13 (6,78)	14,57 (1,65)	467,23 (82,47)	101,95 (12,59)
V	38,25 (3,18)	13,07 (2,09)	361,61 (74,61)	86,90 (7,68)
Média total	39,91 (4,69)	13,18 (1,68)	399,35 (102,09)	88,21 (16,49)

Fonte : Laboratório de genética e biotecnologia UFJF (2024)

Figura 10-Comparação morfológica de Folhas diploide e tetraploide de *Stylosanthes guianensis*

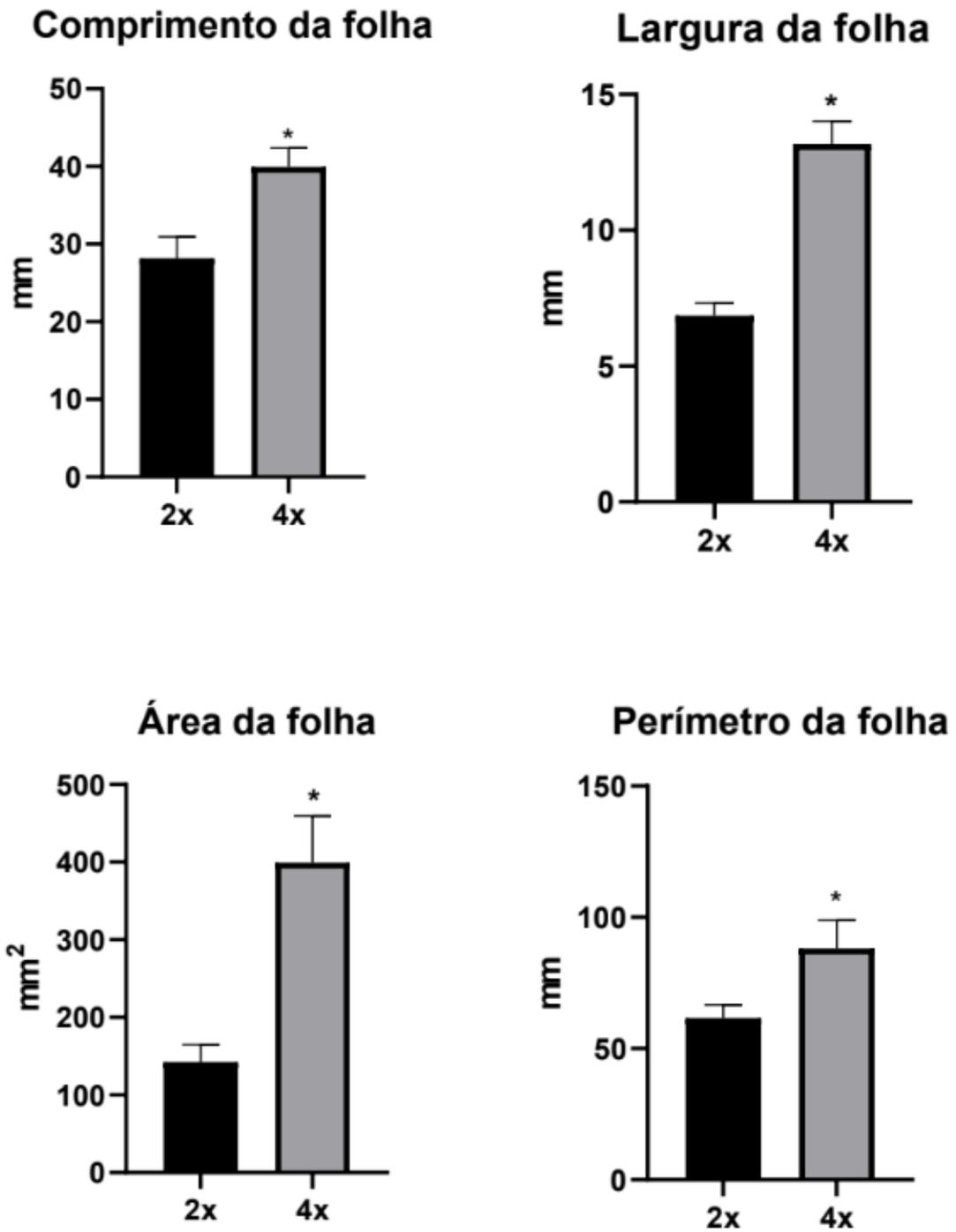
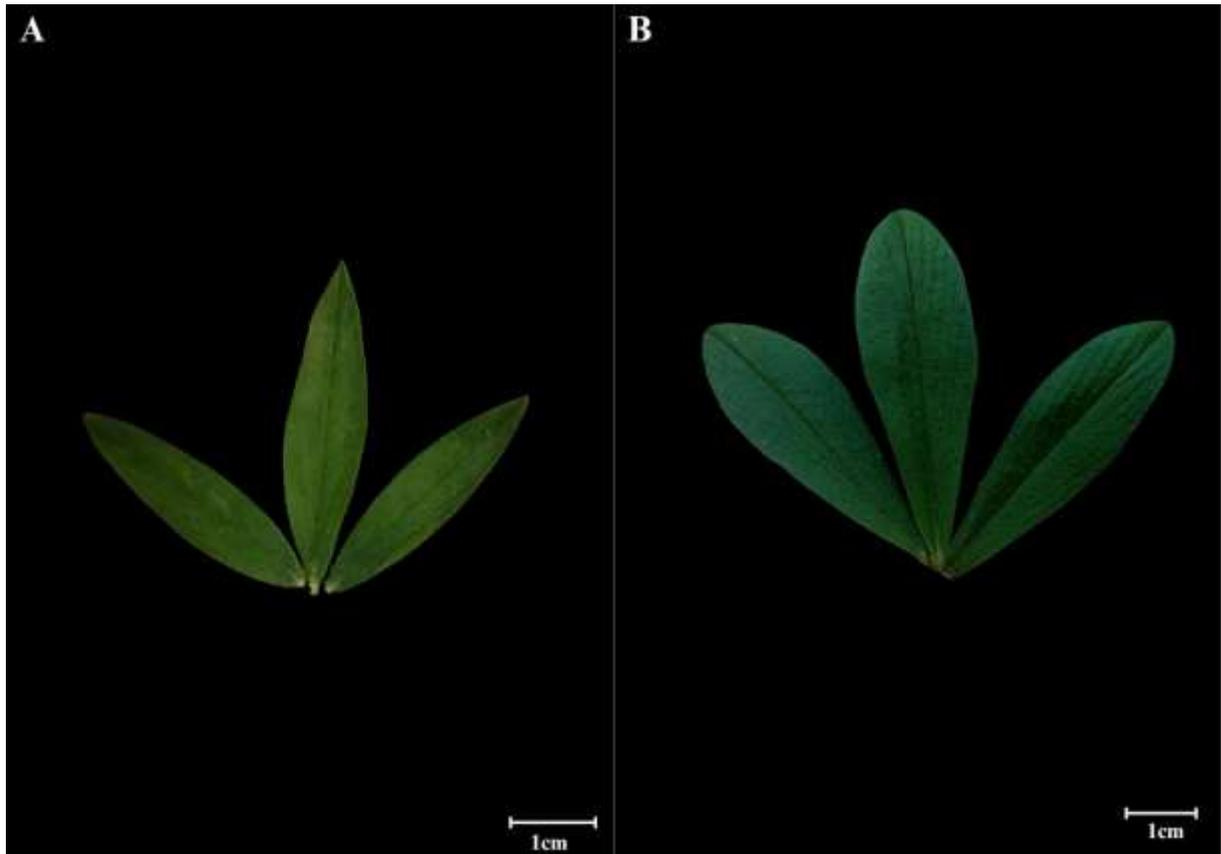


Figura 11- Estacas de *Stylosanthes guianensis* de indivíduos diploide e tetraploide.



Comparação de estacas de indivíduos Diploide (A) e Tetraploide (B) de *Stylosanthes guianensis* (Fonte : Acervo pessoal ,2025)

Imagem 12- Folhas de *Stylosanthes guianensis* de indivíduos diploide (A) e tetraploides (B).



Comparação de estacas de indivíduos Diploide (A) e Tetraploide (B) de *Stylosanthes guianensis* (Fonte : Acervo pessoal ,2025)

5.5 Análise estomática

Os indivíduos tetraploides apresentaram médias superiores aos diploides em todas as variáveis analisadas. A média da medida polar foi de 30,34 μm nos tetraploides, enquanto nos diploides foi de 21,26 μm . Já a medida equatorial esquerda nos tetraploides foi de 7,48 μm , enquanto nos diploides foi de 5,44 μm . O mesmo padrão foi observado para a medida equatorial direita, com médias de 7,43 μm para os tetraploides e 5,37 μm para os diploides. A soma das medidas equatoriais esquerda e direita apresentou média de 14,83 μm para os tetraploides e 10,81 μm para os diploides (Tabela 5).

Os testes de normalidade de Shapiro-Wilk apresentaram valores de $p < 0,05$, indicando que os dados não seguem uma distribuição normal. Dessa forma, a comparação entre os grupos foi realizada por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney, para a comparação entre indivíduos diplóides e tetraploides em cada parâmetro analisado. Os resultados

indicaram diferença estatística significativa (*) entre diploides e tetraploides (Figura 13 e Figura 14).

Tabela 5- Dados morfométricos de estômatos de indivíduos diploides e tetraploides

	Indivíduo	Polar	Equatorial Esquerda	Equatorial Direita	Equatorial total
	I	20,54 (1,64)	5,30 (1,04)	5,17 (1,13)	10,47 (1,69)
	II	21,69 (1,91)	5,06 (0,79)	5,18 (0,80)	10,25 (1,26)
Diploide	III	21,50 (1,60)	5,22 (0,74)	5,27 (0,83)	10,50 (1,41)
	IV	21,45 (0,87)	5,54 (0,62)	6,62 (0,80)	11,17 (1,07)
	V	21,02 (1,54)	5,44 (0,83)	5,37 (0,87)	10,81 (1,37)
Média total		21,26 (1,54)	5,44 (0,83)	5,37 (0,87)	10,81 (1,37)
	I	30,71 (2,36)	6,98 (1,32)	6,76 (1,29)	12,74 (2,18)
	II	28,2 (3,13)	6,84 (1,12)	6,98 (1,22)	13,83 (1,74)
Tetraploide	III	30,94 (2,24)	7,91 (1,25)	7,91 (1,22)	15,83 (1,83)
	IV	31,15 (2,78)	7,56 (1,24)	7,92 (1,03)	15,10 (2,77)
	V	30,60 (2,78)	8,06 (1,19)	7,55 (1,13)	15,62 (2,05)
Média total		30,34 (2,73)	7,48 (1,29)	7,43 (1,19)	14,83 (2,27)

Fonte : Laboratório de genética e biotecnologia UFJF (2024).

Figura 13- Comparação morfológica de estômatos diploide e tetraploide de *Stylosanthes guianensis*

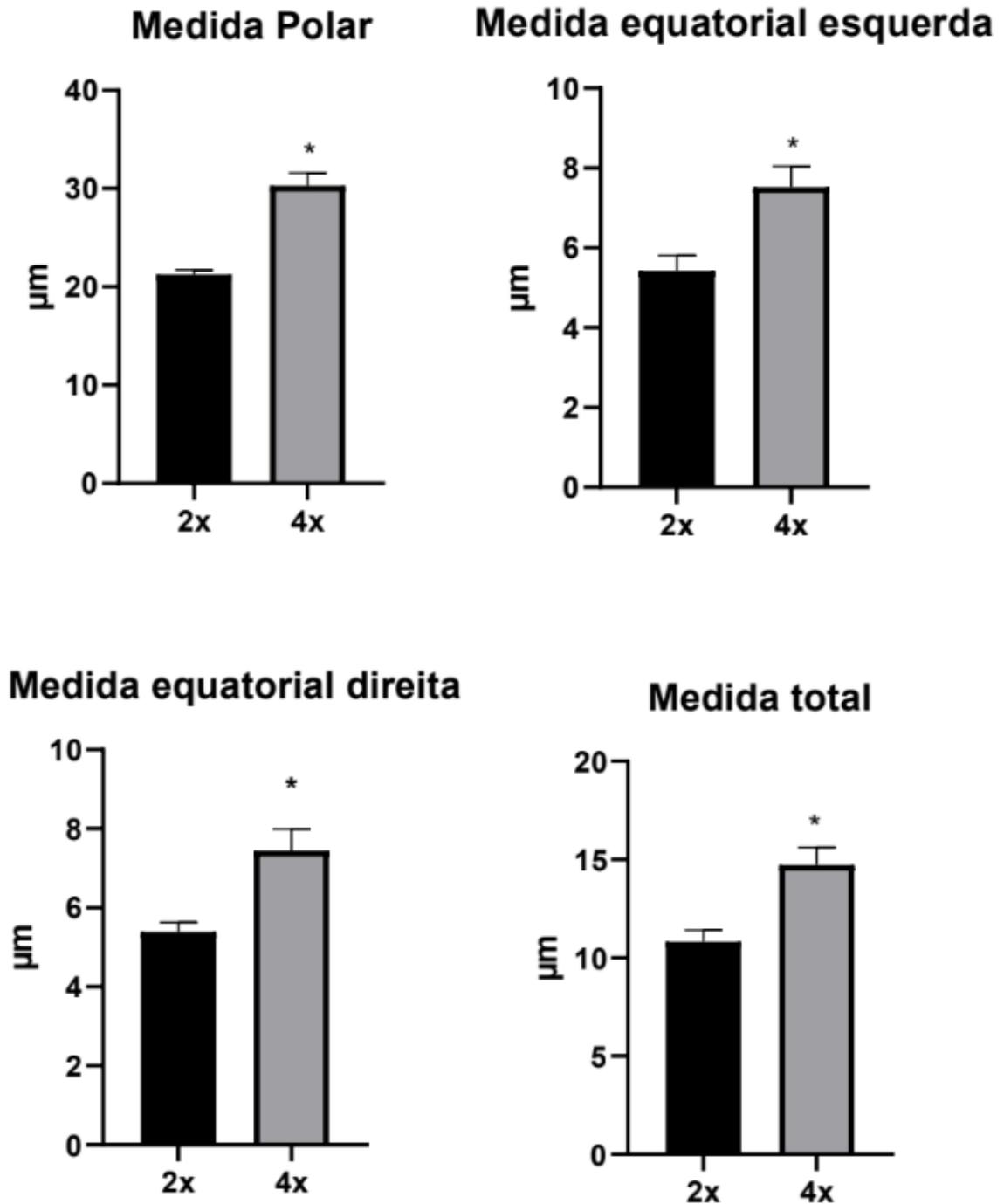
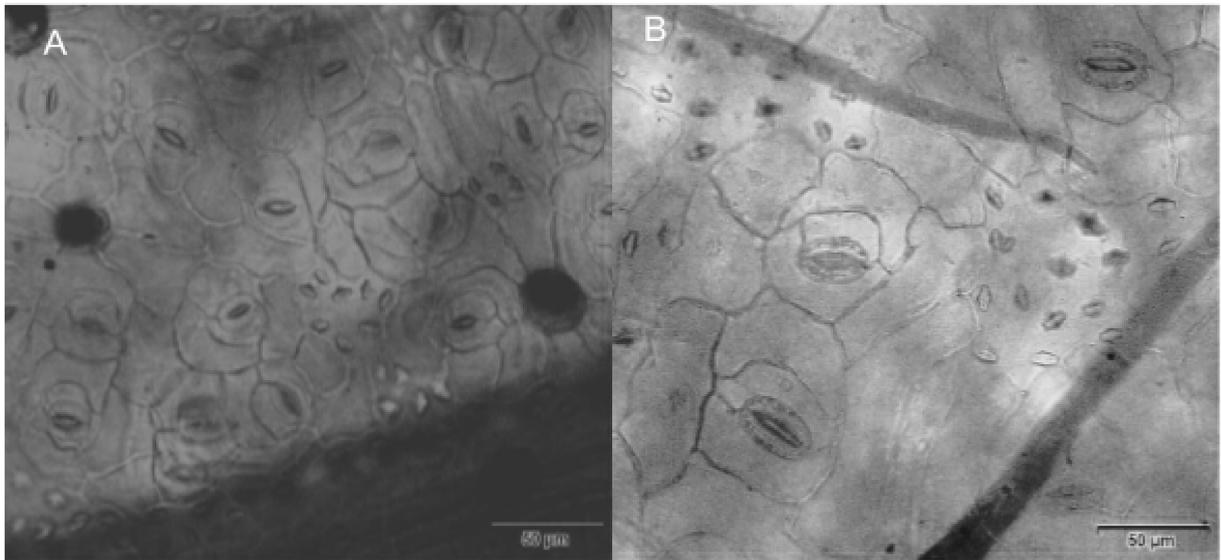


Figura 14- Campo fotografado em microscopia óptica de Lâminas foliares de indivíduos diploide (A) e tetraploides (B).



Fonte : Acervo pessoal (2024).

6 DISCUSSÃO

A indução de poliploidização por meio do uso de colchicina é uma estratégia consolidada e amplamente utilizada em pesquisas que visam aumentar a diversidade genética e aprimorar características fenotípicas de plantas (TOMÉ et al ,2016 WITTMANN et al., 2023;IANNICELLI et al,2024 ; VARGAS et al ,2024). A eficácia do processo de duplicação cromossômica depende de fatores como a concentração e o tempo de exposição ao agente químico.

Nos dados analisados, observou-se a eficiência do uso de colchicina na indução de poliploidia em *Stylosanthes guianensis* de forma controlada, combinando concentração e tempo de exposição. . Embora todas as concentrações testadas tenham mostrado eficácia, com a produção de indivíduos diploides, mixoplóides e tetraploides, a concentração de 0,1% por 12 horas se destacou como a mais eficiente. Esse tratamento resultou não apenas em uma maior quantidade de indivíduos tetraploides, mas também possibilitou a obtenção de um indivíduo octaploide, sugerindo que concentrações mais altas e tempos de exposição mais longos promovem uma maior eficiência na indução de poliploidias em *S. guianensis*. Por outro lado, baixas concentrações do químico apresentaram menor eficiência, enquanto concentrações excessivas levaram à morte das plantas (Pereira, 2012)

A citometria de fluxo é amplamente reconhecida como uma técnica eficiente para determinar o nível de ploidia em plantas regeneradas, permitindo a identificação precisa de

indivíduos com diferentes ploidias. Essa metodologia é fundamental em programas de melhoramento vegetal, pois facilita a seleção de genótipos desejados com base na quantificação do conteúdo de DNA celular (GARCÍA et al., 2021).

Um exemplo prático dessa aplicação é o estudo de Doležel et al. (2007), que destaca a utilização da citometria de fluxo na análise do conteúdo de DNA nuclear em plantas, possibilitando a distinção entre diferentes níveis de ploidia. No presente trabalho, a identificação da poliploidia por citometria de fluxo evidenciou diferenças claras nos picos de fluorescência: 2,8 para diploides e 5,6 para tetraploides, indicando um aumento no conteúdo de DNA e, conseqüentemente, o sucesso na duplicação do genoma.

Essa confirmação é essencial para garantir que os indivíduos selecionados expressem as características fenotípicas esperadas. No estudo de Iannicelli et al. (2024), a citometria de fluxo também permitiu distinguir entre plantas diploides e tetraploides, validando o protocolo de poliploidização em *Solanum sisymbriifolium*

A identificação e confirmação da ploidia por meio de lâminas de citogenética mostraram grande sucesso nos resultados. Indivíduos diploides apresentaram ploidia de $2n = 20$, enquanto os tetraploides apresentaram o dobro de cromossomos ($2n = 40$), confirmando a poliploidização dos indivíduos expostos à concentração de 0,1% de colchicina por 12 horas. A análise de cariótipo é uma técnica clássica baseada na observação de cromossomos em metáfase. Ela permite a contagem do número cromossômico, descrever a morfologia, posição do centrômero etc (SAKODA et al;2020) O estudo de Afonso et al. (2020) também utilizou técnicas citogenéticas para identificar diferentes níveis de ploidia no complexo poliplóide *Linum suffruticosum* s.l., combinando citometria de fluxo com contagens cromossômicas. A citometria foi utilizada para estimar o tamanho do genoma (2C) e inferir a ploidia relativa dos indivíduos, enquanto as contagens cromossômicas confirmaram os resultados, evidenciando cinco citótipos principais, entre eles, diploides (2x), tetraploides (4x), hexaploides (6x), octoploides (8x) e decaploides (10x), além de triplóides e aneuploides em menor frequência.

Além disso, a diferença significativa no tamanho das folhas entre os indivíduos diploides e tetraploides também é frequentemente documentada em estudos sobre poliploidização. Wittmann et al (2003) relatam que a duplicação do número cromossômico pode afetar o tamanho das células e, conseqüentemente, o tamanho dos órgãos vegetativos. O

aumento da área foliar e do perímetro sugere um efeito positivo da poliploidização no crescimento das plantas, podendo contribuir positivamente para a pecuária sustentável.

De igual forma, a análise estomática revelou um aumento no tamanho dos estômatos nos indivíduos tetraploides impactou na redução no número de estômatos, o que é frequentemente associado a um aumento no número de cromossomos, indicando uma correlação entre a ploidia e a morfologia estomática. Essa característica é frequentemente associada a eventos de poliploidização, como demonstrado por Da Silva et al. (2024) em estudos com *Coffea canephora*

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a viabilidade da indução de poliploidia em *Stylosanthes guianensis* via calo com a utilização de colchicina. Os resultados evidenciam que a exposição a 0,01% de colchicina por 12 horas foi o tratamento mais eficiente na indução de tetraploides, conforme confirmado pelas análises de citometria de fluxo e técnicas citogenéticas. A poliploidização resultou em alterações fenotípicas significativas, incluindo o aumento da área foliar e dos estômatos, características que podem influenciar positivamente a fisiologia e o desempenho agrônômico da espécie.

Estudos adicionais utilizando diferentes concentrações e tempos de exposição à colchicina, bem como a aplicação de outros bloqueadores mitóticos, podem contribuir para o aprimoramento do desempenho e da produção de poliploides em *S. guianensis*.

Este estudo reforça a importância da poliploidização como ferramenta biotecnológica no melhoramento de forrageiras, especialmente para o desenvolvimento de cultivares mais produtivas e com maior resistência a estresses ambientais. A continuidade nesta linha de pesquisa pode contribuir significativamente para os avanços na pecuária sustentável, evitando o uso de substâncias tóxicas para melhorar a produtividade, destruir pragas e etc.

8 REFERÊNCIAS

- AFONSO, Ana et al.** Cytogenetic diversity in the polyploid complex *Linum suffruticosum* sl. (*Linaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 195, n. 2, p. 216-232, 2021.
- AMABILE, Renato Fernando; VILELA, Michelle Souza; PEIXOTO, José Ricardo** (Orgs.). *Melhoramento de plantas: variabilidade genética, ferramentas e mercado*. Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2018. 108 p.
- ANGEL, A.** Comportamento ingestivo e ganância de peso de terneiros pastando em banco de proteínas de *Stylosanthes guianensis* cv. Pucallpa e *Panicum maximim* cv. Mombasa, 2023.
- AVERSANO, R. et al.** Molecular tools for exploring polyploid genomes in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, p. 10316-10335, 2012.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V.** *Melhoramento de Plantas*. Viçosa, MG: Editora UFV, 2005.
- BRAGA, G. J. et al.** Ganho de peso de bovinos nelore em pastagens consorciadas com replantio do estilosantes BRS Bela, 2020.
- CARVALHO, J. M. F. C. et al.** Considerações gerais sobre organogênese. 2006.
- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S.** A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes. *Heredity*, v. 70, p. 515-519, 1993.
- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S.** High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosomes. *Journal of Plant Research*, v. 110, p. 417-420, 1997.
- COSTA, N. M. S.** *Revisão do gênero Stylosanthes Sw.* 2006. Tese (Doutorado) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- DA SILVA ANGELO, Paula Cristina et al.** Avaliação da Orizalina como indutor de alterações na ploidia de *Coffea canephora*. *Brazilian Journal of Development*, v. 10, n. 9, p. e72659, 2024.
- DE PINHO COSTA, Kátia Aparecida et al.** Avaliação do desenvolvimento de nutrientes e absorção pelo *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão sob doses crescentes de calcário em solo do cerrado. *Ciência Animal Brasileira/Brazilian Animal Science*, v. 3, n. 2, p. 13-19, 2002.

DOLEŽEL, Jaroslav; BARTOŠ, J. A. N. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of botany*, v. 95, n. 1, p. 99-110, 2005.

DUSI, D. M. A. et al. Indução de poliploidia em plantas: uma revisão. *Ciência Rural*, v. 33, n. 5, p. 963-970, 2003.

GARCÍA, P. T. et al. An optimized method for flow cytometric ploidy determination of dried leaf specimens of *Urochloa* tropical forage grasses. *Genes*, v. 12, n. 9, p. 957, 2021.

HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J. On Ö. Winge and a prayer: The origins of polyploidy. *The Botanical Review*, v. 41, p. 361-390, 1975.

GUERRA, Marcelo; SOUZA, Maria José de. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto (FUNPEC), 2002. ISBN 85-87528-38-6.

HUSSON, O. et al. *Stylosanthes guianensis*. 2008.

IANICELLI, Jesica et al. A new variety of *Solanum sisymbriifolium* obtained by *in vitro* polyploidization. *Rodriguésia*, v. 75, e01252022, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860202475025>.

IKEUCHI, M.; IWASE, A.; SUGIMOTO, K. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*, v. 25, n. 9, p. 3159-3173, 2013.

ISHIGAKI, G. et al. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and seedlings. *Grassland Science*, v. 55, n. 3, p. 164-170, 2009.

LEHRER, J. M.; BRAND, M. H.; LUBELL, J. D. Induction of tetraploidy in meristematically active seeds of Japanese barberry (*Berberis thunbergii* var. *atropurpurea*) through exposure to colchicine and oryzalin. *Scientia Horticulturae*, v. 119, p. 67-71, 2008.

LOUREIRO, João et al. Dois novos tampões de isolamento nuclear para citometria de fluxo de DNA vegetal: um teste com 37 espécies. *Annals of Botany*, v. 100, n. 4, p. 875-888, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.

PEREIRA, Roselaine Cristina et al. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. *Ciência Rural*, v. 42, p. 1278-1285, 2012.

PHENGSAVANH, Phonepaseuth; STÜR, Werner. O uso e o potencial de suplementar porcos de aldeia com *Stylosanthes guianensis* na República Democrática Popular do Laos. In: Workshop-seminário "Forragens para Porcos e Coelhos", MEKARN-CelAgrid, Phnom Penh, Camboja, 2006. p. 22-24.

RAMOS-HERNÁNDEZ, MR et al. *Stylosanthes guianensis* Sw.(Fabaceae) associado a *Zea mays* L., para uso forrageiro em solo vertisol. 2017.

RANDOLPH, L. F. Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize. *Proceedings of the national academy of sciences*, v. 18, n. 3, p. 222-229, 1932.

RAUF, Saeed et al. Poliploidia induzida: Uma ferramenta para o melhoramento de espécies forrageiras. *Agricultura* , v. 11, n. 3, p. 210, 2021.

SAKODA, K. et al. Maior densidade estomática melhora a indução fotossintética e a produção de biomassa em *Arabidopsis* sob luz flutuante. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.589603>.

SATTLER, Mariana Cansian; CARVALHO, Carlos Roberto; CLARINDO, Wellington Ronildo. A poliploidia e seu papel fundamental no melhoramento de plantas. *Planta* , v. 243, pág. 281-296, 2016.

SILVA, Benedita Aparecida da. *Cultura de tecidos de Stylosanthes guianensis (Aubl.) Sw. Cv. IRI 1022: estudo morfogenético e histológico.* 1992.

SILVA, R. et al. Efeitos de diferentes concentrações de fitormônios na regeneração de *Stylosanthes guianensis*. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 14, n. 4, p. 502-507, 2019.

SOLTIS, D. E.; VISGER, C. J.; SOLTIS, P. S. The polyploidy revolution then...and now: Stebbins revisited. *American Journal of Botany*, v. 101, n. 7, p. 1057-1078, 2014.

Tang YQ, Wu ZY, Liu GD, Xi K X (2009). Research advances in germplasm resources of *Stylosanthes*. (In Chinese). *Chinese Bull. Bot.* 44: 752-762. (In Chinese)

TOMÉ, Livia Gracielle Oliveira et al. Colchicina e orizalina na indução de tetraploides e na anatomia foliar de *Solanum commersonii*. *Ciência Rural*, v. 46, p. 1973-1979, 2016.

DA CUNHA, T. B. et al. Synthetic Tetraploid of *Oncidium crispum* Lodd. (*Orchidaceae*). In: LOYOLA-VARGAS, V.; OCHOA-ALEJO, N. (eds.). *Plant Cell Culture Protocols*. New York: Humana, 2024. (Methods in Molecular Biology, v. 2827). DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3954-2_18.

VARGAS CALLE, D. E.; CHÁVEZ PÁEZ, C. V. Inducción *in vitro* a la poliploidía en *Caucaea pichincha* (*Orchidaceae*), mediante el uso de colchicina. 2024. Documento de trabalho final, Universidad Politécnica Salesiana.

VIEIRA, M. L. C. *Estudo citotaxonômico de espécies brasileiras do gênero Stylosanthes Sw.* 1988. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

WENDEL, Jonathan F. Genome evolution in polyploids. *Plant molecular evolution*, p. 225-249, 2000.

WITTMANN, M. T. S.; DALL'AGNOL, M. Indução de poliploidia no melhoramento de plantas. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, v. 9, n. 1, p. 155-164, 2003.

ZEMEK, O. et al. A contribuição de *Stylosanthes guianensis* para o ciclo do nitrogênio em uma rotação de leguminosas-arroz de baixo insumo sob agricultura de conservação. *Plant and Soil*, v. 425, p. 553-576, 2018.