



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA  
DE SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS**



**IRLANE CRISTINE DE SOUZA ANDRADE LIRA**

**ANÁLISE COMPARATIVA CITOGENÉTICA E MOLECULAR EM  
ACESSOS DE *Stylosanthes* E DE DÉFICIT HÍDRICO EM ACESSOS DE  
*Macroptilium***

**Orientador:** Dr. Ronaldo Simão de Oliveira  
**Coorientadores:** Dra. Rafaela Priscila Antonio  
Dr. Manoel Abílio de Queiroz

**IRLANE CRISTINE DE SOUZA ANDRADE LIRA**

**ANÁLISE COMPARATIVA CITOGENÉTICA E MOLECULAR EM ACESSOS DE  
*Stylosanthes* E DE DÉFICIT HÍDRICO EM ACESSOS DE *Macropitilium***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito para obtenção do título de Doutora em Recursos Genéticos Vegetais.

**Orientador:** Dr. Ronaldo Simão de Oliveira  
**Coorientadores:** Dra. Rafaela Priscila Antonio  
Dr. Manoel Abílio de Queiroz

Feira de Santana – BA  
2022

**BANCA EXAMINADORA**



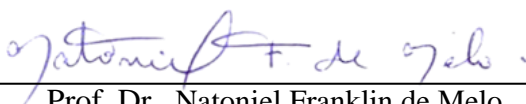
---

Prof. Dr. Welson Lima Simões  
(EMBRAPA Semiárido)



---

Profa. Dra. Lindomar Maria da Silveira  
(UFERSA)



---

Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo  
(UEFS)



---

Profa. Dra. Claudineia Regina Pelacani Cruz  
(UEFS)



---

Prof. Dr. Ronaldo Simão de Oliveira  
(IFBAINO Xique-Xique) Orientador e  
Presidente da Banca

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

L745 Lira, Irlane Cristine de Souza Andrade

Análise comparativa citogenética e molecular em acessos de *Stylosanthes* e de déficit hídrico em acessos de *Macroptilium* / Irlane Cristine de Souza Andrade Lira. – 2022.

95 f.: il.

Orientador: Ronaldo Simão de Oliveira.

Coorientadores: Rafaela Priscila Antonio, Manoel Abílio de Queiroz.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Feira de Santana, 2022.

Renata Aline Souza Silva - Bibliotecária - CRB-5/1702

*À minha Mãe Dona Isnalia (In memoriam) MINHA GUERREIRA, essa vitória é para a senhora, saudade eterna, quanta falta você me faz...*

## AGRADEÇO

À Deus, minha fortaleza, meu refúgio, meu tudo, minha paz, por ter concedido pelos meios que só Ele tem, a graça de entrar no doutorado e perseverar até o fim; e ter me dado ânimo de superar todas as dificuldades que surgiram durante este tempo.

Aos meus familiares, os **Souzas**, os **Andrades** e os **Tavares de Lira**, em especial ao meu esposo **Roberto Tavares de Lira**, ao meu pai **Jorge Coelho de Andrade** e aos meus irmãos **Jorge Cristiano Coelho de Andrade**, **Carlos Eduardo Coelho de Andrade** e **Andersom Luiz Rodrigues de Andrade**, por também terem me dado os sobrinhos mais lindos do mundo, todos vocês são fundamentais na minha vida, obrigada por sempre torcerem por mim.

Inúmeras pessoas contribuíram com este trabalho, seja direta ou indiretamente. De qualquer forma, todas foram fundamentais para o meu desenvolvimento e para a minha formação. A todos agradeço imensamente. Em especial, agradeço: Ao meu orientador **Dr. Ronaldo Simão de Oliveira**. Aos meus coorientadores **Dr<sup>a</sup> Rafaela Priscila Antonio** e **Dr. Manoel Abílio de Queiroz**. Agradeço ainda ao **Dr. Nataniel Franklin de Melo**, **Dr. Welson Lima Simões** e ao **Dr. Pedro Martins Junior**, pelo apoio e incentivo.

As amigas **Carla Maria**, **Yrlânia Guerra**, **Glêyce Oliveira**, **Carla Tatiana**, **Fabiana Américo**, **Ierla Carla** e **Ângela Katiuscia** pelo apoio psicológico e emocional. A **David Sergio**, **Roberta Lane**, **Lourival Neto**, pela imensurável contribuição na realização deste trabalho. Em especial, as minhas grandes incentivadoras **Simone Macedo**, **Jacqueline Aleluia**, **pois** vocês foram presentes de Deus para minha vida, obrigada pelos muitos puxões de orelha quando precisava, nunca passaram a mão na cabeça, nunca me deixando desistir.

À todos os responsáveis técnicos, doutorandos, mestrandos, estagiários e bolsistas da sala de apoio de Melhoramento Genético de Forrageiras (MGF) e do Laboratório de Biotecnologia (LaBiotec), aos demais colegas de turma do Doutorado, ao corpo docente a Coordenação e a secretária do PPGRGV-UEFS e em especial ao nosso eterno secretário **Alberto Vicente Silva**.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) do Semiárido, pela parceria desenvolvida na condução do trabalho, disponibilizando suas instalações e tudo que foi necessário para a realização da pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa e como profissional. Parafraseando Augusto Branco “Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês”.

**MUITO OBRIGADA!**

“Agradeço todas as dificuldades que passei na vida. Elas foram grandes adversárias, mas tornaram minhas vitórias muito mais saborosas.”  
Autor desconhecido.

## ANÁLISE COMPARATIVA CITOGENÉTICA E MOLECULAR EM ACESSOS DE *Stylosanthes* E DE DÉFICIT HÍDRICO EM ACESSOS DE *Macroptilium*

### RESUMO

Este trabalho objetivou caracterizar acessos de leguminosas forrageiras dos gêneros (*Stylosanthes* e *Macroptilium*) com vistas à identificação de materiais com potencial para uso em programas de melhoramento visando alimentação animal. Os acessos do gênero *Stylosanthes* foram avaliados por meio de caracterização citogenética e molecular. Com relação ao gênero *Macroptilium* foi realizado um estudo sobre o efeito do déficit hídrico no desenvolvimento vegetativo desse gênero. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, teste de médias e análise de regressão. Como resultado da caracterização citogenética foram avaliados citogeneticamente 13 acessos de *Stylosanthes* das espécies *S. scabra* e *S. seabrana* identificando o número, a morfologia cromossômica e o padrão de distribuição de heterocromatina visando estudar a variabilidade cariológica em apoio à caracterização das espécies. Foram observados acessos com  $2n=40$  (*S. scabra*) e  $2n=20$  (*S. seabrana*) cromossomos, núcleo interfásico do tipo semirreticulado, cariótipo simétrico com morfologia cromossômica variando de metacêntrica a submetacêntrica e tamanho cromossômico médio em torno de 2,5  $\mu\text{m}$  com diferenças no comprimento médio dos cromossomos e no comprimento total do genoma. A análise com dupla coloração CMA/DAPI permitiu a visualização de dois blocos CMA+ nos acessos de ambas as espécies localizados na região subterminal do braço curto do menor par cromossômico também foi possível a visualização de bandas DAPI+/CMA- em dois dos dez acessos de *S. scabra* (acessos CPAC 1261 e CPAC 5205). Na caracterização molecular foram produzidas 104 bandas polimórficas e apenas quatro monomórficas. Os coeficientes de similaridade calculados a partir do método de Dice (Sorenso - Nei e Li) variaram de um mínimo de 0,06349 e um máximo de 0,70588 de distância. A partir do dendrograma, obtido foi possível separar os acessos em cinco grupos, onde o Grupo 1 foi formado por 14 componentes, o Grupo 2 formado apenas por 1 acesso; O Grupo 3 formado por 3 acessos, o Grupo 4 formado pela cultivar BRS Campo Grande; e o último Grupo 5, formado apenas pela cultivar BRS Bela. Já com relação ao *Macroptilium*, quando submetido ao déficit hídrico, foi observado que os acessos que foram mais tolerantes ao nível de estresse hídrico mais severo (umidade do solo de 25% da CC), inclusive muitas vezes superiores a testemunha CTM-A27, foram os CTM-A15, da espécie *M. atropurpureum*, seguido pelos acessos CTM-A3 e CTM-A54. Já entre os acessos de *M. lathyroides*, os mais tolerantes foram os acessos CTM-L27 e CTM-L7, sendo estes os acessos mais recomendados para utilização em futuros programas de melhoramento da espécie para condições de seca. Os resultados desse estudo permitem inferir que há grande variabilidade dentro do germoplasma dos dois gêneros estudados, o que possibilita sua utilização em programas de seleção e melhoramento genético.

**PALAVRAS-CHAVE:** Leguminosa forrageira. Fabaceae. Estresse hídrico. Análise genética.



## COMPARATIVE CYTOGENETIC AND MOLECULAR ANALYSIS OF *Stylosanthes* ACCESSORIES AND WATER DEFICIT IN *Macroptilium* ACCESSORIES

### ABSTRACT

This work aimed to characterize accessions of forage legumes of the genera (*Stylosanthes* and *Macroptilium*) with a view to identifying materials with potential for use in breeding programs aimed at animal feed. Accessions of the genus *Stylosanthes* were evaluated through cytogenetic and molecular characterization. Regarding the genus *Macroptilium*, a study was carried out on the effect of water deficit on the vegetative development of this genus. The data obtained were subjected to analysis of variance, test of means and regression analysis. As a result of the cytogenetic characterization, 13 *Stylosanthes* accessions of the species *S. scabra* and *S. seabrana* were cytogenetically evaluated, identifying the number, chromosomal morphology and heterochromatin distribution pattern in order to study the karyological variability in support of the characterization of the species. Accessions with  $2n=40$  (*S. scabra*) and  $2n=20$  (*S. seabrana*) chromosomes, semi-reticulated interphase nucleus, symmetrical karyotype with chromosomal morphology ranging from metacentric to submetacentric and mean chromosome size of around  $2.5 \mu\text{m}$  were observed. with differences in mean chromosome length and total genome length. The analysis with double CMA/DAPI staining allowed the visualization of two CMA+ blocks in the accessions of both species located in the subterminal region of the short arm of the smallest chromosome pair, it was also possible to visualize DAPI+/CMA- bands in two of the ten accessions of *S. scabra* (accessions CPAC 1261 and CPAC 5205). In the molecular characterization, 104 polymorphic bands and only four monomorphic bands were produced. The similarity coefficients calculated from the Dice method (Sorenso - Nei and Li) ranged from a minimum of 0.06349 to a maximum of 0.70588 in distance. From the dendrogram obtained, it was possible to separate the accessions into five groups, where Group 1 was formed by 14 components, Group 2 formed by only 1 accession; Group 3 formed by 3 accessions, Group 4 formed by the cultivar BRS Campo Grande; and the last Group 5, formed only by the cultivar BRS Bela. With regard to *Macroptilium*, when subjected to water deficit, it was observed that the accessions that were more tolerant to the most severe water stress level (soil moisture of 25% of CC), even many times higher than the control CTM-A27, were the CTM-A15, of the species *M. atropurpureum*, followed by the accessions CTM-A3 and CTM-A54. Among the *M. lathyroides* accessions, the most tolerant were the accessions CTM-L27 and CTM-L7, these being the most recommended accessions for use in future breeding programs for the species for drought conditions. The results of this study allow inferring that there is great variability within the germplasm of the two genera studied, which enables its use in selection and genetic improvement programs.

**KEYWORDS:** Forage legume. Fabaceae. Hydric stress. Genetic analysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** (A, B) subarbutos eretos, decumbentes ou prostrados, (C-D) forma das espigas em acessos de *Stylosanthes*. 18
- Figura 2** (A, B) flores de *Stylosanthes* com e sem estrias. 18
- Figura 3** (A) *M. atropurpureum*, folhas trifoliadas e folíolos ovais, (B) *M. lathyroides*, folhas trifoliadas e folíolos ovais a lanceolados. 20

### CAPÍTULO 1

- Figura 1** Coloração CMA<sub>3</sub>/DAPI em *Stylosanthes seabrana* com  $2n = 20$ . Acesso CPAC 4966 (“a” e “b”); acesso 4963 (“c” e “d”); acesso 4950 (“e” e “f”). Cabeças de setas indicam a localização de blocos CMA+/DAPI- nas regiões terminais de dois pequenos cromossomos. Barra em “f” representa 5  $\mu$ m. 40
- Figura 2** Coloração CMA<sub>3</sub>/DAPI em *Stylosanthes scabra* com  $2n = 40$ . Acesso CPAC 4394 (“a” e “b”); acesso CPAC 5234 (“c” e “d”); acesso CPAC 1261 (“e” e “f”); acesso CPAC 5205 (“g” e “h”). Cabeças de setas indicam a localização de blocos CMA+/DAPI- em “b, d, f, h” e DAPI+/CMA- em “e, g”. Barra em “h” representa 5  $\mu$ m. 41
- Figura 3** Idiogramas dos acessos de *Stylosanthes seabrana* ( $2n = 20$ ) mostrando o comprimento cromossômico (L), a razão entre braços (AR) e o comprimento cromossômico relativo (RL) e bandas CMA+ em amarelo. CO = ordenamento dos pares cromossômicos. 44
- Figura 4** Idiogramas dos acessos CPAC 397, CPAC 564 e CPAC 1244 de *Stylosanthes scabra* ( $2n = 40$ ) mostrando o comprimento cromossômico (L), a razão entre braços (AR) e o comprimento cromossômico relativo (RL) e bandas CMA+ em amarelo. CO = ordenamento dos pares cromossômicos. 46
- Figura 5** Idiogramas dos acessos CPAC 1261, CPAC 4947 e CPAC 5114 de *Stylosanthes scabra* ( $2n = 40$ ) mostrando o comprimento cromossômico (L), a razão entre braços (AR) e o comprimento cromossômico relativo (RL) e bandas DAPI+ em azul e CMA+ em amarelo. CO = ordenamento dos pares cromossômicos. 47
- Figura 6** Idiogramas dos acessos CPAC 5196, CPAC 5205 e CPAC 5228 de *Stylosanthes scabra* ( $2n = 40$ ) mostrando o comprimento cromossômico (L), a razão entre braços (AR) e o comprimento cromossômico relativo (RL) e bandas DAPI+ em azul e CMA+ em amarelo. CO = ordenamento dos pares cromossômicos. 48
- Figura 7** Idiograma do acesso CPAC 5234 de *Stylosanthes scabra* ( $2n = 40$ ) 49

mostrando o comprimento cromossômico (L), a razão entre braços (AR) e o comprimento cromossômico relativo (RL) e bandas CMA+ em amarelo. CO = ordenamento dos pares cromossômicos.

## CAPÍTULO 2

- Figura 1** Polimorfismo em gel agarose com três primers e quatro acessos de *Stylosanthes* spp. M: Marcador 50 pares de base (Cellco). 64
- Figura 2** Dendrograma obtido pelo método UPGMA com dados de dissimilaridade genética a partir do método de Dice (Sorenso - Nei e Li) entre os acessos de *Stylosanthes*. 69

## CAPÍTULO 3

- Figura 1** (A)Dados de temperaturas do ar máxima (Ta max), média (Ta méd) e mínima (Ta min) e (B) umidade relativa do ar máxima (Ur max), média (Ur med) e mínima (Ur min) durante o experimento (dezembro de 2018 a março de 2019), durante os dois cortes da cultura. 81
- Figura 2** Determinação do teor de água no solo utilizando o equipamento Time Domain Reflectometry (reflectometria no domínio de tempo, TDR 100). 81
- Figura 3** Características avaliadas em acessos de *Macroptilium*, sendo A - largura do lóbulo central e B - comprimento do lóbulo central. 82
- Figura 4** Sintoma visual do efeito do déficit hídrico no desenvolvimento vegetativo do acesso CTM-L22 (*M. lathyroides*) submetido aos níveis de umidade no solo de 1; 2; 3 e 4, sendo 25; 50; 75 e 100% da capacidade de campo, respectivamente, ao fim do experimento. 91

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1** Lista com dados de coleta dos acessos de *Stylosanthes scabra* Vogel e *S. seabrana* B.L. Maass & L. 't Mannetje estudados no presente trabalho. **37**
- Tabela 2** Número cromossômico (NC), comprimento cromossômico médio (mCL), fórmula cariotípica (FC), comprimento cromossômico haploide total (TCL) de acessos de *Stylosanthes* analisados em metáfases mitóticas. **39**

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1** Origem dos acessos do gênero *Stylosanthes* utilizados na estimativa da diversidade, por meio de marcador molecular. **62**
- Tabela 2** Sequência de *primers* ISSR e SSR utilizados no trabalho com *Stylosanthes* e suas respectivas temperaturas de anelamento. Ta= temperatura de anelamento, pb= pares de bases, AF= amplitude de fragmentos gerados, NA= Não amplificaram. **63**
- Tabela 3** Matriz de similaridades obtida com base no coeficiente de Jaccard entre os 17 acessos de *Stylosanthes* estudados, e duas cultivares, baseada em marcadores ISSR/SSR. **67**

### CAPÍTULO 3

- Tabela 1** Acessos do gênero *Macroptilium* avaliados para tolerância ao estresse hídrico. **80**
- Tabela 2** Largura do lóbulo central das folhas em dois cortes da parte aérea de genótipos de *Macroptilium*, cultivados sobre diferentes níveis de umidade do solo. **83**
- Tabela 3** Comprimento do lóbulo central das folhas em dois cortes da parte aérea de genótipos de *Macroptilium*, cultivados sobre diferentes níveis de umidade do solo. **85**
- Tabela 4** Número de folhas por planta (NFP) em dois cortes da parte aérea de genótipos de *Macroptilium*, cultivados sobre diferentes níveis de umidade do solo. **86**
- Tabela 5** Altura da planta (AP) em dois cortes da parte aérea de genótipos de *Macroptilium*, cultivados sobre diferentes níveis de umidade do solo. **87**
- Tabela 6** Matéria seca da planta (MSP) em dois cortes da parte aérea de genótipos de *Macroptilium*, cultivados sobre diferentes níveis de umidade do solo. **89**

## Sumário

INTRODUÇÃO GERAL .....	14
REVISÃO DE LITERATURA .....	16
Leguminosas e seu potencial forrageiro .....	16
O gênero <i>Stylosanthes</i> .....	17
O gênero <i>Macroptilium</i> .....	19
Caracterização citogenética .....	20
Marcadores moleculares no melhoramento genético de forrageira .....	22
Déficit hídrico .....	23
Referências .....	25
CAPÍTULO 1 - CARIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DA HETEROCROMATINA EM ACESSOS DE <i>Stylosanthes scabra</i> e <i>Stylosanthes seabrana</i> .....	32
1.1 Introdução .....	35
1.2 Material e Métodos .....	37
1.3 Resultados e Discussão .....	39
1.4 Conclusão .....	51
1.5 Referências .....	52
CAPÍTULO 2 - ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE <i>Stylosanthes</i> POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES ISSR E SSR. ....	56
2.1 Introdução .....	59
2.2 Material e Métodos .....	61
2.3 Resultados e Discussão .....	65
2.4 Conclusão .....	70
2.5 Referências .....	71
CAPÍTULO 3 - TOLERÂNCIA DE GERMOPLASMA DE <i>Macroptilium</i> AO DÉFICIT HÍDRICO .....	74
3.1 Introdução .....	77
3.2 Material e Métodos .....	79
3.3 Resultados e Discussão .....	82
3.4 Conclusão .....	91
3.5 Referências .....	92
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	94

## INTRODUÇÃO GERAL

É de suma importância desenvolver cultivares para alimentação animal voltadas para a região semiárida, que sofre com escassez de alimento para o rebanho local devido aos períodos longos de estiagens. Segundo dados do IBGE (2021), em 2020 o Nordeste brasileiro é o detentor do maior efetivo de caprinos, bovinos e ovinos do Brasil, destacando-se os estados da Bahia e de Pernambuco, que possuem seus rebanhos quase que exclusivamente em áreas de caatinga. Ainda segundo dados do IBGE (2021), ao se comparar estes dados com os de anos anteriores, pode-se observar uma diminuição nos rebanhos, destacando-se que isso provavelmente ocorreu devido o período intenso de seca, o que diminuiu drasticamente a oferta de alimentos para esses rebanhos levando muitos a morte.

Entre as famílias de importância forrageira mais utilizadas na alimentação animal na Caatinga, estão as famílias das leguminosas, dentre as quais destacam-se as leguminosas do gênero *Stylosanthes* e *Macroptilium*, pois compõem grande parte da dieta de ruminantes, especialmente no período de seca. Isso se deve ao fato dessas leguminosas apresentarem características nutritivas favoráveis às exigências nutricionais dos rebanhos, boa adaptação às condições climáticas da região semiárida. Associado a isso, são excelentes fontes de proteína para o animal em tempos de escassez. Devido a importância dos dois gêneros, para caracteres de tolerância a seca e a qualidade nutricional de forragem, torna-se essencial a geração de informações, por meio de estudos de caracterização e de seleção de material promissor para uso potencial nos programas de melhoramento genético vegetal fortalecendo os sistemas de produção de forrageiras para a região semiárida (CÓRDULA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2014; AMORIM et al., 2016).

No Brasil, nos últimos 10 anos, houve um crescimento das iniciativas para estabelecimento destes programas de melhoramento genético. Como primeira etapa, se faz o estudo da variabilidade genética existente. Com as espécies dos gêneros *Stylosanthes* e *Macroptilium*, podem ser citados os trabalhos de pesquisa realizados com *Stylosanthes* por Américo (2015), Oliveira (2015), Oliveira et al. (2016), Franco (2017), Vanni (2017), Marques et al. (2018), Franco et al. (2020), Gonçalves Neto (2021), Jesus (2021), Silva (2021) e Américo et al. (2022). E com *Macroptilium* podendo ser citados os estudos desenvolvidos por Araújo et al. (2014), Jones (2014), Borges (2017) e Lima et al. (2018).

Apesar da importância desses estudos para acessar a variabilidade existente nos gêneros *Stylosanthes* e *Macroptilium*, que sem dúvida trouxeram uma gama de conhecimento sobre as

espécies abordadas nesta linha de trabalho é essencial a realização de estudos continuados e mais aprofundados, como forma de agregar conhecimentos para o desenvolvimento de culturas voltadas para o Semiárido brasileiro dando continuidade a esses trabalhos que já vem sendo desenvolvidos, visando a otimização e a utilização dessa variabilidade na alimentação animal, possibilitando ao melhorista escolher genótipos com características de interesse, seja essa característica agronômica, molecular ou citogenética (CHISTÉ et al., 2010; ANTONIO, 2015; FRANCO, 2017; SOARES et al., 2017).

Dessa forma, o objetivo desta pesquisa foi realizar uma análise comparativa, utilizando técnicas de citogenética e de marcadores moleculares, entre acessos de *Stylosanthes* e da tolerância ao déficit hídrico em acessos de *Macroptilium*.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Leguminosas e seu potencial forrageiro

As famílias Gramineae e Leguminosae apresentam as espécies forrageiras mais utilizadas nas pastagens brasileiras. As leguminosas pertencem a uma das três maiores famílias de plantas forrageiras da caatinga. A família Leguminosae é o grupo de plantas mais bem representado neste bioma, sendo uma das maiores entre as dicotiledôneas, incluindo aproximadamente cerca de 20 mil espécies e 770 gêneros, dos quais 31 são endêmicos, estando representada em todos os biomas brasileiros principalmente na caatinga, sendo o grupo mais importante economicamente (COSTA, 2006; LEWIS et al., 2005; JUDD et al., 2009; LIMA et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2011).

Segundo Pereira et al. (2018), existem poucas leguminosas resistentes ao pastejo, sendo de extrema importância, a identificação de plantas que apresentem elevada resistência. Para tanto, se faz necessário o desenvolvimento de estudos que visem identificar formas de melhorar o manejo, buscando agregar resistência e definindo estratégias para identificação de outras formas de utilização das leguminosas com potencial produtivo, como a utilização para produção de feno ou silagem. Assim, para maximizar o potencial de produção forrageira e conseqüentemente a produção animal, pode-se selecionar plantas adaptadas ao ambiente por meio do melhoramento genético ou provocar uma mudança parcial no ambiente (ARAÚJO et al., 2014).

Os estudos relacionados as leguminosas forrageiras vêm aumentando gradativamente nos últimos anos, devido a sua importância econômica, destacando-se pesquisas que utilizam ferramentas como: o uso de marcadores moleculares no estudo de cruzamentos, genotipagem, indução de poliploidias e análises citogenéticas, sendo essas algumas das linhas de pesquisas que contribuem para a ampliação do conhecimento sobre a espécie como forma de promover a melhor utilização dos recursos genéticos, principalmente em leguminosas dos gêneros *Stylosanthes* e *Macroptilium*, que são ótimas fontes de proteína para a alimentação animal em épocas de grande escassez de água (FRANCO, 2017). Uma das grandes utilidades da família das leguminosas é fornecer recursos forrageiros, principalmente durante a seca no Semiárido brasileiro (QUEIROZ, 2009). A família das leguminosas por se destacarem entre as famílias de maior importância forrageira na caatinga, apresentam grande potencial nutritivo para os animais, e são em sua maioria adaptadas às condições edafoclimáticas da região semiárida (COSTA, 2011).

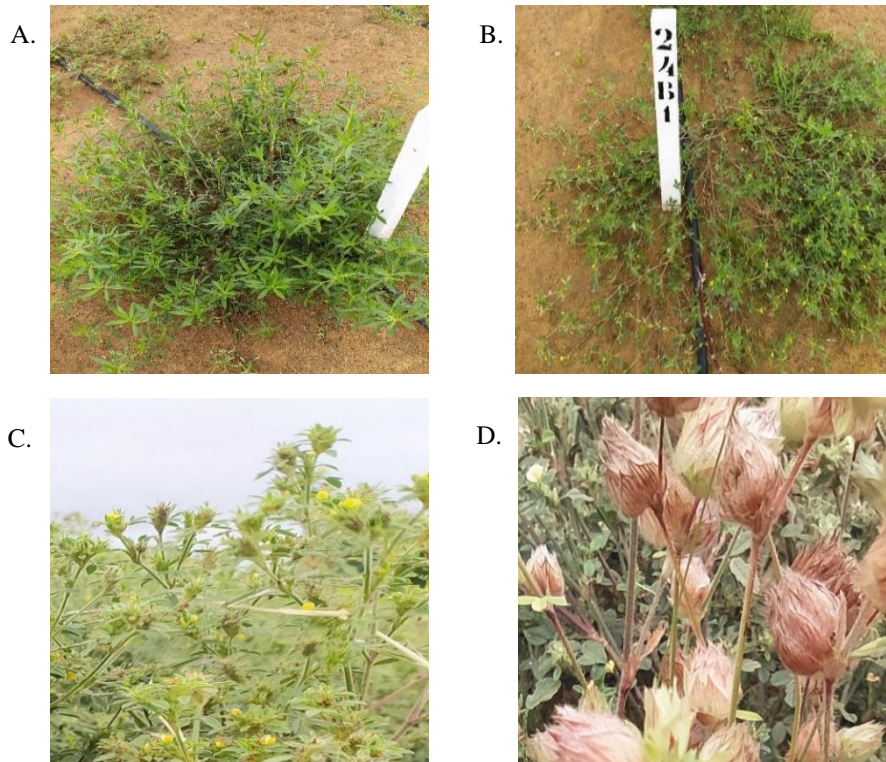


Apesar da grande riqueza de espécies leguminosas presentes nos bancos de germoplasma, o potencial forrageiro de muitos grupos ainda não foi completamente realizado, o que vai depender da intensificação das pesquisas nessa área. Em diversas unidades da Embrapa existem bancos de germoplasma de leguminosas forrageiras, nesses bancos estão depositados mais de 6000 acessos distribuídos em 47 gêneros, onde se pode destacar espécies dos gêneros, *Stylosanthes* (30%), *Centrosema* (12%), *Zornia* (10%), *Arachis* (9%), *Desmodium* (6%) e *Aeschynomene* (6%), por possuírem o maior número de amostras depositadas nesses bancos. Portanto, se faz extremamente necessário a caracterização deste germoplasma através de estudos sobre a diversidade genética nas coleções de germoplasma, que podem ser realizados a partir do emprego de descritores fenotípicos (morfológicos e agronômicos), genéticos (moleculares e citogenéticos) e bioquímicos (Bromatológicos).

### **O gênero *Stylosanthes***

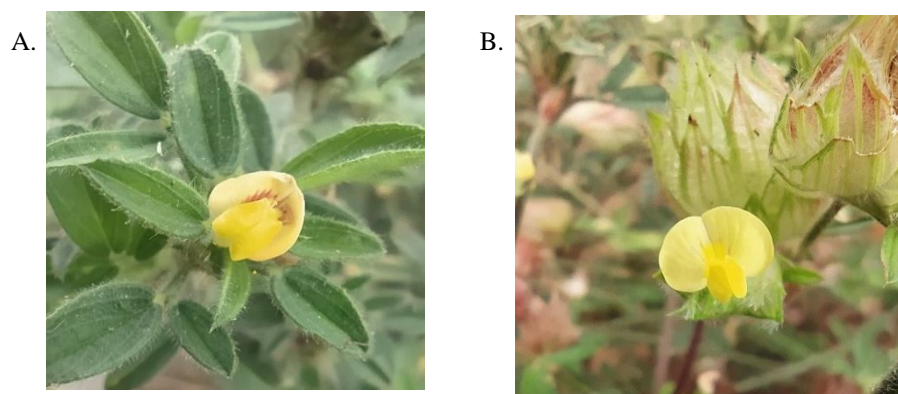
As espécies do gênero *Stylosanthes* pertencem à família Fabaceae (POLHILL; RAVEN, 1981). Apresentam de modo geral, grande variabilidade, tanto intra como interespecífica e são plantas perenes, havendo apenas uma espécie anual *S. humilis* (COSTA, 2006). O gênero foi descrito pela primeira vez em 1788 por O. Swartz, onde apresentava apenas duas espécies, *S. procumbens* Sw. (= *S. hamata* (L.) Taubert) e *S. viscosa* Sw. Atualmente o gênero possui cerca de 50 espécies descritas, com 44 delas ocorrentes nas Américas.

Este gênero está amplamente distribuído em todo território nacional, onde no Brasil já foram catalogadas 31 espécies, 16 só no Estado da Bahia, onde 13 delas são endêmicas (COSTA; VALLS, 2010; SANTOS-GARCIA *et al.*, 2011) e podem ser encontrados em quase todos os estados das regiões Norte; Nordeste; Centro-Oeste; Sudeste e Sul (GISSI, 2020). Stace e Edye (1984) já relatavam que em vários países já era utilizado o gênero *Stylosanthes* em pastagens em virtude de suas espécies apresentarem alta produção de massa verde e alto valor nutricional. As plantas do gênero *Stylosanthes* são subarbustos eretos, decumbentes ou prostrados, perenes, raramente anuais, com ou sem xilopódio, possuem ramos pilosos, pubescentes, setosos, raramente glabros, viscosos ou não, com folhas alternas, trifoliadas; estípulas amplexicaules, bidentadas; pecíolo canaliculado, nervura marginal presente ou ausente (Figura 1A; B). Suas inflorescências são espiciformes formadas por uma ou várias espigas, globosas, capituliformes, cônicas ou cupuliformes, axilares ou terminais e pedunculadas (Figura 1C; D) (GISSI, 2020).



**Figura 1** - (A, B) subarbustos eretos, decumbentes ou prostrados, (C-D) forma das espigas em acessos de *Stylosanthes*.

Ainda segundo Gissi (2020), o gênero possui flores com uma bractéola externa e uma ou duas bractéolas internas, cálice campanulado, lobado com ápices emarginados a obtusos, corola amarela, raramente creme com guias de néctar vináceos, anteras dorsifixas, basifixas e oblongas nos cinco maiores, ovário biovulado, estilete alongado, persistente no fruto, os lomentos com um ou dois artículos, artículos com rostro helicoidal, uncinado, ou rudimentar, glabros ou indumentados; reticulados, e sementes negras, castanhas, amareladas, maculadas ou não, com ou sem estrias (Figura 2 A-B).



**Figura 2** - (A, B) flores de *Stylosanthes* com e sem estrias.

No intuito de ampliar o BGF- UEFS, Santana (2010) e Oliveira (2016) realizaram várias expedições de coleta de germoplasma em regiões do Semiárido e constataram uma grande ocorrência de populações naturais de espécies pertencentes ao gênero *Stylosanthes*. Ao todo foram realizados o resgate de 355 acessos em cinco mesorregiões da Bahia. Segundo Oliveira e Queiroz (2016) desses acessos que estão no BGF-UEFS, muitas espécies já foram catalogadas, onde as espécies que apresentaram maior número de exsicatas foram, *S. scabra* e *S. viscosa*, seguida de *S. scabra*, *S. humilis*, *S. capitata* e *S. viscosa*.

Os materiais das últimas coletas encontram-se em fase de identificação, o que indica que possivelmente o número de espécies ocorrentes no estado da Bahia irá aumentar. Já a Embrapa Semiárido possui uma coleção de trabalho de *Stylosanthes*, com cerca de 20 acessos, esses acessos são mantidos em câmara fria em forma de sementes, com intuito de desenvolver futuras pesquisas voltadas para a região semiárida.

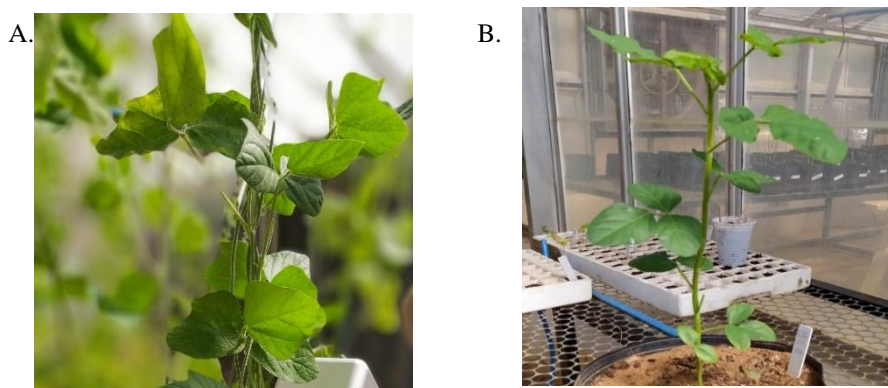
### **O gênero *Macroptilium***

Dentre os gêneros de ocorrência espontânea, com grande frequência nas áreas semiáridas de Pernambuco e Bahia, como em outros estados do Nordeste do Brasil, destaca-se o gênero *Macroptilium*, que pertence à família das leguminosas herbáceas com cerca de 20 espécies atualmente aceitas, sendo sete delas utilizadas como forragem e adubo verde, tendo com preferência por habitat abertos, com climas secos e algumas se comportam como plantas colonizadoras ou invasoras (MATOS; ARTILES, 2005; CARDOSO, 2008). A Embrapa Semiárido conta com uma coleção de trabalho de *Macroptilium* (CTM) com aproximadamente 109 acessos do gênero compostos por três espécies (*M. atropurpureum*, *M. lathyroides* e *M. martii*), que estão disponíveis para realização de estudos sobre o gênero, voltados para o semiárido.

O gênero apresenta o México como seu principal centro de diversidade na América do Norte apresentando 12 táxons, seguido pelo Brasil e o Paraguai, na América do Sul que juntos apresentam 12 táxons, sendo este gênero distribuído em quase todo território brasileiro. O Chile é o único país da América do Sul onde não se encontram ocorrência de espécies do gênero *Macroptilium* (ESPERT; BURGHARDT, 2010). Plantas desse gênero podem ser consumidas em pastejo direto e na forma de feno, pois apresentam características nutritivas importantes na alimentação dos rebanhos. As principais espécies de *Macroptilium* que ocorrem no Nordeste brasileiro são: *M. martii* (Benth), *M. lathyroides* (L. Urb) e *M. atropurpureum* (Urb.). A mais conceituada cultivar originada de esforços dos cientistas, foi a cv. Siratro (*M. atropurpureum*),

lançada em 1960 e proveniente de melhoramento genético a partir de germoplasma selvagem, cuja espécie não havia sido domesticada ou utilizada comercialmente (SNACK et al., 2020).

O *M. atropurpureum* é uma leguminosa tropical perene, seus caules são peludos, com raízes que atingem 5 m de profundidade e muitas vezes são mais largas que 5 mm de diâmetro. As folhas são trifoliadas pinadas, verde-escuras, mais peludas na face inferior do que na superior, os folíolos são ovais, 2 -7 cm de comprimento x 1,5-5 cm de comprimento (Figura 3A) (HEUZÉ, 2015). Já a espécie *M. lathyroides* é uma herbácea anual ou perene de vida curta, ereta, de 0,6 - 1 m de altura, folhas trifoliadas; folíolos na maior parte inteiros, ovais a lanceolados, ou estreitamente elípticos, possui de 3 - 8 cm de comprimento e 1 - 3,5 cm de largura (Figura 3B).



**Figura 3** - (A) *M. atropurpureum*, folhas trifoliadas e folíolos ovais, (B) *M. lathyroides*, folhas trifoliadas e folíolos ovais a lanceolados.

### Caracterização citogenética

O uso de técnicas citogenéticas vem sendo utilizadas como um importante instrumento na taxonomia vegetal, para a compreensão das relações de parentesco e dos mecanismos de evolução das espécies, pois contribui para o melhoramento de plantas permitindo identificar alterações cromossômicas, realizar estudos relacionados à transferência de alelos em espécies nativas e cultivadas, como ainda analisar a origem e a construção poliploide das espécies (RASKINA et al., 2008; SOLTIS; SOLTIS, 2009; REIS et al., 2014; PINTO et al., 2016). Cromossomos são unidades herdáveis do material genético dos eucariotos, sendo cada um deles uma única molécula de DNA. A combinação de coloração com fluorocromos com métodos comparativos filogenéticos constitui-se em uma importante ferramenta para reconstruir a evolução detalhada do cariótipo (GUERRA, 2012; VAN-LUME et al., 2017; ASHE et al., 2021).

Números cromossômicos têm comprovado valor nas revisões e na melhoria da classificação de espécies de Fabaceae, além de auxiliar no entendimento da evolução da família. Esses números são constantes em muitos gêneros e mesmo dentro de algumas tribos, mas, quando usados em conjunto com outros dados, têm mostrado maiores evidências nas relações de parentesco entre determinadas espécies. Caracteres citológicos, tais como número e morfologia dos cromossomos mitóticos podem contribuir para o conhecimento da evolução e das relações entre diferentes populações e espécies (GOLDBLATT, 1981; MORAES et al., 2012; SOUZA et al., 2012).

A citogenética tem um importante papel nos programas de pré-melhoramento e melhoramento genético de plantas, pois só através dos estudos citogenéticos é possível determinar o número cromossômico, nível de ploidia, comportamento cromossômico na meiose e na mitose, dando auxílio na identificação de materiais que possam ser utilizados em cruzamentos dirigidos, durante o processo de pré-melhoramento. Esta técnica vem sendo utilizada de forma estratégica na obtenção de dados que visam subsidiar os pesquisadores melhoristas, levando os mesmos a obterem um maior número de informações sobre o objeto estudado.

Uma caracterização citogenética realizada de forma detalhada permite o estabelecimento de parentesco, como ainda, a identificação de alterações tanto numéricas como estruturais dos cromossomos, podendo-se fazer a correlação fenotípica com essas informações, é possível também utilizar esses dados em prováveis cruzamentos e retrocruzamentos, o que leva a minimização dos possíveis erros de seleção de progênies (GUERRA; SOUZA, 2002; DAVIDE et al., 2009; MELO, 2009).

O parâmetro citogenético mais amplamente utilizado em vegetais tem sido a variação no número cromossômico (GUERRA, 1988). Os estudos referentes à citogenética do gênero *Stylosanthes*, relatam a ocorrência de espécies diploides ( $2n=20$ ), como *S. guianensis*, *S. hippocampoides*, *S. humilis*, *S. seabrana* e *S. gracilis*; espécies alotetraploides ( $2n=40$ ), como *S. capitata*, *S. fruticosa* e *S. scabra*; além de um representante alohexaploide ( $2n=60$ ), *S. erecta* (STACE; CAMERON, 1984; VIEIRA, 1988).

A análise cromossômica pode ser realizada por várias técnicas, sendo a com fluorocromos a utilizada no processo de confirmação, pois possibilita uma análise mais detalhada com fluorocromos CMA<sub>3</sub> (cromomicina A<sub>3</sub>) e DAPI (4''-6''diamidino-2-10-fenilindol), evidenciando regiões heterocromáticas ricas em bases GC e AT, respectivamente. As regiões heterocromáticas são formas de cromatina densamente compactada encontradas no núcleo das células eucarióticas, por ser uma estrutura condensada que não permite que DNA e RNA

polimerases acessem o DNA, pois ela impede a replicação e transcrição do DNA. A caracterização dessas regiões auxilia na diferenciação dos cariótipos que possuem números estáveis de cromossomos (CORDEIRO et al., 2020).

Existem ainda regiões que funcionam como marcadores cromossômicos que permitem a confirmação dos cruzamentos nos híbridos e são conhecidas como regiões satélites ou RONS (Regiões Organizadoras de Nucléolos) (MELO et al., 2001, EMILIANO et al., 2022). Bolsheva et al., (2015) ao utilizar a técnica de bandeamento com fluorocromos em espécies do gênero *Linum* encontraram grande variação no número cromossômico ( $2n=16, 18, 20, 26, 28, 30, 32, 36, 42, 72, 84$ ) indicando que as alterações cromossômicas têm um importante papel na especiação. Outros gêneros dentro da família da leguminosas vem sendo submetidos a caracterização citogenética levando ao conhecimento dos aspectos genômicos diferenciados em cada espécie (PUCIARELLO et al., 2013; BAZIZ et al., 2014; SHE et al., 2015).

### **Marcadores moleculares no melhoramento genético de forrageira**

O uso de marcadores moleculares permite que a seleção e novos cruzamentos sejam realizados em uma mesma geração, o que aumenta consideravelmente a eficiência de um programa de melhoramento. Os marcadores podem ser usados mesmo que não tenham sido mapeados, a uma região cromossômica ou a um fenótipo, desde que possam ser seguidos em gerações posteriores podendo assim, comprovar sua natureza genética (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998).

Ferreira e Grattapaglia (1998) afirmam ainda que os marcadores moleculares proporcionam ao pesquisador uma grande informação de dados, que junto com os dados fenotípicos, auxiliam nos resultados em programas de melhoramento, podendo ser no planejamento de cruzamentos, no agrupamento de genótipos ou na identificação de híbridos.

Marcadores moleculares são sequências de DNA, que são herdadas geneticamente e diferenciam dois ou mais indivíduos (BRONDANI et al., 2002). Baseado no conceito de marcadores moleculares, a etapa seguinte da escolha, deve ser fundamentada em vários critérios e objetivos da pesquisa, a escolha do marcador molecular tem que ser feita levando em consideração a facilidade do desenvolvimento da técnica na avaliação, interpretação e análise dos dados.

Para se realizar a detecção desse polimorfismo com marcadores moleculares, é necessário a aplicação de metodologias, que permitam que os fragmentos amplificados sejam separados de acordo com o seu tamanho molecular como é o caso da eletroforese em gel, que é baseada

no movimento de moléculas através de uma matriz sólida que funciona como um filtro onde as moléculas serão separadas de acordo com o tamanho e a carga elétrica que apresenta (CAIXETA et al., 2013).

Os marcadores moleculares do tipo ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) são marcadores dominantes bastante utilizados quando o objetivo é identificar os polimorfismos das culturas, pois permitem uma rápida identificação de variabilidades intra e interespecíficas. Nagaich (2009) em estudos de diversidade com 63 espécies do gênero *Stylosanthes* utilizando três diferentes marcadores moleculares, o marcador ISSR foi o que rendeu a maior porcentagem de bandas polimórficas e a menor probabilidade média de confusão, gerando 43 fragmentos, 17 bandas únicas, sendo indicados para caracterização da diversidade entre acessos.

Já os marcadores microssatélites do tipo SSR (simple sequence repeats) apresentam sequências repetidas em serie de 2-5 nucleotídeos, possuem alto polimorfismo, são codominantes característica que evidencia a separação entre homozigotos e heterozigoto para um determinado loco (RISTERUCCI et al., 2010; DANTAS et al., 2012).

## **Déficit hídrico**

O sexto relatório do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) realizado em 2022, traça um cenário preocupante, onde afirma que as mudanças climáticas (MC) já afetam todas as partes do mundo, com o aquecimento atual de 1,1°C, ampliando o cenário de secas devastadoras e calor extremo em várias partes do mundo, e que já ameaçam a segurança alimentar e os meios de subsistência de milhões de pessoas. Estimasse ainda que, nas próximas décadas, cerca de 32 a 132 milhões de pessoas irão entrar na linha da pobreza extrema devido à escassez de alimento, pois as MC, também estão afetando espécies e ecossistemas inteiros levando muitas espécies vegetais e animais a extinção (LEVIN et al., 2022).

A previsão dos pesquisadores frente ao cenário de MC, coloca a Caatinga como uma das regiões mais afetadas, podendo chegar a sofrer uma redução em suas chuvas de até 40%, acarretando grandes impactos em vários setores, pois essa mudança tende a aumentar a magnitude dos eventos climáticos, como a seca, tornando o Semiárido brasileiro a região mais afetada (LETRAS AMBIENTAIS, 2017). Cabe destacar que a Caatinga ocupa uma área total de 862.818 km<sup>2</sup> cerca de 10% do território nacional, com baixos índices pluviométricos e longos períodos de seca, que duram de seis a 11 meses, sendo este o único bioma exclusivamente brasileiro, possuindo vegetação adaptada as condições do semiárido. Cerca de 27 milhões de

peças vivem na área original da Caatinga, grande parte dependente dos recursos da biodiversidade local para a sua sobrevivência (MORO et al., 2016).

Em plantas forrageiras, o efeito da deficiência hídrica é complexo, pois possuem diversos processos adaptativos dentro de cada grupo ecofisiológico, o que permite tolerarem a escassez de água (NOGUEIRA et al., 2005). Pois a resposta da planta ao déficit hídrico pode ser diretamente influenciada por fatores como tempo, intensidade, frequência e das condições climáticas da região (SAINT PIERRE et al., 2012, DRIEVER; KROMDIJK 2013).

A correta identificação de materiais tolerantes à escassez de água no solo, se inicia através de técnicas precisas que ajudam a determinar o teor de água no solo. essa metodologia pode ser realizada através do uso de tecnologias para determinar esta característica física de forma automatizada. Pode-se encontrar no mercado, vários aparelhos que medem o teor de água existente no solo como por exemplo, a técnica que recebe o nome de TDR (Time Domain Reflectometry) ou Reflectometria por Domínio do Tempo que avalia a obtenção da constante dielétrica relativa do solo. Uma das vantagens dessa técnica se dá pela sua capacidade de medir o valor da constante dielétrica relativa do solo e como consequência medir a quantidade de água no solo, uma vez que a constante dielétrica é proporcional à quantidade de água no solo (BATISTA, 2004).

Pesquisas que envolvam o conhecimento da constituição genética das espécies, tanto no âmbito molecular quanto citogenético, são de fundamental importância pois fornecem informações relevantes para futuros estudos com a espécie levando ao conhecimento da diversidade existente, também é de imprescindível a realização de estudos que visam identificar genótipos que tenham seu desenvolvimento menos afetados pelo aumento do déficit hídrico, pois a busca por genótipos mais adaptados, é crucial para enfrentar desafios futuros principalmente relacionados as mudanças climáticas e a escassez de água.



## Referências

- ALENCAR, C. A. B. et al. Bromatologia e digestibilidade de gramíneas manejadas por corte submetidas à adubações nitrogenadas e estações anuais. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, 8-15p. 2014.
- AMÉRICO, F. K. A. **Germinação e armazenamento de sementes de *Stylosanthes* sw. em diferentes ambientes**. 2015. 60 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). UEFS. Feira de Santana, Bahia.
- AMÉRICO, F. K. A. et al. *Stylosanthes scabra*: genetic variability of forage quality traits. **Genetic Resources** (2022), 3 (5), 24–35. 2022.
- AMORIM, L. D. M. D. et al. Fabaceae at National Forest (FLONA) of Assú, potiguar semiarid, Brazilian northeastern Louise. **Rodriguésia**, v. 67, n. 1, p. 105-124, 2016.
- ANTONIO, R. P. **Espécies forrageiras: principais contribuições, estado atual e perspectivas para a pesquisa na Embrapa Semiárido**. Documentos, 269 - Embrapa Semiárido. 27 p. 2015.
- ARAÚJO, A. M. S. et al. Caracterização morfométrica e germinação de sementes de *Macroptilium martii* Benth. (Fabaceae). **Revista Caatinga**, v. 27, n. 3, p. 124-131, 2014.
- ASHE, A.; COLOT, V.; OLDROYD, B. P. How does epigenetics influence the course of evolution? **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 376, n. 1826, p. 20200111, 2021.
- BAZIZ, K. et al. First karyotype analysis, physical rDNA mapping, and genome size assessment in four North African *Astragalus* taxa (Fabaceae). **Turkish Journal of Botany**, v. 38, p. 1248-1258, 2014.
- BISPO, S. V. et al. Spineless cactus in replacement of elephant grass hay. Effect on intake, apparent digestibility and ruminal fermentation characteristics in sheep. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.1902-1909, 2007.
- BOLSHEVA, N. L. et al. The Diversity of Karyotypes and Genomes within Section Syllinum of the Genus *Linum* (Linaceae) Revealed by Molecular Cytogenetic Markers and RAPD Analysis. **PLoS ONE**, v. 10, n.4, 2015.
- BORGES, R. O., **Caracterização morfoagrônoma e químico-bromatológica de acessos do gênero *Macroptilium***. 2017. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciencia Animal) UNIVASF. Petrolina, Pernambuco.
- BOYER, J. S. Plant productivity and environment. **Science**, Washington, D.C., v. 218, p. 443-448, 1982.
- BRONDANI, R.P.V., BRONDANI, C., GRATTAPAGLIA, D., Towards a genus-wide reference linkage map for Eucalyptus based exclusively on highly informative microsatellite markers. **Molecular Genetics and Genomics**. n. 267. p. 338-347, 2002.

BÜRLING, K. et al. Fluorescencebased sensing of drought-induced stress in the vegetative phase of four contrasting wheat genotypes. **Environmental and Experimental Botany** n. 89, p. 51-59. 2013.

CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L. F. V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Org.) **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. 1 ed. Visconde do Rio Brando: Suprema, 2013. p. 31-68.

CARDOSO, D. B. O. S. **Taxonomia da tribo Sophoreae. I.** (Leguminosae, Papilionoideae) **na Bahia, Brasil**. 2008. 209 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – UEFS. Feira de Santana, Bahia.

CAVALCANTE, T. B. Coleta de germoplasma vegetal, atualização e o impacto de novas tecnologias. In: VEIGA, R. F. de A.; QUEIRÓZ, M. A. de. (Org.). **Recursos fitogenéticos: a base da agricultura sustentável no Brasil**. 631ed. Viçosa: UFV, 2015, p. 77-85.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA J. Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 239-264, 2003.

CHISTÉ, R. C. et al. Quantificação de cianeto total nas etapas de processamento das farinhas de mandioca dos grupos seca e d'água. **Acta Amazônica**, v. 40, p.221-226, 2010.

CLEMENTS R. J.; HENZELL E. F. Pasture research and development in northern Australia: an ongoing scientific adventure. **Tropical Grasslands**, v. 44, n. 4, p. 221–230, 2010.

CORDEIRO, J. M. P.; KAEHLER, M.; SOUZA, L. G.; FELIX, L. P. Heterochromatin and numeric chromosome evolution in Bignoniaceae, with emphasis on the Neotropical clade *Tabebuia* alliance. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 1, 2020.

CÓRDULA, E.; DE QUEIROZ, L. P.; ALVES, M. Checklist da flora de Mirandiba, Pernambuco: Leguminosae. **Rodriguésia**, v. 3, n. 59, p. 597-602, 2008.

COSTA, N. M. S. **Revisão do gênero *Stylosanthes* Sw.** 469 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica), Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal. 2006.

COSTA, L. C.; VALLS, J. F. M. *Stylosanthes* Sw. In: Forzza RC, et al, eds. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil** vol. 2. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1090–1091. 2010.

COSTA, M. R. G. F. Utilização do feno de forrageiras lenhosas nativas do Nordeste brasileiro na alimentação de ovinos e caprinos. **Pubvet**, v.5, n.7, 2011.

DANTAS, A. C. de A. et al. Caracterização molecular de acessos de melão coletados no Nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.34, n.1, p.183-189, 2012.

DAVIDE, L. C. et al. Citogenética e suas aplicações no melhoramento de plantas. **Informe Agropecuario**, v. 30, n. 253, p. 53–63, 2009.

DRIVER, S.M.; KROMDIJK, J. Will C3 crops enhanced with the C4CO<sub>2</sub>- concentrating mechanism live up to their full potential (yield)? **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 13, p. 3925-3935, 2013.

EMILIANO, T. de O.; SANTOS, A. M. da S.; FELIX, L.P. **Determinação do número cromossômico e composição da heterocromatina em espécies da família aristolochiaceae.** XVII Semana de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal da Paraíba. 2022.

ESPERT, S. M, BURGHARDT, A. D. Biogeography and divergence times of genus *Macrotium* (Leguminosae). **AoB PLANTS**. v. 2010, plq018, 2010.

FERNANDES, C. D. **Resistência de Progênies de *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes acrocephala* à antracnose causada por *Colletrotrichum gloeosporioides*.** 2003. 91 f. Tese (Doutorado em Agronomia), UNESP, Botucatu-São Paulo.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3.ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, p.220. 1998.

FLEXAS, J. et al. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. **Plant Biology**, v. 6, p. 269-279, 2004.

FRANCO, A. L. **Caracterização cromossômica comparada no gênero *Stylosanthes* (Fabaceae).** 2017. 90 f. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas: genética e biotecnologia) UFJF. Minas Gerais.

FRANCO, A. L. et al. Low cytomolecular diversification in the genus *Stylosanthes* Sw. (Papilionoideae, Leguminosae). **Genetics and Molecular Biology**, n. 43, v. 1, 2020.

FREITAS, Eduardo de. **"Importância da Agropecuária Brasileira "** Disponível em: <<https://brasilescola.uol.com.br/brasil/a-importancia-agropecuaria-brasileira.htm>>. Acesso em: 29 set. 2022.

GISSI, D.S. 2020. ***Stylosanthes* in Flora do Brasil 2020.** Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB29854>>. Acesso em: 15 jul. 2021.

GIULIETTI, A. M. et al. (org.). **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação.** MMA: UFPE - Conservation International - Biodiversitas - Embrapa Semiárido, Brasília. p.45-90. 2004.

GOLDBLATT, P. Cytology and phylogeny of leguminosae. In: POLHILL, R.M. & RAVEN, R.H. **Advances in legume systematics.** Kew: Royal Botanic Garden. p. 427- 463, 1981.

GUEDES, F. L. et al. **Desempenho de forrageiras em caatinga manipulada em região semiárida.** Circular técnica, Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral – CE, 2018.

GONÇALVES NETO, L. P. **Respostas fisiológicas, caracterização morfoagronômica e qualidade de forragem de *Stylosanthes* sp. em diferentes disponibilidades hídricas.** 2021. 60 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). UEFS, Feira de Santana – Bahia.

GUERRA, M. Introdução a Citogenética Geral. In: \_\_\_\_\_ (ed.) **Heterocromatina e Bandeamento Cromossômico**. Guanabara, Rio de Janeiro, p. 24-35, 1988.

GUERRA, Marcelo. **Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo: FUNPEC, 2002. 132 p.

GUERRA, M. Citotaxonomia: o fim da infância. **Journal of Plant Biology**. n. 146, p. 703-710. 2012.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Agropecuária Municipal**. Disponível em: <[https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?utm\\_source=landing&utm\\_medium=explica&utm\\_campaign=producao\\_agropecuaria&t=resultados](https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?utm_source=landing&utm_medium=explica&utm_campaign=producao_agropecuaria&t=resultados)>. Acesso em: 29 out. 2022.

JUDD, W.S. et al. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. 3 ed. Porto Alegre: **Artmed**. 632p., 2009.

JESUS, G. S. de. **Avaliação da fitotoxicidade do alumínio em diferentes genótipos de *Stylosanthes***. 2021. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Agronomia. Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS. 2021.

JONES, R.M. The rise and fall of Siratro (*Macroptilium atropurpureum*) – what went wrong and some implications for legume breeding, evaluation and management. **Tropical Grasslands – Forrajes Tropicales**, v.2, p.154–164, 2014.

KARIA, C. T. **Caracterização genética e morfoagronômica de germoplasma de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) SW**. 2008. 138 f. Tese (Doutorado em Agronomia). UFG, Goiânia.

LETRAS AMBIENTAIS. **Mudanças climáticas: 10 impactos sobre a Caatinga**. Disponível em: < <https://www.letrasambientais.org.br/posts/mudancas-climaticas:-10-impactos-sobre-a-caatinga#>>. Acesso em: 03 nov. 2022.

LEVIN, K.; BOEHM, S. CARTER, R. **Impacto das mudanças climáticas: 6 descobertas do relatório do IPCC de 2022 sobre adaptação**. Disponível em: <<https://www.wri.org/insights/ipcc-report-2022-climate-impacts-adaptation-vulnerability>> Acesso em: 24 out. 2022.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, Kew, 2005. 577 p.

LIMA, A. T. B. et al. Molecular characterization of cajá (*Spondias mombin*) (Anacardiaceae) by RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p. 2893-2904, 2011.

MADRUGA, M. S. et al. Características químicas e sensoriais de cortes comerciais de caprinos SRD x mestiços de Bôer. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.25, n.4, p.713-719, 2005.

MAPBIOMAS. **Coleção 7 da Série Anual de Mapas de Cobertura e Uso do Solo do Brasil**. Disponível em: <<https://mapbiomas.org/caatinga-perde-160-mil-hectares-de-superficie-de-agua--e-mais-de-10-de-vegetacao-nativa-nos-ultimos-37-anos>>. Acesso em: 16 out. 2022.

MATOS, A. B.; ARTILES, G. R. El género *Macroptilium* (Benth.) Urb. (Leguminosae) em Cuba. **Anales Del Jardín Botánico de Madrid**, v. 62, n. 2, p. 181-190, 2005.

MELO, N. F.; CERVI, A. C.; GUERRA, M. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 226, p. 69-84, 2001.

MELO, C. A. F. de. **Estudo citogenético e molecular em nove espécies do gênero *Solanum* L. (*Solanaceae* Juss.)**. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) UFRPE, Recife.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141 p.

MORAES, A. P.; LEITCH, I. J.; LEITCH, A. R. Chromosome studies in Orchidaceae: karyotype divergence in Neotropical Genera in Subtribe Maxillariinae. **Botanical Journal of the Linnean Society**. n. 170, p. 29-39, 2012.

MORO, M. F. et al. A Phylogeographical Metaanalysis of the Semiarid Caatinga Domain in Brazil. **Botanical Review**, v. 82, n. 2, p. 91–148, 2016.

NAGAICH, D. Assessment of genetic diversity and identification of informative molecular markers for germplasm characterization in caribbean stylo (*Stylosanthes hamata*). **Journal of plant biochemistry and biotechnology**, n. 18, p. 257-260. 2009.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; ALBUQUERQUE, M. B.; SILVA, E. C. Aspectos ecofisiológicos da tolerância à seca em plantas da caatinga. In CORTEZ, J. A. et al., (org) **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005. p. 22-31.

OLIVEIRA, R. S. **Coleta, Caracterização e Avaliação Preliminar de Acessos de *Stylosanthes* sp.** 2016. 112 f. Tese (Doutorado em Recursos genéticos Vegetais). UEFS, Feira de Santana, Bahia.

OLIVEIRA, R. S.; QUEIROZ, M. A. Banco Ativo de Germoplasma de *Stylosanthes* sp. da Universidade Estadual de Feira de Santana – BA. **Revista RG News**, n.2, v. 2, p. 119-128. 2016.

PEDREIRA, C. G. S.; PEDREIRA, B. C. Manejo de pastagens tropicais para intensificação da produção, In. CARNEIRO e PEDREIRA, B. et al. **Intensificação da produção animal em pastagens: anais...** Embrapa Agrossilvipastoril – Brasília, DF: p83. 2014.

PEREIRA, S. R. et al. **Avaliação do uso de leguminosas no estabelecimento de espécies nativas na APA (Área de Proteção Ambiental) do Guariroba**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, PDF (41 p.): il. color. – Documentos / Embrapa Gado de Corte. 2018.

PEREIRA, Y. C. et al. Brassinosteroids in soybean plants under water deficit. **Photosynthetica** n. 57, v.1, p. 181-191, 2019.

PINTO, R. B. et al. Evidence for a conserved karyotype in *Swartzia* (Fabaceae, Papilionoideae): Implications for the taxonomy and evolutionary diversification of a species-rich neotropical tree genus. **Brittonia**, n. 68, p. 93-101. 2016.

POLHILL, R. M., RAVEN, P.H. Advances in legume systematics: Part 1. **Royal Botanic Gardens**. Kew. 1981.

PUCCIARELO, O. et al. Chromosome analysis of the *Arachis pintoi* x *a. repens* (Leguminosae) hybrid by classical and molecular cytogenetics. **Boletim Da La Sociedad Argentina de Botânica**, v. 48, n. 1, p. 111-119, 2013.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da caatinga**. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009. 443 p.

RASKINA, O. et al. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, n. 3-4, v. 120, p. 351- 357. 2008.

REIS, A. C. et al. *Lippia alba* (Verbenaceae): A new tropical autopolyploid complex? **American Journal of Botany**, n. 101, v. 6, p. 1002–1012. 2014.

RISTERUCCI, A.M. et al. Development of guava microsatellite (ssr) markers using the sat software. **Acta Horticulturae** (ISHS), v. 849, p. 113-120, 2010.

SAINT PIERRE, C. et al. Phenotyping transgenic wheat for drought resistance. **Journal Experimental Botany**, n. 63, p. 1799-1808. 2012.

SANTANA, A. S. **Resgate, Caracterização Morfométrica e Avaliação Bromatológica de acessos de *Stylosanthes* sp. do Semiárido baiano**. 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). UEFS, Feira de Santana, Bahia.

SANTOS-GARCIA, M.O. et al. Mating systems in tropical forages: *Stylosanthes capitata* Vog. and *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. **Euphytica**, v.178, p.185-193, 2011.

SILVA, A. A. da. **Avaliação fisiológica de sementes de *Stylosanthes* sp. armazenadas no BGF-UEFS**. 2021. 86 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). UEFS, Feira de Santana, Bahia.

SHE, C. W. et al. Molecular cytogenetic characterization and phylogenetic analysis of the seven cultivated *Vigna* species (Fabaceae). **Plant Biology**, v.17, p. 268–280, 2015.

SNACK, C.; RIBEIRO, C.L.; SALINAS, A.O.D. 2020. *Macroptilium* in **Flora do Brasil 2020**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB29785>>. Acesso em: 15 jul. 2021.

SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. The role of hybridization in plant speciation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 561-588. 2009.

SOUZA, L. G. R. et al. Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in: *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). **Annals of Botany**, v. 109, n. 5, p. 987-999, 2012.

SAINT PIERRE, C.; CROSSA, J.L.; BONNETT, D.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; REYNOLDS, M. Phenotyping transgenic wheat for drought resistance. **Journal Experimental Botany**, v. 63, p. 1799-1808. 2012.

STACE, H. M. e EDYE, L. A. (Ed.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Academic Press Sidney: 1984.

STACE, H. M.; CAMERON, D. Cytogenetics and the evolution of *Stylosanthes*. In: Stace, H.M.; Edey, L.A. (eds) **The Biology and Agronomy of *Stylosanthes***. Academic Press Australia, cap. 3, p. 49-72. 1984.

VAN-LUME, B. et al. Heterochromatic and cytomelecular diversification in the *Caesalpinia* group (Leguminosae): Relationships between phylogenetic and cytoeographical data. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics (PPEES)** , v. 29, p. 51-63. 2017.

VASCONCELOS, W. A. et al. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de figo de pombo (*Macroptilium lathyroides*). **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 5, n. 1, p. 3-11, 2011.

VIEIRA, M.L.C. **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. 1988.

VILELA, H. **Seleção e Escolha de Espécies Forrageiras**. Formação de Pastagens. CPT. Viçosa.128p. 2000.

---

**CAPÍTULO 1 - CARIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DA  
HETEROCROMATINA EM ACESSOS DE *Stylosanthes scabra* e  
*Stylosanthes seabrana*.**

---



## CARIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DA HETEROCROMATINA EM ACESSOS DE *Stylosanthes scabra* e *Stylosanthes seabrana*

### RESUMO

O gênero *Stylosanthes* (Fabaceae) é composto por um grupo de espécies leguminosas com importância econômica como as forrageiras e esta tem grande importância na recuperação de áreas degradadas em regiões semiáridas. Abordagens citogenéticas revelaram relacionamentos complexos entre espécies envolvendo hibridização e diferentes ploidias ( $2n = 20, 40$  e  $60$ ). Nesse caso, a separação das espécies *S. scabra* e *S. seabrana* foi proposta anteriormente utilizando como critério principal as diferenças no nível de ploidia. O presente trabalho objetivou investigar citogeneticamente 13 acessos de *Stylosanthes* das espécies *S. scabra* e *S. seabrana*, identificando o número, a morfologia cromossômica e o padrão de distribuição de heterocromatina visando estudar a variabilidade cariológica em apoio à caracterização das espécies. Foram observados acessos com  $2n=40$  (*S. scabra*) e  $2n=20$  (*S. seabrana*) cromossomos, núcleo interfásico do tipo semirreticulado, cariótipo simétrico com morfologia cromossômica variando de metacêntrica a submetacêntrica e tamanho cromossômico médio em torno de  $2,5 \mu\text{m}$  com diferenças no comprimento médio dos cromossomos e no comprimento total do genoma. A análise com dupla coloração CMA/DAPI permitiu a visualização de dois blocos CMA+ nos acessos de ambas as espécies localizados na região subterminal do braço curto do menor par cromossômico e a visualização de bandas DAPI+/CMA- em dois dos 10 acessos de *S. scabra* (acessos CPAC 1261 e CPAC 5205). Os resultados obtidos sugerem que não só os rearranjos cromossômicos, mas também mudanças na composição da heterocromatina podem ter ocorrido durante a especiação dessas espécies de *Stylosanthes* e que *S. scabra* como um alotetraploide recente pode estar em processo de evolução cromossômica em função das diferenças cariológicas observadas. Assim, este gênero representa um grupo interessante de plantas para estudos mais aprofundados de conteúdo e quantidade de sequências repetitivas e não repetitivas de DNA.

**Palavras-chave:** Diversidade Genética. Bandeamento cromossômico. Fluorocromos.

## KARIOLOGY AND DISTRIBUTION OF HETEROCHROMATIN IN ACCESSES OF *Stylosanthes scabra* e *Stylosanthes seabrana*

### ABSTRACT

The genus *Stylosanthes* (Fabaceae) is composed of a group of legume species with economic importance such as forage and this has great importance in the recovery of degraded areas in semiarid regions. Cytogenetic approaches revealed complex relationships between species involving hybridization and different ploidy ( $2n = 20, 40$  and  $60$ ). In this case, the separation of species *S. scabra* and *S. seabrana* was previously proposed using as main criterion the differences in the level of ploidy. The present work aimed to investigate 13 *Stylosanthes* accesses of *Stylosanthes* of *S. scabra* and *S. seabrana* species, identifying the number, chromosomal morphology and heterochromatin distribution pattern in order to study the cariological variability in support of the characterization of the species. Accesses with  $2n=40$  (*S. scabra*) and  $2n=20$  (*S. seabrana*) chromosomes, semi-phase nucleus of the semireticulate type, symmetrical karyotype with chromosomal morphology ranging from metacentric to submetacentric and average chromosome size around 2.5  $\mu$ m with differences in the average length of chromosomes and in the total length of the genome were observed. The analysis with double CMA/DAPI staining allowed the visualization of two CMA+ blocks in the accesses of both species located in the subterminal region of the short arm of the smallest chromosomal pair and the visualization of DAPI+/CMA bands- in two of the 10 accesses of *S. scabra* (CPAC 1261 and CPAC 5205 accesses). The results suggest that not only chromosomal rearrangements, but also changes in heterochromatin composition may have occurred during the speciation of these Species of *Stylosanthes* and that *S. scabra* as a recent allotetraploid may be in the process of chromosomal evolution as a function of the observed cariological differences. Thus, this genus represents an interesting group of plants for further studies of content and quantity of repetitive and non-repetitive DNA sequences.

**Keywords:** Genetic Diversity, Chromosome banding, Fluorochromes.

## 1.1 Introdução

O gênero *Stylosanthes* é composto por cerca de 50 espécies, das quais aproximadamente 25 ocorrem no Brasil (COSTA et al., 2008). Em vários relatos, a distinção das espécies é baseada principalmente em características morfológicas, embora uma série de outras técnicas vem sendo utilizadas para auxiliar na taxonomia do gênero, como, por exemplo, a eletroforese de proteínas de sementes, o polimorfismo de bandas da reação de cadeia da polimerase (PCR), a caracterização citogenética e a análise da variabilidade das regiões do ITS (*Internal Transcribed Spacer Region*) (GILLIES; ABBOTT, 1996; LIU et al., 1999; VANDER; STAPPEN et. al., 2002; CHANDRA; KAUSHAL, 2009; DATE, 2016). Estudos envolvendo caracterização citogenética do gênero *Stylosanthes* ainda é incipiente, o que tem se constituído numa lacuna para os programas de melhoramento genético. Nesse caso, há relatos de espécies com número cromossômico variando de  $2n = 20$  (diploides),  $2n = 40$  (tetraploides) e  $2n = 60$  (hexaploides) (CAMERON, 1967; POLIDO et al., 2015, FRANCO et al., 2020).

Por outro lado, atividades de melhoramento genético com esta leguminosa forrageira no Nordeste brasileiro foram iniciadas pela Embrapa Semiárido (CPATSA), a partir de acessos originados do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Cerrados (CPAC), os quais foram coletados entre as décadas de 70 e 90 do século XX, sendo inicialmente identificados como *S. scabra*. Entretanto, dentre esses acessos, foi gerada uma dúvida sobre a possível presença da espécie *S. seabrana*, considerando que a mesma foi descrita taxonomicamente apenas em 2002 (MAASS; MANNETJE, 2002). Isso ocorre, porque as duas espécies são morfológicamente semelhantes, no entanto, apresentam diferentes números cromossômicos, já que *S. scabra* é um tetraploide ( $2n = 40$ ) enquanto *S. seabrana* é diploide ( $2n = 20$ ).

Contudo, Vanni e Fernandez (2011) propuseram a sinonimização de *S. seabrana* como um citotipo de *S. scabra*, haja vista terem encontrado ambos diploides e tetraploides nas raízes de mudas cultivadas de uma amostra de semente comercial de *S. seabrana* cv. Única, da Austrália. Antagonicamente, Cook e Schultze-Kraft (2020), baseados na revisão de trabalhos utilizando diversas abordagens, refutaram a sinonimização de *S. seabrana* como *S. scabra*. Por sua vez, Marques et al. (2018), utilizando a técnica de FISH, GISH e análises filogenéticas de DNA plastidial, sequências de rDNA 5S e 35S, propuseram *S. scabra* como um alotetraploide originário de espécies progenitoras intimamente relacionadas com *S. hamata* e *S. viscosa*.

Citogeneticamente, características de bandas são conhecidas principalmente para espécies com  $2n = 20$ , com relatos de heterocromatina CMA+ (rica em GC) colocalizadas com sítios de DNAr 35S no braço curto do menor cromossomo de *S. hippocampoides*, *S. gracilis*, *S.*

*macrocephala*, *S. pilosa*, *S. ruellioides*, e os acessos 1480, 1463, 4171 e LC2538 de *S. guianensis*, enquanto *S. acuminata*, *S. grandifolia* e *S. guianensis* cv. Mineirão, apresentaram quatro bandas CMA+, duas delas também localizadas nos braços curtos do menor par de cromossomos e as outras duas na região proximal de um grande par de cromossomos (FRANCO et al., 2020). Esses autores também observaram bandas CMA-/DAPI+ proximais em todos os cromossomos de *S. ruellioides*. Marques et al. (2018) relataram heterocromatina pericentromérica DAPI+ em todos os cromossomos de *S. hamata*, *S. viscosa* ( $2n = 20$ ) e *S. scabra* ( $2n = 40$ ), embora algumas vezes o sinal tenha sido muito fraco, especialmente em *S. scabra*.

Uma caracterização clara e precisa do cariótipo é fundamental quando se compara citogeneticamente espécies diferentes, ou examina-se a variação entre indivíduos da mesma espécie, pois alguns dos mais importantes mecanismos evolutivos promotores de especiação são os rearranjos cromossômicos e polimorfismos de heterocromatina (HUANG; RIESEBERG, 2020; VIMALA, et al., 2021). Assim, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar citogeneticamente 13 acessos de *Stylosanthes* de ocorrência no Brasil, identificando o número, a morfologia cromossômica e o padrão de distribuição da heterocromatina.

## 1.2 Material e Métodos

O presente estudo foi realizado utilizando 13 acessos (Tabela 1) primariamente identificados como *S. scabra*, os quais foram coletados em várias regiões brasileiras e mantidos no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Cerrados (Planaltina-DF). As análises foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Semiárido (Petrolina-PE) utilizando-se meristemas radiculares obtidos de sementes germinadas em caixas tipo gerbox e mantidas em BOD a 25 °C por 24 h.

**Tabela 1** – Lista com dados de coleta dos acessos de *Stylosanthes scabra* Vogel e *S. seabrana* B.L. Maass & L. t Mannetje estudados no presente trabalho.

Acesso CPAC	Espécie	2 <i>n</i>	Local de coleta	Ano de coleta
397	<i>S. scabra</i>	40	Campo Grande - MS, Rodovia BR-163, km 184 (8 km N)	1979
564	<i>S. scabra</i>	40	São Gabriel do Oeste – MT, Rodovia BR-163, km 603	1979
1244	<i>S. scabra</i>	40	PA	1981
1261	<i>S. scabra</i>	40	MA	1981
4947	<i>S. scabra</i>	40	Pajeú – MG	1997
4950	<i>S. seabrana</i>	20	Andaraí – BA	1997
4963	<i>S. seabrana</i>	20	Morro do Chapéu – BA	1997
4966	<i>S. seabrana</i>	20	Oliveira dos Brejinhos – BA	1997
5114	<i>S. scabra</i>	40	Estrada Diamantina/Mendanha – MG, após posto policial ± 12 km à direita	1999
5196	<i>S. scabra</i>	40	Datas – MG	2000
5205	<i>S. scabra</i>	40	Santa Vitória – MG	2000
5228	<i>S. scabra</i>	40	Estrada Piracicaba/Charqueada - SP, Rodovia SP-308, km 187	2000
5234	<i>S. scabra</i>	40	Espírito Santo do Pinhal - SP, Rodovia SP-147, km 63 (- 200m)	2000

As análises mitóticas foram realizadas segundo o protocolo descrito por Guerra e Souza (2002) onde pontas de raízes foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8HQ) 0,002 M, durante 24 horas a 8 °C, e fixadas em solução de Carnoy 3:1 (álcool etílico:ácido acético), sendo em seguida armazenadas a -20 °C até sua utilização.

Na preparação das lâminas, as raízes fixadas foram lavadas em água destilada, sendo em seguida, realizada sua digestão com uma mistura de celulase (2% p/v) e pectinase (20% v/v) a 37 °C por 90 min, sendo esmagadas em ácido acético a 45%. As lamínulas foram retiradas após

congelamento em nitrogênio líquido e as lâminas secas com ar.

O bandeamento cromossômico foi feito após três dias da preparação das lâminas, utilizando CMA (0,5 mg/ml) por 1 hora e DAPI (2 µg/ml) por 30 minutos, seguida da montagem em meio McIlvaine (glicerol/MgCl<sub>2</sub>). As melhores células foram capturadas através do programa Leica QFish, acoplada a um microscópio de fluorescência Leica DM 2000.

Para a identificação do número e morfologia cromossômica, pelo menos três metáfases foram examinadas por indivíduo, das quais as melhores foram utilizadas para as medições cromossômicas e confecção dos idiogramas. As medições foram realizadas também com o auxílio do programa Leica QFish sendo medidos cromossomos de metáfases bem espalhadas, calculando-se o comprimento dos braços curtos (BC), comprimento dos braços longos (BL) e comprimento total cromossômico ou comprimento absoluto (L).

Os idiogramas foram organizados em ordem por tamanho decrescente do braço curto. Foi adotada a nomenclatura cromossômica sugerida por Guerra (1988), onde a posição dos centrômeros foi definida numericamente calculando a razão entre o braço longo (l) e o braço curto (c), através da fórmula:  $r = l/c$ , usando os descritores para definição da fórmula cariotípica: Metacêntrico (M); Submetacêntrico (SM); Acrocêntrico (A); Telocêntrico (T). Além disso, foram estimados os seguintes parâmetros cariológicos: comprimento cromossômico haploide total (TCL); comprimento cromossômico médio (mCL); razão entre o maior e o menor braço (BL/BC ou RA); e comprimento cromossômico relativo (CA/TCL ou RL).

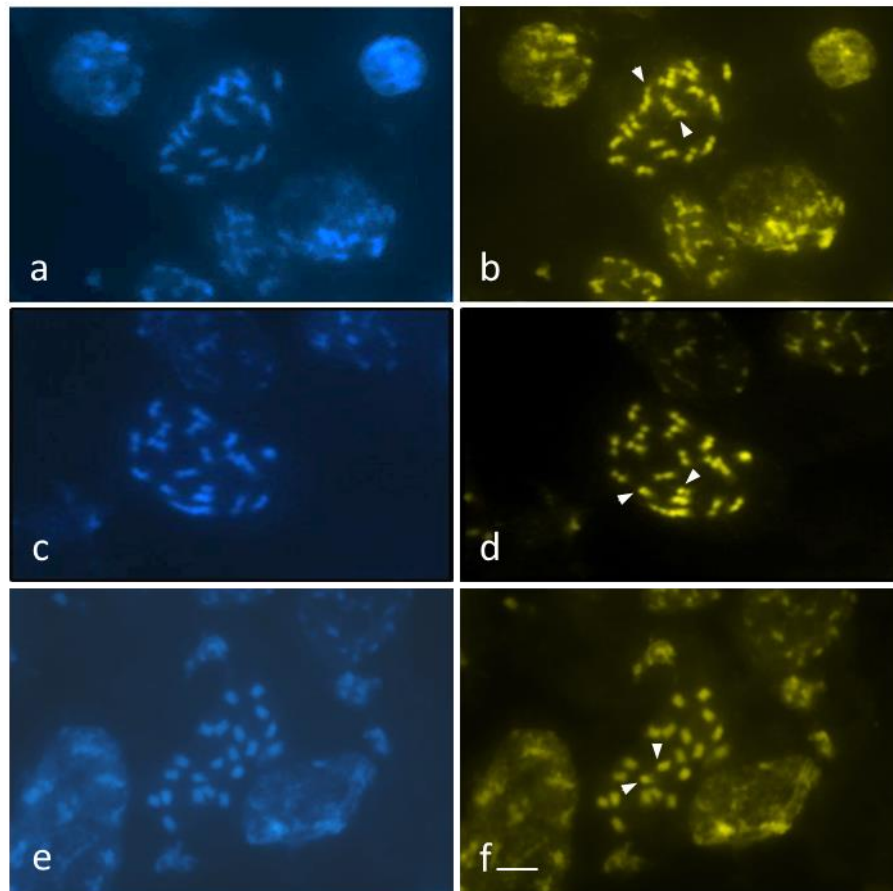
### 1.3 Resultados e Discussão

A Tabela 2 apresenta os dados referentes ao número e morfologia cromossômica dos 13 acessos de germoplasma de *Stylosanthes* avaliados, dos quais três apresentaram cariótipos com  $2n = 20$  e 10 apresentaram cariótipos com  $2n = 40$  (Figuras 1 e 2). De uma maneira geral, foi observado um padrão cariológico simétrico muito conservado com cromossomos metacêntricos a submetacêntricos e núcleos interfásicos do tipo semirreticulado.

**Tabela 2** – Número cromossômico (NC), comprimento cromossômico médio (mCL), fórmula cariotípica (FC), comprimento cromossômico haploide total (TCL) de acessos de *Stylosanthes* analisados em metáfases mitóticas.

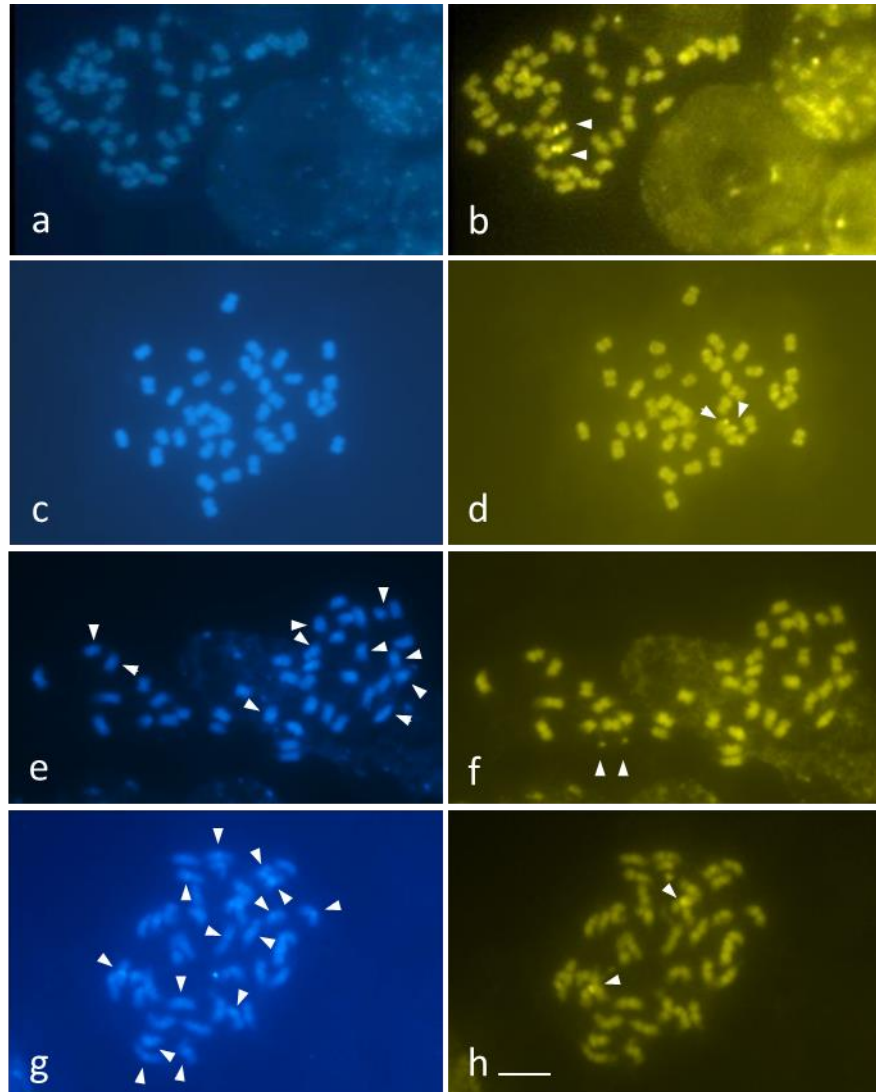
ACESSOS	NC ( $2n$ )	mCL ( $\mu\text{m}$ )	FC	TCL ( $\mu\text{m}$ )
CPAC 4950	20	1,58	10 m	15,88
CPAC 4963	20	1,60	10 m	16,05
CPAC 4966	20	1,57	10 m	15,68
CPAC 397	40	1,60	18 m + 2 sm	32,02
CPAC 564	40	2,48	18 m + 2 sm	49,67
CPAC 1244	40	2,10	19 m + 1 sm	41,94
CPAC 1261	40	1,68	19 m + 1 sm	33,66
CPAC 4947	40	1,31	17 m + 3 sm	26,27
CPAC 5114	40	1,51	19 m + 1 sm	30,26
CPAC 5196	40	2,26	20 m	45,29
CPAC 5205	40	1,83	19 m + 1 sm	36,56
CPAC 5228	40	1,38	18 m + 2 sm	27,52
CPAC 5234	40	1,66	18 m + 2 sm	33,13

m= metacêntrico; sm= submetacêntrico



**Figura 1** - Coloração CMA<sub>3</sub>/DAPI em *Stylosanthes seabrana* com  $2n = 20$ . Acesso CPAC 4966 (“a” e “b”); acesso 4963 (“c” e “d”); acesso 4950 (“e” e “f”). Cabeças de setas indicam a localização de blocos CMA+/DAPI- nas regiões terminais de dois pequenos cromossomos. Barra em “f” representa 5  $\mu$ m.





**Figura 2** – Coloração CMA<sub>3</sub>/DAPI em *Stylosanthes scabra* com  $2n = 40$ . Acesso CPAC 4394 (“a” e “b”); acesso CPAC 5234 (“c” e “d”); acesso CPAC 1261 (“e” e “f”); acesso CPAC 5205 (“g” e “h”). Cabeças de setas indicam a localização de blocos CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> em “b, d, f, h” e DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>-</sup> em “e, g”. Barra em “h” representa 5  $\mu$ m.

A análise dos valores da relação entre os braços, o comprimento do complemento haploide, comprimento médio dos cromossomos e índice de assimetria cariotípica, bem como a presença de satélites, permitiram a identificação e comparação de características em comum nas espécies. Em diversas espécies, variações interespecíficas nesses caracteres são importantes, pois fornecem informações substanciais para o estabelecimento das relações entre táxons, com respeito à organização dos cromossomos (SOARES- SCOTT et al., 2005; BERNARDES, 2013).

O comprimento cromossômico médio mostrou variações entre os acessos diploides ( $2n = 20$ ), sendo a variação entre 1,57  $\mu\text{m}$  no acesso CPAC 4966, a 1,60  $\mu\text{m}$  no acesso CPAC 4963, enquanto nos acessos tetraploides ( $2n=40$ ) foi de 1,31  $\mu\text{m}$  no acesso CPAC 4947, a 2,48  $\mu\text{m}$  no acesso CPAC 564 (Tabela 2). Em *Stylosanthes*, Franco et al. (2020) avaliando oito espécies diferentes do gênero (*S. acuminata*, *S. gracilis*, *S. grandifolia*, *S. guianensis*, *S. hippocampoides*, *S. macrocephala*, *S. pilosa* e *S. ruellioides*) e cinco acessos *S. guianensis* (1480, 4171, 1463, LC2538 e cv. Mineirão) observaram que todas as espécies de *Stylosanthes* estudadas eram diploides ( $2n = 20$ ) com cromossomos predominantemente metacêntricos e medindo em média 2,7  $\mu\text{m}$ . Da mesma forma, comparando-se o tamanho médio dos cromossomos das duas espécies de *Stylosanthes* estudadas neste trabalho com os valores relatados para outros gêneros da mesma tribo Papilionoideae (*Phaseolus*, *Vigna* e *Macroptilium*), observou-se que os valores do tamanho médio dos cromossomos destas espécies variam de 1  $\mu\text{m}$  a 3  $\mu\text{m}$  (FORNI-MARTINS, 1989). Tendência para o aumento do tamanho cromossômico em poliploides tem sido relatada em várias outras espécies, por exemplo, na família *Velloziaceae* (MELO et al., 1997) e *Passifloraceae* (MELO et al., 2001).

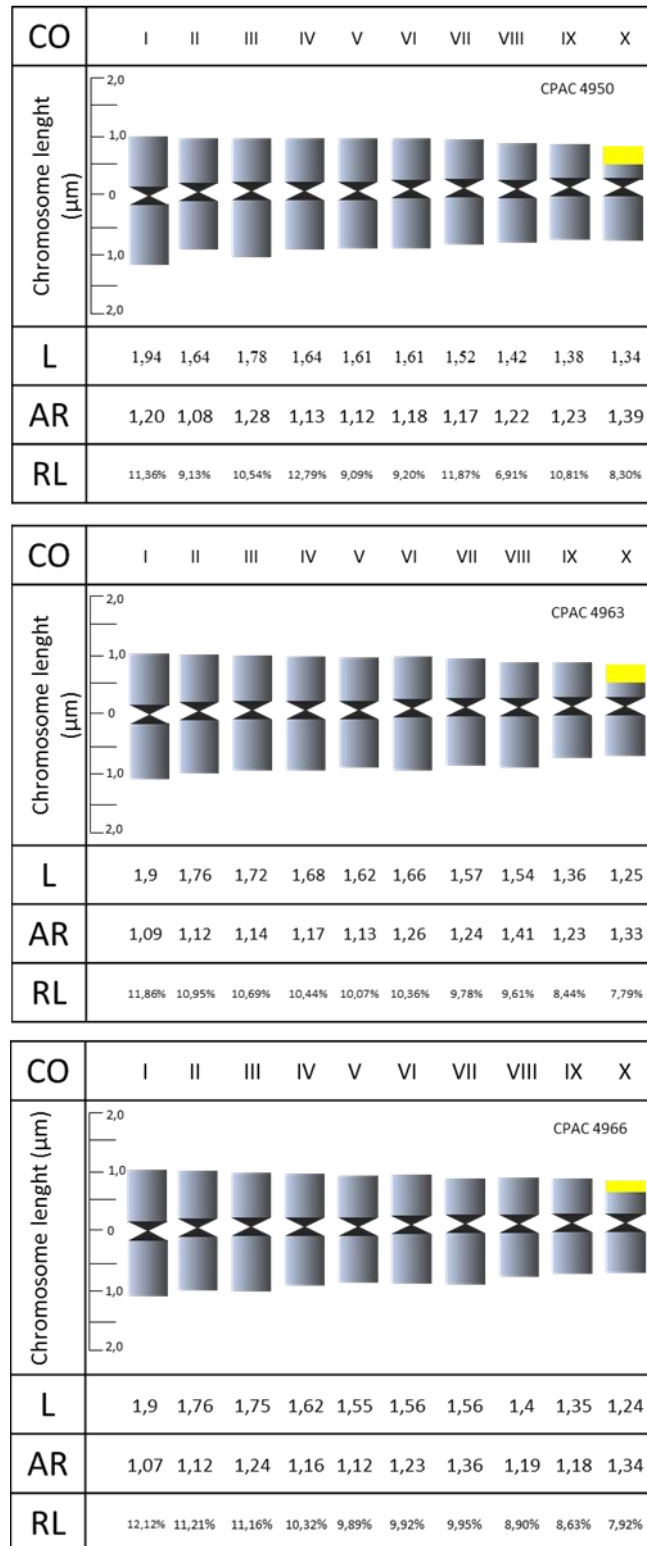
Em relação à fórmula cariotípica, entre os acessos diploides, todos apresentaram cromossomos com morfologia metacêntrica. Entre os acessos tetraploides, nove dos 10 acessos de *S. scabra* analisados apresentaram cariótipo com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, sendo observado, de uma maneira geral, de um a três submetacêntricos. Apenas o acesso *S. scabra* CPAC 5196 apresentou todos os cromossomos metacêntricos (Tabela 2), confirmando, ainda que pequena, uma variabilidade cariomorfológica na espécie estudada. A predominância de cromossomos metacêntricos nos acessos das duas espécies indicou uma tendência de manutenção do cariótipo simétrico. Esta tendência à simetria em cariótipos de membros de Fabaceae foi também observada por Kumari e Bir (1989) em alguns representantes da subfamília *Caesalpinioideae*, e por Franco (2020) em pelo menos sete espécies de *Stylosanthes*.

O estudo detalhado da assimetria cariotípica em alguns grupos de plantas permite uma compreensão clara do sentido da evolução cariológica. Nesse caso, os índices de assimetria cariotípica têm sido extensamente utilizados para inferir mecanismos de evolução cromossômica em plantas (PASZKO, 2006). Aumentos na assimetria cariotípica são principalmente decorrentes de translocações Robertsonianas (forma comum de rearranjo cromossômico), inversões e translocações desiguais detectáveis através da análise do comportamento meiótico (ROMERO, 1986). As diferenças cariológicas observadas entre os acessos de *Stylosanthes* sugerem que dois mecanismos podem ter originado alterações

cromossômicas: i) rearranjos cromossômicos, por exemplo, inversões pericêntricas ou translocações desiguais no caso de cromossomos correspondentes de diferentes acessos, mostrando comprimentos semelhantes, mas diferentes proporções de comprimento dos braços; ii) alterações no conteúdo de DNA, como poderia ser o caso de aumento observado nos acessos *S. scabra* CPAC 564 (mCL 2,48  $\mu\text{m}$ ), CPAC 1244 (mCL 2,10  $\mu\text{m}$ ) e CPAC 5196 (mCL 2,26  $\mu\text{m}$ ), ou diminuição como observado no acesso CPAC 4947 (mCL 1,31  $\mu\text{m}$ ).

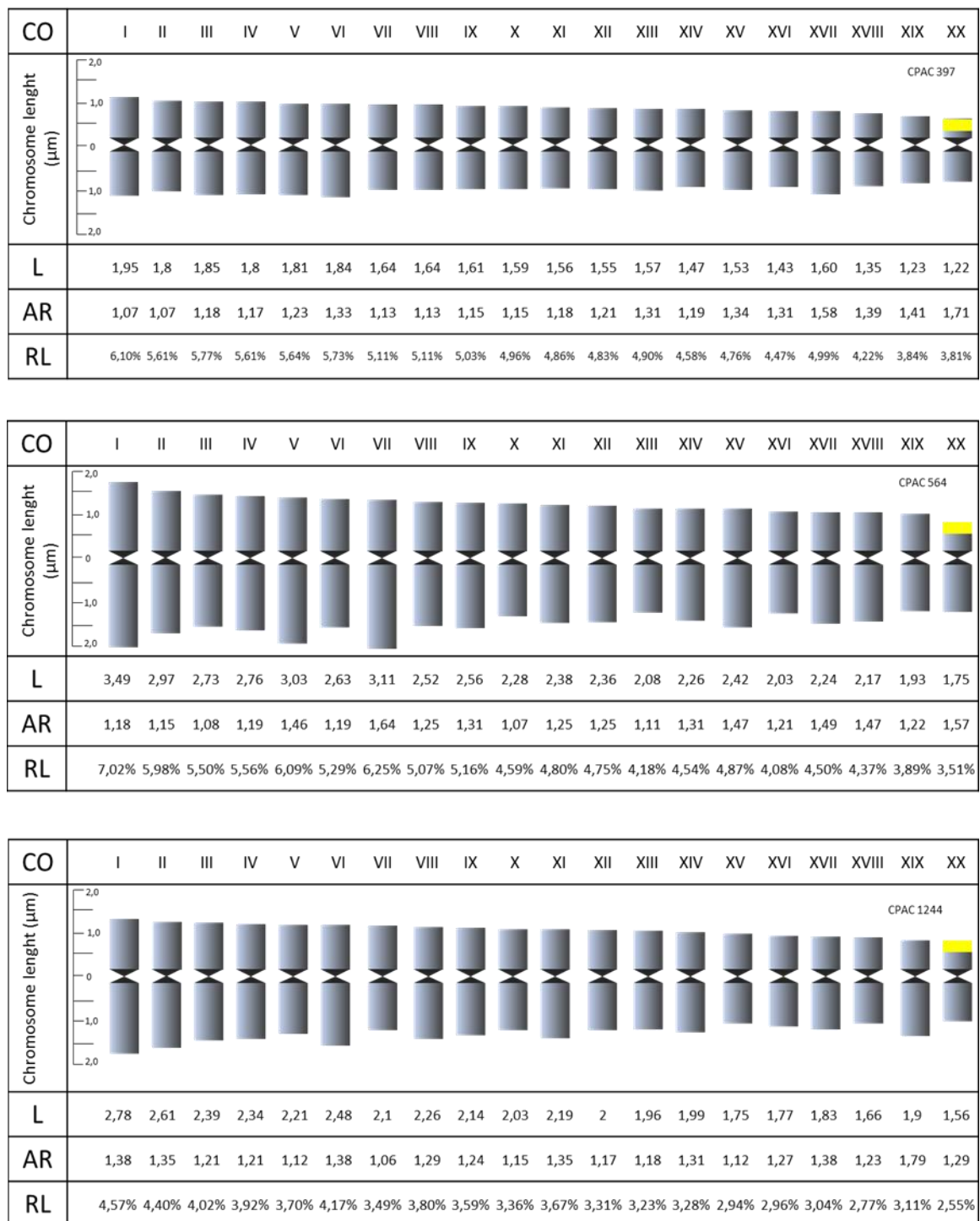
O comprimento relativo (CR ou RL) dos cromossomos, por representar a proporção de cada cromossomo dentro do comprimento total do lote haploide (CA/TCL ou RL), é uma medida importante para comparar diferentes acessos e, até mesmo, diferentes espécies. Na Figura 3 observou-se que nos três acessos diploides de *S. seabrana* não houve variação significativa entre os tamanhos cromossômicos dos pares de I a X, onde os cromossomos que apresentaram maior variação foram o cromossomo VIII e o cromossomo IX, cujos valores variaram para o cromossomo VIII entre 6,91%, no acesso CPAC 4950, a 9,61%, no acesso CPAC 4963, e para o cromossomo IX de 8,44%, acesso CPAC 4963, a 10,81% no acesso CPAC 4950.

Vieira et al. (1993) observaram em 12 espécies diploides do gênero *Stylosanthes* variação entre 11,15% a 12,16% para o tamanho do cromossomo I e 7,08% a 9,77% e para o tamanho do cromossomo X, demonstrando também haver variação significativa entre esses acessos diploides.

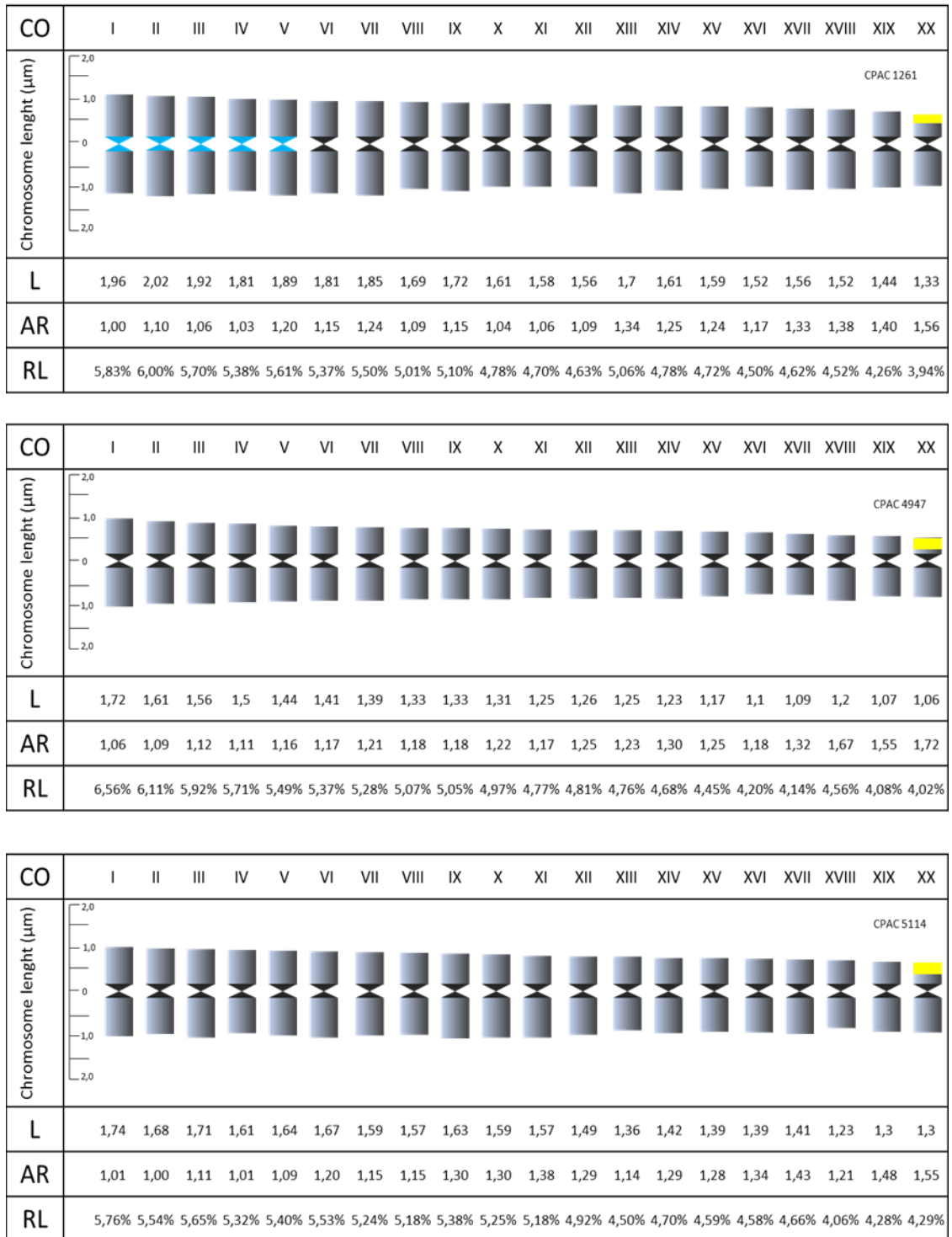


**Figura 3** – Idiogramas dos acessos de *Stylosanthes seabrana* ( $2n = 20$ ) mostrando o comprimento cromossômico (L), a razão entre braços (AR) e o comprimento cromossômico relativo (RL) e bandas CMA+ em amarelo. CO = ordenamento dos pares cromossômicos.

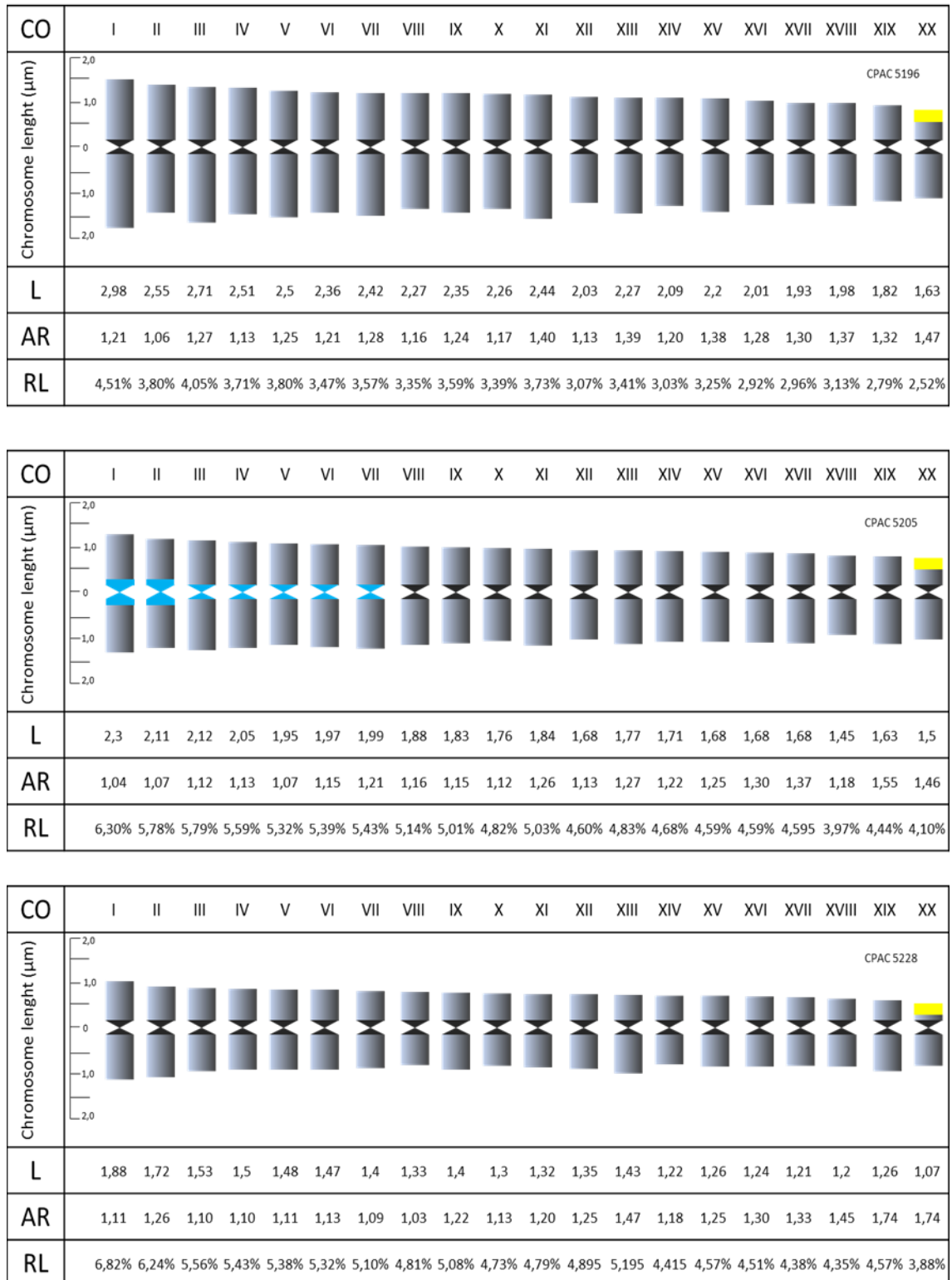
Por outro lado, entre os 10 acessos tetraploides analisados de *S. scabra* observou-se maior variação de comprimento cromossômico relativo, destacando-se o par I, com variação entre 4,51% no acesso CPAC 5196, a 7,02% no acesso CPAC 564, o que representa uma diferença maior que 50% entre os acessos, sendo esse par cromossômico muito importante para diferenciação na análise comparativa desses genótipos (Figuras 4 a 7). Para o par cromossômico XX a variação foi entre 2,55% no acesso CPAC 5196, a 4,50% no acesso CPAC 4387. Outros cromossomos também apresentaram variação significativa nos comprimentos relativos, com variações entre 3,70% e 6,09% no par V, e entre 3,49% e 6,25% no par VII, para os acessos CPAC 1244 e CPAC 564, respectivamente. Nesse caso, a observação de predominância de cromossomos metacêntricos é uma indicação de que o cariótipo é simétrico, observação está feita geralmente em vários membros de Leguminosae (PINTO et al., 2006; VAN-LUME et al., 2017).



**Figura 4** – Idiogramas dos acessos CPAC 397, CPAC 564 e CPAC 1244 de *Stylosanthes scabra* ( $2n = 40$ ) mostrando o comprimento cromossômico (L), a razão entre braços (AR) e o comprimento cromossômico relativo (RL) e bandas CMA+ em amarelo. CO = ordenamento dos pares cromossômicos.

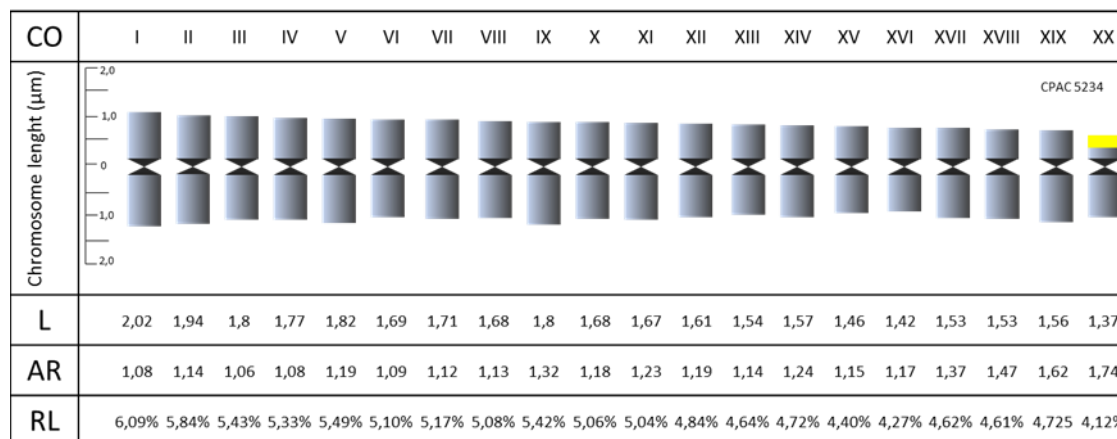


**Figura 5** – Idiogramas dos acessos CPAC 1261, CPAC 4947 e CPAC 5114 de *Stylosanthes scabra* ( $2n = 40$ ) mostrando o comprimento cromossômico (L), a razão entre braços (AR) e o comprimento cromossômico relativo (RL) e bandas DAPI+ em azul e CMA+ em amarelo. CO = ordenamento dos pares cromossômicos.



**Figura 6** – Idiogramas dos acessos CPAC 5196, CPAC 5205 e CPAC 5228 de *Stylosanthes scabra* ( $2n = 40$ ) mostrando o comprimento cromossômico (L), a razão entre braços (AR) e o comprimento cromossômico relativo (RL) e bandas DAPI+ em azul e CMA+ em amarelo. CO = ordenamento dos pares cromossômicos.





**Figura 7** – Idiograma do acesso CPAC 5234 de *Stylosanthes scabra* ( $2n = 40$ ) mostrando o comprimento cromossômico (L), a razão entre braços (AR) e o comprimento cromossômico relativo (RL) e bandas CMA+ em amarelo. CO = ordenamento dos pares cromossômicos.

A análise com a dupla coloração CMA/DAPI permitiu a visualização de dois blocos CMA+ na região terminal do menor par cromossômico nos acessos de *S. seabrana* e *S. scabra* (Figuras 2 e 3). Blocos DAPI+ foram observados em dois acessos de *S. scabra* (CPAC 1261 e CPAC 5205) não sendo observados nos outros oito acessos da espécie.

Vieira et al. (1993) também relataram a existência de constrição secundária no menor par cromossômico de algumas espécies diploides, o que corrobora com a existência dos blocos CMA+ observados na região terminal do último par cromossômico metacêntrico dos citótipos diploides do nosso trabalho.

Bandas CMA+ foram relatadas por Franco et al. (2020) para as espécies *S. hippocampoides*, *S. gracilis*, *S. macrocephala*, *S. pilosa*, *S. ruellioides* e *S. guianensis* (acessos 1480, 1463, 4171 e LC2538) observando-se dois sinais CMA+ nos braços curtos do menor par cromossômico. Por outro lado, *S. acuminata*, *S. grandifolia* e *S. guianensis* cv. Mineirão apresentaram quatro bandas CMA+, duas delas nos braços curtos do menor par cromossômico e as outras duas na região proximal de um par cromossômico grande. Já em *S. ruellioides*, esses autores observaram bandas proximais CMA-/DAPI+ em todos os cromossomos dessa espécie. Marques et al. (2018) relataram heterocromatina pericentromérica DAPI+ em todos os cromossomos de *S. hamata*, *S. viscosa* ( $2n = 20$ ) e *S. scabra* ( $2n = 40$ ), embora algumas vezes o sinal tenha sido muito fraco, especialmente em *S. scabra*.

Os resultados obtidos sugerem que não só os rearranjos cromossômicos, mas também mudanças na composição da heterocromatina podem ter ocorrido durante a especiação dessas espécies de *Stylosanthes* e que *S. scabra* como um alotetraploide recente. Segundo Marques et al. (2018) as espécies podem estar em processo de evolução cromossômica por mostrar acessos

com diferenças cariológicas relatadas. Assim, este gênero representa um grupo interessante de plantas para estudos mais aprofundados de conteúdo e quantidade de sequências repetitivas e não repetitivas de DNA.

#### 1.4 Conclusão

A análise citogenética cromossômica numérica realizada no presente estudo permite diferenciar acessos de *S. seabrana* dos acessos *S. scabra*.

Através da avaliação cromossômica morfológica comparativa é possível fornecer subsídios para uma melhor diferenciação entre acessos de *Stylosanthes*.

Por meio da coloração cromossômica com fluorocromos observa-se a existência de diferentes regiões heterocromáticas entre os acessos.

## 1.5 Referências

- ANDRADE, D. A. V. de; ORTOLANI, F. A.; MORO, J. R.; MORO, F. V. Aspectos morfológicos de frutos e sementes e caracterização; citogenética de *Crotalaria lanceolata* E. Mey. (Papilionoideae - Fabaceae), **Revista Acta botânica Bbrasileira**, v. 22, n.3, p. 621-625. 2008.
- BERNARDES, E. C. S.; BENKO-ISEPPON, A. M.; VASCONCELOS, S.; CARVALHO, R.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C. Polimorfismos cromossômicos intra e interespecíficos em espécies cultivadas de *Cichorium* L. (Asteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, p. 357-363. 2013.
- CAMERON, D. F. Chromosome number and morphology of some introduced *Stylosanthes* species. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 18, p. 375–379. 1967.
- CHANDRA, A.; KAUSHAL, P. Identification of diploid *Stylosanthes seabrana* accessions from existing germplasm of *S. scabra* utilizing genome-specific STS markers and flow cytometry, and their molecular characterization. **Molecular Biotechnology**, v. 42, p. 282–291. 2009.
- COOK, B. G; SCHULTZE-KRAFT, R. Clearing confusion in *Stylosanthes* taxonomy: 1. *S. seabrana* B.L. Maass & 't Mannetje. **Tropical Grasslands**, v. 8, n. 1, p. 40-47. 2020.
- COSTA, N. M. S. **Revisão do gênero *Stylosanthes* Sw.** 2006. 469 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica), Universidade Técnica de Lisboa, 2006.
- COSTA, L. C.; VALLS, J. F. M. *Estilosante* Sw. Org. FORZZA, R. C. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. v. 2. p. 1090–1091.
- DATE, R. A.; JANSEN, P. I.; MESSER, B.; EAGLES, D. A. Morphological variation and classification of field grown *Stylosanthes seabrana* and *S. scabra*. **Tropical Grasslands**, v. 44, n. 1, p. 165-173. 2010.
- DATE, R. A. Selection of effective strains of *Bradyrhizobium* for Caatinga stylo (*Stylosanthes seabrana*). **Tropical Grasslands**, v. 4, n. 2, p. 54–70. 2016.
- FAO. **Bancos de germoplasma**. Disponível em: < <https://www.fao.org/common-pages/search/en/?q=banco%20de%20germoplasma>>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- FORNI-MARTINS, E. R. **Cariótipo e sua análise numérica como subsídio a estudos taxonômicos e evolutivos de *Phaseolus* L., *Vigna* Savi e *Macroptilium* (Bentham) Urban – Leguminosae, Papilionoideae.** 1989. 146 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de Campinas, Campinas.
- FRANCO, A. L. et al. Low cytomolecular diversification in the genus *Stylosanthes* Sw. (Papilionoideae, Leguminosae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 1, n. 43, 2020.

GILLIES, A. C. M.; ABBOTT, R.J. Phylogenetic relationships in the genus *Stylosanthes* (Leguminosae) based upon chloroplast DNA variation. **Plant Systematics and Evolution**, v. 200, p. 193-211. 1996.

GUERRA. M. dos S. **Introdução a Citogenética Geral**. Guanabara: Rio de Janeiro, 1988. 142 p.

GUERRA. M dos S.; SOUZA. M. J. Como Observar os Cromossomos: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal. Animal e Humana. In: Guerra M. Souza M. J. (eds.) **Como analisar os cromossomos mitóticos**. FUNPEC. São Paulo. p.23-38. 2002.

HUANG, K.; RIESEBERG, L. H. Frequency, Origins, and Evolutionary Role of Chromosomal Inversions in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 13 p. 2020.

KUMARI, S.; BIR, S. S. Karyomorphological evolution in *Caesalpinaceae*. **Journal of Cytology & Genetics**, v. 24, n. 1, p.149-163, 1989.

LIU, C. J.; MUSIAL, J. M. *Stylosanthes* sp. aft. *S. scabra*: a putative diploid progenitor of *Stylosanthes scabra* (Fabaceae), **Plant Systematics and Evolution**, v. 208, p. 99-105, 1997.

LIU, C. J.; MUSIAL, J. M.; THOMAS, B. D. Genetic relationships among *Stylosanthes* species revealed by RFLP and STS analyses. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p. 1179-1186. 1999.

MAASS, B.L.; 'tMENNTJE, L. *Stylosanthes seabrana* (Leguminosae: Papilionoideae), a New Species from Bahia, Brazil. **Novon**, v. 12, n. 4, p. 497-500, 2002.

MAASS, B. L.; SAWKINS, M. História e diversidade entre espécies *Stylosanthes* de importância comercial. In: Chakraborty C, ed. ***Stylosanthes de alto rendimento resistente à antracnose para sistemas agrícolas***. Canberra, Austrália: Centro Australiano para Pesquisa Agrícola Internacional, p. 9-26. 2004.

MARQUES, A. et al. Origin and parental genome characterization of the allotetraploid *Stylosanthes scabra* Vogel (Papilionoideae, Leguminosae), an important legume pasture crop. **Annals Of Botany**, v. 122, p. 1143-1159, 2018.

MELO, N. F. ou DE MELO, N.F.; GUERRA, M; ISEPPON, A. M. B.; MENEZES, N. L. de. Cytogenetics and cytotaxonomy of Velloziaceae. **Plant Systematics and Evolution**, v. 204, n. 3-4, p. 257-273, 1997.

MELO, N. F.; CERVI, A. C.; GUERRA, M. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 226, n.1-2, p. 69-84, 2001.

PASZKO, B. A. Critical and a new proposal of karyotype asymmetry indices. **Plant Systematics and Evolution**, v.258, p.39-48, 2006.

PEREIRA, T. N. S. **Germoplasma: conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas**. 1ª edição. Viçosa, MG: editora Arca. 2010. 250p.

PINTO, R. B.; MANSANO, V. F.; TORKE, B. M.; FORNI-MARTINS, E. R. Evidence for a conserved karyotype in *Swartzia* (Fabaceae, Papilionoideae): Implications for the taxonomy and evolutionary diversification of a species-rich neotropical tree genus. **Brittonia**, v. 68, p. 93-101, 2016.

POLIDO, C. A.; MORAES, A. P.; FORNI-MARTINS, E. R. IAPT/IOPB Chromosome data 20. **Taxon**. v.64, n. 6, p. 1344-1350, 2015.

REIS, A. C. et al. *Lippia alba* (Verbenaceae): A new tropical autopolyploid complex? **American Journal of Botany**, v. 101, n. 6, p. 1002–1012, 2014.

ROMERO, Z. C. A new method for estimating karyotype Taxonomy. **Taxon**, v.35, n. 1, p. 526-530. 1986.

SANTOS-GARCIA, M. O.; KARIA, C. T.; RESENDE, R. M. S. et al. Identificação de variedades de *Stylosanthes guianensis* usando análise genética molecular. **Plantas AoB**, v. 1, 14 p. 2012.

SOARES-SCOTT, M. D.; MELETTI, L. M.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. **Citogenética clássica e molecular em passifloras**. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds), Maracujá: Germoplasma e Melhoramento Genético. Embrapa Cerrados, Planaltina, Brazil, p. 213-240. 2005.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. London: Edward Arnold. 1971. 216p.

‘tMANNETJE, L. *Stylosanthes seabrana*. Disponível em:  
<<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Gbase/Data/pf000496.HTM>> Acesso em: 25 set. 2022.

VANDER STAPPEN, J. et al. Phylogenetic analysis of *Stylosanthes* (Fabaceae) based on the internal transcribed spacer region (ITS) of nuclear ribosomal DNA. **Plant Systematics and Evolution**, v. 234, p. 27-51. 2002.

VARGAS, S. M. **Citogenética de acessos de *Cratylia* sp. (FABACEAE–PAPILIONOIDEAE)**. 2005. 48 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas). UFLA, Lavras.

VANNI, R. O.; FERNANDEZ, A. The true identity of *Stylosanthes seabrana* B.L. Maass & L. ‘t Man-netje (Leguminosae Papilionoideae), **Caryologia**, v. 64, n. 3, p. 247-250. 2011.

VANNI, R. O. The genus *Stylosanthes* (Fabaceae, Papilionoideae, Dalbergieae) in South America. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 52, p. 549-585. 2017.

VAN-LUME, B. et al. Heterochromatic and cytomolecular diversification in the Caesalpinia group (Leguminosae): Relationships between phylogenetic and cytogeographical data. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics (PPEES)**, v. 29, p. 51-63. 2017.

VIEIRA, M. L. C.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R.; MARTINS, P. S. Cytotaxonomic study in twelve Brazilian taxa *Stylosanthes* Sw., Leguminosae. **Cytologia**, v. 58, p. 305-311. 1993.

VIEIRA, E. A.; CHARCHAR, M. J. A; SILVA, M. S.; ANJOS, J. R. N. Virulência de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de populações selvagens de *Stylosanthes* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 5, p. 661-667, 2007.

VIMALA, Y.; LAVANIA, S.; LAVANIA, U. C. Chromosome change and karyotype differentiation—implications in speciation and plant systematics. **Nucleus**, v. 64, p. 33-54. 2021.

---

**CAPÍTULO 2 - ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM  
ACESSOS DE *Stylosanthes* POR MEIO DE MARCADORES  
MOLECULARES ISSR E SSR.**

---



## ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM ACESSOS DE *Stylosanthes* POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES ISSR E SSR.

### RESUMO

Os BAG'S e Coleções de germoplasma apresentam grande número de cultivares, isso se deva à ocorrência de duplicatas, sendo imprescindível determinar a diversidade genética desse material. Diante disso, o presente trabalho objetivou avaliar a diversidade genética de acessos de *Stylosanthes* do Banco ativo de germoplasma de forrageira da Universidade Estadual de Feira de Santana e da coleção de trabalho da Embrapa Semiárido, utilizando 19 marcadores moleculares SSR e ISSR. Foram utilizados 19 acessos, os quais produziram um total de 104 bandas polimórficas, e apenas quatro monomórficas entre os genótipos avaliados, apresentando um nível de polimorfismo de 96%, com média de 8,67 bandas por primer. As bandas foram submetidas à análise de diversidade genética, pelo método de agrupamento UPGMA e coeficiente de Dice. Os coeficientes de similaridade, variaram de mínimo de 0,06349 ao máximo de 0,70588 de distância, sendo os acessos CPAC 417 e CPAC 1243 com maior similaridade e a cultivar BRS Bela e acesso BGF 08-080 com maior divergência. A partir do dendrograma, obtido com base na matriz de dissimilaridade genética entre os acessos, foi possível observar a formação de cinco grupos, onde o Grupo 1 foi formado por 14 componentes, Grupo 2 apenas pelo acesso CPAC 1246; Grupo 3 formado por 3 acessos, Grupo 4 formado pela cultivar BRS Campo Grande e o último Grupo 5, formado apenas pela cultivar BRS Bela. Os resultados desse estudo nos permitem inferir que há variabilidade dentro do germoplasma estudado, o que possibilita sua utilização em programas de seleção e melhoramento genético.

**Palavra-chave:** leguminosas forrageiras; polimorfismos de DNA; similaridade genética

## ESTIMATE OF GENETIC DIVERSITY IN ACCESSIONS OF *Stylosanthes* BY MOLECULAR MARKERS ISSR AND SSR.

### ABSTRACT

The BAG'S and germplasm collections present a large number of cultivars, this is due to the occurrence of duplicates, being essential to determine the genetic diversity of this material. Therefore, the present work aimed to evaluate the genetic diversity of *Stylosanthes* accessions from the Active Forage Germplasm Bank of the State University of Feira de Santana and from the work collection of Embrapa Semiárid, using 19 SSR and ISSR molecular markers. Nineteen accessions were used, which produced a total of 104 polymorphic bands, and only four monomorphic among the evaluated genotypes, presenting a polymorphism level of 96%, with an average of 8.67 bands per primer. The bands were submitted to genetic diversity analysis, using the UPGMA grouping method and Dice coefficient. The similarity coefficients ranged from a minimum of 0.06349 to a maximum of 0.70588 in distance, with accessions CPAC 417 and CPAC 1243 having the greatest similarity and cultivar BRS Bela and accession BGF 08-080 having the greatest divergence. From the dendrogram, obtained based on the matrix of genetic dissimilarity between the accessions, it was possible to observe the formation of five groups, where Group 1 was formed by 14 components, Group 2 only by accession CPAC 1246; Group 3 formed by 3 accessions, Group 4 formed by the cultivar BRS Campo Grande and the last Group 5, formed only by the cultivar BRS Bela. The results of this study allow us to infer that there is variability within the studied germplasm, which enables its use in selection and genetic improvement programs.

**Keywords:** forage legumes; DNA polymorphisms; genetic similarity

## 2.1 Introdução

A degradação das pastagens, a redução da sua qualidade nos períodos de seca e o alto custo da sua manutenção, faz com que a pecuária enfrente enormes dificuldades no Semiárido brasileiro, pois intensifica a necessidade do uso de fertilizantes químicos para a sua manutenção, o que gera riscos ambientais (SANTANA NETO et al., 2015). O gênero *Stylosanthes* tem uma importante função que é a de fixação de nitrogênio no solo, além de ser rico em proteína, o que leva a redução de impactos ambientais e proporciona um maior aumento de peso nos rebanhos (OLAFADEHAN et al., 2014; MENDONÇA et al., 2017). O gênero possui o maior número de cultivares entre as leguminosas forrageiras, sendo que no Brasil encontram-se disponíveis no mercado três cultivares deste gênero, BRS Bela, BRS Mineirão e BRS Campo Grande (EMBRAPA, 2007; FERNANDES, 2019).

Para se obter novos materiais genéticos adaptados ao clima da região semiárida, é importante a disponibilização de informações sobre a variabilidade genética disponível, pois essa informação pode promover a melhoria da produtividade das forragens e a manutenção de coleções e bancos de germoplasma do gênero. No início de todo programa de melhoramento, estudo preliminares são essenciais (SILVESTRI et al., 2020). Segundo Costa et al., (2019), quatro tipos de marcadores podem ser utilizados na caracterização da diversidade genética, morfológicos, bioquímicos, moleculares e citológicos. No entanto, quando o objetivo é identificar genes de interesse ao melhoramento, principalmente devido ao nível de diversidade genética das espécies variar muito, os marcadores moleculares são ideais na caracterização da diversidade de genótipos em plantas.

Assim, com vistas a contribuir com o processo de melhoramento de *Stylosanthes*, a utilização de marcadores moleculares para detectar a existência de polimorfismos entre as populações estudadas, dependendo do objetivo do programa de melhoramento genético, a população e sua diversidade poderão ser manejadas, mediante cruzamentos e seleções devidamente direcionados, aumentando consideravelmente a eficiência desses programas.

Os marcadores podem ser usados mesmo que não tenham sido mapeados a uma região cromossômica ou a um fenótipo, desde que possam ser seguidos em gerações posteriores podendo assim comprovar sua natureza genética (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998). Nesse sentido, os marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) são regiões genômicas de 100 a 3.000 pb, que possuem herança dominante, são muito utilizados para estimar a diversidade genética entre indivíduos, são bastante utilizados por se tratar de uma técnica rápida, de fácil utilização e com baixo custo quando comparados ao marcadores

codominantes que necessitam de sequenciamento, um dos principais fatos que o tornou popular em estudos genéticos, e os marcadores microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeat) que são sequências de DNA compostas de um a seis nucleotídeos, e que possui alto grau de polimorfismo e reprodutibilidade. Esses marcadores precisam de uma quantidade de DNA muito pequena para que possam ser estudados, são marcadores conhecidos por apresentam diversas utilizações e aplicações no melhoramento de plantas, entre estas, caracterizar a estrutura e a diversidade genética, realizar seleção assistida por marcadores (SAM) como ainda mapear e realizar estudos genéticos (BOREM; CAIXETA, 2006; TOPPA; JADOSKI, 2013; NADEEM et al., 2017; ALZATE-MARIN et al., 2020).

O objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética em acessos de *Stylosanthes*, utilizando marcadores SSR e ISSR, a fim de obter geneticamente subsídios para futuros programa de melhoramento do gênero.

## 2.2 Material e Métodos

Foram utilizados 17 acessos de *Stylosanthes* e duas cultivares (BRS Campo Grande e BRS-Bela) (Tabela 1). As folhas foram coletadas do experimento para caracterização morfoagronômica de *Stylosanthes*, implementado no ano de 2020, no Campo Experimental da Caatinga (CEC) que pertence a Embrapa Semiárido, as amostras foliares foram acondicionadas em sacos de papel e encaminhados ao Laboratório de Biotecnologia (LABIOTEC) da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em freezer -80°C até sua utilização.

**Tabela 1.** Origem dos acessos do gênero *Stylosanthes* spp. Utilizados.

Acesso	Espécie	Origem /Cidade
CPAC 1243	<i>Stylosanthes scabra</i>	Abadiânia - GO
CPAC 1246	<i>Stylosanthes scabra</i>	Campinorte - GO
CPAC 1254	<i>Stylosanthes scabra</i>	Darcinópolis - TO
CPAC 4945	<i>Stylosanthes scabra</i>	Monte azul - MG
CPAC 4947	<i>Stylosanthes scabra</i>	Pajeú - MG
CPAC 4952	<i>Stylosanthes scabra</i>	Palmeiras - BA
CPAC 4953	<i>Stylosanthes scabra</i>	Palmeiras - BA
CPAC 4959	<i>Stylosanthes scabra</i>	Iraquara - BA
CPAC 417	<i>Stylosanthes scabra</i>	Jaciara - MT
BGF 12-039	<i>Stylosanthes</i> sp.	Canarana -BA
BGF 08-016	<i>Stylosanthes scabra</i>	Feira de Santana-BA
BGF 14-172	<i>Stylosanthes</i> sp.	Varzea Nova -BA
BGV 14-164	<i>Stylosanthes</i> sp.	Morro Do Chapéu -BA
BGF 14-230	<i>Stylosanthes</i> sp.	Ibotirama -BA
BGF 14-184	<i>Stylosanthes</i> sp.	Morro Do Chapéu-BA
BGF 14-226	<i>Stylosanthes</i> sp.	Seabra -BA
BGF 08-080	<i>Stylosanthes</i> sp.	Feira de Santana-BA
cv. BRS-Campo Grande	<i>Stylosanthes macrocephala</i> / <i>Stylosanthes capitata</i>	Campo Grande - MS
cv. BRS-Bela	<i>Stylosanthes guianensis</i> cv. BRS GROF 1463 e <i>Stylosanthes guianensis</i> cv. BRS GROF 1480	Brasília - DF

\*CPAC= acessos pertencentes a Coleção de trabalho da Embrapa semiárido; BGF= acessos pertencentes ao banco ativo de forrageiras da UEFS.

Foram utilizando marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) e SSR (Simple Sequence Repeat) Tabela 2, com o objetivo de identificar a diversidade existente entre os acessos.

**Tabela 2.** Sequência de primers ISSR e SSR utilizados no trabalho com *Stylosanthes* e suas respectivas temperaturas de anelamento. Ta= temperatura de anelamento, pb= pares de bases, AF= amplitude de fragmentos gerados, NA= Não amplificaram.

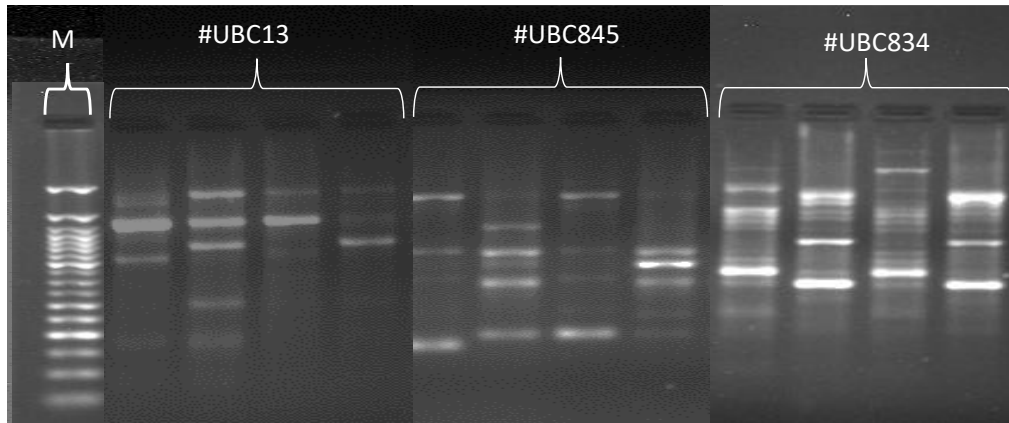
	Primer		Ta (°C)	pb	AF (pb)
1	#UBC1	ACACACACACACACT	50	17	600-1500
2	#UBC2	GAGAGAGAGAGAGAT	50	17	500-1500
3	#UBC13	CTCTCTCTCTCTCTT	50	17	430-1450
4	#UBC820	GTGTGTGTGTGTGTGTC	50	17	400-1500
5	#UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	50	18	400-1400
6	#UBC845	CTCTCTCTCTCTCTRG	50	18	250-1450
7	#UBC851	GTGTGTGTGTGTGTGYG	50	18	300-1350
8	#UBC858	TGTGTGTGTGTGTGTRT	50	18	NA
9	#UBC860	TGTGTGTGTGTGTGTGRA	50	18	350-1400
10	#UBC862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC	50	18	NA
11	#UBC864	ATGATGATGATGATGATG	50	18	916-950
12	#UBC866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	50	18	700-1350
13	#UBC885	BHBGAGAGAGAGAGAGA	50	17	200-1000
14	#UBC886	VDVCTCTCTCTCTCTCT	50	17	400-1400
15	#UBC897	CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG	50	22	NA
16	SC18-01B3	F- TGGAGACAACACCCTTATG	56	19	120-180
		R- ATTCTATTACTCTTGCCTTTTCT	56	23	
17	SC18-01E11	F- GGCTAAAGAACGGCTAATG	56	19	250-1000
		R- TCGAAAGATCCAAGAACAAA	56	20	
18	SC18-01C7	F- CTTCTTTATCCCCACCTTTTT	56	21	280-330
		R- AGCACACTCTTTGATGATGAG	56	21	
19	SC18-01TF11A	F- CCGACCAAGGGGGATGTC	60	18	185-200
		R- AAGTAGCAGCGGCGAGACC	60	19	

\*N = (A,G,C,T), R = (A,G), Y = (C,T), B = (C,G,T), D = (A,G,T), H = (A,C,T), V = (A,C,G)

O DNA genômico total de folhas jovens das plantas foi extraído com o auxílio do Kit Wizard® genomic DNA Purification Kit (Promega) constituído de 600µl de Nuclei Lysis Solution, 3 µl de solução de RNase, 200µl de Protein Precipitation Solution, 600 µl de isopropanol, 600µl de etanol a 70% à temperatura ambiente, 100µl de solução de reidratação de DNA. O DNA extraído foi quantificado em aparelho tipo Nano drop NanoDrop™ One/One<sup>C</sup> Microvolume UV-Vis Spectrophotometer. Todas as amplificações foram realizadas em um termociclador, Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

A qualidade e integridade das amostras de DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), em tampão TBE 0,5x (Tris-Borato-EDTA), corado com Brometo de Etídeo (0,2 mg/ml) e visualizado sob luz ultravioleta. A densidade óptica foi mensurada em espectrofotômetro. E com base nisso, as concentrações de cada amostra foram ajustadas para aproximadamente 20 ng/µl.

Inicialmente foram realizados testes de ampliações via PCR em quatro amostras, utilizando 15 primers ISSR e quatro primers SSR, destes apenas três primers ISSR não amplificaram, os demais apresentaram bandas nítidas, reproduzíveis e polimórficas (Figura 1) sendo estes selecionados na caracterização da diversidade genética em todos os indivíduos.



**Figura 1.** Polimorfismo em gel agarose com três primers e quatro acessos de *Stylosanthes*. M: Marcador 50 pares de base (Cellco).

As reações de amplificação dos primers ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) foi submetida a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em um volume final de 10  $\mu$ l contendo: 1  $\mu$ l de DNA genômico numa concentração de 20ng/L; 1  $\mu$ l de cada primer (5 mM, DNA Express Biotecnologia); 1  $\mu$ l de solução tampão (10X, DNA Express Biotecnologia); 0,8  $\mu$ l de DNTp'S (2,5 mM de cada um dos desoxiribonucleotídeos dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 100mM, Cellco); 0,2  $\mu$ l de TaqPolimerase (5U/  $\mu$ l, ClassFive); 0,4  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (50mM, DNA Express Biotecnologia) e água Ultrapura para completar o volume final. As ampliações foram realizadas utilizando o seguinte protocolo: 95 °C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, hibridização a 50 °C por 45s e extensão a 72 °C por 1 minuto, com uma etapa final de alongamento a 72 °C por 7 minutos, deixando os produtos das reações a 4 °C.

Já as reações de amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) SSR (simple sequence repeats) foram realizadas também em um volume final de 10  $\mu$ l contendo: 1  $\mu$ l de DNA genômico numa concentração de 20ng/L; 0,5  $\mu$ l de cada primer (10mM, DNA Express Biotecnologia); 1  $\mu$ l de solução tampão (10X, DNA Express Biotecnologia); 0,8  $\mu$ l de DNTp'S (2,5 mM de cada um dos desoxiribonucleotídeos dATP, dCTP, dGTP e dTTP-100mM, Cellco); 0,2  $\mu$ l de TaqPolimerase (5U/ $\mu$ l, ClassFive); 0,3  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (50mM, DNA Express Biotecnologia) e água Ultrapura para completar o volume final. A programação

do termociclador consistiu em 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 50-60 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto. Para finalizar, foi realizada uma extensão a 72 °C por 7 minutos, deixando os produtos das reações a 4 °C.

Os produtos de PCR de ISSR e SSR foram desnaturados e separados em géis de agarose a 2% (p/v). Corados com brometo de etídio, submetidos à voltagem constante de 100 V por 3 h. A visualização dos amplicons foi realizada sob luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos foi determinado com marcador de peso molecular 50 pb Plus DNA Ladder (cellco).

A análise de agrupamento dos 17 acessos de *Stylosanthes* e das duas cultivares (BRS Campo Grande e BRS-Bela) foram realizadas usando dados binários em que os alelos foram transformados na presença ou ausência de uma banda ISSR e SSR (SIQUEIRA et al., 2009), utilizando o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) e coeficiente de Dice (Sorenso ou Nei e Li). Um dendrograma foi obtido a partir da matriz de distâncias genéticas. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GENES (CRUZ, 2016).



### 2.3 Resultados e Discussão

Foram produzidas 104 bandas polimórficas e apenas quatro monomórficas, o que corresponde a um nível de polimorfismo de 96%, um número bastante satisfatório, com média de 8,67 bandas por primer. Os tamanhos das bandas variaram de 120 a 1500 pb (Tabela 2). Dos 15 marcadores do tipo ISSR utilizados por Alzate-Marin et al. (2020) para caracterizar espécies de leguminosas forrageiras *Stylosanthes capitata* Vogel e *Stylosanthes macrocephala* MB. Ferreira & Sousa Costa, que compõem a cultivar ‘Estilosantes Campo Grande’ apenas nove (UBC 1, 2, 834, 851, 860, 862, 864, 885, 886) foram considerados polimórficos e apenas oito foram utilizados. Neste mesmo estudo, estes oito primers geraram 116 bandas polimórficas, com uma média de 14,5 bandas ou loci por primer, variando de nove (UBC-834) a 21 (UBC-2) bandas ou loci por primer.

Os resultados demonstram eficácia na análise da diversidade genética por meio destes marcadores, devido ao alto nível de polimorfismo encontrado entre os diferentes acessos, o que confirma que estas técnicas geram perfis de DNA altamente reprodutíveis para acessos de *Stylosanthes*. O mesmo ocorreu com o trabalho de Costa et al., (2018), que identificaram um polimorfismo de 95% em populações de *S. scabra*, com o mesmo tipo de marcador; e no trabalho de Alzate-Marin et al., (2020) que obteve porcentagem média de polimorfismo de *S. capitata* e *S. macrocephala* de 92%. Já Silvestri et al., (2020), também identificaram alto nível de polimorfismo em populações de *S. guianensis* e *S. hippocampoides*, com 73% e 85%, respectivamente, utilizando marcadores do tipo ISSR. No entanto, foram menores do que o presente estudo, segundo estes mesmos autores, esta variação, nas estimativas de variabilidade genética, pode existir, pois distintos marcadores analisam regiões do DNA com diferentes níveis de polimorfismo e diferem no tipo de herança.

Os coeficientes de similaridade calculados a partir do método de Dice (Sorenso - Nei e Li) variaram de um mínimo de 0,06349 e um máximo de 0,70588 de distância, com os acessos CPAC 417 e CPAC 1243 com maior similaridade genética e a cultivar BRS Bela e acesso BGF 08-080 com maior divergência (Tabela 3).

**Tabela 3.** Matriz de similaridades obtida com base no coeficiente de Jaccard entre os 17 acessos de *Stylosanthes* estudados, e duas cultivares, baseada em marcadores ISSR/SSR.

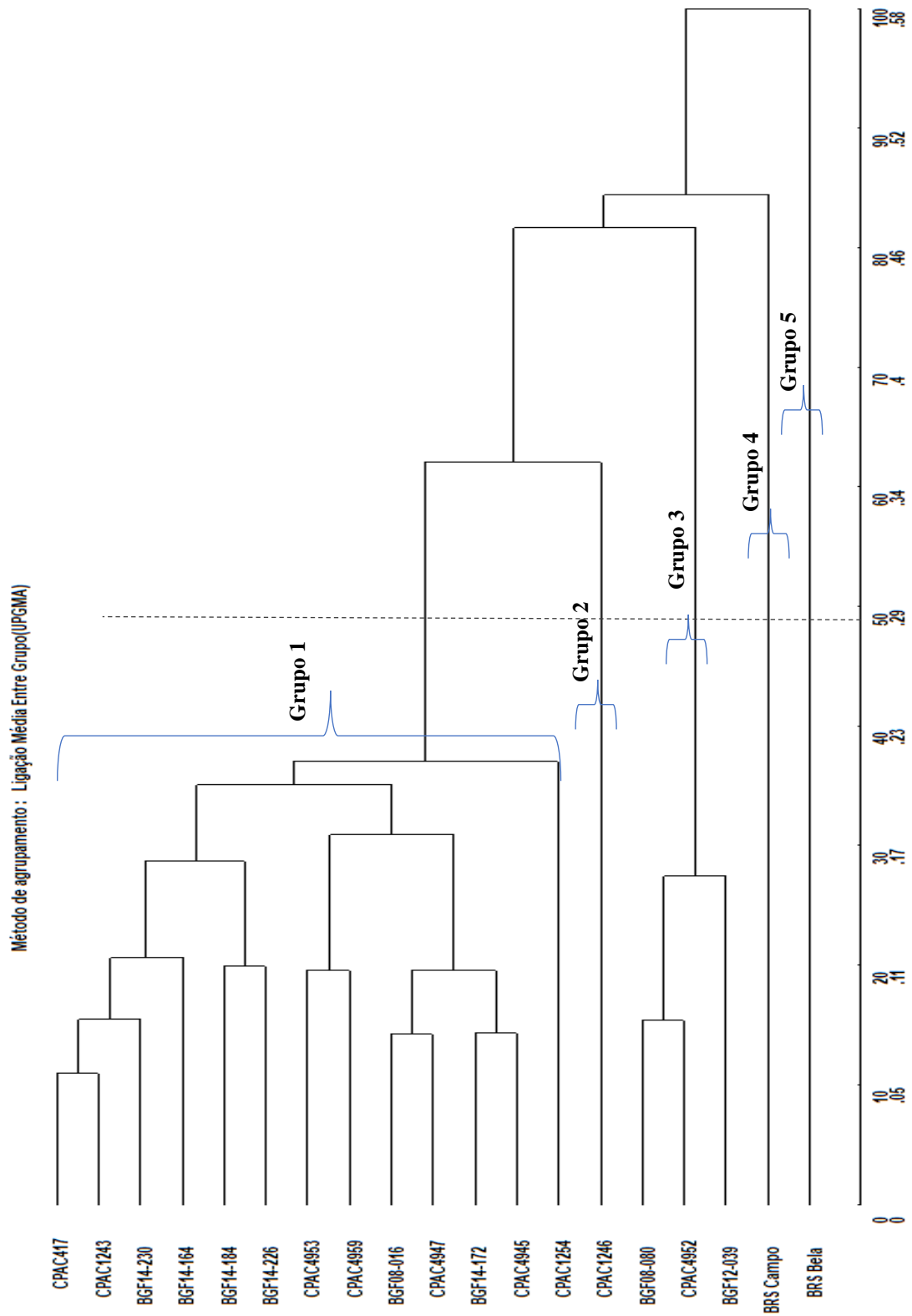
	BRS-Campo Grande	<i>S. guianensis</i> cv. BRS-Bela	BGF 12-039	BGF 08-016	BGF 08-080	BGV 14-164	BGF 14-172	BGF 14-184	BGF 14-226	BGF 14-230	CPAC 417	CPAC 1243	CPAC 1246	CPAC 1254	CPAC 4945	CPAC 4947	CPAC 4952	CPAC 4953	CPAC 4959	
BRS-Campo Grande	0																			
<i>S. guianensis</i> cv. BRS-Bela	0.5	0																		
BGF 12-039	0.47475	0.63158	0																	
BGF 08-016	0.43119	0.52632	0.51304	0																
BGF 08-080	0.56701	0.70588	0.15385	0.48673	0															
BGV 14-164	0.49057	0.53846	0.47748	0.15000	0.44954	0														
BGF 14-172	0.45833	0.50000	0.50495	0.09091	0.46000	0.12150	0													
BGF 14-184	0.57778	0.65714	0.44898	0.25714	0.41667	0.18812	0.21739	0												
BGF 14-226	0.44954	0.60976	0.45614	0.17073	0.44643	0.12605	0.14019	0.11538	0											
BGF 14-230	0.49533	0.58974	0.46429	0.17355	0.47273	0.11111	0.14815	0.19608	0.11667	0										
CPAC 417	0.47664	0.64103	0.41593	0.18033	0.45946	0.13559	0.14545	0.22330	0.15702	0.07563	0									
CPAC 1243	0.48673	0.60976	0.41176	0.18750	0.43590	0.11290	0.15517	0.19266	0.13386	0.10400	0.06349	0								
CPAC 1246	0.52941	0.52941	0.53846	0.30435	0.55000	0.34783	0.34884	0.31707	0.34884	0.40909	0.39535	0.34783	0							
CPAC 1254	0.47826	0.52941	0.43750	0.15152	0.43750	0.20000	0.22581	0.18750	0.23529	0.23529	0.17647	0.25714	0.28000	0						
CPAC 4945	0.39130	0.50000	0.39130	0.12000	0.47826	0.21429	0.08333	0.25000	0.25926	0.18519	0.23077	0.25926	0.52941	0.18182	0					
CPAC 4947	0.45263	0.51724	0.50000	0.08257	0.49495	0.20755	0.12381	0.25275	0.15094	0.15888	0.15596	0.20000	0.30000	0.18750	0.12000	0				
CPAC 4952	0.5625	0.65714	0.16505	0.51786	0.08911	0.46296	0.49495	0.41053	0.45946	0.46789	0.45455	0.46552	0.56098	0.39394	0.41667	0.53061	0			
CPAC 4953	0.52577	0.64706	0.52475	0.20000	0.51515	0.18868	0.17526	0.27473	0.19266	0.19626	0.22222	0.22807	0.40541	0.29032	0.20000	0.16667	0.55102	0		
CPAC 4959	0.48454	0.55556	0.54000	0.18182	0.48980	0.22642	0.14583	0.27473	0.22936	0.25234	0.23364	0.23894	0.35000	0.25000	0.20000	0.16667	0.50515	0.11340	0	

A partir do dendrograma (Figura 2), obtido com base na matriz de dissimilaridade genética (Tabela 3) entre os acessos de *Stylosanthes*, com linha de corte sobre a distância de 50%, foi possível separar os acessos em cinco grupos:

Grupo 1: composto pela maioria dos acessos, formado por 14 componentes (BGF 08-016, BGV 14-164, BGF 14-172, BGF 14-184, BGF 14-226, BGF 14-230, CPAC 417, CPAC 1243, CPAC 1254, CPAC 4945, CPAC 4947, CPAC 4953 e CPAC 4959); Grupo 2: formado apenas pelo acesso CPAC 1246; Grupo 3: formado pelos acessos BGF 08-080, CPAC 4952 e BGF 12-039; Grupos 4 e 5: representados pelas cultivares BRS Campo Grande e BRS Bela, respectivamente.

A formação desses grupos, pode ser explicada pela origem geográfica distinta entre os diferentes acessos (Goiás, Mato Grosso, Tocantins, Minas Gerais e Bahia), como também pelo fato de as testemunhas serem formadas por materiais genéticos que passaram por um processo de seleção e, portanto, por serem cultivares, possuem características distintas dos demais acessos. A cultivar ‘Estilosantes Campo Grande’ é composta pela mistura física de acessos resistentes à antracnose de *S. macrocephala* (20 %) e acessos produtivos de *S. capitata* (80%) (JANK et al., 2011), e é atualmente a cultivar comercial mais utilizada.

O coeficiente de correlação cofenética (CCC) encontrado foi de 0,96. Este é um indicativo de bom ajuste entre a matriz de distância original e a matriz de agrupamento (CRUZ et al., 2014), ou seja, há uma grande confiabilidade na utilização do agrupamento pelo método UPGMA.



**Figura 2.** Dendrograma obtido pelo método UPGMA com dados de dissimilaridade genética a partir do método de Dice (Sorenso - Nei e Li) entre os acessos de *Stylosanthes*.

Entre os acessos do Grupo 1 encontramos amostras que ainda não foram classificadas taxonomicamente (Tabela 1). Segundo Alzate-Marin et al., (2020), apesar da alta diversidade intraespecífica e interespecífica do gênero *Stylosanthes* ser buscada na seleção de materiais superiores em programas de melhoramento genético, esta variabilidade tem dificultado sua taxonomia. Dessa forma, os resultados apresentados neste estudo, podem indicar que os componentes do Grupo 1 provavelmente pertencem a mesma espécie que os acessos já classificados taxonomicamente (CPAC 417, CPAC 1243, CPAC 1254, CPAC 4945, CPAC 4947, CPAC 4953, CPAC 4959 e BGF- 08-016) todos identificados como *S. scabra*. Matida et al., (2013) estudando acessos de diferentes espécies observou uma tendência de agrupamento pela variedade botânica. Isso também foi observado em outros trabalhos com *Stylosanthes* (VANDER STAPPEN et al., 1999; FALEIRO et al., 2007; KARIA, 2008).

Silvestri et al., (2020), estudando populações de diferentes espécies do gênero *Stylosanthes*, correlacionaram a diversidade genética encontrada entre os acessos com suas distâncias geográficas. Para este estudo, o Grupo 2, apresentou apenas um acesso, que foi coletado no estado de Goiás. O Grupo 3 foi formado por acessos da região Nordeste e os Grupos 4 e 5 pelas cultivares. E mesmo no Grupo 1, formado por acessos de regiões distintas, podemos observar a formação de cinco subgrupos, com destaque para dois subgrupos formados apenas por amostras do Nordeste e um subgrupo formado por um componente da região Norte (Tabela 1; Figura 2).

## 2.4 Conclusão

Os marcadores utilizados foram eficientes na detecção de polimorfismos moleculares e, portanto, de variabilidade genética entre os acessos de *Stylosanthes*. As cultivares BRS-Campo Grande e BRS-Bela, respectivamente, foram os mais divergentes em relação aos demais.

## 2.5 Referências

- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Diagnostic fingerprints ISSR/SSR for tropical leguminous species *Stylosanthes capitata* and *Stylosanthes macrocephala*. **Scientia Agricola**, v. 77, n. 3. 9 p. 2020.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa-MG: UFV, 2006. 532 p.
- BLAIR, M. W.; HEDETALE, V.; MCCOUCH, S. R. Fluorescent-labeled microsatellite panels useful for detecting allelic diversity in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, n. 2-3, p. 449-457, 2002.
- BRONDANI, R.P.V., BRONDANI, C., GRATTAPAGLIA, D., Towards a genus-wide reference linkage map for Eucalyptus based exclusively on highly informative microsatellite markers. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 267, p. 338-347, 2002.
- CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L. F. V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Org.) **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. 1 ed. Visconde do Rio Brando: Suprema. p. 31-68. 2013.
- CHIARI, L. et al. **Variabilidade genética molecular entre acessos de *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala*, resistentes e suscetíveis à antracnose**. Campo Grande, MS. Embrapa Gado de Corte, 2010.
- COSTA, J. C. et al. Genetic diversity in natural populations of *Stylosanthes scabra* Fabaceae using ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 18, n. 2, 9 p. 2019.
- CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S.; REGAZZI, A.J. **Modelos Biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3th ed. Editora UFV. Viçosa. 2014.
- CRUZ, C.D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum**, v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016.
- EMBRAPA GADO DE CORTE. **Cultivo e uso do estilosantes Campo Grande**. Campo Grande: Embrapa CNPGC, 11p. (Embrapa Gado de Corte, Comunicado Técnico, 105). 2007.
- FALEIRO, F.G. et al. **Utilização de marcadores moleculares na composição de amostra nuclear de *Stylosanthes guianensis***. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 4., 2007, São Lourenço, MG. Anais... São Lourenço: SBMP. p.1-3. 1 CD-ROM. 2007.
- FERNANDES, C. D. **Estilosantes Bela: novo aliado da agropecuária brasileira**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, Folder. 2019.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 220 p. il. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 20). 1998.

HUANG, C.; LIU, G.; BAI, C. Polymorphism analysis in identification of genetic variation and relationships among *Stylosanthes* species. **Biotech**, v. 7, n. 39. 10 p. 2017.

KARIA, C.T. **Caracterização genética e morfoagronômica de germoplasma de *Stylosanthes guianensis*** (Aubl.) SW. 2008. 140 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - UFG, Goiás.

MATIDA, E. T. et al. Variabilidade genética de acessos da cultivar ‘BRS Bela’ de *Stylosanthes guianensis* usando marcadores moleculares RAPD. **Ciência Rural**, v. 43, n. 1, p. 114-119, 2013.

MENDONÇA E. S.; LIMA, P. C.; GUIMARÃES, G. P.; MOURA, W. M. et al. Biological nitrogen fixation by legumes and N uptake by coffee plants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, 10 p. 2017.

NADEEM et al. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. **Biotechnology e Biotechnological Equipment**. v. 32, n. 2, p. 261-285. 2017.

NI, J.; COLOWIT, P. M.; MACKILL, D. J. Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers. **Crop Science**, v. 42, n. 2, p. 601-607. 2002.

OLAFADEHAN, A. O.; ADEWUMI, M. K.; ANDOKUNADE, A. S. Effects of feeding tannin-containing forage in varying proportion with concentrate on the voluntary intake, haematological and biochemical indices of goats. **Trakia Journal of Sciences**, v. 12, n. 1, p. 73-81. 2014.

POWELL, W.; et al. Polymerase chain reaction-based assays for the characterisation of plant genetic resources. **Electrophoresis**, v. 16, n. 9, p. 1726-1730, 1995.

SANTANA-NETO, J. A.; OLIVEIRA, V. S.; VALENÇA, R. L. Leguminosas adaptadas como alternativa alimentar para ovinos no semiárido. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 14, n. 2, p. 191-200. 2015.

SIQUEIRA, M. V. B. M. et al. Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 1, p. 104–110. 2009.

SILVA, M. P. Estilosantes – *Stylosanthes* spp. **Fauna e Flora do Cerrado**, Campo Grande, junho 2004. Disponível em: <<http://cloud.cnpqg.embrapa.br/faunaeflora/plantas-forrageiras/estilosantes-stylosanthes-spp>>. Acesso em: 10 nov. 2022.

SILVESTRI, M. C.; ACUÑA, A.; MORENO, E. M. S.; GARCIA, A. V.; VANNI, R. O.; LAVIA, G. I. Patterns of genetic diversity and potential ecological niches of *Stylosanthes* species from northeastern Argentina. **Crop Science**, v. 60, p. 1436-1449. 2020.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O Uso dos Marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2013.



VANDER STAPPEN, J. et al. Microsatellite markers in *Stylosanthes guianensis*. **Molecular Ecology**, v.8, p.514-517, 1999.

VANHAUWAERT, S. et al. Expressed Repeat Element Improve RT-qPCR Normalization across a Wide Range of Zebrafish Gene Expression Studies. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10. 2014.

---

**CAPÍTULO 3 - TOLERÂNCIA DE GERMOPLASMA DE *Macroptilium*  
AO DÉFICIT HÍDRICO**

---

## TOLERÂNCIA DE GERMOPLASMA DE *Macroptilium* AO DÉFICIT HÍDRICO

### RESUMO

A caatinga apresenta diversas espécies nativas com potencial forrageiro, como a do gênero *Macroptilium* que tem demonstrado boa adaptabilidade a períodos prolongados de seca. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de germoplasmas sob condições de deficiência hídrica. O experimento foi conduzido em casa de vegetação com delineamento em blocos casualizados, com arranjo fatorial 10 x 4 x 2, e três repetições, sendo dez acessos de *Macroptilium*, pertencentes a coleção de trabalho da Embrapa Semiárido, quatro níveis de umidade no solo (25; 50; 75 e 100% da capacidade de campo - CC), e dois cortes. Foram avaliadas as características morfológicas de altura da planta (AP), largura (LLC) e comprimento do lóbulo central (CLC), número de folhas (NF) e massa seca da planta (MSP). Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, sendo as médias entre os cortes comparadas pelo teste de Tukey, os acessos pelo Scott-Knott e os níveis de umidade no solo por regressão. O acesso CTM-A15, da espécie *M. atropurpureum*, seguido pelos acessos CTM-A3 e CTM-A54 foram mais tolerantes ao déficit hídrico e cortes estudados, se mantendo superiores até mesmo a testemunha CTM-A27, apresentando bom desempenho no nível de umidade no solo de 25% da CC. Já entre os acessos de *M. lathyroides* os mais tolerantes foram os acessos CTM-L27 e CTM-L7. Sendo estes os acessos mais recomendados para utilização em futuros programas de melhoramento da espécie para condições de seca.

**Palavra-chave:** Leguminosa forrageira. Umidade do solo. Forragem. Semiárido.

## GERMOPLASM TOLERANCE OF *Macroptilium* TO THE WATER DEFICIT

### SUMMARY

The caatinga has several native species with forage potential, such as the genus *Macroptilium*, which has shown good adaptability to prolonged periods of drought. Thus, the objective of this work was to evaluate the behavior of germplasms under conditions of water deficit. The experiment was carried out in a greenhouse with a randomized block design, in a factorial arrangement 10 x 4 x 2, and three replications, with ten accessions of *Macroptilium*, belonging to the work collection of Embrapa Semiarid, four soil moisture levels (25; 50; 75 and 100% of field capacity - CC), and two cuts. The morphological characteristics of plant height (AP), width (LLC) and length of the central lobe (CLC), number of leaves (NF) and plant dry mass (MSP) were evaluated. The data obtained were subjected to analysis of variance, with the averages between cuts compared by Tukey's test, accessions by Scott-Knott and soil moisture levels by regression. The accession CTM-A15, of the species *M. atropurpureum*, followed by the accessions CTM-A3 and CTM-A54, were more tolerant to water deficit and studied cuts, remaining superior even to the control CTM-A27, presenting good performance in the humidity level in the soil of 25% of CC. Among the *M. lathyroides* accessions, the most tolerant accessions were CTM-L27 and CTM-L7. These are the most recommended accessions for use in future breeding programs for the species for drought conditions.

Keyword: Forage legume. Soil moisture. fodder. Semiarid.

### 3.1 Introdução

O clima semiárido apresenta altas temperaturas e índices elevados de evaporação, resultando em baixa umidade do ar, além de longos períodos de estiagem, com chuvas escassas e mal distribuídas. Estas características climáticas prejudicam o desenvolvimento do alimento para os animais, fazendo-se imprescindível a identificação de espécies forrageiras resistentes e de fácil cultivo como alternativa de alimentação durante esses períodos secos. Considerando-se que esses animais muitas vezes são as únicas fontes de proteína e de renda para os agricultores da região, torna-se imprescindível o desenvolvimento de estudos que permitam criar estratégias alimentares visando otimizar o incremento desse recurso genético local (CAMPOS et al., 2017; PEREIRA, 2018).

Com relação a alimentação dos animais na caatinga, cerca de 70% das espécies vegetais fazem parte da dieta dos caprinos, ovinos e bovinos e outros animais herbívoros, sendo esses pouco resistentes aos grandes períodos de estiagens. Os outros 30% contam com mecanismos de defesa como pelos e espinhos, o que dificulta a alimentação in natura, sendo o cultivo e identificação de espécies nativas da Caatinga resistentes uma importante alternativa para aumentar a oferta de forragem, particularmente porque as plantas são ecologicamente adaptadas.

Entre as famílias de importância forrageira desta região destacam-se as leguminosas (Fabaceae) que compõem grande parte da dieta dos ruminantes, especialmente no período de seca e são uma importante fonte de proteína (GUEDES et al., 2018; PEREIRA, 2018). Espécies do gênero *Macroptilium* são leguminosas forrageiras de porte herbáceo, bem adaptadas a regiões de clima quente e de baixas precipitações, as quais regeneram-se através de sementes que formam bancos no solo formando um estoque de material genético que germinam quando ocorrem as primeiras chuvas. As principais espécies de *Macroptilium* que ocorrem no Nordeste são: *M. martii* (Benth), *M. lathyroides* (L. Urb.) e *M. atropurpureum* (Urb.), sendo estas encontradas nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (SNAK et al., 2020).

O estudo das características morfológicas nos indivíduos é muito importante para se conhecer o comportamento dessa espécie quando submetidos ao estresse provocado pelo déficit hídrico, principalmente no cenário atual de mudanças climáticas que estamos vivendo. Assim, observa-se que existe uma escassez de trabalhos sobre a tolerância ao estresse hídrico, o comportamento e o desempenho de plantas em ambientes de pouca oferta de chuvas e com a previsão de períodos mais prolongados de secas em função do desequilíbrio climático, bem

como sua influência na produção e na qualidade da forragem, tornando necessária a realização desta pesquisa, especialmente para a região semiárida. Assim, frente a necessidade de oferta de material vegetal que venha suprir a demanda para os agricultores em períodos mais crítico de seca o presente trabalho teve por objetivo avaliar a tolerância de germoplasmas de *Macroptilium* ao déficit hídrico sob condições controladas.

### 3.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, pertencente a Embrapa Semiárido, na cidade de Petrolina, PE, Brasil, no período de dezembro de 2018 a março de 2019. As sementes de *Macroptilium* foram semeadas em bandejas de polietileno contendo substrato comercial e quando apresentaram pelo menos duas folhas expandidas, foram transplantadas para vaso com capacidade de 4,5 L, contendo uma mistura de terra, areia e esterco bovino, na proporção de 1:1:1, onde cada planta foi considerada como uma parcela, perfazendo assim um total de 120 parcelas.

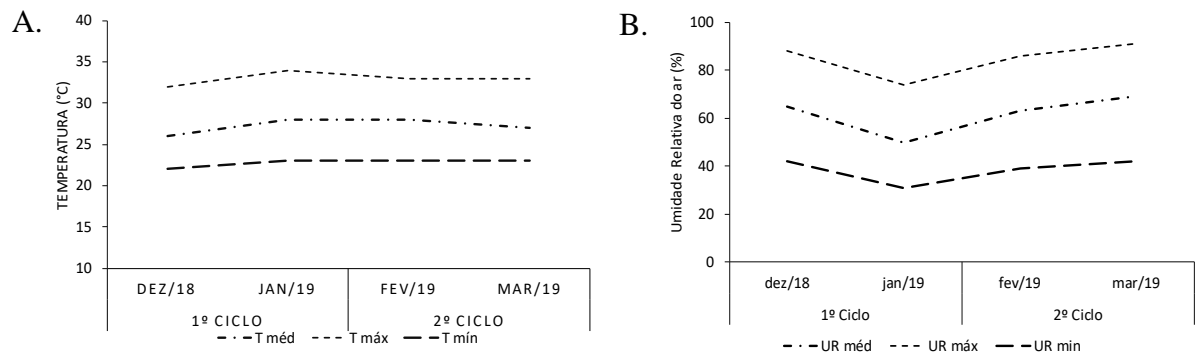
O delineamento experimental foi em blocos casualizados, dispostos em arranjo fatorial 10 x 4 x 2, sendo dez acessos de *Macroptilium*, pertencentes a coleção de trabalho de *Macroptilium* (CTM) da Embrapa Semiárido (Tabela 1), quatro níveis de umidade no solo (25; 50; 75 e 100% da Capacidade de Campo) em dois cortes da cultura, e três blocos casualizados.

Foram avaliados acessos coletados no Nordeste brasileiro e provenientes da Colômbia, Austrália e México e uma cultivar comercial como testemunha (Tabela 1).

**Tabela 1.** Acessos do gênero *Macroptilium* avaliados para tolerância ao estresse hídrico.

Acesso	Espécie	Origem
CTM-A03	<i>M. atropurpureum</i>	Meta, Colômbia
CTM-A15	<i>M. atropurpureum</i>	Tolima, Colômbia
CTM-A27	<i>M. atropurpureum</i> cv. <i>Siratro</i> (Testemunha)	Unknown, Australia
CTM-A54	<i>M. atropurpureum</i>	Oaxaca, Mexico
CTM-L7	<i>M. lathyroides</i>	Pernambuco, Brasil
CTM-L17	<i>M. lathyroides</i>	Bahia, Brasil
CTM-L19	<i>M. lathyroides</i>	Pernambuco, Brasil
CTM-L22	<i>M. lathyroides</i>	Pernambuco, Brasil
CTM-L24	<i>M. lathyroides</i>	Pernambuco, Brasil
CTM-L27	<i>M. lathyroides</i>	Pernambuco, Brasil

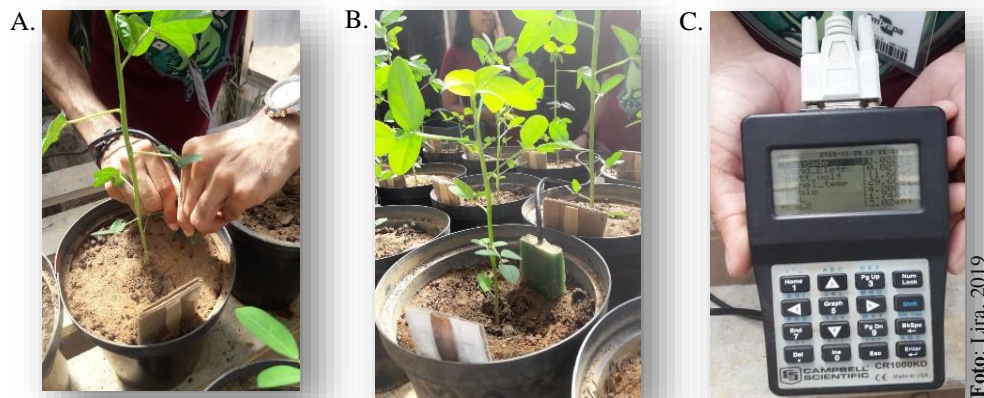
O clima predominante do município, é BSw<sub>h</sub>, com precipitações médias anual de 500 mm temperatura média anual de 26,5°C e umidade relativa do ar de 66% segundo a classificação de Köpper (LOPES et al., 2017). Os dados agro meteorológicos do período de execução do trabalho encontram-se apresentados na Figura 1.



**Figura 1.** (A) Dados de temperaturas do ar máxima ( $T_a$  max), média ( $T_a$  méd) e mínima ( $T_a$  min) e (B) umidade relativa do ar máxima ( $U_r$  max), média ( $U_r$  med) e mínima ( $U_r$  min) durante o período do experimento (dezembro de 2018 a março de 2019), durante os dois cortes da cultura.

As plantas foram mantidas sob rega na capacidade de campo durante 15 dias após serem transplantadas para os vasos, sendo o manejo da irrigação realizado a cada dois dias, através de dados determinados pelo equipamento Time Domain Reflectometry (reflectometria no domínio de tempo - TDR 100), que emite um pulso numa frequência de microondas, utilizando um circuito elétrico adequado para fornecer os dados já convertidos no teor de água no solo (Figura 2).

Aos 30 dias após o início dos tratamentos, com os diferentes níveis de umidade no solo, foi realizada uma avaliação morfoagronômica, seguida do primeiro corte e 30 dias após foi realizada outra avaliação e o segundo corte.

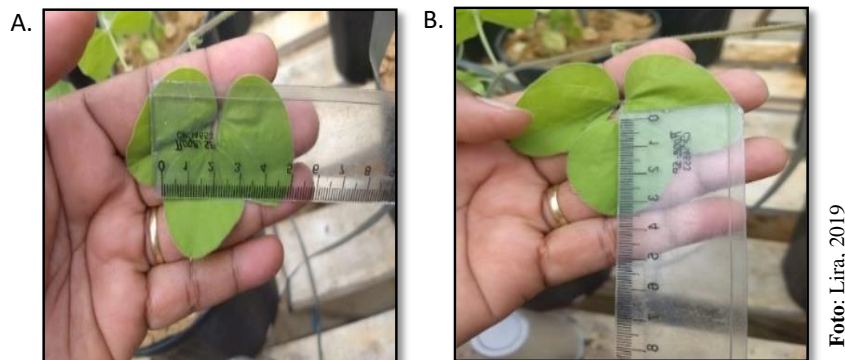


**Figura 2.** A-C Determinação do teor de água no solo utilizando o equipamento Time Domain Reflectometry (reflectometria no domínio de tempo, TDR 100).



As avaliações morfológicas, da parte aérea das plantas, foram realizadas durante os dois cortes da cultura, uma em fevereiro de 2019 e outra em março de 2019, que ocorreram nos períodos de florescimento, pontos onde há maior disponibilidade de forragem pelas plantas.

Foram mensurados os seguintes descritores (Figura 3): largura do lóbulo central (LLC); comprimento do lóbulo central (CLC); altura da planta (AP) (ambos mensurados com auxílio de uma régua graduada); número de folhas por planta (NF); matéria seca da parte aérea da planta (MSP) mensurada após secagem das amostras realizada em estufa de circulação de ar á 55°C por 72 horas.



**Figura 3.** Características avaliadas em acessos de *Macroptilium*, sendo A - largura do lóbulo central e B - comprimento do lóbulo central.

Os resultados foram submetidos à análise de variância com aplicação do teste F ( $p < 0,05$ ), sendo as médias entre os cortes comparadas pelo teste de Tukey, os acessos pelo Scott-Knott e os níveis de umidade no solo por regressão, por meio do software SISVAR, versão 5.3.

### 3.3 Resultados e Discussão

A análise de variância indicou uma interação tripla entre os fatores avaliados, para todos as características analisadas. Nas Tabelas 2 e 3 verificam-se os modelos de equação e de  $R^2$  para as variáveis largura e comprimento do lóbulo central das folhas, respectivamente. Com relação a característica largura do lóbulo central (LLC) (Tabela 2), observa-se um crescimento com o aumento do nível de umidade no solo, tendo um comportamento quadrático no corte 1 para os acessos CTM-A15 e CTM-L7, sendo seus valores máximos da derivada 5,25 e 4,50 cm para os níveis de umidade no solo de 97 e 71,5% da capacidade de campo (CC), respectivamente.

**Tabela 2.** Largura do lóbulo central das folhas em dois cortes da parte aérea de genótipos de *Macroptilium*, cultivados sobre diferentes níveis de umidade do solo.

Genótipo	Níveis de umidade no solo (% da CC)				Equação de regressão	R2	DERIVADA DH/MED.
	25	50	75	100			
<b>Largura do lóbulo central (LLC)</b>							
<b>CORTE 1</b>							
CTM-A15	3,68 Aa	4,79 Aa	5,19 Aa	5,63 Aa	$y = -0,0003x^2 + 0,0582x + 2,4312$	98,68*	97%/ 5,25
CTM-A27	3,40 Ab	3,56 Ac	4,42 Ab	4,82 Ab	$y = 0,0205x + 2,7625$	94,29**	
CTM-A3	3,26 Ab	3,63 Ac	3,98 Ac	4,12 Aa	$y = 0,0117x + 3,0167$	96,59**	
CTM-A54	3,34 Ab	3,57 Ac	4,45 Ab	4,91 Ab	$y = 0,0224x + 2,6688$	95,58**	
CTM-L17	2,39 Ad	2,75 Ad	3,66 Ad	4,27 Aa	$y = 0,0262x + 1,625$	97,73**	
CTM-L19	3,46 Ab	4,13 Ab	4,59 Ab	4,80 Ab	$y = 0,0179x + 3,1208$	95,12**	
CTM-L22	3,83 Aa	4,19 Ab	5,29 Aa	5,87 Aa	$y = 0,0289x + 2,9875$	96,67**	
CTM-L24	2,99 Ac	3,06 Ad	4,04 Ac	4,21 Ac	$y = 0,0186x + 2,4125$	87,91**	
CTM-L27	3,79 Aa	4,10 Ab	4,20 Ac	4,65 Ab	$y = 0,0107x + 3,5167$	94,55**	
CTM-L7	3,63 Aa	4,56 Aa	4,66 Ab	4,72 Ab	$y = -0,0004x^2 + 0,0572x + 2,4625$	96,08**	71,5%/4,50
<b>CORTE 2</b>							
CTM-A15	2,88 Ba	3,25 Ba	3,31 Ba	3,57 Ba	$y = 0,0085x + 2,7229$	93,60**	
CTM-A27	2,58 Ba	2,88 Bb	2,94 Bb	3,11 Bb	$y = 0,0066x + 2,4667$	93,48*	
CTM-A3	2,28 Bb	2,50 Bc	2,69 Bc	2,82 Bc	$y = 0,0072x + 2,125$	98,66**	
CTM-A54	2,79 Ba	2,85 Bb	3,05 Bb	3,44 Ba	$y = 0,0086x + 2,4979$	89,36**	
CTM-L17	2,13 Ab	2,29 Bc	2,68 Bc	2,98 Bb	$y = 0,0118x + 1,7792$	97,93**	
CTM-L19	2,25 Bb	2,49 Bc	2,56 Bc	3,07 Bb	$y = 0,0101x + 1,9625$	89,22**	
CTM-L22	2,63 Ba	2,72 Bc	3,11 Bb	3,50 Ba	$y = 0,0121x + 2,2333$	94,40**	
CTM-L24	2,12 Bb	2,29 Bc	2,33 Bc	2,56 Bc	$y = 0,0055x + 1,9771$	94,73*	
CTM-L27	2,46 Ba	3,08 Ba	3,47 Ba	3,77 Ba	$y = 0,0172x + 2,1167$	97,11**	
CTM-L7	2,21 Bb	2,63 Bc	2,88 Bb	3,01 Bb	$y = 0,0106x + 2,0167$	94,56**	

CC – Capacidade de campo; \*Médias com letras maiúsculas (diferença entre cortes), não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), e médias com letras minúsculas (diferença entre acessos) na lâmina, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). \* e \*\* = regressão significativa com 5 e 1% de significância, respectivamente, ns = não significativa.

Para os demais acessos, os crescimentos foram lineares com o aumento da umidade do solo, com diferenças significativas de 5 e 1% de probabilidade, tendo as maiores médias registradas no nível de 100% da CC, umidade esta que deve ser tomada como referência, uma vez que nela a água fica retida com uma menor tensão no solo e se torna mais disponível para as plantas. Por meio do teste de médias (Tabela 2) podemos inferir que para a característica largura do lóbulo central, houve diferença significativa entre os dois cortes, em todos os níveis de umidade testados. Ao comparar os dois cortes, observou-se os maiores valores para as

plantas no corte 1, sendo este superior ao corte 2 em todos os níveis de umidade e para todos os acessos.

Quando considerado o desempenho dos acessos dentro de cada nível de umidade aplicado, observa-se que no nível de estresse hídrico mais severo (25% da CC), os acessos CTM-L22 e CTM-L27 foram os que mais se destacaram, apresentando maior largura das folhas nos dois cortes. Nos níveis de estresse hídrico moderado (umidades de 50 e 75% da CC), observa-se que o acesso CTM-L7 apresentou maior tolerância no corte 1 para a umidade de 50% da CC, e o acesso CTM-L22 apresentou melhor desempenho no corte 1 quando submetido a umidade de 75% da CC. Considerando o corte 2, em todos os níveis de umidade aplicado, o acesso CTM-L27 foi o que demonstrou melhor desempenho. O acesso que demonstrou melhor desempenho nos dois cortes foi o acesso CTM-L22, e o acesso CTM-A54 apenas no corte 2.

Já ao considerar a característica comprimento do lóbulo central (CLC) (Tabela 3), todos os acessos estudados apresentaram diferença significativa entre os dois cortes, sendo os valores obtidos no corte 1 superiores aos do corte 2, a exemplo do que foi observado na característica largura do lóbulo central, em todos os níveis de umidade testados.

A equação da regressão apresentou comportamento linear para os acessos que apresentaram significância, com bom ajuste do  $R^2$  e altamente significativo, a 1% de probabilidade, com o nível de umidade máximo em 100% da CC. Apenas os acessos CTM-A3 e CTM-A54 além da testemunha, não apresentaram efeito significativo no corte 2 (Tabela 3).

Analisando as médias dos comprimentos dos lóbulos centrais nos níveis de estresse hídrico mais severo (umidade de 25% da CC), o acesso mais tolerante nos dois cortes foi CTM-L7, seguido pelo acesso CTM-L24 e CTM-L27, que apresentaram tolerância ao déficit hídrico apenas no corte 1 e pelos acessos CTM-L17 e CTM-L22 que se mostraram tolerantes apenas no corte 2.

Para os níveis de estresse hídrico moderado os acessos que se destacaram foram CTM-L17 e CTM-L7 nos dois cortes, no nível de umidade de 50% da CC seguidos pelos acessos CTM-L22 e CTM-L24, no corte 1 e o acesso CTM-L27 no corte 2. Para a nível de umidade 75% da CC os acessos que apresentaram maiores comprimentos do lóbulo central nos dois cortes foram, CTM-L17, CTM-L22, CTM-L27 e CTM-A15, seguidos pelos acessos CTM-A54, CTM-L19 e CTM-L24 no corte 1, e pelo acesso CTM-L7 no corte 2. O acesso CTM-A15, apresentou um desempenho satisfatório tanto no estresse hídrico mais severo, quanto nos moderados, nos dois cortes, sendo o acesso que apresentou maior largura e comprimento do lóbulo central.

**Tabela 3.** Comprimento do lóbulo central das folhas em dois cortes da parte aérea de genótipos de *Macroptilium*, sobre diferentes disponibilidades da água no solo para a planta.

Genótipo	Níveis de umidade no solo (% da CC)				Equação de regressão	R <sup>2</sup>	DERIVADA DH/MED.
	25	50	75	100			
<b>Comprimento do lóbulo central (CLC)</b>							
<b>CORTE 1</b>							
CTM-A15	5,25 Aa	6,02 Aa	6,52 Aa	6,71 Ab	y = 0.0196x + 4.9	93,02**	
CTM-A27	4,64 Ab	5,64 Aa	6,42 Aa	6,80 Ab	y = 0.029x + 4.0625	96,41**	
CTM-A3	4,79 Ab	5,23 Ab	5,27 Ac	5,49 Ac	y = 0.0086x + 4.6542	88,83**	
CTM-A54	4,79 Ab	4,90 Ab	6,39 Aa	6,64 Ab	y = 0.0282x + 3.9146	87,48**	
CTM-L17	4,87 Ab	5,72 Aa	6,62 Aa	7,36 Aa	y = 0.0335x + 4.0458	99,85**	
CTM-L19	4,87 Ab	5,31 Ab	6,15 Aa	6,43 Ab	y = 0.0221x + 4.3104	96,64**	
CTM-L22	4,94 Ab	6,19 Aa	6,62 Aa	7,16 Aa	y = 0.0283x + 4.4542	93,85**	
CTM-L24	5,53 Aa	6,09 Aa	6,68 Aa	6,78 Ab	y = 0.0174x + 5.1792	93,63**	
CTM-L27	5,21 Aa	5,50 Ab	6,48 Aa	7,15 Aa	y = 0.0271x + 4.3875	96,31**	
CTM-L7	5,75 Aa	5,78 Aa	5,96 Ab	6,54 Ab	y = 0.0102x + 5.3687	80,62**	
<b>CORTE 2</b>							
CTM-A15	3,52 Ba	4,16 Ba	4,46 Ba	4,58 Bb	y = 0.014x + 3.3063	89,79**	
CTM-A27	3,59 Ba	3,59 Bb	3,69 Bb	3,83 Bc	y	ns	
CTM-A3	3,20 Bb	3,59 Bb	3,66 Bb	3,71 Bc	y	ns	
CTM-A54	3,25 Bb	3,50 Bb	3,55 Bb	3,72 Bc	y	ns	
CTM-L17	3,88 Ba	4,08 Ba	4,37 Ba	5,15 Ba	y = 0.0164x + 3.3417	90,20**	
CTM-L19	3,00 Bb	3,54 Bb	3,73 Bb	4,54 Bb	y = 0.0192x + 2.5	94,44**	
CTM-L22	3,54 Ba	3,44 Bb	4,42 Ba	4,55 Bb	y = 0.0159x + 2.9896	79,77**	
CTM-L24	3,11 Bb	3,69 Bb	3,70 Bb	4,46 Bb	y = 0.0163x + 2.7229	89,76**	
CTM-L27	3,29 Bb	4,11 Ba	4,42 Ba	4,75 Bb	y = 0.0187x + 2.9708	93,79**	
CTM-L7	3,49 Ba	4,14 Ba	4,28 Ba	4,31 Bb	y = 0.0104x + 3.4021	77,31**	

CC – Capacidade de campo; \*Médias com letras maiúsculas (diferença entre cortes), não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), e médias com letras minúsculas (diferença entre acessos) na lâmina, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). \* e \*\* = regressão significativa com 5 e 1% de significância, respectivamente, ns = não significativa.

Segundo Soares et al., (2017), o estresse leva as plantas a passarem por várias adaptações morfológicas e fisiológicas, sendo uma delas a redução no tamanho das folhas, essa redução aumenta a sobrevivência das plantas em ambientes adversos. Amaral (2018) ao estudar o déficit hídrico em laranjeiras também constatou que o estresse hídrico tem vários efeitos sobre o crescimento vegetal, entre eles a inibição da expansão foliar, abscisão foliar, acentuado crescimento de raízes e fechamento estomático levando a planta a diminuir a taxa transpiratória e conseqüentemente a expansão foliar.

Considerando a característica número de folhas da planta (NFP) (Tabela 4), podemos observar que os acessos CTM-A54, CTM-L19 e CTM-L22 no corte 1 e CTM-L17 e CTM-L27 no corte 2, também apresentaram um crescimento no NFP com o aumento da disponibilidade da água no solo, tendo um comportamento quadrático, mas de forma exponencial, obtendo assim o maior valor com a umidade de 100% da CC. Já no corte 2, os acessos CTM-A54 e a testemunha obtiveram um comportamento quadrático da curva com valores máximos da derivada nos níveis de umidade de 92,9 e 118,6% da CC, respectivamente, sendo seus NFP de 105 e 78 respectivamente. Os demais acessos apresentaram comportamento linear, todos com bom ajuste do R<sup>2</sup> e alta significância nos dois cortes.

**Tabela 4.** Número de folhas por planta (NFP) em dois cortes da parte aérea de genótipos de *Macroptilium*, cultivados sobre diferentes níveis de umidade do solo.

Genótipo	Níveis de umidade no solo (% da CC)				Equação de regressão	R2	DERIVADA DH/MED
	25	50	75	100			
<b>NÚMERO DE FOLHAS POR PLANTA (NFP)</b>							
<b>CORTE 1</b>							
CTM-A15	39 Ab	45 Bc	54 Ac	56 Bc	$y = 0.2467x + 33.167$	94,92**	
CTM-A27	36 Ab	44 Ac	59 Bb	64 Bc	$y = 0.404x + 25.667$	96,83**	
CTM-A3	56 Aa	75 Aa	84 Aa	111 Aa	$y = 0.6933x + 38.167$	96,51**	
CTM-A54	45 Ab	55 Bb	61 Bb	94 Bb	$y = 0,0092x^2 - 0,5327x + 53,75$	96,64*	Exponencial
CTM-L17	42 Ab	46 Ac	82 Aa	92 Ab	$y = 0.7427x + 19$	90,90**	
CTM-L19	49 Aa	56 Ab	68 Ab	94 Ab	$y = 0,0076x^2 - 0,354x + 53,583$	99,61**	Exponencial
CTM-L22	52 Aa	54 Ab	66 Ab	91 Ab	$y = 0,0091x^2 - 0,624x + 62,083$	99,95**	Exponencial
CTM-L24	36 Ab	43 Ac	50 Ac	60 Ac	$y = 0.3147x + 27.667$	98,47**	
CTM-L27	56 Aa	63 Ab	66 Ab	67 Ac	$y = 0.1467x + 54$	87,55*	
CTM-L7	52 Aa	59 Ab	77 Aa	90 Ab	$y = 0.528x + 36.667$	97,33**	
<b>CORTE 2</b>							
CTM-A15	33 Aa	59 Ab	62 Ac	89 Ab	$y = 0.688x + 17.667$	92,95**	
CTM-A27	33 Aa	47 Ac	73 Ab	75 Ac	$y = -0,0054x^2 + 1,281x + 2,4583$	94,34*	118,6%/78
CTM-A3	25 Ba	42 Bc	70 Bb	78 Bc	$y = 0.748x + 7.1667$	96,08**	
CTM-A54	28 Ba	82 Aa	93 Aa	106 Aa	$y = -0,016x^2 + 2,9733x - 33,5$	97,28*	92,9%/105
CTM-L17	35 Aa	36 Bd	73 Ab	92 Ab	$y = 0,0073x^2 - 0,0753x + 29,25$	93,96**	Exponencial
CTM-L19	39 Ba	44 Bc	49 Bd	67 Bc	$y = 0.3587x + 27.333$	89,27**	
CTM-L22	27 Ba	40 Bd	73 Ab	78 Bc	$y = 0.754x + 7.3333$	92,49**	
CTM-L24	29 Aa	44 Ac	45 Ad	59 Ad	$y = 0.3613x + 21.417$	92,51**	
CTM-L27	33 Ba	36 Bd	48 Bd	72 Ac	$y = 0,0088x^2 - 0,588x + 42,667$	99,96**	Exponencial
CTM-L7	32 Ba	33 Bd	42 Bd	47 Be	$y = 0.2203x + 24.542$	92,90**	

CC – Capacidade de campo; \*Médias com letras maiúsculas (diferença entre cortes), não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), e médias com letras minúsculas (diferença entre acessos) na lâmina, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). \* e \*\* = regressão significativa com 5 e 1% de significância, respectivamente, ns = não significativa.

Já na comparação entre as médias do NFP, dentro dos diferentes níveis de umidade do solo testados, os acessos que apresentaram maior tolerância ao estresse hídrico mais severo (umidade de 25% da CC) nos dois cortes, foram os acessos CTM-A3, CTM-L19, CTM-L22, CTM-L27 e CTM-L7, seguidos pelo acesso CTM-A15, CTM-A54, CTM-L17 e CTM-L24, que apresentaram maiores NFP apenas no corte 2. Quando submetidos aos estresses hídricos moderados, os acessos CTM-A3 no corte 1 e CTM-A54 no corte 2, foram os que apresentaram maior NFP no nível de umidade de 50% da CC e os acessos CTM-A3, CTM-L17 e CTM-L7 no corte 1, e CTM-A54 no corte 2, foram os que apresentaram maior NFP quando submetidos ao nível de umidade de 75% da CC.

Esses acessos foram superiores a testemunha CTM-A27 em relação a todas as disponibilidades hídricas testadas, apresentando o mesmo comportamento apenas na umidade de 25% da CC no corte 2, e não responderam significativamente na umidade de 100% da CC, controle. Pode-se observar na Tabela 4 que no corte 2 houve uma redução no número de folhas para as disponibilidades hídricas de estresse severo como também as de estresse moderado, quando comparado ao corte 1 para todos os acessos, apresentando um crescimento no número de folhas apenas para o tratamento controle. Essa redução provavelmente se dá pelo fato de o estresse hídrico acelerar a senescência foliar com o decorrer dos cortes da planta.

Campos et al., (2021) relata que em feijoeiro submetidos ao estresse hídrico foram encontrados efeitos severos como, baixo rendimento dos grãos e poucas folhas para a planta, sendo estas na maioria folhas menores e murchas. Du et al., (2020), observaram em seus estudos com leguminosas com a soja, que o estresse hídrico apresentou efeitos negativos no crescimento no desenvolvimento e no rendimento da cultura, pois o déficit hídrico inibiu a produção de produtos fotossintéticos levando a diminuição da capacidade fotossintética da folha, o que acelera tanto a senescência foliar quanto o estresse oxidativo, levando a uma diminuição no quantitativo de folhas e consequentemente na produção de biomassa. Silva (2021), também trabalhando com soja, observou uma diminuição no número de folhas por planta, quando esta foi submetida ao estresse severo por 32 dias, porém essa diminuição foi considerada por ele inexpressiva.

Ao observar a característica altura da planta na Tabela 5, nota-se que os acessos CTM-A3 e CTM-L7 apresentaram comportamento quadrático de forma exponencial no ciclo 1, já os acessos CTM-L17 e CTM-L27, apresentaram comportamento quadrático da curva para a maioria dos acessos, sendo os valores máximos nas umidades de 89,16 e 103,6% da CC, com medias máximas de 75,90 e 93,62 cm, respectivamente no corte 1. Os demais acessos apresentaram comportamento linear neste corte e no corte 2, sendo que os modelos de equação de  $R^2$  apresentaram excelentes ajustes, com significância de 1%.

**Tabela 5.** Altura da planta (AP) em dois cortes da parte aérea de genótipos de *Macropitilium*, cultivados sobre diferentes níveis de umidade do solo.

Genótipo	Níveis de umidade no solo (% da CC)				Equação de regressão	R2	DERIVADA DH/MED
	25	50	75	100			
<b>ALTURA DA PLANTA (AP)</b>							
<b>CORTE 1</b>							
CTM-A15	66 Aa	82 Aa	100 Ab	118 Ac	$y = 0.5133x + 55.667$	93,76**	
CTM-A27	51 Ab	83 Aa	91 Ac	93 Ad	$y = -0.0121x^2 + 2.062x + 7.5833$	98,67**	85,2%/95,43
CTM-A3	71 Aa	73 Ab	116 Aa	144 Aa	$y = 0.0101x^2 - 0.2123x + 67.208$	95,78**	Exponencial
CTM-A54	66 Aa	90 Aa	103 Ab	125 Ab	$y = 0.7633x + 48.417$	99,15**	
CTM-L17	35 Ad	59 Ac	72 Ae	76 Af	$y = -0.012x^2 + 2.14x - 19.5$	99,67**	89,16%/75,90
CTM-L19	38 Ac	47 Ad	67 Ae	71 Af	$y = 0.478x + 25.667$	95,01**	
CTM-L22	46 Ab	64 Ac	71 Ae	85 Ae	$y = 0.4987x + 35.5$	98,03**	
CTM-L24	45 Ab	72 Ab	87 Ac	108 Ac	$y = 0.8147x + 27.333$	98,76**	
CTM-L27	46 Ab	75 Ab	81 Ad	93 Ad	$y = -0.0072x^2 + 1.492x + 14.333$	96,47**	103,6%/93,62
CTM-L7	53 Ab	56 Ac	64 Ae	90 Ad	$y = 0.0095x^2 - 0.694x + 64.75$	99,06**	Exponencial
<b>CORTE 2</b>							
CTM-A15	41 Ba	77 Aa	78 Bb	103 Ba	$y = 0.9367x + 20$	90,42**	
CTM-A27	40 Ba	55 Bb	56 Bc	83 Bc	$y = 0.5213x + 26$	88,53*	
CTM-A3	38 Ba	59 Bb	77 Bb	96 Bb	$y = 0.7607x + 19.833$	99,90**	
CTM-A54	38 Ba	66 Bb	88 Ba	123 Aa	$y = 1.108x + 9.6667$	99,15**	
CTM-L17	26 Ab	41 Bc	69 Ab	75 Ad	$y = 0.588x + 18.167$	91,66**	
CTM-L19	26 Bb	37 Bc	45 Bd	55 Be	$y = 0.382x + 16.5$	99,63**	
CTM-L22	31 Bb	44 Bc	57 Bc	58 Be	$y = 0.3647x + 24.667$	91,18**	
CTM-L24	33 Bb	46 Bc	47 Bd	67 Bd	$y = 0.42x + 21.75$	90,59**	
CTM-L27	31 Bb	40 Bc	43 Bd	56 Be	$y = 0.3047x + 23.25$	94,38**	
CTM-L7	34 Bb	36 Bc	53 Bc	55 Be	$y = 0.324x + 24.167$	88,17**	

CC – Capacidade de campo; \*Médias com letras maiúsculas (diferença entre cortes), não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), e médias com letras minúsculas (diferença entre acessos) na lâmina, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). \* e \*\* = regressão significativa com 5% e 1% de significância, respectivamente, ns = não significativa.

Quando se compara as médias dos acessos submetidos ao nível de estresse hídrico mais severo (umidade de 25% da CC), os que apresentaram plantas com maior altura nos dois cortes foram os da espécie *M. atropurpureum* CTM-A15, CTM-A3 e CTM-A54, sendo estes superiores a testemunha CTM-A27, que apenas mostrou um bom desenvolvimento no corte 2. O acesso CTM-A15 ainda se mostrou responsivo quando submetido ao estresse hídrico moderado, com umidade de 50% da CC nos dois cortes, já o acesso CTM-A54 respondeu bem no corte 1 a este mesmo nível de umidade, porém no nível de umidade de 75% da CC apenas os acessos CTM-A3 no corte 1 e CTM-A54 no corte 2 apresentaram plantas mais altas. Para o nível de umidade de 100% da CC os acessos CTM-A15 e CTM-A54 foram os únicos que se apresentaram responsivos, porém apenas no corte 2. Os demais acessos não apresentaram diferença significativa para nenhuma outra disponibilidade hídrica. Os acessos da espécie *M. atropurpureum* foram os únicos acessos que apresentaram maior altura de planta entre as duas espécies, isso provavelmente se deu por essa espécie, apresentar um comportamento característico de plantas trepadeiras.

Diante do exposto, pode se inferir que os acessos que têm menor alteração no número de folhas e altura das plantas tem maior capacidade de tolerar o déficit hídrico, demonstrando ter potencial para serem recomendadas como alternativas para tolerância à seca. Os resultados podem estar associados ao fato que o estresse hídrico severo inibe a síntese de produtos fotossintéticos e interrompe o balanço de carbono, resultando em crescimento reduzido e distúrbios metabólicos fisiológicos. Esta redução, principalmente no tamanho das folhas é comum em plantas sob estresse, pois as mudanças impostas na fisiologia das plantas levam-nas a desenvolver mecanismos de adaptação e resistência, ajudando a converter a energia poupada em atividades bioquímicas da planta, otimizando a absorção de nutrientes (TAIZ; ZEIGER, 2017; DU et al., 2020; SOUZA et al., 2020).

Segundo Campos et al., (2021), uma das formas que a planta desenvolve para manter seu desenvolvimento, mesmo quando submetidas a estresse hídrico severo, é o ajustamento osmótico, pois dessa forma mantém tanto o abastecimento de água nas folhas, como a produção de folhas. Assim, pode-se inferir que acessos submetidos ao estresse severo e que tem menor alteração no número de folhas e altura das plantas nesta condição, tem maior capacidade de tolerância ao déficit hídrico, demonstrando ter potencial para serem selecionadas como alternativas para utilização em épocas de seca.

Observa-se na Tabela 6 que para a característica da matéria seca da planta (MSP), no corte 1, os acessos que apresentaram comportamento quadrático da curva foram CTM-A54 e CTM-L17, com os máximos valores de 1114 e 1235 g para os níveis de umidade de 89,98 e

90,91% da CC, respectivamente. Cabe destacar que o acesso CTM-A15 apresentou comportamento exponencial e os demais apresentaram comportamento linear. No corte 2 foi observado comportamento linear para quase todos os acessos, com excelente ajuste do  $R^2$  e alta significância a 1%, sendo que apenas os acessos CTM-L24 e CTM-L27 não apresentaram diferença significativa com relação a disponibilidade de água no solo.

**Tabela 6.** Matéria seca da planta (MSP) em dois cortes da parte aérea de genótipos de *Macroptilium*, cultivados sobre diferentes níveis de umidade do solo.

Genótipo	Níveis de umidade no solo (% da CC)				Equação de regressão	R2	DERIVADA DH/MED
	25	50	75	100			
<b>MASSA SECA DA PLANTA (g)</b>							
<b>CORTE 1</b>							
CTM-A15	365 Ab	568 Ad	772 Ad	1223 Ad	$y = 0.19x^2 - 11.93x + 530.42$	99,20**	Exponencial
CTM-A27	498 Ac	835 Ac	1356 Aa	1415 Ac	$y = 16.587x - 110$	92,33**	
CTM-A3	660 Aa	673 Ac	1326 Ab	1768 Ac	$y = 11.333x + 270$	90,63**	
CTM-A54	427 Ab	970 Ab	977 Ac	1133 Ad	$y = -0.1547x^2 + 27.84x - 138.33$	91,79*	89,98%/1114
CTM-L17	268 Ac	823 Ac	1195 Ab	1210 Ad	$y = -0.2353x^2 + 42.783x - 708.75$	99,88**	90,91/1235
CTM-L19	550 Aa	805 Ac	1483 Aa	1613 Ab	$y = 15.473x + 145.83$	93,61**	
CTM-L22	550 Aa	893 Ab	1377 Aa	1707 Ab	$y = 15.813x + 143.33$	99,45**	
CTM-L24	667 Aa	760 Ac	1513 Aa	1710 Ab	$y = 15.533x + 191.67$	90,77**	
CTM-L27	673 Aa	1130 Aa	1375 Aa	1835 Aa	$y = 14.92x + 320.83$	98,71**	
CTM-L7	630 Aa	1096 Aa	1433 Aa	1897 Aa	$y = 16.547x + 230$	99,62**	
<b>CORTE 2</b>							
CTM-A15	320 Ab	367 Bb	747 Ab	803 Bb	$y = 6.6173x + 202.33$	91,56**	
CTM-A27	260 Ba	675 Ba	865 Ab	952 Bb	$y = 5.5587x + 440.17$	81,24**	
CTM-A3	462 Ba	670 Aa	1133 Ba	1450 Ba	$y = 18.279x - 85.417$	96,81**	
CTM-A54	394 Aa	742 Ba	827 Bb	937 Bb	$y = 6.852x + 296.5$	88,93**	
CTM-L17	220 Ab	427 Bb	882 Bb	952 Bb	$y = 10.02x + 5.8333$	92,57**	
CTM-L19	247 Bb	450 Bb	555 Bc	673 Bc	$y = 5.5387x + 135$	97,53**	
CTM-L22	517 Aa	575 Bb	742 Bb	868 Bb	$y = 4.8867x + 370$	97,05**	
CTM-L24	522 Aa	531 Bb	540 Bc	568 Bc	y	ns	
CTM-L27	508 Ba	510 Bb	522 Bc	642 Bc	y	ns	
CTM-L7	414 Ba	440 Bb	715 Bb	865 Bb	$y = 6.512x + 201.5$	92,44**	

CC – Capacidade de campo; \*Médias com letras maiúsculas (diferença entre cortes), não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). e médias com letras minúsculas (diferença entre acessos) na lâmina, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). \* e \*\* = regressão significativa com 5% e 1% de significância, respectivamente, ns = não significativa.

Quando os acessos foram submetidos ao nível de estresse hídrico mais severo (umidade de 25% da CC), os que apresentaram mais acúmulo de massa nos dois cortes foram os acessos CTM-L22 e CTM-L24. Quando submetidos a um estresse mais moderado (umidade de 50% da CC) o acesso que apresentou melhor desempenho foi o acesso CTM-A54 no corte 2 e para o nível de umidade de 75% da CC, foram os acessos CTM-L19, CTM-L22 e CTM-L24 no corte 1. Os acessos CTM-A3, no corte 1, CTM-L27 e CTM-L7 no corte 2, apresentaram melhor acúmulo de massa em todas as lâminas, se assemelhando a testemunha CTM-A27 apenas no nível de umidade de 75% da CC, sendo superior nas demais lâminas.

Silva (2021) em estudos com outras espécies de leguminosas como a soja, relatou que o déficit hídrico foi o maior responsável por diversas alterações fisiológicas causadas nas plantas, porém em seus estudos, somente a matéria seca da folha não apresentou interação significativa quando aplicado um estresse severo de 32 dias, o que não foi observado neste estudo, pois para



essa característica quase todos os acessos apresentaram interação significativa, sendo que apenas os acessos CTM-L24 e CTM-L27 não apresentaram interação significativa no corte 2.

Os resultados corroboram com a descrição de alguns autores, os quais descrevem que a baixa disponibilidade hídrica leva ao fechamento dos estômatos, que resulta no aumento da temperatura foliar e na diminuição da eficiência fotossintética, o que acarreta um decréscimo do acúmulo de matéria seca e uma expressiva diminuição do fluxo de nutriente que vão do solo para as raízes, inibindo o desenvolvimento da planta (PEIXOTO, 2011; MENEZES et al., 2014; PERDOMO et al., 2017; TAIZ et al., 2017).

Nesse contexto, ao correlacionar os dados obtidos neste trabalho com as características climáticas da região semiárida, conforme apresentada na Figura 1, as altas temperaturas registradas durante a realização do experimento nos dois ciclos estudados tendem a favorecer a diminuição da largura e comprimento do lóbulo central, como ainda a diminuição no número de folhas por acelerar a senescência, isso se dá como forma da planta se proteger da perda de água em suas folhas, pois ao acionar esse mecanismo de defesa, esta tende a diminuir o tamanho e a espessura da folha proporcionando menor teor de matéria seca da planta. Para Rowland et al., (2018), o déficit hídrico é um dos principais fatores que reduzem o crescimento das plantas, sendo visto como um limitante de produtividade.

No trabalho com estresse hídrico em leguminosa desenvolvido por Du et al., (2020), ocorreu uma diminuição expressiva da biomassa da parte aérea mais do que das raízes. Apesar de não ter sido quantificado essa relação, foi possível observar uma maior redução de matéria seca e desenvolvimento da planta neste trabalho (Figura 4), frente às menores disponibilidades hídricas. Pereira (2019) também relatou, que em seus estudos com soja submetida ao estresse hídrico resultaram tanto na redução da matéria seca quanto na diminuição do índice de área foliar.

Diante dos resultados observados, pode-se afirmar que existe variabilidade para as características avaliadas, o que sugere sucesso na seleção de materiais potencialmente superiores. A variação das plantas frente aos diferentes níveis de umidade no solo pôde ser observada no final do experimento (Figura 4), na qual observa-se visualmente uma diferença entre as alturas das plantas, com relação os diferentes níveis de umidade do solo nos quais elas foram cultivadas.



**Figura 4.** Sintoma visual do efeito do déficit hídrico no desenvolvimento vegetativo do acesso CTM-L22 (*M. lathyroides*) submetido aos níveis de umidade no solo de 1; 2; 3 e 4, sendo 25; 50; 75 e 100% da capacidade de campo, respectivamente, ao fim do experimento.

### 3.4 Conclusão

Os acessos que foram mais tolerantes ao nível de estresse hídrico mais severo (umidade do solo de 25% da CC), inclusive muitas vezes superiores a testemunha CTM-A27, foram os CTM-A15, da espécie *M. atropurpureum*, seguido pelos acessos CTM-A3 e CTM-A54. Já entre os acessos de *M. lathyroides* os mais tolerantes fôramos acessos CTM-L27 e CTM-L7, sendo estes os acessos mais recomendados para utilização em futuros programas de melhoramentos da espécie para condições de seca.

### 3.5 Referências

- BARROS, J. M. T. M. **Fungos micorrízicos em mudas de *Jatropha curcas* L. submetidas a estresse hídrico.** 2018. 30 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção vegetal). UFAL, Alagoas.
- CAMPOS, A. J. M.; SANTOS, S. M.; NACARATH, I. R. F. F. Estresse hídrico em plantas: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, 7 p. 2021.
- CAMPOS, F. S. et al. Alternativa de forragem para caprinos e ovinos criados no semiárido. **Revista Nutritime**, v. 14, n. 2, p. 5004-5013. 2017.
- DU, Y. et al. Effect of drought stress on sugar metabolism in leaves and roots of soybean Seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 146, p. 1-12. 2020.
- GUEDES, F. L. et al. **Desempenho de forrageiras em caatinga manipulada em região semiárida.** Circular Técnica. Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral. 2018.
- LOPES, I. et al. Balanço hídrico em função de regimes pluviométricos na região de Petrolina-PE. **Irriga**, v. 22, p. 443-457. 2017.
- MENEZES JÚNIOR, F. O.; GONÇALVES, P. A.; VIEIRA NETO, J. Produtividade da cebola em cultivo mínimo no sistema convencional e orgânico com biofertilizantes. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 475-481, 2014.
- PEIXOTO, C. P. **Curso de Fisiologia Vegetal.** Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2011. 177 p.
- PERDOMO, J. A. et al. Rubisco and Rubisco Activase Play an Important Role in the Biochemical Limitations of Photosynthesis in Rice, Wheat, and Maize under High Temperature and Water Deficit. **Frontiers Plant Science**, v.13, n. 8, 15 p. 2017.
- PEREIRA, I. M. C. **Potencial de Produção de Oleaginosas no Semiárido Pernambucano, com ênfase ao desenvolvimento de *Syagrus Coronata* (Licuri) em Solos Degradados.** 2018. 148 p. Tese (Doutorado em Geografia) UFPE, Recife.
- PEREIRA, Y. C. et al. Brassinosteroids in soybean plants under water deficit. **Photosynthetica**, v. 57, n. 1, p. 181-191, 2019.
- ROWLAND, L. S.; SMITH, H. K.; TAYLOR, G. The potential to improve culinary herb crop quality with deficit irrigation. **Scientia Horticulturae**, v. 242, p.44-50, 2018.
- SILVA, A. L. J. **24-epibrassinolídeo atenua o estresse hídrico na fase de crescimento vegetativo e melhora o rendimento de plantas de soja.** 2021. 72p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal). UFAL, Alagoas.

SOARES, E. V. de L. et al. Avaliação de parâmetros relacionados ao estresse hídrico. In: org. Broetto, F.; Gomes, E. R.; Joca, T. A. C. **O estresse das plantas (recurso eletrônico): teoria & prática**. São Paulo, Cultura acadêmica, Cap. 8, p.133-145. 2017.

SOUZA, L. P. et al. Alocação de fitomassa e crescimento de clones de cajueiro irrigados com águas de diferentes salinidades. **Revista Desafios**, v.7, n.1, p.52-63, 2020.

SNAK, C., RIBEIRO, C.L., DELGADO-SALINAS, A. 2020. *Macroptilium* in **Flora do Brasil 2020**. Disponível em: <<https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB29790>>. Acesso em 21 set 2022.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 888 p. 2017.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Diante dos dados observados, os resultados desse estudo permitem entender a variabilidade dentro do germoplasma estudado dos dois gêneros, principalmente com relação as características moleculares, morfoagronômica e citogenéticas, o que possibilita sua utilização em programas de melhoramento genético permitindo ainda realizar seleção e novos cruzamentos em uma mesma geração, aumentando consideravelmente a eficiência do programa de melhoramento.

A utilização de métodos variados e inovadores para a verificação da diversidade genética, que sejam voltados para espécies de leguminosas forrageiras no semiárido, fornecem subsídios para estudos mais aprofundados dos dois gêneros para essa região. Pois são informações importantes para a gestão de coleções de trabalho e banco de germoplasma que possuam em seu acervo amostras desses acessos.

