



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



**IRLANE CRISTINE DE SOUZA ANDRADE LIRA**

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E  
MORFOAGRONÔMICA DE ACESSOS DE *Stylosanthes* spp.  
(Fabaceae – Papilionoideae) COLETADOS NO NORDESTE  
BRASILEIRO**

Feira de Santana- BA

2015



**IRLANE CRISTINE DE SOUZA ANDRADE LIRA**

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E  
MORFOAGRONÔMICA DE ACESSOS DE *Stylosanthes* spp.  
(Fabaceae – Papilionoideae) COLETADOS NO NORDESTE  
BRASILEIRO**

Feira de Santana- BA

2015

**IRLANE CRISTINE DE SOUZA ANDRADE LIRA**

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E  
MORFOAGRONÔMICA DE ACESSOS DE *Stylosanthes* spp.  
(Fabaceae – Papilionoideae) COLETADOS NO NORDESTE  
BRASILEIRO**

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

Orientador: *Dr. Nataniel Franklin de Melo*

Feira de Santana- BA


2015

## BANCA EXAMINADORA



---

Prof. Dr. Manoel Abilio de Queiróz  
(Universidade do Estado da Bahia)



---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Rafaela Priscila Antonio  
(Embrapa Semiárido)



---

Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo  
(Embrapa Semiárido)  
Orientador e Presidente da Banca

### **Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteadó**

Lira, Irlane Cristine de Souza Andrade

L745c      Caracterização citogenética e morfoagronômica de acesso de  
*Stylosanthes* spp. (Fabaceae – Papilionoideae) coletados no nordeste  
brasileiro / Irlane Cristine de Souza Andrade Lira. – Feira de Santana,  
2015.

60 f. : il.

Orientador: Nataniel Franklin de Melo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2015.

1. *Stylosanthes* - Citogenética. I. Melo, Nataniel Franklin de, orient.  
II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 582.738

## ***TE AGRADEÇO***

*Por tudo o que tens feito, por tudo o que vais fazer  
Por Tuas promessas e tudo o que és, eu quero Te agradecer, Com todo o meu ser*

*Te agradeço, meu Senhor, te agradeço, meu Senhor*

*Te agradeço por me libertar e salvar, Por ter morrido em meu lugar  
Te agradeço, Jesus, Te agradeço, Eu Te agradeço, Te agradeço*

*Dennis Jernigan*

A minha mãe Isnalia (Em memória), mãe está vitória foi pela senhora!

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fortaleza, meu refúgio, meu tudo, minha paz

**BUSQUEI AO SENHOR, E ELE ME RESPONDEU!**

### ***A JESUS CRISTO***

Por ter concedido pelos meios que só Ele tem, a graça de entrar no mestrado e ter tido a oportunidade de realizar esse trabalho; Por ter me dado ânimo de superar todas as dificuldades que surgiram durante este tempo.

Em especial ao meu esposo ***Roberto Tavares de Lira*** que sempre acreditou em mim e me incentivou a sempre ir mais longe, por ser esse companheiro inseparável, incansável, sempre ao meu lado compartilhando todos os momentos, essa vitória é sua também, obrigada pelo AMOR, cuidado, proteção compreensão e paciência, pelo esforço e sacrifício. “Amo-te”. Aos meus familiares, os Souzas os Andrades e os agregados, todos vocês são fundamentais na minha vida, obrigado por sempre torcerem por mim, em especial aos meus irmãos ***Jorge Cristiano Coelho de Andrade, Carlos Eduardo Coelho de Andrade e Andersom Luiz Rodrigues de Andrade***, e minhas cunhadas ***Paula Nagatomo, Daniele Andrade e Lúdia Dias***, que me deram seis sobrinhos lindos e maravilhosos, amo muito vocês.

Ao ***Dr. Nataniel Franklin de Melo***, agradeço pela orientação, por contribuir com meu crescimento intelectual, e por sempre buscar alternativas para que aprendesse sempre mais.

A ***Dra. Maria Aldete Justiniano da Fonseca***, pela sua contribuição e orientação no desenvolvimento deste estudo.

A ***Dra. Rafaela Priscila Antonio*** pelos inúmeros conselhos e orientações e pelo socorro durante toda fase de desenvolvimento deste estudo, obrigada não só pela ajuda mas também pela amizade e confiança, agradeço a Deus por ter te colocado em meu caminho.

Ao ***Dr. Pedro Martins Junior*** pelo apoio e conselhos e por sempre se mostrar disposto e pronto a ajudar.

A ***Dra. Maria Luciene da Silva*** que sempre me apoiou demonstrando sua total confiança em

minha capacidade e até hoje mesmo a quase 900km de distância continuou me incentivando, aconselhando e apoiando, obrigada.

A **Leila Regina Gomes Passos Bruno** por sempre estar ao meu lado, compartilhando momentos bons e ruins, uma amiga imensurável um anjo que Deus colocou em meu caminho e me deu o anjinho **Pedro Manoel** como sobrinho, a **Barbara Laís Ramos Barbosa** sentirei saudades de nossas resenhas na madrugada, família que Deus me deu em Feira de Santana-BA, nos momentos que estava longe da minha, amo vocês meninas e creio que um dia nossos caminhos iram se cruzar novamente.

As amizadas construídas ao longo do mestrado, em especial, **Fabiana Karla de Araújo Américo**, e **Jacqueline da Aleluia Costa**, pelo convívio agradável e amizade sincera. Deus não coloca pessoas no nosso caminho por acaso.

Aos estagiários da Embrapa Semiárido pela contribuição na realização e desenvolvimento do experimento.

Aos demais colegas de turma do Mestrado e do Doutorado do PPGRGV, todos vocês de alguma forma contribuíram com este trabalho.

A todos do Laboratório de biotecnologia da Embrapa semiárido pela atenção e constante ajuda, obrigada a todos.

Ao corpo docente do PPGRGV, por proporcionar-me crescimento intelectual e a **Alberto Vicente Silva**, por aturar minhas dúvidas e questionamentos (que não foram poucos) e sempre está pronto para me atender, que Deus te abençoe.

A **CAPES** pela concessão da bolsa de estudo e a instituição Embrapa Semiárido por permitir o uso de suas instalações.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

*“Como é bom render graças ao Senhor e cantar louvores ao teu nome, ó Altíssimo; anunciar de manhã o teu amor leal e de noite a tua fidelidade” ...Salmos 92:1-2*



...O excelente mestre não é o que mais sabe, mas o  
que mais tem consciência do quanto não sabe...  
...Não é o que declara os seus acertos, mas o que  
reconhece suas próprias falhas...  
(Augusto Cury)

# **CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MORFOAGRONÔMICA DE ACESSOS DE *Stylosanthes* spp. (Fabaceae – Papilionoideae) COLETADOS NO NORDESTE BRASILEIRO**

## **RESUMO**

Pesquisas relacionadas a avaliação e seleção de forrageiras nativas podem contribuir para melhoria na alimentação dos rebanhos do Semiárido brasileiro, destacando-se o gênero *Stylosanthes* como uma importante fonte de espécies com grande potencial forrageiro. O presente trabalho teve por objetivo realizar caracterização morfoagronômica e citogenética de acessos de *Stylosanthes*, visando contribuir com estudos que promovam a inserção desta leguminosa na alimentação animal, buscando caracterizar e selecionar genótipos superiores, e também selecionar descritores de importância na caracterização de germoplasma da espécie. Para caracterização morfoagronômica, foram avaliados 19 descritores e destes, quatro foram descartados imediatamente por não apresentarem variabilidade entre os acessos, sendo a análise estatística realizada nos 15 descritores restantes. Os dados foram submetidos à análises univariadas e multivariadas. Foi realizada a análise de variância apenas nos descritores quantitativos NRP, CHP, Lfo, Cfo, ECAA, ECAS e CP, já para os descritores qualitativos CC, AC, PC, HC, CF, AF, PF e FF, foi realizada análise descritiva. Para a caracterização citogenética foram utilizadas pontas de raízes obtidas de sementes de 17 acessos de *Stylosanthes*, seguindo a metodologia descrita por Guerra e Souza (2002). O teste de Scott e Knott foi realizado para o agrupamento de médias, os descritores foram significativos a ( $p \geq 0,01$ ) o que possibilitou a formação de dois grupos, também foi realizada análise multivariadas pelo cálculo da distância de Mahalanobis, utilizando o método de Tocher original, observa-se a formação de dois grupos. O grupo 1 foi formado por 42 acessos e o grupo 2 apenas pelo acesso CPAC 4955. Observou-se a formação de quatro grupos onde no dendograma observar-se também que apenas o acesso CPAC 4955 não agrupou com nenhum outro acesso. Este acesso apresentou folhas mais compridas que os demais, caule muito espesso e falta de pilosidade nas folhas. Dos descritores avaliados pelo teste de Singh observa-se que os que mais contribuíram para a diversidade dos genótipos foram CP (11,64%) e NRP (10,98%) seguidos por HC (8,62%) e FF (8,44%). Através da análise citogenética observaram-se acessos com  $2n=20$  e  $2n=40$  cromossomos, permitindo a diferenciação das espécies *S. scabra* da *S. seabrana*, com núcleo interfásico do tipo semirreticulado, cariótipo simétrico com morfologia cromossômica variando de metacêntrica a submetacêntrica e tamanho cromossômico médio em torno de 2,5  $\mu\text{m}$ . Foram observadas diferenças no comprimento médio dos cromossomos e no comprimento total do genoma. A análise com dupla coloração CMA<sub>3</sub>/DAPI permitiu a visualização de quatro blocos CMA<sup>+</sup>, sendo dois blocos CMA<sup>+</sup> localizados na região subterminal do braço curto de um par cromossômico submetacêntrico, e dois blocos localizados na região proximal de outro par metacêntrico em *S. scabra*, e ainda dois blocos na região subterminal de um par metacêntrico nos acessos de *S. seabrana*. Também foi possível a visualização de bandas DAPI<sup>+</sup> e CMA<sup>-</sup> nos acessos CPAC 1261 e CPAC 5205. Os acessos avaliados neste estudo apresentaram, em geral, plantas com hábito de crescimento semiereto, folhas com coloração verde escura e com pilosidade, caule em sua maioria bastante ramificado. A coloração diferencial de cromossomos, associados a outros marcadores citogenéticos, auxilia na caracterização de acessos de coleções de germoplasma de *Stylosanthes* spp. Observou-se que há variabilidade genética entre os acessos estudados da coleção de *Stylosanthes* da Embrapa Semiárido.

**Palavras-chave:** Cromossomos, Fluorocromos, Diversidade genética, Melhoramento de forrageiras.

# **CYTOGENETIC CHARACTERIZATION AND MORPHOAGRONOMIC OF *Stylosanthes* spp. (Fabaceae – Papilionoideae) COLLECTED IN NORTHEAST BRAZILIAN**

## **ABSTRACT**

Searches related to evaluation and selection of native forages can contribute to improvement in feeding cattle in the Brazilian semiarid region, highlighting the *Stylosanthes* genus as an important source of forage species with great potential. This study aimed to perform morphoagronomic and cytogenetics *Stylosanthes* accessions, to contribute to studies that promote the inclusion of this legume in animal feed, seeking to characterize and select superior genotypes, and also select important in the characterization of germplasm of the species. To characterize morphoagronomic were evaluated 19 descriptors and of these, four were immediately discarded for not having variability among accessions, with the statistical analysis performed in the remaining 15 descriptors. The data were submitted to univariate and multivariate analyzes. Analysis of variance was performed only in quantitative descriptors NRP, CHP, Lfo, Cfo, ECAA, ECAS and CP, as to the qualitative descriptors CC, AC, PC, HC, CF, AF, PF and FF, descriptive analysis was performed. For cytogenetic characterization were obtained root tips used seed access *Stylosantes* 17, following the method described by War and Souza (2002). Scott and Knott test was performed for the grouping of averages, the descriptors were significant at ( $p \geq 0.01$ ) which allowed the formation of two groups, multivariate analysis was also performed by calculating the Mahalanobis distance using the method original Tocher, there is the formation of two groups. Group 1 consisted of 42 accesses and the group 2 only through access CPAC 4955. We observed the formation of four groups where the dendrogram also be noted that only the access CPAC 4955 did not group with any other access. This access, for long leaves that too, very thick stem and lack of body hair on the sheets. The descriptors evaluated by Singh test is observed that the main contributors to the diversity of genotypes were CP (11,64%) and NRP (10,98%) followed by HC (8,62%) and FF (8, 44%). By cytogenetic analysis were observed hits with  $2n = 20$  and  $2n = 40$  chromosomes, allowing differentiation of species *S. scabra* of *S. seabrana* with interphase nucleus of semirreticulado type, symmetrical karyotype with chromosome morphology ranging from the metacentric submetacêntrica and size Average chromosomal around 2,5 microns. Differences were observed in the average length of the chromosomes and the total length of the genome. The analysis with double staining CMA<sub>3</sub>/DAPI enabled visualization of four CMA<sup>+</sup> blocks, two CMA<sup>+</sup> blocks in subterminal region of the short arm of a chromosome pair submetacentric, and two blocks located in the proximal region of another metacentric pair in *S. scabra*, and still two blocks in the subterminal region of a metacentric pair in *S. seabrana* access. It was also possible to visualize DAPI and CMA<sup>+</sup> bands in access CPAC 1261 and CPAC 5205. The accessions in this study were, in general, plants with semiereto growth habit, leaves with dark green color and hairiness, stem mostly quite branched. The differential staining of chromosomes, together with other cytogenetic markers, assists in characterizing germplasm collections access *Stylosanthes* spp. It was observed that there is genetic variability among the accessions studied the collection of *Stylosanthes* Embrapa Semi-Arid.

**Keywords:** chromosomes, fluorochromes, Genetic diversity, forage enhancement.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

- Figura 1** Variabilidade intraespecífica quanto ao hábito de crescimento em *Stylosanthes scabra*. Acesso CPAC 4396 (A) e Acesso CPAC 5196 (B), comprimento da folha e coloração das folhas acesso CPAC 4950 (C) e Acesso CPAC 4385 (D), espessura do caule Acesso CPAC 4955 (E) e Acesso CPAC 4962 (F). **17**

- Figura 2** Esquema ilustrativo de cromossomo metafásicos com bandas. **19**

### **CAPÍTULO 1- CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA DE ACESSOS DE *Stylosanthes* spp. (Fabaceae – Papilionoideae) COLETADOS NO NORDESTE BRASILEIRO**

- Figura 1** Dendograma obtido por meio de descritores morfológicos com a distância generalizada de Mahalanobis e pelo método de agrupamento UPGMA, dos 43 acessos de *Stylosanthes* spp., Linha pontilhada: corte no dendograma em aproximadamente 50% da máxima distância, em experimento conduzido em Petrolina, PE (2012/2014). **36**

### **CAPÍTULO 2- CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ACESSOS DE *Stylosanthes* spp. (Fabaceae – Papilionoideae) COLETADOS NO NORDESTE BRASILEIRO**

- Figura 1** Metáfases mitóticas de *Stylosanthes seabrana*, apresentando número cromossômico  $2n=20$  no acesso CPAC 4950(A) e de *Stylosanthes scabra*, apresentando número cromossômico  $2n=40$  no acesso CPAC 5234(B); Barra representa 5  $\mu$ m. **48**

- Figura 2** Idiogramas do complemento cromossômico haploide do acesso CPAC 4966 de *Stylosanthes seabrana* com  $n=10$  destacando as bandas CMA+ em amarelo. Barra em 5  $\mu$ m. **51**

- Figura 3** Gráfico da distribuição do comprimento relativo do complemento cromossômico total haploide (%) dos cromossomos de acessos de *Stylosanthes seabrana*, alinhados em função do comprimento decrescente do braço curto de cada par cromossômico (pares de 1 a 10). **51**

- Figura 4** Idiogramas do complemento cromossômico haploide do acesso CPAC 4387 de *S. scabra* Vogel com  $n=20$ , destacando as bandas CMA+ em amarelo. Barra 5  $\mu$ m. **52**

- Figura 5** Gráfico da distribuição do comprimento relativo do complemento cromossômico total haploide (%) dos cromossomos de acessos de *Stylosanthes scabra*, alinhados em função do comprimento decrescente do braço curto de cada par cromossômico (pares de 1 a 20). **52**

- Figura 6** Metáfases com  $2n=20$  com dupla coloração CMA<sub>3</sub>/DAPI em *Stylosanthes seabrana*. Setas indicam a localização em dois blocos CMA<sup>+</sup> nas regiões terminais dos cromossomos homólogos no acesso **55**

CPAC 4950, foto em (A) DAPI, em (B) CMA, em (C) sobreposto, e acesso CPAC 4963, foto em (D) DAPI, em (E) CMA, em (F) sobreposto. Barra em C e F = 5  $\mu$ m.

**Figura 7** Metáfases com  $2n=40$  com dupla coloração CMA<sub>3</sub>/DAPI em *Stylosanthes scabra*. Setas indicam a localização de quatro blocos CMA<sup>+</sup> nas regiões subterminal e proximal dos cromossomos homólogos no acesso CPAC 4387, foto em (A) DAPI, em (B) CMA, em (C) sobreposição e no acesso CPAC 4394, foto em (D) DAPI, em (E) CMA, em (F) sobreposição. Barra em C e F = 5  $\mu$ m. **56**

**Figura 8** Metáfases com  $2n=40$  com dupla coloração CMA<sub>3</sub>/DAPI em *Stylosanthes scabra*, setas indicam a localização de dois blocos DAPI + nos cromossomos homólogos do acesso CPAC 5205, foto em (A) DAPI, em (B) CMA, Barra em B = 5  $\mu$ m. **57**

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1- CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA DE ACESSOS DE *Stylosanthes* spp. (Fabaceae – Papilionoideae) COLETADOS NO NORDESTE BRASILEIRO**

- Tabela 1** Relação dos 43 acessos de *Stylosanthes* utilizados e ano de coleta **29**
- Tabela 2** Resumo da análise de variância para os descritores, número de ramos primários (NRP), comprimento da haste principal (CHP), largura do folíolo (Lfo), comprimento do folíolo (Cfo), espessura do caule acima do solo (ACAS), espessura do caule abaixo do ápice (ECAA), comprimento do pecíolo (CP), realizada a partir da avaliação de 43 acessos de *Stylosanthes* spp., em experimento conduzido em Petrolina, PE (2012/2014). **32**
- Tabela 3** Comparação dos valores médios e agrupamentos obtidos para os descritores número de ramos primários (NRP), largura do folíolo (Lfo). Entre 43 acessos de *Stylosanthes*, em experimento conduzido em Petrolina, PE (2012/2014). **33**
- Tabela 4** Grupos formados pelo método de Tocher original, com base na distância generalizada de Mahalanobis ( $D^2$ ), referentes aos 43 acessos e 15 descritores, em experimento conduzido em Petrolina, PE (2012/2014). **35**
- Tabela 5** Importância relativa ( $S_j$ ) de caracteres morfológicos para o estudo da diversidade genética entre 43 acessos de *Stylosanthes* spp. **37**

### **CAPÍTULO 2- CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ACESSOS DE *Stylosanthes* spp. (Fabaceae – Papilionoideae) COLETADOS NO NORDESTE BRASILEIRO**

- Tabela 1** Relação dos 17 acessos de *Stylosanthes* utilizados e ano de coleta **46**
- Tabela 2** NC= número cromossômico, mCL= comprimento cromossômico médio, FC= fórmula cariotípica, TCL= comprimento cromossômico haploide total de acessos de *Stylosanthes* spp., analisados em metáfases mitóticas. m= metacêntrico; sm= submetacêntrico. **49**
- Tabela 3** Comprimentos cromossômicos médios do braço curto (BC), braço longo (BL) e comprimento absoluto (CA), em  $\mu\text{m}$ , e comprimento relativo percentual (CR %) em três acessos de *Stylosanthes seabrana*, coletados no semiárido Brasileiro **51**
- Tabela 4** Comprimentos cromossômicos médios do braço curto (BC), braço longo (BL) e comprimento absoluto (CA), em  $\mu\text{m}$ , e comprimento relativo percentual (CR %) em três acessos de *Stylosanthes scabra* Vogel. Coletados no semiárido Brasileiro. **53**

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>16</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA DE ACESSOS DE <i>Stylosanthes</i> spp. (Fabaceae – Papilionoideae) COLETADOS NO NORDESTE BRASILEIRO</b>	<b>24</b>
<b>RESUMO</b>	<b>25</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>26</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>27</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Análise univariadas</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Análise multivariadas</b>	<b>35</b>
<b>3.2.1 Análise de agrupamento</b>	<b>35</b>
<b>3.3 Importância dos descritores para a divergência</b>	<b>36</b>
<b>4. CONCLUSÕES</b>	<b>38</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>39</b>
<b>CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ACESSOS DE <i>Stylosanthes</i> spp. (Fabaceae – Papilionoideae) COLETADOS NO NORDESTE BRASILEIRO</b>	<b>41</b>
<b>RESUMO</b>	<b>42</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>43</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>44</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>46</b>
<b>2.1 Caracterização citogenética</b>	<b>46</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Caracterização citogenética</b>	<b>48</b>
<b>4. CONCLUSÕES</b>	<b>58</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>59</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

As espécies do gênero *Stylosanthes* pertencem à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae (POLHILL e RAVEN, 1981), sendo constituído por 50 espécies descritas, das quais 25 ocorrem no Brasil, seu maior centro de origem (LEWIS *et al.* 2005). Embora o gênero seja originário da América Central e do Sul, em virtude de sua importância econômica, também é encontrado em cultivo na América Subtropical e na Austrália (STACE e EDYE, 1984), sendo a Austrália o primeiro país a reconhecer a espécie como forrageira (EDYE, 1997). No Brasil, as espécies de *Stylosanthes* são conhecidas vulgarmente como trifólio, meladinho, manjerição do campo e alfafa do Nordeste (KARIA, 2008). Em outros países são também conhecidas como *stylo arbustiva* (Austrália), *capitan juan* ou *pata de Terecay* (Venezuela), *pencilflower* (EUA), e *stylo perduan* (Indonésia) (FORAGES, 2013).

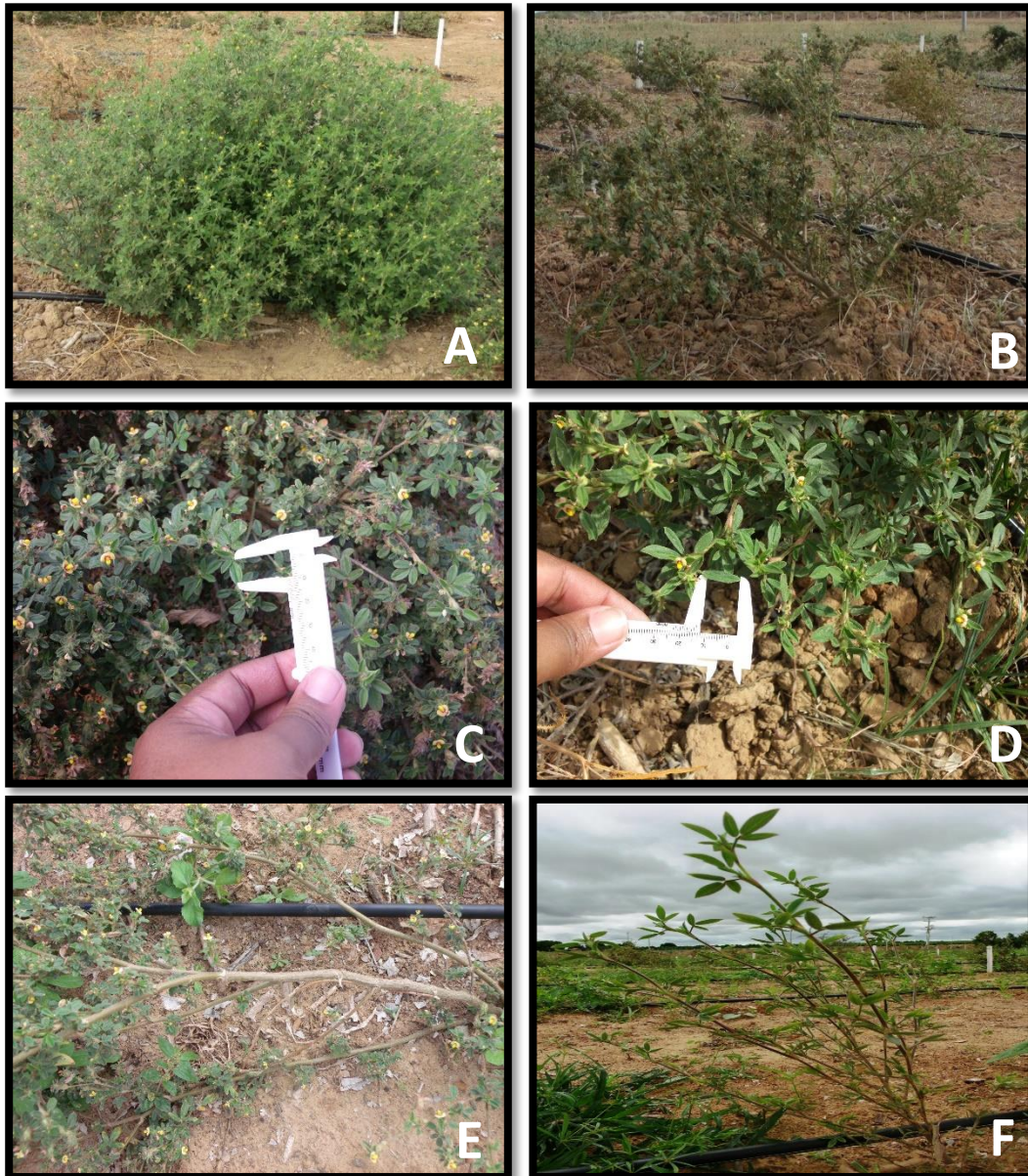
As leguminosas ainda são pouco utilizadas em pastagens no semiárido brasileiro, sendo necessária a realização de estudos que estimulem o seu uso (PAULINO *et al.* 2006). Espécies do gênero *Stylosanthes* estão entre as mais importantes leguminosas forrageiras para utilização, sob pastejo, em áreas de solos ácidos e de baixa fertilidade natural, como as áreas tropicais áridas e semiáridas (GUODAO *et al.* 1997).

Gomide e Zago (1980) afirmam que as forrageiras leguminosas suprem as necessidades nutricionais do rebanho, orgânicas ou minerais, e desempenham inúmeras funções fisiológicas que estão relacionadas com a espécie, a idade da planta e a fertilidade do solo. Entretanto, apesar de serem muito difundidas em regiões de clima temperado, as leguminosas ainda são pouco utilizadas em regiões de clima tropical (KARIA, 2008).

As leguminosas são o grupo de plantas mais bem representados na caatinga, com cerca de 264 espécies (COSTA, 2002). A maioria das espécies de *Stylosanthes* é perene, com potente sistema radicular, tolerantes a seca, possuindo grande capacidade de colonização de novos ambientes por sua adaptação a solos de baixa fertilidade e simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio (ANDRADE e KARIA, 2000; VILELA, 2000).

Apresentam sistema reprodutivo predominantemente autógamo, porém é muito comum encontrar certa taxa de polinização cruzada (STACE *et al.* 1984). De modo geral, as espécies do gênero *Stylosanthes* apresentam grande variabilidade, tanto intra como interespecífica (VIEIRA *et al.* 2007) (Figuras 1A, B, C, D, E e F).





**Figura 1.** Variabilidade intraespecífica quanto ao hábito de crescimento em *Stylosanthes scabra*. Acesso CPAC 4396 (A) e Acesso CPAC 5196 (B), comprimento da folha e coloração das folhas acesso CPAC 4950 (C) e Acesso CPAC 4385 (D), espessura do caule Acesso CPAC 4955 (E) e Acesso CPAC 4962 (F). Fotos: Irlane Lira e Leila Bruno.

Um dos principais problemas em todo tipo de atividade agropecuária é a produção de forrageiras adequadas à região de produção, pois nas últimas décadas, os setores econômicos, estão sujeitos às mudanças, as quais exigem modificações de comportamentos por parte dos produtores em relação às variações nos modelos atuais de exploração. Para tanto, o modelo proposto seria a intensificação dos sistemas de produção pastoris de forma sustentável, evitando

a ocorrência de desmatamento de novas áreas para a produção agropecuária (BARCELLOS *et al.* 2008).

Dentre as espécies de *Stylosanthes* com uso potencial em pastagens no Brasil, destacamos as espécies *S. seabrana* e *S. scabra*. A *S. seabrana* possui ocorrência registrada apenas no estado da Bahia, enquanto *S. scabra* tem ocorrência em 22 estados brasileiros sendo que a maioria se concentra nos estados da Bahia, com 269 ocorrências, e Pernambuco, com 179 ocorrências (CRIA, 2015). Porém apesar do grande número de ocorrências nessas regiões, o potencial de uso destas espécies ainda é muito pouco estudado.

As duas espécies são nativas do semiárido brasileiro, apresentam tolerância à seca e à baixa fertilidade dos solos, além de terem um grande potencial forrageiro. Falta, entretanto, ações de coleta e caracterização tanto morfoagronômica como citogenética desses materiais. Vale ressaltar que na Austrália existe cultivares comerciais derivadas de acessos de germoplasma coletados no semiárido brasileiro (STACE e EDYE, 1984). Por outro lado, o Brasil possui nove bancos de espécies forrageiras que ficam localizados em Unidades da Embrapa, no Instituto de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras - UFLA, e na Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - Epagri, os quais possuem um total de 9.956 acessos, sendo que 1.229 são acessos do gênero *Stylosanthes* e, desses, apenas 167 estão devidamente identificados (FAO, 2014).

Ainda existem poucas informações sobre a delimitação taxonômica entre as espécies de *Stylosanthes*, tornando-se necessária a realização de estudos mais detalhados para caracterização das espécies e acessos. Nesse caso, as técnicas em citogenética têm sido uma importante ferramenta de estudo para caracterização dos mais variados táxons (SILVA *et al.* 2009).

Em *Stylosanthes*, os poucos estudos referentes à citogenética do gênero relatam a existência de diploides, tetraploides e hexaploides em várias espécies (CAMERON, 1967; GOLDBLATT, 1981; BATTISTIN, 1981; VIEIRA, 1988).

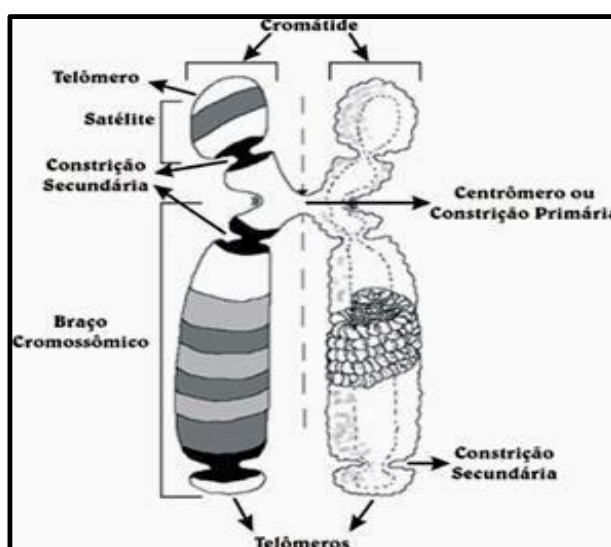
Vanni e Fernandez (2011), relataram a existência de citótipos diploides e tetraploides em uma mesma amostra de sementes comerciais de *S. seabrana* cv. *Única*, considerando o nível de ploidia insuficiente como critério para distinção de espécies.

A citogenética vem sendo utilizada como um importante instrumento para a compreensão das relações de parentesco, na taxonomia vegetal, e nos estudos sobre mecanismos de evolução das espécies (GUERRA, 1988). Para Sybenga (1992), no senso amplo da palavra, citogenética

é a ciência dos cromossomos, que inclui não só o estudo das características microscópicas e moleculares, mas seu comportamento durante a interfase e divisão celular.

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 (HEYWOOD, 1978). A citogenética desenvolveu-se principalmente a partir do início do século passado, e seu progresso acompanhou o aprimoramento de técnicas e equipamentos de microscopia.

A caracterização cromossômica foi por muito tempo baseada unicamente em parâmetros morfológicos, como tamanho dos braços, posição dos centrômeros e localização das constrições secundárias (GUERRA, 2000; GUERRA e SOUZA, 2002) (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema ilustrativo de cromossomo metafásico com bandas. Fonte: Soares-Scott *et al.* (1998).

Porém os horizontes da citogenética tem se expandido muito com o advento das técnicas de bandeamento cromossômico, cuja aplicação deu-se primeiramente no pareamento cromossômico, sendo baseadas na coloração diferencial de regiões da cromatina. Essas técnicas têm possibilitado compreender melhor as alterações cromossômicas que se estabelecem em cada genótipo (GUERRA, 1988).

Dessa forma, quando se trabalha com qualquer grupo vegetal a fim de desenvolver novas combinações e cruzamentos, é necessário conhecer o número, o tamanho e a forma dos

cromossomos, além de outros marcadores úteis para o reconhecimento de cada par cromossômico.

Portanto, considerando a escassez de estudos citogenéticos e morfoagronômicos no gênero *Stylosanthes*, realizou-se a caracterização morfoagronômica e citogenética de acessos de *Stylosanthes*, visando promover o seu uso como forrageira, por meio da geração de informações básicas necessárias para o desenvolvimento de um programa de melhoramento genético das espécies do gênero.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, R.P.; KARIA, C.T. **O uso de *Stylosanthes* em pastagens no Brasil.** In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGEM, Lavras. Anais. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000, p.273-309. 2000.

BARCELLOS, A. de O., *et al.* **Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros.** Revista Brasileira de Zootecnia. Viçosa, v.37, n. spe, July 2008.

BATTISTIN, A. **Estudo biossistemático de diferentes taxons do gênero *Stylosanthes* Sw.** (Leguminosae-Papilionoideae), São Paulo. 106p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo. 1981.

CAMERON, D. F. **Chromosome number and morphology of some introduced *Stylosanthes* species.** Aust. J. Agric. Res, 18 : 375-379. 1967.

COSTA, N. M. de S. **Revisão do gênero *Stylosanthes* Sw.** Tese (Doutorado em Engenharia Agronomica)- Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 470 f. 2006.

CRIA, Centro de Referência em Informação Ambiental, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo ***Stylosanthes*.** In: speciesBase. Disponível em: <<http://www.splink.org.br/index?lang=pt>>. Acesso em: Fev 2015.

EDYE, L. A. **Commercial development of *Stylosanthes* pastures in Northern Australia. I. Cultivar development within *Stylosanthes* in Australia.** Tropical Grasslands, St. Lucia, v.31, n.5, p. 503-508, 1997.

FAO. **Bancos de germoplasma,** disponível em: <https://www.fao.org.br/quemSomos.asp>. Acesso em Mar/2014

FORAGES, Tropical, *Stylosanthes*. Disponível em: <<http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Stylosanthes> >, Acesso em: 27 de Nov de 2013.

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

GOMIDE, J. A. ; ZAGO, C. P. **Crescimento e recuperação do capim colônia após corte.** Rev. Soc. Bras. Zoot., 9(2):293-305, 1980.

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

GUERRA, M dos S. **Chromosome Number Variation and Evolution in Monocots.** Monocots: Systematics and Evolution. CSIRO: Melbourne, 2000.



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. pp.23-38. 2002

GUODAO, L.; PHAIKAEW, C.; STUR, W. W. Status of *Stylosanthes* development in other countries. II. *Stylosanthes* development and utilization in China and south-east Asia. **Tropical Grasslands**, Brisbane, v. 31, n. 4, p. 460-466, 1997.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. Oxford: 1978.

KARIA, C. T. **Caracterização genética e morfoagronômica de germoplasma de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.** 140f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Curso de Pós-graduação em Agronomia. Universidade Federal de Goiás. GO. 2008.

LEWIS, G.L.; MACKINDER B.; LOCK, M. **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, Kew, 578p. 2005.

PAULINO, V. T. et al. **Retrospectiva do uso de leguminosas forrageiras**. In: ENCONTRO SOBRE LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS, Nova Odessa, 2006. 46p

POLHILL, R. M., RAVEN, P.H. Advances in legume systematics: Part1. Royal Botanic Gardens. Kew. 1981. In: COSTA, N. M. de. **Revisão do Gênero de *Stylosanthes* Sw.** Tese de Dissertação de Doutorado. Universidade Técnica de Lisboa Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. Portugal, 2006.

SILVA, S. J. B. da; et al, **Caracterização citogenética de acessos de *Stylosanthes* Sw. ocorrentes no semiárido brasileiro**. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, Petrolina. Anais. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. p. 62-67. Série Embrapa Semiárido. Documentos, 221, 2009.

SOARES-SCOTT, M. D. **Caracterização Citogenética de algumas Espécies e Híbridos Interespecíficos de *Passiflora***. 1998. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

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

SYBENGA, J. **Cytogenetics in Plant Breeding**. Berlin: Springer, 1992.

VANNI, R.O., FERNANDES, A., **The true identity of *Stylosanthes seabrana* B.L. Maass & L. 't Mannetje (Leguminosae Papilionoideae)**, Revista Caryologia, Vol. 64, no. 3: 247-250, Instituto de Botânica del Nordeste, IBONE. UNNE-CONICET, 3400 Corrientes, Argentina, 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.

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.

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

## **CAPÍTULO 1**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA DE ACESSOS DE *Stylosanthes* spp.  
(Fabaceae – Papilionoideae) COLETADOS NO NORDESTE BRASILEIRO**

Capítulo submetido a publicação na revista Caatinga.



## **CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA DE ACESSOS DE *Stylosanthes* spp. (Fabaceae – Papilionoideae) COLETADOS NO NORDESTE BRASILEIRO**

### **RESUMO**

Um dos fatores que mais limitam o desempenho da caprino-ovinocultura no Semiárido é a escassez de alimentação para os rebanhos. Tal situação é um reflexo de muitos fatores, porém, um deles está relacionado a falta de pesquisas voltadas para a avaliação e seleção de forrageiras, entre elas as espécies de *Stylosanthes*. Assim esse trabalho teve por objetivo caracterizar morfológicamente 43 acessos de *Stylosanthes* spp. visando quantificar a variabilidade genética existente, assim como também selecionar os descritores de maior importância com a finalidade de gerar informações para o programa de melhoramento genético dessa leguminosa. Foram avaliados 19 descritores: hábito de crescimento (HC); número de ramos primários (NRP); comprimento da haste principal (CHP); espessura do caule 5 cm acima do solo (ECAS); espessura do caule 5cm abaixo do ápice (ECAA); cor (CC), acúleo (AC) e pilosidade no caule (PL); cor (CF), acúleo(AF) e pilosidade nas folhas (PF); formato (FF), largura(LFo) e comprimento do folíolo (CFo); comprimento do pecíolo (CP); viscosidade na inflorescência (VI); formato do ápice do folíolo(FAF); acúleo na inflorescência (AI) e viscosidade do caule (VC). Os ensaios foram conduzidos no Campo Experimental de Bebedouro da Embrapa Semiárido, localizados em Petrolina-PE. Para caracterização morfoagronômica, foram avaliados 19 descritores destes quatro foram descartados imediatamente por não apresentarem variabilidade entre os acessos, sendo a análise estatística realizada nos 15 descritores restantes. Os dados foram submetidos às análises univariadas e multivariadas. A análise de variância foi realizada apenas nos descritores quantitativos NRP, CHP, Lfo, Cfo, ECAA, ECAS e CP, já para os descritores qualitativos CC, AC, PC, HC, CF, AF, PF e FF, foi realizada análise descritiva. O teste de Scott e Knott foi realizado para o agrupamento de médias, os descritores foram significativos a ( $p \geq 0,01$ ) o que possibilitou a formação de dois grupos, também foi realizada análise multivariadas pelo cálculo da distância de Mahalanobis, utilizando o método de Tocher original, observa-se a formação de dois grupos. O grupo 1 foi formado por 42 acessos e o grupo 2 apenas pelo acesso CPAC 4955. No dendograma observou-se a formação de quatro grupos onde observar-se também que apenas o acesso CPAC 4955 não agrupou com nenhum outro acesso, este acesso apresentou caule muito espesso, maior largura no folíolo e falta de pilosidade nas folhas. Dos descritores avaliados pelo teste de Singh observa-se que os descritores que mais contribuíram para a diversidade dos genótipos foram CP (11,64%) e NRP (10,98%) seguidos por HC (8,62%) e FF (8,44%). Os acessos avaliados neste estudo apresentaram em geral plantas com hábito de crescimento semiereto, folhas com coloração verde escura e com pilosidade, caule bastante ramificado.

**Palavras-chave:** Forrageiras, Diversidade genética, Melhoramento, Descritores.

**CHARACTERIZATION MORPHOAGRONOMIC OF ACCESS *Stylosanthes* spp.**  
**(Fabaceae – Papilionoideae) COLLECTED IN THE NORTHEAST BRAZILIAN**

**ABSTRACT**

One of the factors that limit the performance of the goat and sheep production in the semiarid region is the shortage of feed for livestock. This situation is a reflection of many factors, but one of them is related to lack of research focused on the evaluation and selection of forage, including the species of *Stylosanthes*. Thus, this study aimed to characterize morphologically 43 accessions of *Stylosanthes* spp. to quantify the genetic variability, as well as select the most important descriptors in order to generate information for the breeding program of this legume. We evaluated 19 descriptors: growth habit (HC); number of primary branches (NRP); length of main stem (CHP); thickness of stem 5 cm above ground (ECAS); thickness of stem 5cm below the apex (ECAA); color (CC), aculeus (AC) and hairiness on stem (PL); color (CF), aculeus (AF) and pubescence on leaves (PF); format (FF), width (LFO) and length of leaves (CoF); length of the petiole (CP); viscosity in the inflorescence (VI); leaflet apex format (FAF); aculeus in the inflorescence (AI) and viscosity of the stem (VC). The tests were conducted at the Bebedouro Experimental Station of Embrapa Semi-Arid, located in Petrolina. To characterize morphoagronomic were evaluated 19 descriptors of these four were immediately discarded for not having variability among accessions, with the statistical analysis performed in the remaining 15 descriptors. The data were submitted to univariate and multivariate analyzes. Analysis of variance was performed only in quantitative descriptors NRP, CHP, Lfo, Cfo, ECAA, ECAS and CP, as to the qualitative descriptors CC, AC, PC, HC, CF, AF, PF and FF, descriptive analysis was performed. Scott and Knott test was performed for the grouping of averages, the descriptors were significant at ( $p \geq 0.01$ ) which allowed the formation of two groups, multivariate analysis was also performed by calculating the Mahalanobis distance using the method original Tocher, there is the formation of two groups. Group 1 consisted of 42 accesses and the group 2 only through access CPAC 4955. The dendrogram was observed the formation of four groups where also be noted that only the access CPAC 4955 did not group with any other access, access is presented stem very thick, wider on the leaflet and lack of body hair on the sheets. The descriptors evaluated by Singh test is observed that the descriptors that most contributed to the diversity of genotypes were CP (11,64%) and NRP (10,98%) followed by HC (8,62%) and FF (8,44%). The accessions evaluated in this study had generally plants with semiereto growth habit, leaves with dark green color and hairiness, very branched stems.

**Keywords:** Forage, Genetic diversity, Improvement, Descriptors.

## INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Stylosanthes* pertencem à família Leguminosae ou Fabaceae (APGII, 2003), terceira maior família de angiospermas, compreendendo cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies (LEWIS *et al.* 2005). De modo geral, *Stylosanthes* se caracteriza por ser uma planta perene, havendo apenas uma espécie anual (*S. humilis*), apresentando distribuição natural no trópico e subtropical de todos os continentes, sendo o Brasil seu principal centro de origem e diversidade (VIEIRA *et al.* 2007). A maioria das espécies é autógama, porém apresenta uma pequena porcentagem de fecundação cruzada em condições naturais (MILES, 1985; STACE, 1984).

Uma das atividades sócio-econômicas mais importantes para agricultura familiar de áreas de sequeiro da região Nordeste do Brasil é a ovino-caprinocultura (NEPPA, 2005), sendo a forragem produzida na pastagem a fonte de alimento mais barata (ELY, 1995). Figueiredo (1990) já expressava a necessidade do lançamento e avaliação de plantas forrageiras mais específicas para criação de pequenos ruminantes, com alta produção e boa aceitabilidade.

De acordo com IBGE (2013) no Brasil o efetivo de caprinos foi de 8,779 milhões, registrando crescimento de 1,5% em relação ao número de cabeças de 2012, a Bahia foi o estado brasileiro com o maior efetivo desta espécie (28,0%), seguido pelo Estado de Pernambuco (22,5%). Os maiores efetivos municipais estavam localizados em Floresta (PE), com 3,6%, Casa Nova (BA), com 2,6%, e Petrolina (PE), com 2,4%, observando-se grande dispersão municipal. Entre os 10 municípios com os maiores efetivos, metade situava-se no Estado da Bahia e a outra metade, no Estado de Pernambuco.

Ainda segundo IBGE (2013) o número de ovinos registrado pela Produção da Pecuária Municipal 2013 foi de 17,291 milhões de cabeças, aumento de 3,0% em relação ao efetivo de 2012. Em termos de participação regional, foi observado que 56,5% dos animais estavam na Região Nordeste; 30,0% na região Sul; 5,5% na região Centro-Oeste; 4,2% na região Sudeste; e 3,8% na região Norte. O efetivo de ovinos encontrava-se, sobremaneira, localizado nos Estados do Rio Grande do Sul (24,6%), Bahia (16,9%), Ceará (11,9%) e Pernambuco (10,6%).

Segundo Araújo *et al.* (2008) esses rebanhos estão quase que exclusivamente em áreas de sequeiro no Nordeste, evidenciando-se a necessidade de plantio de espécies forrageiras mais adaptadas. Nesse caso, uma das alternativas é o uso de algumas espécies nativas que já são adaptadas as condições adversas de clima e solo da região.

Por outro lado, a primeira etapa para se realizar um programa de seleção e melhoramento genético vegetal é a introdução de populações de plantas heterogêneas e a sua devida caracterização (KARIA *et al.* 2002). Nesse caso, durante a caracterização de germoplasma, costuma-se realizar avaliações com um número muito grande de caracteres morfológicos, botânicos e agronômicos, levando assim a necessidade de utilização de muita mão de obra e muito tempo.

Entretanto, é possível reduzir drasticamente o tempo e a mão de obra realizando o descarte de alguns descritores que não contribuem com a identificação das espécies, sendo importante conhecer qual a real contribuição de cada descritor para discriminar os acessos de maneira eficiente (SANTOS *et al.* 1995). Segundo Daher *et al.* (1997), há uma tendência de que o aumento do número de descritores avaliados ocasione a presença de caracteres redundantes, por estarem quase sempre associados a outros caracteres.

Diante do exposto, este estudo procurou caracterizar 43 acessos de *Stylosanthes* spp. provenientes da coleção de trabalho da Embrapa Semiárido, visando quantificar a variabilidade genética existente, assim como também selecionar os descritores de maior importância com a finalidade de gerar informações para o programa de melhoramento genético dessa leguminosa.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Campo Experimental de Bebedouro pertencente à Embrapa Semiárido, localizado em Petrolina-PE, realizado de Outubro de 2012 a Junho de 2014. Inicialmente as sementes destes acessos foram tratadas através de escarificação mecânica com lixa e colocadas para germinar em caixas gerbox. Em seguida, foram transplantadas para bandejas de polietileno com 280 células e mantidas em casa de vegetação por 60 dias, sendo novamente transferidas para sacos plásticos de 1 kg e mantidas em telado por três meses até o transplante definitivo em campo. Com 100 dias de cultivo foi realizado um corte de uniformização das plantas, sendo a avaliação realizada 100 dias após o referido corte. Foi utilizado o delineamento em blocos inteiramente casualizados, contendo três repetições, com quatro plantas por parcela, sendo considerada como parcela útil as duas plantas centrais, no espaçamento de 1,5m x 1,0m em solo. Para o preparo do solo foi utilizado uma aração e uma gradagem. O sistema de irrigação utilizado foi por gotejamento, sendo irrigado 3 vezes por semana por uma hora por dia durante os primeiros 130 dias, depois a irrigação passou a ser a cada 8 dias por duas horas por dia, sendo totalmente suspensa 15 dias antes da avaliação. Como tratamentos culturais foram realizadas capinas frequentes. Para o experimento foram utilizados 43 acessos de *Stylosanthes* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Relação dos 43 acessos de *Stylosanthes* spp. utilizados e ano de coleta.

Acessos/ CPAC	ANO DE COLETA	Acessos/ CPAC	ANO DE COLETA	Acessos/ CPAC	ANO DE COLETA	Acessos/ CPAC	ANO DE COLETA
397	1979	1261	1981	4401	1996	5114	1999
415	1979	1273	1981	4947	1997	5178	2000
490	1979	1275	1981	4950	1997	5179	2000
564	1979	4380	1996	4953	1997	5196	2000
995	1980	4385	1996	4954	1997	5197	2000
996	1980	4387	1995	4955	1997	5203	2000
1242	1981	4388	1996	4956	1998	5205	2000
1244	1981	4389	1995	4962	1997	5228	2000
1245	1981	4393	1996	4963	1997	5234	2000
1249	1981	4394	1997	4966	1997	5612	2004
1251	1981	4395	1996	4986	1997		

Os acessos foram avaliados quanto as seguintes características adaptadas a partir dos estudos de Karia *et al.* (2002) e Costa (2006):

Descritores morfoagronômicos avaliados.

- 1) Hábito de crescimento (HC): para cada planta foi atribuída uma nota, 1=ereta. 2=semiereta. 3=prostrada.
- 2) Número de ramos primários (NRP): Contado a quantidade de ramos primários até a altura de 10cm do solo.
- 3) Comprimento da haste principal (CHP): medido em centímetro da base até o ápice.
- 4) Espessura do caule acima do solo (ECAS): medida a 5 cm do solo.
- 5) Espessura do caule abaixo do ápice (ECAA): medida a 5 cm abaixo do ápice.
- 6) Cor do caule (CC): para cada planta foi atribuída uma nota 1=verde. 2=avermelhado. 3=outra cor.
- 7) Acúleo no caule (AC): atribuídas notas para 1=ausente; 2=presente nas estípulas; 3=presente nos nódulos; 4=presente nas estípulas e nódulos; 5=presente em toda planta.
- 8) Pilosidade do caule (PC): atribuída de acordo com as seguintes notas: 1=ausente; 2=de um lado do caule; 3=em todo o caule.
- 9) Cor das folhas (CF): 1=verde claro; 2=verde escuro; 3=verde muito escuro; 4=outra cor.
- 10) Acúleo nas folhas (AF): 1=ausente; 2=ao redor das margens; 3=em toda a folha.
- 11) Pilosidade nas folhas (PF): 1=ausente; 2=atrás da folha; 3=em toda folha.
- 12) Formato do folíolo (FF): 1=lanceolada; 2=elíptica; 3=ovalada.
- 13) Largura do folíolo (LFo): medido na 5ª folha do 1º ramo secundário.
- 14) Comprimento do folíolo (CFo): medido na 5ª folha do 1º ramo secundário.
- 15) Comprimento do pecíolo (CP): medido na 5ª folha do 1º ramo secundário.
- 16) Viscosidade da inflorescência (VI): foi atribuído 0=não viscoso; 1=viscoso
- 17) Formato do ápice do folíolo (FAF): foi atribuído 1=agudo; 2=obtusos
- 18) Acúleo na inflorescência (AI): 0 = ausente. 1= presente
- 19) Viscosidade do caule (VC): 0=não viscoso; 1= viscoso

Para a obtenção dos dados morfoagronômicos foram utilizadas régua e paquímetros manuais. Os dados obtidos, a partir dos descritores, foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste proposto por Scott e Knott (1974), com nível de significância de 5% de probabilidade. Para avaliar a divergência genética entre os acessos, foram utilizadas técnicas de análise multivariada, tais como: distância generalizada de Mahalanobis ( $D^2$ ), como

pelo método de otimização de Tocher (este método adota o critério de que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo deve ser menor do que as distâncias médias entre quaisquer grupos), e a medida de dissimilaridade para determinar o grau de divergência entre os pares de acessos, através do agrupamento com o método UPGMA (agrupamento pela ligação média entre grupos) o dendograma é estabelecido pelo acesso geneticamente mais próximo. Foi calculada também a importância relativa dos caracteres ( $S_j$ ) para a diversidade, utilizando-se o método proposto por Singh (1981). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GENES (CRUZ, 2006).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 19 descritores avaliados, os descritores VI, FAF, AI, VC, foram descartados imediatamente por não apresentarem variabilidade entre os acessos, sendo as análises estatísticas realizadas nos 15 descritores restantes 7 descritores quantitativos e 8 descritores qualitativos.

#### 3.1 Análises univariadas

Na Tabela 2 é apresentado o resumo da ANOVA para as variáveis quantitativas, sendo elas: NRP, CHP, Lfo, Cfo, ECAS, ECAA e CP. Pode-se inferir que houve diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) entre os genótipos para as variáveis, NRP e Lfo, indicando que houve variabilidade entre os acessos. Nessas variáveis, os coeficientes de variação experimental (CV) não indicaram boa precisão experimental, porém mesmo apresentando CV muito alto as diferenças foram significativas, o que pode ser devido à grande variabilidade existente no gênero tanto inter como intraespecífica (VIEIRA *et al.* 2007).

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância para os descritores, número de ramos primários (NRP), comprimento da haste principal (CHP), largura do folíolo (Lfo), comprimento do folíolo (Cfo), espessura do caule acima do solo (ECAS), espessura do caule abaixo do ápice (ECAA) e comprimento do pecíolo (CP), realizada a partir da avaliação de 43 acessos de *Stylosanthes* spp., em experimento conduzido em Petrolina, PE (2012/2014).

QUADRADOS MÉDIOS								
FV	GL	NRP	CHP	Lfo	Cfo	ECAS	ECAA	CP
BL	2	216,18	261,33	1,72	56,23	6,07	3,79	62,9
ACES	42	285,42 **	296,23 <sup>ns</sup>	3,46**	21,02 <sup>ns</sup>	15,47 <sup>ns</sup>	0,82 <sup>ns</sup>	7,46 <sup>ns</sup>
RS	84	117,16	231,27	1,47	14,64	12,84	0,24	0,17
MD		27,48	65,78	6,09	15,18	6,26	1,66	5,56
CV (%)		39,39	23,12	19,93	25,21	57,25	51,94	45,46

\*\* e \* significativos a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; <sup>ns</sup> não-significativo pelo teste F, FV=Fonte de variação; BL= bloco; ACES= acessos; RS= resíduos; MD= média; CV= coeficiente de variação; GL= grau de liberdade.

De acordo com o teste de Scott e Knott apresentado na Tabela 3, observam-se as características avaliadas que apresentaram variabilidade genética entre e dentro dos acessos para os descritores (NRP e Lfo). O descritor NRP apresentou amplitude de variação entre 14,00 e 57,33 ramos por planta, sendo o acesso CPAC 1245 o que obteve o maior NRP. Karia *et al.* (2002), entretanto, obtiveram em seus estudos valores médios com variação entre 8 e 12 ramos, e 12 e 20 ramos, para as espécies *S. macrocephala* e *S. capitata*, respectivamente. O NRP é



uma característica importante para estimar a quantidade de matéria seca da planta, onde acessos com NRP elevados apresentam-se como uma excelente alternativa para alimentação animal.

O descritor Lfo apresentou variação entre 3,67mm, para o acesso CPAC 4950, a 8,67mm, para o acesso CPAC 4385, demonstrando potencialidade para produção de maior massa foliar.

**Tabela 3.** Comparação dos valores médios e agrupamentos obtidos para os descritores número de ramos primários (NRP), largura do folíolo (Lfo). Entre 43 acessos de *Stylosanthes*<sup>(1)</sup>, em experimento conduzido em Petrolina, PE (2012/2014).

Acessos/ CPAC	NRP	Lfo (mm)	Acessos/ CPAC	NRP	Lfo (mm)
397	35,17 a	5,17 b	4401	42,17 a	5,17 b
415	28,33 b	4,67 b	4947	19,50 b	8,17 a
490	40,17 a	6,33 b	4950	42,33 a	3,67 b
564	33,33 a	5,83 b	4953	13,83 b	7,83 a
995	23,00 b	5,67 b	4954	25,00 b	4,83 b
996	24,50 b	4,83 b	4955	28,17 b	7,00 a
1242	14,00 b	7,17 a	4956	41,17 a	6,33 b
1244	19,67 b	6,00 b	4962	18,17 b	5,00 b
1245	57,33 a	6,17 b	4963	15,17 b	5,00 b
1249	36,17 a	4,83 b	4966	24,00 b	5,67 b
1251	46,00 a	6,00 b	4986	29,67 b	5,50 b
1261	39,00 a	5,50 b	5114	27,50 b	7,50 a
1273	20,17 b	6,17 b	5178	35,00 a	5,17 b
1275	22,33 b	7,17 a	5179	32,50 a	6,00 b
4380	36,50 a	5,17 b	5196	21,50 b	8,17 a
4385	19,67 b	8,67 a	5197	33,50 a	5,67 b
4387	24,00 b	6,33 b	5203	27,50 b	6,00 b
4388	18,83 b	5,17 b	5205	18,50 b	6,50 b
4389	19,33 b	6,17 b	5228	18,67 b	6,33 b
4393	19,00 b	7,33 a	5234	24,33 b	6,17 b
4394	17,33 b	6,67 a	5612	23,33 b	7,50 a
4395	26,17 b	5,67 b			

<sup>1</sup>As médias seguidas pela mesma letra na vertical, pertencem ao mesmo grupo estabelecido pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

As variáveis qualitativas HC, CF, FF, CC, AC, PC, AF e PF foram analisadas de forma descritiva, onde se pode observar que para a variável HC, a amplitude de variação foi de 1,00 a 3,00, sendo 1 porte ereto e 3 de porte prostrado. Nove acessos apresentaram HC ereto, sendo eles: CPAC 995, CPAC 1251, CPAC 4387, CPAC 4389, CPAC 4394, CPAC 4401, CPAC 4947, CPAC 4953 e CPAC 5114; trinta e um apresentaram HC semiereto; e apenas os acessos

CPAC 1245, CPAC 4954 e CPAC 4962 apresentaram HC prostrado. O acesso CPAC 1245 apresentou maior média (3,00) entre os 43 acessos, demonstrando HC predominantemente prostrado. Plantas com HC semiereto e prostrado são ideais para alimentação de animais de pequeno e médio porte, já plantas com HC ereto são ideais para cultivo em consórcio para alimentação de animais de grande porte.

A coloração da folha (CF) teve uma amplitude de variação entre 1,00 e 2,83 sendo essa amplitude observada entre e dentro do acesso, sendo atribuída nota 1 para verde claro, 2 para verde escuro, e 3 para verde muito escuro. Sete acessos apresentaram plantas com folhas de coloração verde clara, sendo eles: CPAC 4950, CPAC 4954, CPAC 4956, CPAC 4962, CPAC 4963, CPAC 4966 e CPAC 5178; quatro com folhas de coloração verde muito escura, sendo eles: CPAC 490, CPAC 995, CPAC 1275 e CPAC 4380; e os 32 acessos restantes apresentaram folhas com coloração verde escura. O acesso CPAC 1275 foi o que obteve maior média apresentando folhas de coloração verde muito escura.

O descritor FF apresentou amplitude de variação média entre 1,00 e 2,67 onde a nota 1 é atribuída para folhas lanceoladas, 2 para folhas elípticas e 3 para folhas ovaladas. Foram observados 27 acessos apresentando folhas lanceoladas, 15 folhas elípticas, e apenas o acesso CPAC 5196 apresentou folhas ovaladas.

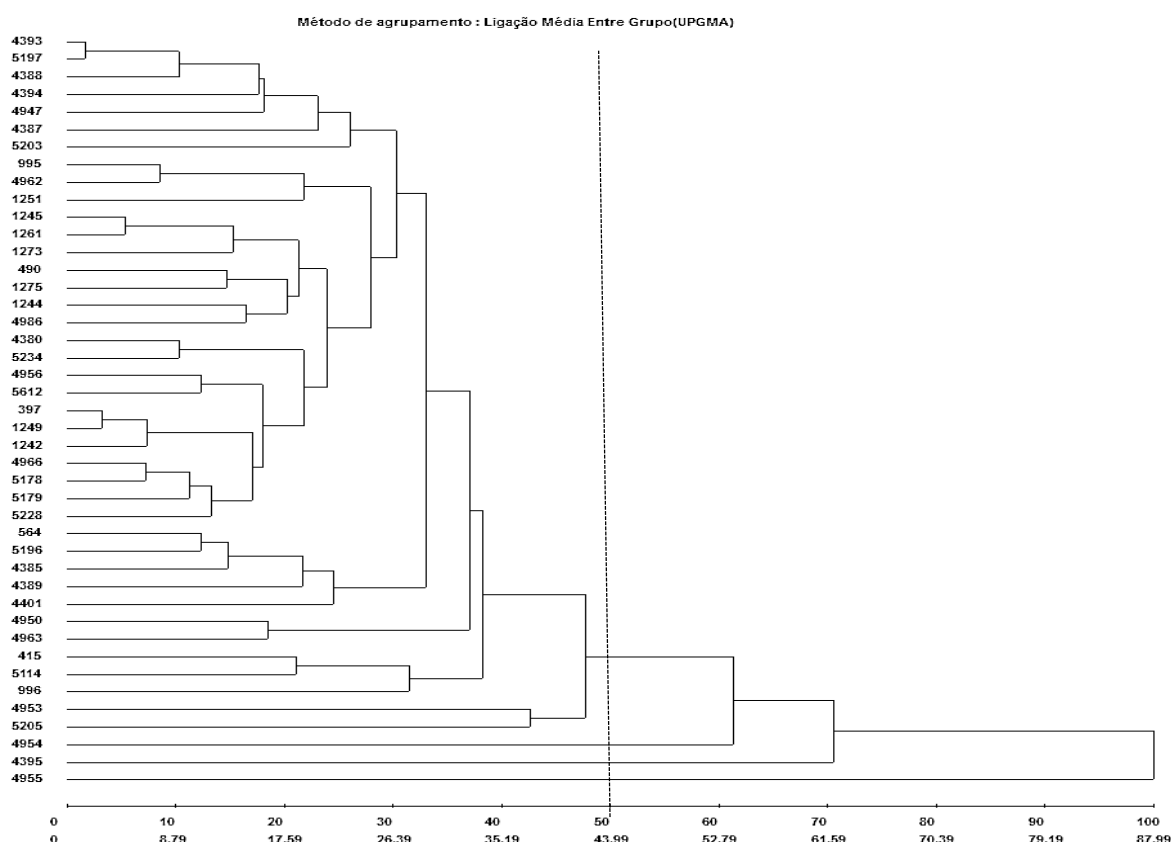
No descritor CC, 36 acessos apresentaram caules avermelhados e apenas os acessos CPAC 415, CPAC 1245, CPAC 1251, CPAC 4954, CPAC 4956, CPAC 4962 e CPAC 4966 apresentaram caules verdes. Para a variável AC, 13 acessos não apresentaram acúleo no caule, 29 apresentaram acúleo nas estípulas e apenas o acesso CPAC 1242 apresentou acúleo nos nódulos. Para a variável PC, 13 acessos apresentaram pilosidades em um lado do caule, e 20 apresentaram pilosidade em todo o caule. Na variável AF, 13 acessos não apresentaram acúleo em suas folhas, e 30 apresentaram acúleo ao redor das margens de suas folhas. Para a variável PF, 24 acessos apresentaram pilosidades apenas atrás das folhas, 17 apresentaram pilosidade em toda a folha, e apenas os acessos CPAC 4955 e CPAC 4966 não apresentaram pilosidade em suas folhas.

Os acessos CPAC 1245, 1275, 4955 e 5196 apresentaram divergência significativa para quatro dos cinco descritores que diferiram estatisticamente. O CPAC 1245 apresentou plantas com número elevado de ramos, crescimento prostrado, folhas verdes escuras e elípticas, enquanto o acesso CPAC 1275 apresentou plantas com maior largura do folíolo, crescimento semiereto, folhas verdes muito escuras e elípticas. O acesso CPAC 4955 também apresentou



Por outro lado, a partir do corte no dendograma em aproximadamente 50% da distância genética, observou-se a formação de quatro grupos (Figura 1). Observa-se que o grupo 1 foi formado por apenas o acesso CPAC 4955, o grupo 2 pelo acesso CPAC 4395, o grupo 3 pelo acesso CPAC 4954 e, o grupo 4 sendo o maior grupo formado por 40 acessos com a menor distância observada neste grupo entre os acessos CPAC 4393 e CPAC 5197.

Observou-se também que o acesso CPAC 4955 não agrupou com nenhum outro grupo, formando um grupo diferente nas duas análises, sugerindo que esse acesso é o mais distante geneticamente, apresentando plantas com características diferentes das demais.



**Figura 1.** Dendograma obtido por meio de descritores morfológicos com a distância generalizada de Mahalanobis e pelo método de agrupamento UPGMA, dos 43 acessos de *Stylosanthes* spp., Linha pontilhada: corte no dendograma em aproximadamente 50% da máxima distância, em experimento conduzido em Petrolina, PE (2012/2014).

### 3.3 – Importância dos descritores para a divergência.

Na Tabela 5 é apresentada a importância relativa ( $S_j$ ) de cada um dos 15 descritores morfológicos utilizados para o estudo da diversidade genética entre os 43 genótipos de

*Stylosanthes*. Observa-se que os descritores que mais contribuíram para a diversidade dos genótipos foram CP (11,64%) e NRP (10,98%), seguidos por HC (8,62%) e FF (8,44%). Já o descritor ECAA (1,84%) não apresentou contribuição relativa ou sua contribuição não foi significativa para a diversidade genética.

Os descritores que apresentaram contribuição relativa podem ser considerados como eficientes na diferenciação de genótipos. Resultados semelhantes também foram encontrados por Santana (2010) relatando que as características CP e NRP foram as que mais contribuíram para a diversidade genética de *Stylosanthes* em seus estudos com acessos de *S. scabra*.

**Tabela 5.** Importância relativa (S<sub>j</sub>) de caracteres morfológicos para o estudo da diversidade genética entre 43 acessos de *Stylosanthes* spp.

VARIÁVEL	S <sub>j</sub>	VALOR (%)
CP	3512,21	11,64
NRP	3313,69	10,98
HC	2601,84	8,62
FF	2547,78	8,44
CHP	2099,85	6,96
AC	2068,04	6,85
ECAS	1975,19	6,55
PC	1935,81	6,41
CF	1902,93	6,31
AF	1737,14	5,76
Lfo	1666,13	5,52
CC	1477,16	4,89
Cfo	1381,10	4,58
PF	1379,88	4,57
ECAA	555,43	1,84

S<sub>j</sub>.: valor estimado da estatística de SINGH (1981), comprimento do pecíolo (CP), número de ramos primários (NRP), habito de crescimento (HC), formato da folha (FF), comprimento da haste principal (CHP), acúleo no caule (AC), espessura do caule acima do solo (ACAS), pilosidade no caule (PC), cor da folha (CF), acúleo na folha (AF), largura do folíolo (Lfo), cor do caule (CC), comprimento do folíolo (Cfo), pilosidade da folha (PF), espessura do caule abaixo do ápice (ECAA).

#### 4 CONCLUSÕES

1. A análise dos caracteres morfoagronômicos entre os acessos de *Stylosanthes* indicou a existência de variabilidade entre os acessos, seja no seu hábito de crescimento, no número de ramos, na largura do folíolo ou na cor e formato da folha.
2. A análise de SINGH foi determinante na identificação de caracteres que realmente contribuem para a diversidade genética da espécie como CP, NRP, HC e FF possibilitando assim a criação de uma lista de descritores realmente eficientes na caracterização de germoplasma, diminuindo tempo e custo nas avaliações.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APG II ( Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 141. p. 399-436, 2003.

ARAÚJO. S. A. C. DEMINICIS. B. B. CAMPOS. P. R. S. S. **Melhoramento genético de plantas forrageiras Tropicais no Brasil**. Archivos de Zootecnia vol. 57. p. 76. 2008.

COSTA, N. M. de S. **Revisão do gênero *Stylosanthes* Sw.** Tese (Doutorado em Engenharia Agronomica)- Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 470 f. 2006.

CRUZ. C. D. **Programa Genes: Biometria**. Viçosa-MG:UFV. 382p. 2006.

DAHER. R.F.; MORAES. C.F.; CRUZ. C.D. **Seleção de caracteres morfológicos em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.)**. Revista Brasileira de Zootecnia.v.26. p.247-259. 1997.

ELY. D.G. **Forages for sheep, goats and rabbits**. In: BARNES. R.F.; MILLER.D.A.; NELSON. C.J. (Eds.) Forages: the science of grassland agriculture. vol. 2.5 ed. p. 313. 1995.

FIGUEIREDO, E.A.P. **Perspectivas da produção de caprinos nas próximas décadas na América Latina**. In: Caprinocultura e ovinocultura. Campinas: SBZ:FEALQ. p. 69-83. 1990.

IBGE, FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS - Sistema IBGE de Recuperação Automática. **Efetivo dos rebanhos por tipo de rebanho**. In: IBGE. Sidra: sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&c=73>>. Acesso em: Janeiro. 2015.

KARIA. C. T.; ANDRADE. R. P.de; CHARCHAR; M. J. D'A.; GOMES; A. C. **Caracterização morfológica de acessos do gênero *Stylosanthes* no banco ativo de germoplasma da Embrapa Cerrados - coleção 1994/1995**. In: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento n. 72. ISSN 1676-918X. Dezembro 2002.

LEWIS GP. **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, Kew , 577p, 2005.

MILES, J.W. **Evaluation of potential genetic marker traits and estimation of out crossing rate in *Stylosanthes guianensis***. Australian Journal of Agricultural Research, v.36, p.259-265, 1985.

NEPPA – NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM PRODUÇÃO ANIMAL DA UNEB. [www.neppa.uneb.br](http://www.neppa.uneb.br). Publicações: **Pastagens para ovinos e caprinos**. 2005.

SANTANA. A. dos S.; ROMÃO. R. L.; **Resgate, Caracterização Morfométrica e Avaliação Bromatológica de Acessos de *Stylosanthes* spp. do Semiárido Baiano**. Dissertação de Mestrado, UEFS, BA, 2010.

SANTOS. C. A. F.; OLIVEIRA. C. A. V.; MENEZES. E. A. **Seleção de descritores na caracterização e avaliação preliminar de germoplasma de guandu**. In: Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília. v.30. n.7. p. 971-975. Julho de 1995. Publicado em 2011.

STACE, H.M. **Breeding system in *Stylosanthes***. I. Observations of outcrossing in *S. scabra* at an alcohol dehydrogenase locus. Australia Journal of Agricultural Research, v.33, p.87-96, 1984.

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.



## **CAPÍTULO 2**

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ACESSOS DE *Stylosanthes* spp. (Fabaceae – Papilionoideae) COLETADOS NO NORDESTE BRASILEIRO**

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ACESSOS DE *Stylosanthes* spp. (Fabaceae – Papilionoideae) COLETADOS NO NORDESTE BRASILEIRO**

**RESUMO**

As espécies do gênero *Stylosanthes* caracterizam-se por apresentarem, de modo geral, grande variabilidade, tanto intra como interespecífica. Os estudos referentes a citogenética do gênero *Stylosanthes* relatam a existência de diploides, tetraploides e hexaploides em várias espécies. O presente trabalho objetivou caracterizar citogenticamente 17 acessos de *Stylosanthes* cedidos pela Embrapa Cerrados e inicialmente identificados como *S. scabra*, identificando o número, a morfologia cromossômica e o padrão de distribuição de heterocromatina. Para isso, ápices de raízes foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína 2 mM e fixados em Carnoy. As raízes foram digeridas em solução enzimática (celulase/pectinase), sendo o material preparado pela técnica de esmagamento, e corado com CMA<sub>3</sub> seguido de DAPI. 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 µm com diferenças no comprimento médio dos cromossomos e no comprimento total do genoma. A análise com dupla coloração CMA<sub>3</sub>/DAPI permitiu a visualização de quatro blocos CMA+ nos acessos de *S. scabra*, sendo dois blocos CMA+ localizados na região subterminal do braço curto de um par cromossômico submetacêntrico, e dois blocos localizados na região proximal de outro par metacêntrico, e dois blocos na região subterminal de um par metacêntrico nos acessos de *S. seabrana*. Também foi possível a visualização de bandas DAPI+ e CMA- nos acessos CPAC 1261 e CPAC 5205. Os blocos CMA+ podem estar relacionados aos loci das regiões organizadoras do nucléolo (RONs). Em algumas células não foi possível visualizar as bandas de um dos pares devido a seu tamanho reduzido e à tendência da distensão da região nas metáfases analisadas. A coloração diferencial de cromossomos, associados a outros marcadores citogenéticos, poderá auxiliar na caracterização de acessos de coleções de germoplasma, visando apoiar o melhoramento genético dessa espécie.

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

**CHARACTERIZATION CYTOGENETICS OF ACCESS *Stylosanthes* spp. (Fabaceae – Papilionoideae) COLLECTED IN NORTHEAST BRAZILIAN**

**ABSTRACT**

The species of the genus *Stylosanthes* characterized by presenting, in general, great variability, both intra- and interspecific. Studies on cytogenetics of the genus *Stylosanthes* report the existence of diploid, tetraploid and hexaploid in several species. This study aimed to characterize citogenticamente 17 *Stylosanthes* accessions donated by Embrapa Cerrado and initially identified as *S. scabra*, identifying number, chromosome morphology and the distribution pattern of heterochromatin. Therefore, root apices were pretreated with 8 - hidroxiquinoleína 2mM and fixed in Carnoy. The roots were digested in enzyme solution (cellulase/pectinase), the material prepared by crushing technique, followed CMA<sub>3</sub> and stained with DAPI. Accesses were observed with 2n = 40 (*S. scabra*) and 2n = 20 (*S. seabrana*) chromosomes, interphase nucleus of semirreticulado type, symmetrical karyotype with chromosome morphology ranging from the submetacêntrica metacentric chromosome and medium size around 2,5microns with differences in the average length of the chromosomes and the total length of the genome. The analysis with double staining CMA<sub>3</sub> / DAPI enabled visualization of four CMA<sup>+</sup> blocks in *S. scabra* hits, two CMA<sup>+</sup> blocks in subterminal region of the short arm of a chromosome pair submetacentric, and two blocks located in the proximal region of another metacentric pair and two blocks in the subterminal region of a metacentric pair in *S. seabrana* access. Also viewing DAPI and CMA<sup>+</sup> bands in CPAC 1261 and CPAC 5205. The CMA<sup>+</sup> blocks access was possible can be related to the loci of the nucleolus organizer regions (NORs). In some cells was not possible to visualize the bands a couple due to its small size and the tendency of the distension of the region in the analyzed metaphases. The differential staining of chromosomes, together with other cytogenetic markers, may assist in the characterization of accessions of germplasm collections, to support the breeding of this species.

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

## INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Stylosanthes* caracterizam-se por apresentar grande variabilidade tanto intra como interespecífica (VIEIRA *et al.* 2007), sendo a distinção das espécies baseada principalmente em características morfológicas (MANNETJE, 1984; COSTA, 2006). Atualmente uma série de outras técnicas estão 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 análise da variabilidade das regiões do ITS (*Internal Transcribed Spacer Region*), entre outras. Citogeneticamente, poucos estudos foram realizados, sendo relacionados apenas ao número cromossômico, quase não havendo relatos sobre morfologia ou técnicas de bandejamento com CMA/DAPI (VIEIRA *et al.* 1993; COSTA, 2006).

Por outro lado, o Brasil possui nove bancos de espécies forrageiras que ficam localizados em Unidades da Embrapa, no Instituto de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras-UFLA, e na Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - Epagri, os quais possuem um total de 9.956 acessos, sendo que 1.229 são acessos do gênero *Stylosanthes* e, desses, apenas 167 estão devidamente identificados (FAO, 2014).

Para dar início às atividades de melhoramento genético com esta leguminosa forrageira no Nordeste brasileiro, a Embrapa Semiárido (CPATSA) recebeu vários acessos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Cerrados (CPAC), os quais foram coletados entre as décadas de 70 e 80 e que estão identificados como *S. scabra*. Porém, dentre esses acessos, há dúvidas sobre a possível existência da espécie *S. seabrana*, visto que, quando os mesmos foram coletados, esta última espécie ainda não tinha sido descrita taxonomicamente (DATE *et al.* 2010). As duas espécies são morfológicamente muito similares, no entanto, apresentam diferentes números de cromossomos, já que *S. scabra* é um alotetraploide com  $2n=40$  e *S. seabrana* é diploide com  $2n=20$  cromossomos (MAASS e 't MENNTJE, 2002).

Segundo Guerra (1988), uma caracterização clara e precisa do cariótipo de uma espécie é de fundamental importância quando se quer comparar citogeneticamente espécies diferentes, ou examinar a variação entre indivíduos da mesma espécie.

A citogenética tem sido utilizada na identificação de alterações cromossômicas numéricas e estruturais, descrição cariotípica de variedades ou cultivares para a inclusão em esquema de cruzamentos, controle na obtenção de híbridos ou poliploides e no mapeamento físico cromossômico (PEREIRA, 2010). Nesse caso, o uso de fluorocromos DAPI e CMA<sub>3</sub> tem sido

muito interessante, pois apresentam especificidade de ligação para a cromatina rica em AT e GC e, com isso, possibilitam a coloração diferencial permitindo a obtenção de mais um marcador cromossômico.

No presente trabalho foram realizados estudos citogenéticos com os objetivos de caracterizar citogeneticamente acessos identificados como *S. scabra* e verificar a possível existência da espécie *S. seabrana* entre esses acessos de *S. scabra*, identificando o número, a morfologia cromossômica e o padrão de distribuição de heterocromatina em 17 acessos de *Stylosanthes* coletados no semiárido brasileiro.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 17 acessos (Tabela 1) primariamente identificados como *Stylosanthes scabra*, os quais foram coletados no semiárido brasileiro e mantidos no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Cerrados (Planaltina-DF). As análises foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Semiárido (Petrópolis-PE) utilizando-se pontas de raízes obtidas de sementes germinadas em microtubos de 2mL contendo água destilada.

**Tabela 1.** Relação dos 17 acessos de *Stylosanthes* utilizados e ano de coleta.

CPAC	ANO DE COLETA	CPAC	ANO DE COLETA
397	1979	4963	1997
564	1979	4966	1997
1244	1981	5114	1999
1261	1981	5196	2000
4387	1995	5205	2000
4393	1996	5228	2000
4401	1996	5234	2000
4947	1997	5612	2004
4950	1997		

### 2.1 Caracterização citogenética

Para a realização das análises mitóticas, 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 (três partes de álcool etílico P.A, para uma parte de ácido acético glacial) com um volume 10 vezes maior que o volume do material a ser fixado.

Na preparação das lâminas, o material vegetal foi lavado por cinco minutos em água destilada, repetindo-se este processo por duas vezes. Em seguida, foi feita a digestão enzimática das raízes com uma mistura de 2% celulase e 10% pectinase a 37° por 60 min. Logo após o material foi colocado em ácido acético para retirada da coifa e macerado, congelando-se a

lâmina em nitrogênio líquido visando a retirada da lamínula por congelamento. Por último, as lâminas foram “envelhecidas” em uma cubeta ou borel por três dias, em temperatura ambiente, para posterior aplicação dos corantes.

Para a coloração com CMA, em cada lâmina envelhecida foi adicionado uma gota de CMA (0,5 mg/ml), coberta com uma lamínula e guardada em caixa escura por 1 hora. Depois foi retirada a lamínula com um jato de água destilada, sendo a lâmina seca rapidamente. Logo após foi adicionada a lâmina uma gota de DAPI (2µg/ml) por 30 min., retirando-se a lamínula novamente com um jato de água destilada, novamente seca, e montada 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.

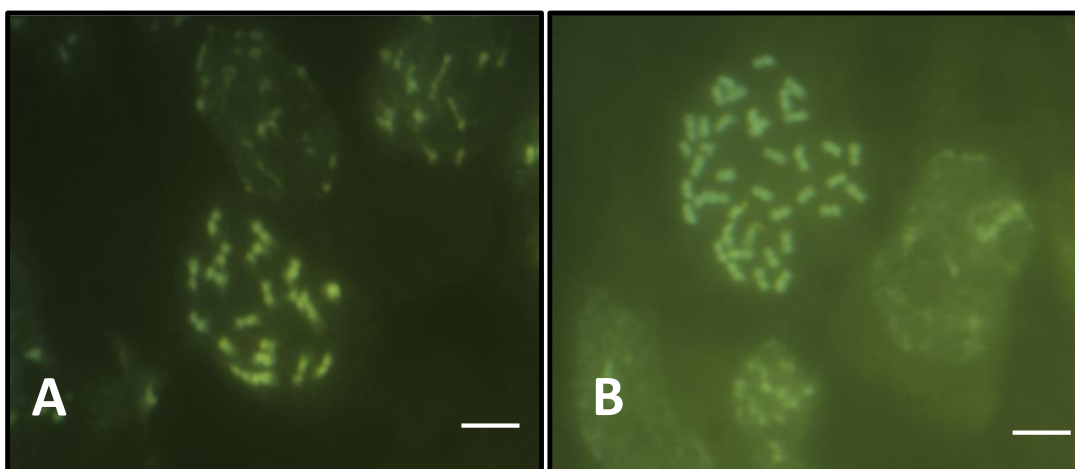
Para a identificação do número e morfologia cromossômica, pelo menos três metáfases foram examinadas por indivíduo, das quais as melhores foram utilizadas para as medições cromossômicas e confecção dos idiogramas. Todas as análises citogenéticas foram realizadas baseadas em Guerra e Souza (2002). As medições foram realizadas também com o auxílio do programa Leica QFish sendo medidos cromossomos de metáfases bem espalhadas, calculando-se: comprimento dos braços curtos (BC); comprimento dos braços longos (BL) e comprimento total.

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: Metacêntrico (M); Submetacêntrico (SM); Acrocêntrico (A); Telocêntrico (T). Além disso, foram estimados os seguintes parâmetros cariológicos: Somatório dos comprimentos cromossômico total (TCL); Comprimento cromossômico médio (mCL); Razão entre o maior e o menor braço (BL/BC); e Comprimento relativo (CA/TCL).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização citogenética

Dos 17 acessos de germoplasma de *Stylosanthes* avaliados, três apresentaram cariótipos com  $2n=20$  (Figura 1A; Tabela 2) e 14 apresentaram cariótipos com  $2n=40$  (Figura 1B; Tabela 2). Foram observados cromossomos metacêntricos a submetacêntricos e núcleos interfásicos do tipo semirreticulado. Esses números cromossômicos mostram a existência de acessos pertencentes a espécie *S. seabrana* ( $2n=20$ , segundo Date 2010) e *S. scabra* ( $2n=40$ ), conforme relatado nos trabalhos de Cameron (1967) e Liu e Musil (1997).



**Figura 1:** Metáfases mitóticas de *Stylosanthes seabrana*, apresentando número cromossômico  $2n=20$  no acesso CPAC 4950(A) e de *Stylosanthes scabra*, apresentando número cromossômico  $2n=40$  no acesso CPAC 5234(B); Barra representa 5  $\mu\text{m}$ .

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, permitem 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 (MELO *et al.* 2001; SOUZA *et al.* 2003; VIEIRA *et al.* 2004; CUCO *et al.* 2005; SOARES- SCOTT *et al.* 2005).

No presente trabalho, o comprimento cromossômico médio mostrou variações entre os acessos diploides ( $2n=20$ ), sendo a variação entre 1,28  $\mu\text{m}$  no acesso CPAC 4950, 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).



Tendência para o aumento do tamanho cromossômico em poliploides tem sido relatado em várias espécies, como, por exemplo, na família *Velloziaceae* (MELO *et al.* 1997) e *Passifloraceae* (MELO *et al.* 2001). Na literatura não se encontram muitos relatos citogenéticos relacionados ao comprimento e a morfologia cromossômica do gênero *Stylosanthes*, com exceção do trabalho de Vieira *et al.* (1993) que relataram comprimentos cromossômicos entre 1,5 e 2,7  $\mu\text{m}$  em doze espécies brasileiras de *Stylosanthes* com  $2n=20$ . Entre esses acessos está a espécie *S. viscosa* (possível ancestral de *S. scabra*) que apresentou comprimento cromossômico médio variando entre 1,55  $\mu\text{m}$  a 2,60  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 2.** NC= número cromossômico, mCL= comprimento cromossômico médio, FC= fórmula cariotípica, TCL= comprimento cromossômico haploide total de acessos de *Stylosanthes* spp., analisados em metáfases mitóticas. m= metacêntrico; sm= submetacêntrico.

ACESSOS	NC (2n)	mCL ( $\mu\text{m}$ )	FC	TCL ( $\mu\text{m}$ )
CPAC 4950	20	1,28	10 m	12,77
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	17 m + 3 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 4387	40	1,48	16 m + 4 sm	29,60
CPAC 4393	40	1,54	18 m + 2 sm	30,88
CPAC 4401	40	1,45	18 m + 2 sm	28,99
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
CPAC 5612	40	1,59	17 m + 3 sm	31,74

Da mesma forma, comparando-se o tamanho médio dos cromossomos das duas espécies de *Stylosanthes* aqui estudadas com os valores relatados para outros gêneros da mesma tribo Papilionoideae (*Phaseolus*, *Vigna* e *Macroptilium*), observa-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).

Entretanto, outras espécies de Papilionoideae apresentam variações maiores de tamanho cromossômico, como relatado em *Crotalaria lanceolata* com valores entre 0,68 e 3,34  $\mu\text{m}$ , (ANDRADE *et al.* 2008), e em *Cratylia* sp., com variação entre 31,61 e 44,38  $\mu\text{m}$  (VARGAS, 2008). Em relação a fórmula cariotípica (FC), entre os acessos diploides, todos apresentaram cromossomos com morfologia metacêntrica (FC=10m). Dos 14 acessos tetraploides analisados, 13 apresentaram cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, sendo um com FC= 16m +

4sm, três com  $FC = 17m + 3sm$ , cinco com  $FC = 18m + 2sm$ , e quatro com  $FC = 19m + 1sm$ . Apenas o acesso CPAC 5196 apresentou  $FC = 20m$  (Tabela 2), confirmando haver variabilidade cariomorfológica na espécie estudada.

A predominância de cromossomos metacêntricos nos acessos das duas espécies indica 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 *Caesalpinoideae*, de acordo com o sistema de classificação proposto por Stebbins (1971).

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).

Embora os acessos tenham o mesmo número cromossômico, os mesmos apresentaram diferenças em relação ao TCL que variou entre 12,77 a 16,05  $\mu m$  nos acessos diploides com  $2n=20$ , e entre 27,52 a 49,67  $\mu m$  nos acessos tetraploides com  $2n=40$  (Tabela 2). Vieira *et al.* (1993) encontraram variação entre diploides de 19,48 e 22,89  $\mu m$  TCL, valores esses próximos dos mensurados no nosso trabalho.

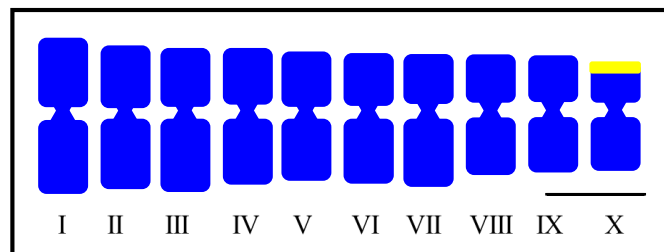
O comprimento relativo (CR) dos cromossomos, por representar a proporção de cada cromossomo dentro do comprimento total do lote haploide ( $CA/TCL$ ), é uma medida interessante para comparar diferentes acessos e, até mesmo, diferentes espécies.

Na Tabela 3, observa-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 entre 6,91%, no acesso CPAC 4950, a 8,90%, no acesso CPAC 4966 para o cromossomo VIII, e 8,44%, acesso CPAC 4963, a 10,81%, acesso CPAC 4950 para o cromossomo IX. Vieira *et al.* (1993) observaram em 12 espécies do gênero *Stylosanthes* variação entre 11,15% a 12,16% para o tamanho do cromossomo I e 7,08% a 9,77% para o tamanho do cromossomo X, demonstrando também haver variação significativa entre esses acessos diploides.

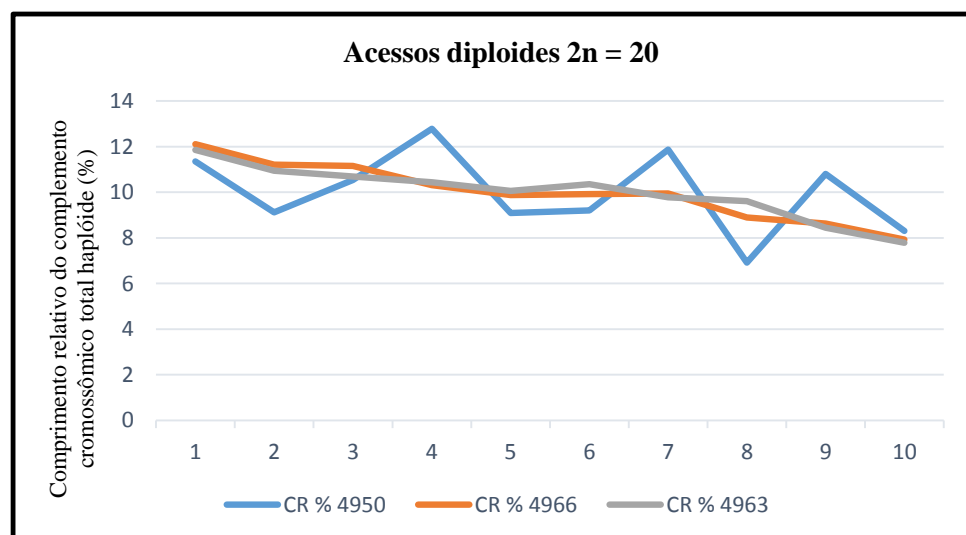
**Tabela 3.** Comprimentos cromossômicos médios do braço curto (BC), braço longo (BL) e comprimento absoluto (CA), em  $\mu\text{m}$ , e comprimento relativo percentual (CR %) em três acessos de *Stylosanthes seabrana*, coletados no semiárido brasileiro

ACESSOS		Cromossomos									
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
CPAC 4950	BC	0,88	0,79	0,78	0,77	0,76	0,74	0,70	0,64	0,62	0,56
	BL	1,06	0,85	1,00	0,87	0,85	0,87	0,82	0,78	0,76	0,78
	CA	1,45	1,17	1,35	1,63	1,16	1,18	1,52	0,88	1,38	1,06
	CR	11,36%	9,13%	10,54%	12,79%	9,09%	9,20%	11,87%	6,91%	10,81%	8,30%
CPAC 4963	BC	0,91	0,83	0,80	0,77	0,76	0,74	0,70	0,64	0,61	0,54
	BL	0,99	0,93	0,91	0,90	0,86	0,93	0,87	0,90	0,75	0,72
	CA	1,90	1,76	1,72	1,68	1,62	1,66	1,57	1,54	1,36	1,25
	CR	11,86%	10,95%	10,69%	10,44%	10,07%	10,36%	9,78%	9,61%	8,44%	7,79%
CPAC 4966	BC	0,92	0,83	0,78	0,75	0,73	0,70	0,66	0,64	0,62	0,53
	BL	0,98	0,93	0,97	0,87	0,82	0,86	0,90	0,76	0,73	0,71
	CA	1,90	1,76	1,75	1,62	1,55	1,56	1,56	1,40	1,35	1,24
	CR	12,12%	11,21%	11,16%	10,32%	9,89%	9,92%	9,95%	8,90%	8,63%	7,92%

Esses dados podem também ser visualizados no idiograma da Figura 2 e no gráfico da Figura 3.



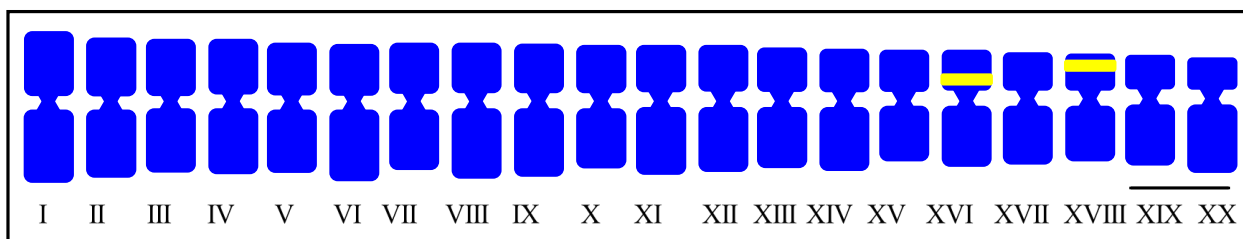
**Figura 2.** Idiogramas do complemento cromossômico haploide do acesso CPAC 4966 de *Stylosanthes seabrana* com  $n=10$  destacando as bandas CMA+ em amarelo. Barra em  $5 \mu\text{m}$ .



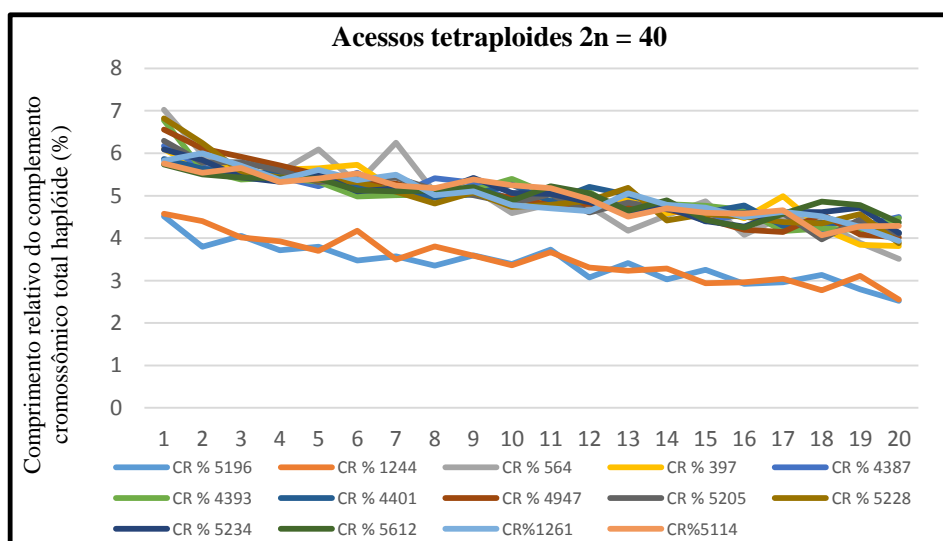
**Figura 3** – Gráfico da distribuição do comprimento relativo do complemento cromossômico total haploide (%) dos cromossomos de acessos de *Stylosanthes seabrana*, alinhados em função do comprimento decrescente do braço curto de cada par cromossômico (pares de 1 a 10).

Por outro lado, entre os 14 acessos tetraploides de *S. scabra* (Tabela 4), 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. 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.

Nas Figuras 4 e 5 pode-se observar o idiograma e o gráfico com os tamanhos cromossômicos dos acessos de *S. scabra*, ficando evidente a diferença nos tamanhos cromossômicos dos acessos CPAC 1244 e CPAC 5196 em relação aos outros acessos da mesma espécie.



**Figura 4.** Idiogramas do complemento cromossômico haploide do acesso CPAC 4387 de *S. scabra* Vogel com  $n=20$ , destacando as bandas CMA+ em amarelo. Barra 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 5** – Gráfico da distribuição do comprimento relativo do complemento cromossômico total haploide (%) dos cromossomos de acessos de *Stylosanthes scabra*, alinhados em função do comprimento decrescente do braço curto de cada par cromossômico (pares de 1 a 20).

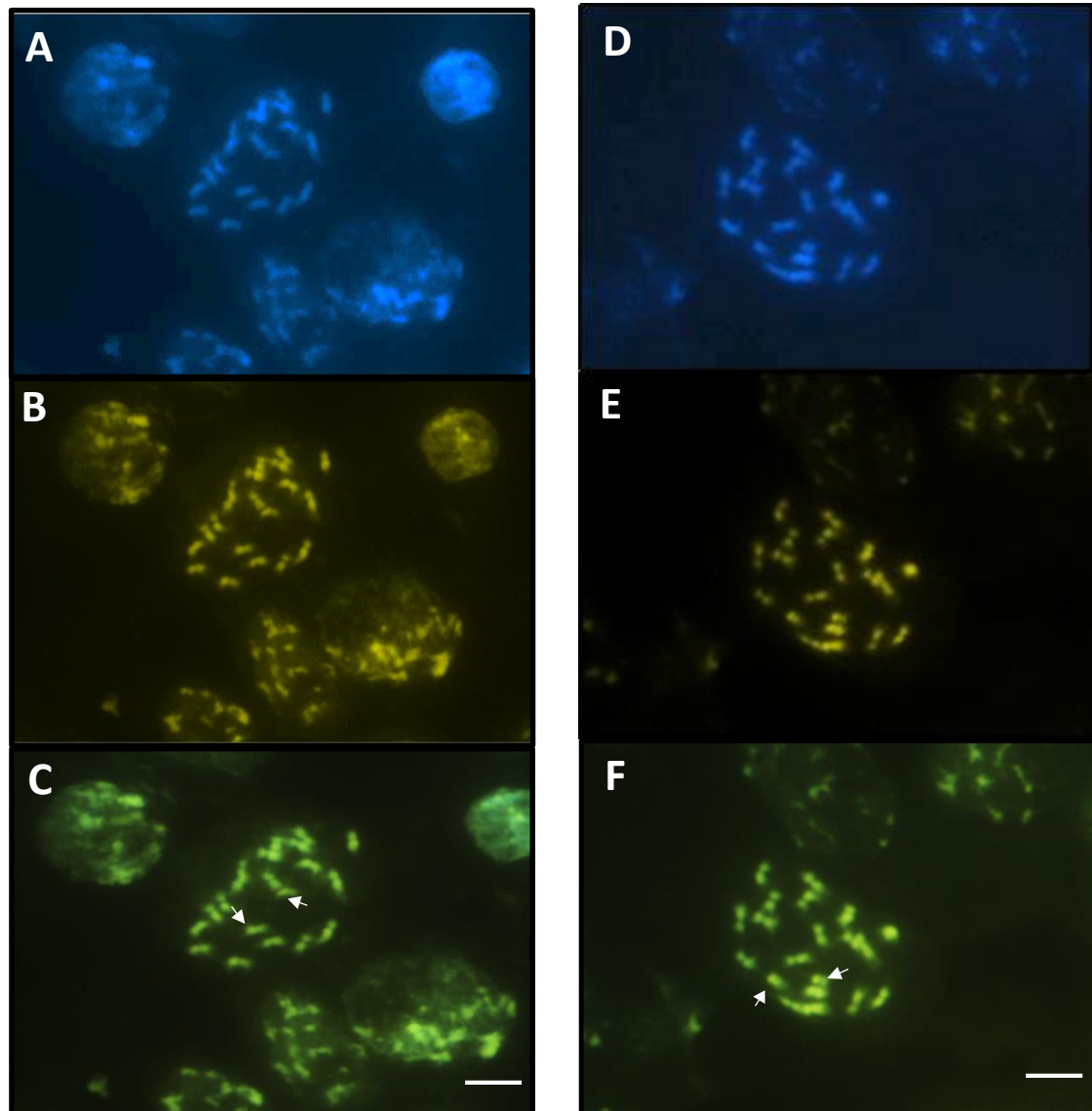
**Tabela 4.** Comprimentos cromossômicos médios do braço curto (BC), braço longo (BL) e comprimento absoluto (CA), em  $\mu\text{m}$ , e comprimento relativo percentual (CR %) em três acessos de *Stylosanthes scabra* Vogel. Coletados no semiárido Brasileiro.

ACESSOS		Cromossomos																			
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX
CPAC 397	BC	0,94	0,87	0,85	0,83	0,81	0,79	0,77	0,77	0,75	0,74	0,71	0,70	0,68	0,67	0,65	0,62	0,62	0,57	0,51	0,45
	BL	1,01	0,93	1,00	0,97	1,00	1,05	0,87	0,87	0,86	0,85	0,84	0,85	0,89	0,80	0,87	0,81	0,98	0,79	0,72	0,77
	CA	1,95	1,80	1,85	1,80	1,81	1,84	1,64	1,64	1,61	1,59	1,56	1,55	1,57	1,47	1,53	1,43	1,60	1,35	1,23	1,22
	CR	6,10%	5,61%	5,77%	5,61%	5,64%	5,73%	5,11%	5,11%	5,03%	4,96%	4,86%	4,83%	4,90%	4,58%	4,76%	4,47%	4,99%	4,22%	3,84%	3,81%
CPAC 564	BC	1,60	1,38	1,31	1,26	1,23	1,20	1,18	1,12	1,11	1,10	1,06	1,05	0,99	0,98	0,98	0,92	0,90	0,88	0,87	0,68
	BL	1,89	1,59	1,41	1,50	1,80	1,43	1,93	1,40	1,45	1,18	1,33	1,31	1,10	1,28	1,44	1,11	1,34	1,29	1,06	1,07
	CA	3,49	2,97	2,73	2,76	3,03	2,63	3,11	2,52	2,56	2,28	2,38	2,36	2,08	2,26	2,42	2,03	2,24	2,17	1,93	1,75
	CR	7,02%	5,98%	5,50%	5,56%	6,09%	5,29%	6,25%	5,07%	5,16%	4,59%	4,80%	4,75%	4,18%	4,54%	4,87%	4,08%	4,50%	4,37%	3,89%	3,51%
CPAC 1244	BC	1,17	1,11	1,08	1,06	1,04	1,04	1,02	0,99	0,96	0,94	0,93	0,92	0,90	0,86	0,83	0,78	0,77	0,75	0,68	0,68
	BL	1,61	1,50	1,31	1,28	1,16	1,44	1,08	1,28	1,19	1,08	1,26	1,08	1,06	1,13	0,93	0,99	1,06	0,92	1,22	0,88
	CA	2,78	2,61	2,39	2,34	2,21	2,48	2,10	2,26	2,14	2,03	2,19	2,00	1,96	1,99	1,75	1,77	1,83	1,66	1,90	1,56
	CR	4,57%	4,40%	4,02%	3,92%	3,70%	4,17%	3,49%	3,80%	3,59%	3,36%	3,67%	3,31%	3,23%	3,28%	2,94%	2,96%	3,04%	2,77%	3,11%	2,55%
CPAC 1261	BC	0,98	0,96	0,93	0,89	0,86	0,84	0,83	0,81	0,80	0,79	0,77	0,75	0,73	0,72	0,71	0,70	0,67	0,64	0,60	0,52
	BL	0,98	1,06	0,99	0,92	1,03	0,97	1,03	0,88	0,92	0,82	0,82	0,82	0,98	0,90	0,88	0,82	0,89	0,88	0,84	0,81
	CA	1,96	2,02	1,92	1,81	1,89	1,81	1,85	1,69	1,72	1,61	1,58	1,56	1,70	1,61	1,59	1,52	1,56	1,52	1,44	1,33
	CR	5,83%	6,00%	5,70%	5,38%	5,61%	5,37%	5,50%	5,01%	5,10%	4,78%	4,70%	4,63%	5,06%	4,78%	4,72%	4,50%	4,62%	4,52%	4,26%	3,94%
CPAC 4387	BC	0,86	0,78	0,76	0,74	0,70	0,69	0,68	0,67	0,66	0,64	0,63	0,62	0,59	0,58	0,56	0,54	0,51	0,49	0,46	0,43
	BL	0,97	0,90	0,85	0,87	0,84	0,95	0,80	0,93	0,91	0,80	0,90	0,86	0,81	0,85	0,74	0,81	0,78	0,74	0,81	0,91
	CA	1,83	1,68	1,60	1,61	1,55	1,64	1,48	1,60	1,57	1,45	1,53	1,48	1,40	1,42	1,30	1,35	1,30	1,23	1,27	1,33
	CR	6,17%	5,68%	5,40%	5,44%	5,22%	5,54%	5,01%	5,41%	5,30%	4,88%	5,16%	5,00%	4,71%	4,81%	4,39%	4,57%	4,37%	4,14%	4,29%	4,50%
CPAC 4393	BC	0,90	0,83	0,81	0,79	0,77	0,75	0,74	0,71	0,71	0,70	0,68	0,67	0,64	0,63	0,62	0,59	0,58	0,55	0,52	0,48
	BL	1,20	0,91	0,86	0,89	0,88	0,79	0,81	0,84	0,88	0,97	0,87	0,90	0,76	0,86	0,85	0,85	0,71	0,76	0,78	0,90
	CA	2,09	1,73	1,66	1,68	1,65	1,54	1,55	1,55	1,59	1,67	1,55	1,57	1,40	1,48	1,47	1,44	1,29	1,31	1,29	1,38
	CR	6,78%	5,61%	5,38%	5,43%	5,33%	4,98%	5,01%	5,03%	5,13%	5,39%	5,02%	5,09%	4,54%	4,80%	4,76%	4,66%	4,17%	4,23%	4,19%	4,47%
CPAC 4401	BC	0,82	0,77	0,76	0,75	0,73	0,71	0,69	0,68	0,67	0,66	0,65	0,65	0,64	0,61	0,59	0,57	0,55	0,51	0,48	0,44
	BL	0,89	0,86	0,84	0,86	0,86	0,80	0,80	0,76	0,80	0,87	0,76	0,86	0,82	0,77	0,74	0,82	0,69	0,75	0,78	0,76
	CA	1,70	1,64	1,60	1,61	1,59	1,51	1,49	1,44	1,46	1,53	1,41	1,51	1,46	1,38	1,34	1,38	1,24	1,27	1,26	1,20
	CR	5,86%	5,64%	5,51%	5,55%	5,48%	5,22%	5,14%	4,95%	5,04%	5,26%	4,86%	5,21%	5,02%	4,76%	4,61%	4,77%	4,29%	4,36%	4,34%	4,13%
CPAC 4947	BC	0,84	0,77	0,73	0,71	0,67	0,65	0,63	0,61	0,61	0,59	0,58	0,56	0,56	0,54	0,52	0,51	0,47	0,45	0,42	0,39
	BL	0,89	0,84	0,82	0,79	0,78	0,76	0,76	0,72	0,72	0,72	0,68	0,70	0,69	0,70	0,65	0,60	0,62	0,75	0,65	0,67
	CA	1,72	1,61	1,56	1,50	1,44	1,41	1,39	1,33	1,33	1,31	1,25	1,26	1,25	1,23	1,17	1,10	1,09	1,20	1,07	1,06
	CR	6,56%	6,11%	5,92%	5,71%	5,49%	5,37%	5,28%	5,07%	5,05%	4,97%	4,77%	4,81%	4,76%	4,68%	4,45%	4,20%	4,14%	4,56%	4,08%	4,02%
CPAC 5114	BC	0,87	0,84	0,81	0,80	0,78	0,76	0,74	0,73	0,71	0,69	0,66	0,65	0,64	0,62	0,61	0,59	0,58	0,56	0,52	0,51
	BL	0,88	0,84	0,90	0,81	0,85	0,91	0,85	0,84	0,92	0,90	0,91	0,84	0,73	0,80	0,78	0,79	0,83	0,68	0,77	0,79
	CA	1,74	1,68	1,71	1,61	1,64	1,67	1,59	1,57	1,63	1,59	1,57	1,49	1,36	1,42	1,39	1,39	1,41	1,23	1,30	1,30
	CR	5,76%	5,54%	5,65%	5,32%	5,40%	5,53%	5,24%	5,18%	5,38%	5,25%	5,18%	4,92%	4,50%	4,70%	4,59%	4,58%	4,66%	4,06%	4,28%	4,29%
CPAC 5196	BC	1,35	1,24	1,19	1,18	1,11	1,07	1,06	1,05	1,05	1,04	1,02	0,96	0,95	0,95	0,93	0,88	0,84	0,84	0,79	0,66
	BL	1,63	1,31	1,51	1,33	1,39	1,29	1,36	1,22	1,30	1,22	1,43	1,08	1,32	1,14	1,28	1,13	1,09	1,15	1,04	0,97
	CA	2,98	2,55	2,71	2,51	2,50	2,36	2,42	2,27	2,35	2,26	2,44	2,03	2,27	2,09	2,20	2,01	1,93	1,98	1,82	1,63
	CR	4,51%	3,80%	4,05%	3,71%	3,80%	3,47%	3,57%	3,35%	3,59%	3,39%	3,73%	3,07%	3,41%	3,03%	3,25%	2,92%	2,96%	3,13%	2,79%	2,52%

Continuação tabela 4.

ACESSOS		Cromossomos																			
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX
CPAC 5205	BC	1,13	1,02	1,00	0,96	0,94	0,92	0,90	0,87	0,85	0,83	0,82	0,79	0,78	0,77	0,75	0,73	0,71	0,67	0,64	0,61
	BL	1,17	1,09	1,12	1,08	1,01	1,06	1,09	1,01	0,98	0,93	1,03	0,89	0,99	0,94	0,94	0,95	0,97	0,79	0,99	0,89
	CA	2,30	2,11	2,12	2,05	1,95	1,97	1,99	1,88	1,83	1,76	1,84	1,68	1,77	1,71	1,68	1,68	1,68	1,45	1,63	1,50
	CR	6,30%	5,78%	5,79%	5,59%	5,32%	5,39%	5,43%	5,14%	5,01%	4,82%	5,03%	4,60%	4,83%	4,68%	4,59%	4,59%	4,595	3,97%	4,44%	4,10%
CPAC 5228	BC	0,89	0,76	0,73	0,71	0,70	0,69	0,67	0,65	0,63	0,61	0,60	0,60	0,58	0,56	0,56	0,54	0,52	0,49	0,46	0,39
	BL	0,99	0,96	0,80	0,78	0,78	0,78	0,73	0,67	0,77	0,69	0,72	0,75	0,85	0,66	0,70	0,70	0,69	0,71	0,80	0,68
	CA	1,88	1,72	1,53	1,50	1,48	1,47	1,40	1,33	1,40	1,30	1,32	1,35	1,43	1,22	1,26	1,24	1,21	1,20	1,26	1,07
	CR	6,82%	6,24%	5,56%	5,43%	5,38%	5,32%	5,10%	4,81%	5,08%	4,73%	4,79%	4,895	5,195	4,415	4,57%	4,51%	4,38%	4,35%	4,57%	3,88%
CPAC 5234	BC	0,97	0,90	0,88	0,85	0,83	0,81	0,81	0,79	0,77	0,77	0,75	0,73	0,72	0,70	0,68	0,65	0,65	0,62	0,60	0,50
	BL	1,05	1,03	0,93	0,92	0,99	0,88	0,91	0,89	1,02	0,91	0,92	0,87	0,82	0,87	0,78	0,76	0,89	0,91	0,97	0,87
	CA	2,02	1,94	1,80	1,77	1,82	1,69	1,71	1,68	1,80	1,68	1,67	1,61	1,54	1,57	1,46	1,42	1,53	1,53	1,56	1,37
	CR	6,09%	5,84%	5,43%	5,33%	5,49%	5,10%	5,17%	5,08%	5,42%	5,06%	5,04%	4,84%	4,64%	4,72%	4,40%	4,27%	4,62%	4,61%	4,725	4,12%
CPAC 5612	BC	0,90	0,84	0,83	0,82	0,79	0,79	0,78	0,76	0,75	0,74	0,73	0,72	0,70	0,68	0,66	0,64	0,63	0,61	0,57	0,52
	BL	0,92	0,90	0,90	0,90	0,92	0,84	0,84	0,87	0,90	0,81	0,93	0,89	0,78	0,88	0,74	0,71	0,82	0,93	0,95	0,87
	CA	1,82	1,75	1,72	1,72	1,72	1,63	1,62	1,63	1,65	1,55	1,66	1,61	1,48	1,55	1,41	1,35	1,45	1,54	1,52	1,39
	CR	5,73%	5,50%	5,43%	5,41%	5,40%	5,13%	5,10%	5,13%	5,20%	4,88%	5,22%	5,06%	4,65%	4,89%	4,43%	4,25%	4,58%	4,86%	4,77%	4,37%

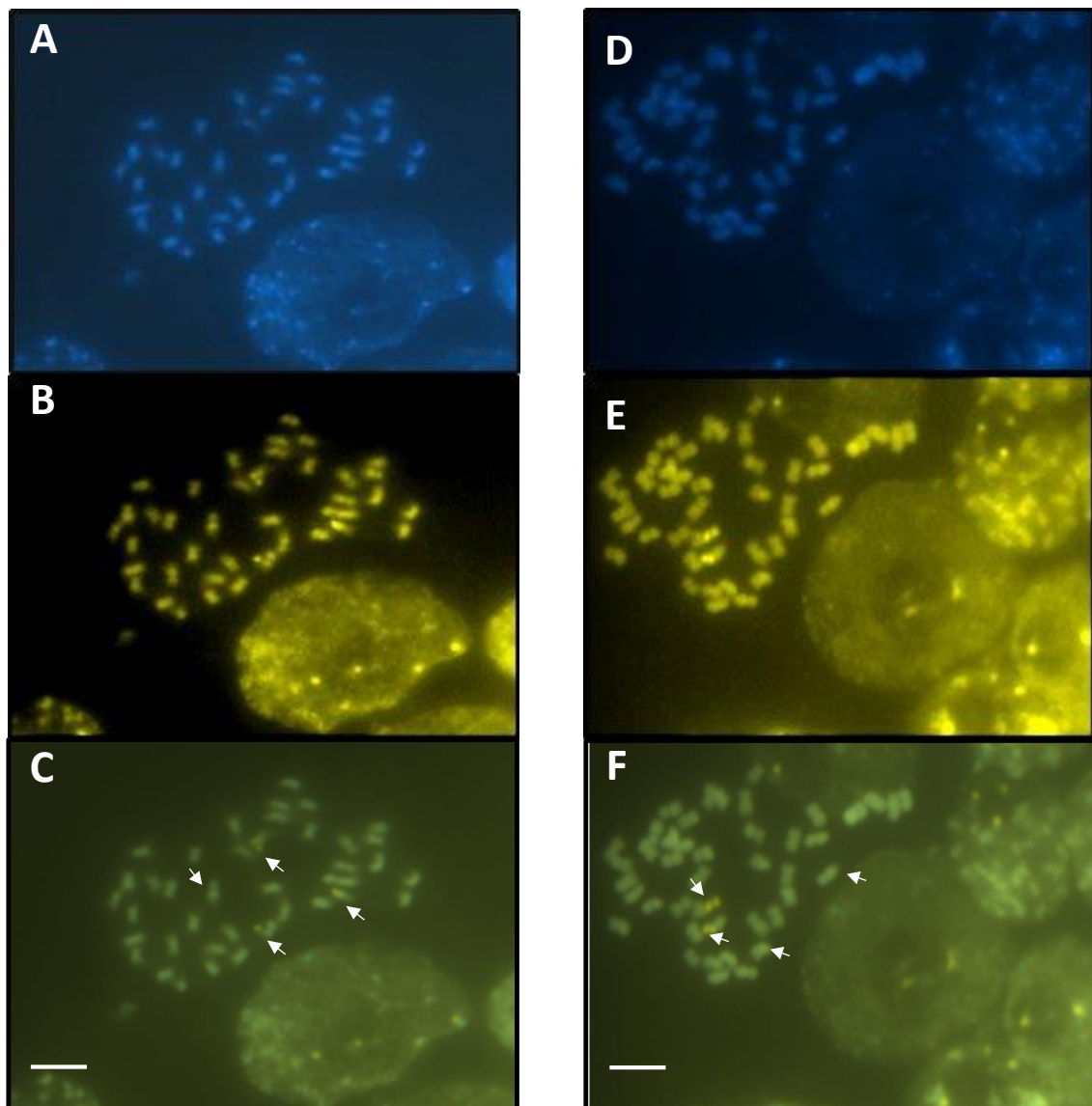
A análise com a dupla coloração CMA<sub>3</sub>/DAPI permitiu a visualização de dois blocos CMA<sup>+</sup> na região terminal de um par metacêntrico nos acessos diploides (Figuras 6A, B, C, D, E, F) e Figura 2, e de quatro blocos CMA<sup>+</sup> nos acessos tetraploides, sendo dois blocos CMA<sup>+</sup> localizados na região subterminal de um par cromossômico submetacêntrico, e dois blocos localizados na região proximal de outro par metacêntrico (Figuras 7A, B, C, D, E, F) e Figura 4.



**Figura 6.** Metáfases com  $2n=20$  com dupla coloração CMA<sub>3</sub>/DAPI em *Stylosanthes seabrana*. Setas indicam a localização em dois blocos CMA<sup>+</sup> nas regiões terminais dos cromossomos homólogos no acesso CPAC 4950, foto em (A) DAPI, em (B) CMA, em (C) sobreposto, e acesso CPAC 4963, foto em (D) DAPI, em (E) CMA, em (F) sobreposto. Barra em C e F = 5  $\mu$ m.

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<sup>+</sup> observados na região terminal do último par cromossômico metacêntrico dos citótipos diploides do nosso trabalho. Nos citótipos tetraploides, foram observados blocos CMA<sup>+</sup>

proximais no par cromossômico 16 e subterminais no par cromossômico 18.

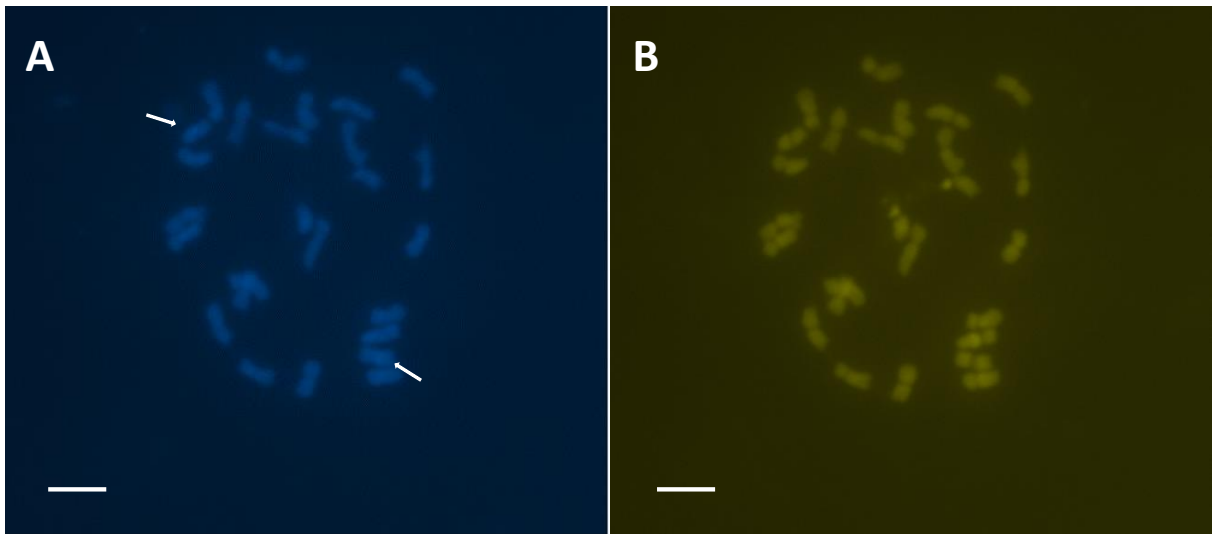


**Figura 7.** Metáfases com  $2n=40$  com dupla coloração CMA<sub>3</sub>/DAPI em *Stylosanthes scabra*. Setas indicam a localização de quatro blocos CMA<sup>+</sup> nas regiões subterminal e proximal dos cromossomos homólogos no acesso CPAC 4387, foto em (A) DAPI, em (B) CMA, em (C) sobreposição e no acesso CPAC 4394, foto em (D) DAPI, em (E) CMA, em (F) sobreposição. Barra em C e F = 5  $\mu$ m.

Esses blocos CMA<sup>+</sup> são relatados pela primeira vez para as espécies e podem estar relacionados aos *loci* das regiões organizadoras do nucléolo (RONs). Em algumas células não foi possível visualizar as bandas de um dos pares devido a seu tamanho reduzido e à tendência da distensão da região nas metáfases analisadas.

Também foi possível a visualização de bandas DAPI<sup>+</sup> e CMA<sup>-</sup> nos acessos CPAC 1261 e CPAC 5205 (Figura 8).





**Figura 8.** Metáfases com  $2n=40$  com dupla coloração CMA<sub>3</sub>/DAPI em *Stylosanthes scabra*, setas indicam a localização de dois blocos DAPI<sup>+</sup> nos cromossomos homólogos do acesso CPAC 5205, foto em (A) DAPI, em (B) CMA, Barra em B = 5  $\mu$ m

#### 4. CONCLUSÕES

1. A análise citogenética cromossômica numérica permite diferenciar acessos de *S. seabrana* dos acessos fornecidos como *S. scabra*.
2. A avaliação cromossômica morfológica comparativa fornece subsídios para uma melhor diferenciação entre acessos de *Stylosanthes*.
3. A coloração cromossômica com fluorocromos mostra a existência de diferentes regiões heterocromáticas entre os acessos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 brasileira*, n. 22(3): p. 621-625. 2008.
- CAMERON, D.F. **Chromosome number and morphology of some introduced *Stylosanthes* species**. *Aust. J. Agric. Res.*, 18 : 375-379. 1967.
- COSTA, N.M. de S. **Revisão do gênero *Stylosanthes* Sw.** UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA-INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA, Dissertação de Doutorado, Lisboa-PT, 2006.
- CUCO S.M., Vieira M.L.C., MONDIN M., Aguiar-Perecin M.L.R. **Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids**. *Caryologia*, 58, 220–228. 2005.
- DATE, R.A., JANSEN, P.I., MESSER, B. and EAGLES, D.A. — **Morphological variation and classification of field-grown *Stylosanthes seabrana* and *S. scabra***. *Tropical Grasslands*, 44, in press. 2010
- FAO. **Bancos de germoplasma**, disponível em: <https://www.fao.org/br/quemsomos.asp>. Acesso em Mar/2014
- FORNI-MARTINS, E. R. Cariótipo e sua análise numérica como subsídio a estudos taxonômicos e evolutivos de *Phaseolus* L., *Vigna* Savi e *Macroptilium* (Benth) Urban – Leguminosae, Papilionoideae. 146 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de Campinas, Campinas. 1989.
- GUERRA. M. dos S. **Introdução a Citogenética Geral**. Guanabara: Rio de Janeiro. 142 p..ISBN-85-277-0065-4. 1988.
- 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. pp.23-38. 2002
- KUMARI, S.; BIR, S.S. **Karyomorphological evolution in Caesalpiniaceae**. *Journal of Cytology & Genetics, Russian*, n.24, p.149-163, 1989.
- LIU. C. J., MUSIAL. J. M., ***Stylosanthes* sp. aff. *S. scabra*: a putative diploid progenitor of *Stylosanthes scabra* (Fabaceae)**, *Plant Systematics and Evolution*. 208: 99-105, 1997.
- MAASS, B.L.; 't MENNTJE L. ***Stylosanthes seabrana* (Leguminosae: Papilionoideae), a New Species from Bahia, Brazil**. *Novon*, 12(4): 497-500, 2002.
- MANNETJE, Leendert 't. ***Stylosanthes seabrana***, disponível em: <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Gbase/Data/pf000496.HTM>, acesso em: 13/11/2012.

- 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 , Viena, 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, Viena, 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, Wien, 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. 250p. 2010.
- ROMERO Z. C. **A new method for estimating karyotype Taxonotry**. Táxon, Bureau, n.35, p.526-530. 1986.
- 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, pp 213–240. 2005.
- SOUZA. M.M., PEREIRA. T.N.S., Silva L.C., Reis D.S.S., Sudre´ C.P. **Karyotype of six *Passiflora* species in the State of Rio de Janeiro**. Cytologia, 68, 165–171. 2003
- STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher plants**. London: Edward Arnold. 216p. 1971.
- VARGAS, S. M., **Citogenética de acessos de *Cratylia* sp. (FABACEAE – PAPILIONOIDEAE)**. Dissertação. Lavras: UFLA, 48 p.: il. 2005.
- VIEIRA, M.L.C.; AGUIAR-PERECIN, M L.R. & MARTINS, P.S. **Cytotaxonomic study in twelve Brazilian taxa *Stylosanthes* Sw., Leguminosae**. Cytologia, 58: 305-311. 1993.
- VIEIRA M.L.C., Barbosa L.V., Mayeda L.Y. **Citogenética dos Maracujazeiros**. In: Lima A.A., Cunha M.A.P. (Eds). Maracujá: Produção e Qualidade na Passicultura. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, Brazil, pp 47–65. 2004.
- 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.